



GENÉTICA VEGETAL

Autores: Cristina López Muñoz² y Ma Ángeles de la Cerda Polo²
Tutores: Julia Rosl Weiss¹ y José Iborra Ramirez².

¹Universidad Politécnica de Cartagena (Instituto de Biotecnología Vegetal IVB)/²IES San Juan de la Cruz.



INTRODUCCIÓN

La especie *Antirrhinum majus*, es una planta herbácea, perenne, de tallo erecto, glabro y de hasta 80 cm de longitud. Posee una corola de entre 30-40 mm de longitud, simpétala, sin espolón, púrpura rosada y con paladar amarillo. Su cápsula es oblonga, glandular-pubescente y su longitud suele rondar los 10 y 14 mm de longitud. Su color viene determinado por metabolitos secundarios llamados antocianinas. Para su síntesis la fenilalanina entra en una reacción de condensación con tres moléculas de malonil-CoA y dan lugar a una chalcona.

El primer paso en la síntesis del pigmento rojo depende del enzima chalcona sintasa la cual está codificada por el gen NIVEA o *Antirrhinum majus CHS (AmCHS)*. El nivel de expresión de este gen se puede medir mediante la RT-PCR. Cuantas más copias de un fragmento de ADN haya en una reacción de PCR cuantitativa (qPCR), más fuerte va a ser la señal de fluorescencia.



Fig. 1: Estadios de apertura floral 1-3

OBJETIVOS

1. Medir la expresión de *AmCHS* mediante qPCR.
2. Analizar y comparar su nivel de expresión en tres estadios de desarrollo floral en dos variedades distintas e investigar si la diferencia de color está relacionada con diferencias en la expresión de *AmCHS*.
3. Medir y comparar la concentración total de antocianinas en pétalos de dos variedades de *Antirrhinum majus* y ver si existe una relación temporal y cuantitativa entre la concentración de antocianinas y el nivel de expresión de *AmCHS*.

METODOLOGÍA

Extracción del ARN

- 1 Machacar las muestras. Añadir y filtrar el tampón de lisis. Separar el material genético.

Cuantificación de ARN

- 2 El ARN absorbe la luz ultravioleta. A mayor luz absorbida mayor concentración de ácido nucleico.

Preparación de ADN copia (cADN)

- 3 Mezclar nuestro ARN con agua, añadir ADNasa y transcriptasa inversa e incubar.

qPCR

- 4 Activar la polimerasa y desnaturalizar el ADN. Ciclar para que la ADN polimerasa copie la región situada entre los cebadores.

Medición de los niveles de antocianinas

- 5 Mediante 0,3 gr de tejido de pétalo el método metanol-HCL y la ecuación $Q_{\text{Total Anthocianinas}} = (A_{530} - 0.25 \times A_{657}) \times MF - 1$ (Masa Fresca).

RESULTADOS

qPCR

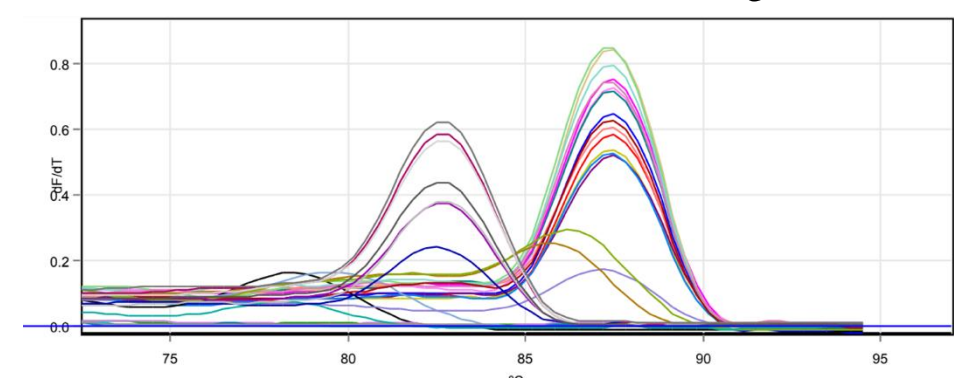


Fig. 2 : Curva de fusión (melting peak) de *AmCHS* y *AmUBI* en muestras de pétalos oscuros.

Fig. 3 : Curva de amplificación de *AmCHS* y *AmUBI* en muestras de pétalos oscuros.

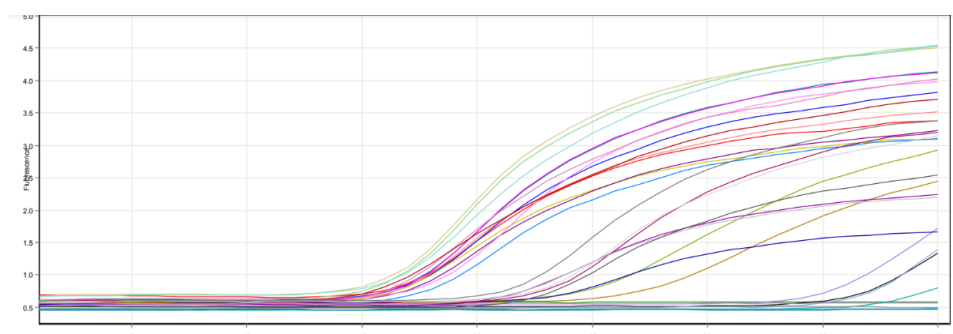


Fig. 4 : Curva de fusión (melting peak) de *AmCHS* y *AmUBI* en muestras de pétalos pálidos.

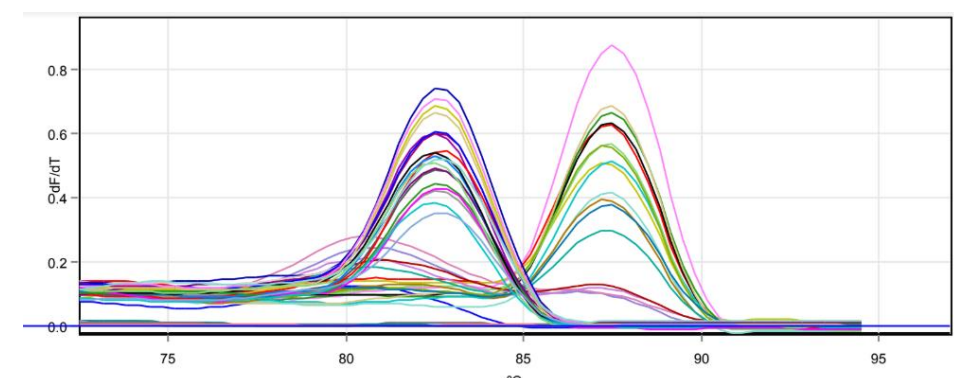


Fig. 5 : Curva de amplificación de *AmCHS* y *AmUBI* en muestras de pétalos pálidos.

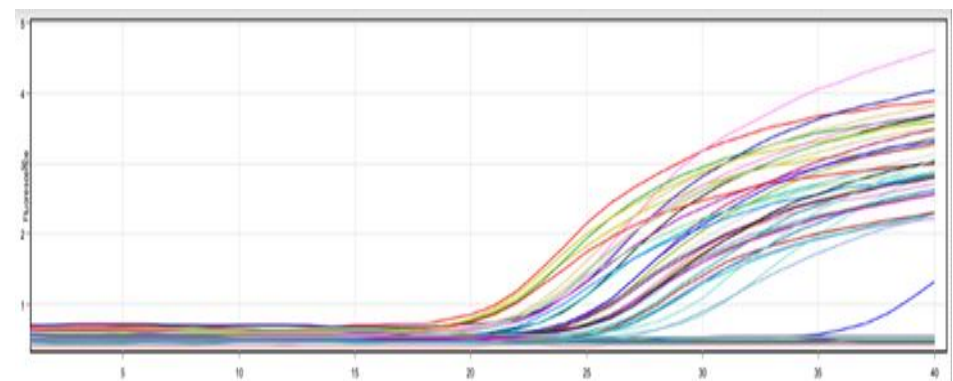


Fig. 6 : Media y desviación estándar de cantidades de antocianinas totales en flores pálidos y oscuros.

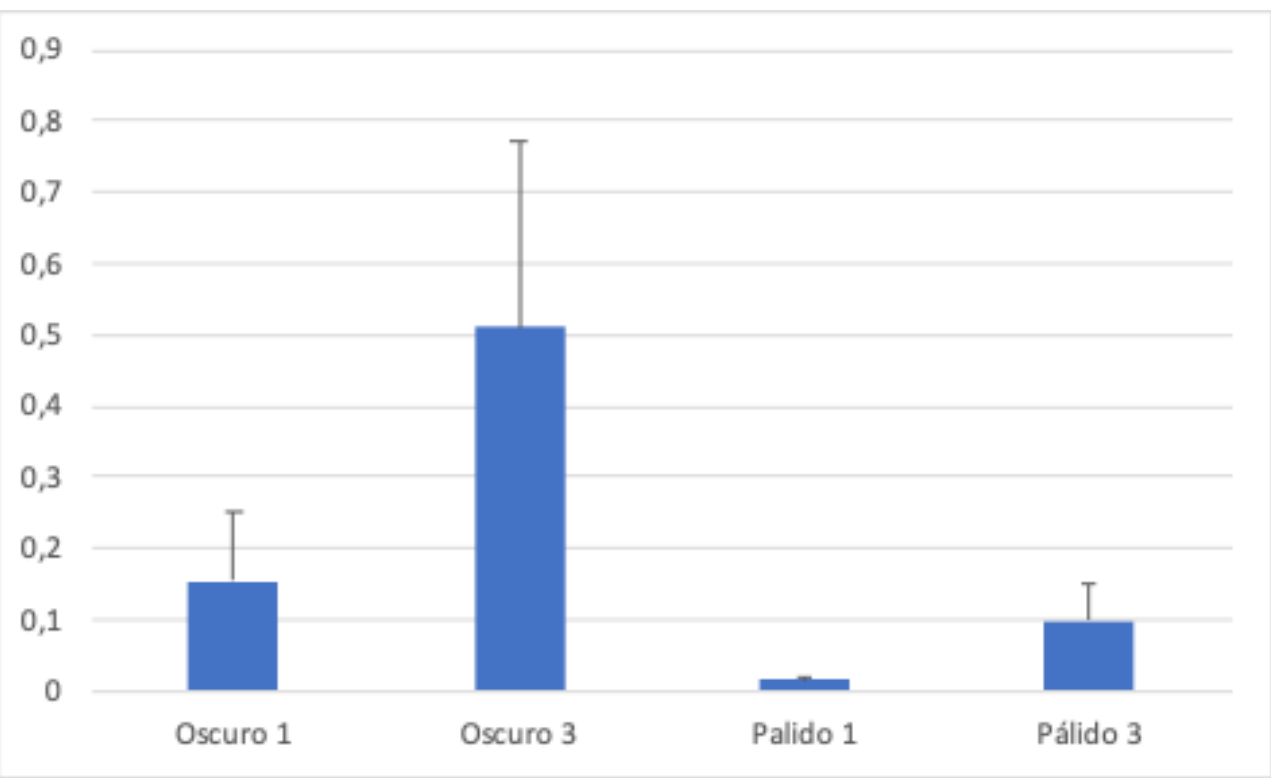


Fig. 7 : Nivel de expresión de *AmCHS* en muestras de flores oscuras y pálidas durante 3 estadios de apertura floral.

CONCLUSIÓN

En estas gráficas podemos observar tanto la media y desviación estándar de cantidades de antocianinas totales en flores pálidas (color rosa) y oscuras (color rojo intenso) como el nivel de expresión de *AmCHS* durante 3 estadios de apertura floral. Estos datos sugieren un incremento en la expresión del gen *AmCHS* a lo largo de la apertura floral tanto en flores oscuras como pálidas. No obstante, el análisis estadístico de niveles de expresión relativos del gen *AmCHS* mostró que esta diferencia fue significativa solo en caso de los pétalos pálidos. También observamos un nivel de expresión significativamente más alto en pétalos oscuros frente a pálidos durante los tres estadios de apertura floral.

	Nivel de expresión	Std. Error	Valor P
Pétalos oscuros: estadio 1 versus 2			
Estadio 1	1.000	0.400 - 3.584	0.893
Estadio 2	1.036		
Pétalos oscuros: estadio 1 versus 3			
Estadio 1	1.000	0.018 - 28.498	0.710
Estadio 3	0.782		
Pétalos pálido: estadio 1 versus 2			
Estadio 1	1.000	0.220 - 0.913	0.000*
Estadio 2	0.513		
Pétalos pálidos: estadio 1 versus 3			
Estadio 1	1.000	0.158 - 0.465	0.019*
Estadio 3	0.293		
Estadios 1 pétalos oscuro versus pálido			
Oscuros	1.000	0.057 - 0.233	0.007*
Pálidos	0.099		
Estadios 2 pétalos oscuro versus pálido			
Oscuros	1.000	0.037 - 0.150	0.000*
Pálidos	0.077		
Estadios 3 pétalos oscuro versus pálido			
Oscuros	1.000	0.001 - 3.904	0.003*
Pálidos	0.069		

Tabla 1. Expresión génica comparativa del gen *AmCHS* entre muestras de pétalos oscuros y pálidos y entre diferentes estadios de apertura floral.



Para acceder al proyecto completo.