

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. Las antocianinas son glucósidos solubles en agua y forman parte de los compuestos fenólicos. La fenilalanina entra en una reacción de condensación con tres moléculas de malonil-CoA y dan lugar a una chalcona.

La síntesis de las antocianinas se realiza a través de etapas catalizadas secuencialmente por enzimas localizadas en la matriz citoplasmática y en el retículo endoplasmático, pero sólo se almacenan en las vacuolas. Los flavonoides son metabolitos secundarios polifenólicos comúnmente con un grupo cetona. La biosíntesis de los flavonoides sigue la vía metabólica del fenilpropano. Esta reacción está catalizada por la 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.

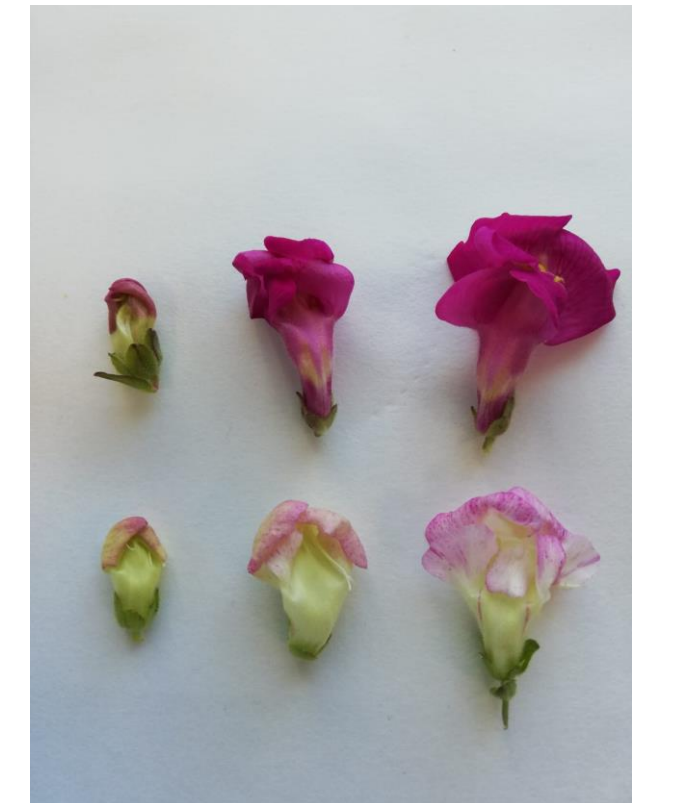


Fig. 1: Estadios de apertura floral 1-3

OBJETIVOS

Medir la expresión de *AmCHS* mediante qPCR. 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*. 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**
Puntas de micropipetas, tampón de lisis, etanol, MDB, centrifugadora, 95µL de DNase, RAW2 y RA3 y agua destilada.
- Cuantificación de ARN**
Espectrofotómetro Nanodrop.
- Preparación de ADN copia (cADN)**
200 ng de ARN, agua destilada, mezcla de un kit de preparación de cADN.
- qPCR**
Rotor Gene Q de Qiagen, mezcla de qPCR con SybrGreen y cebadores específicos de *AmCHS*.
- Medición de niveles de antocianinas**
0,3 gr de tejido de pétalo, agua destilada, metanol-HCL, espectrofotómetro a 530 y 657 nm.

qPCR

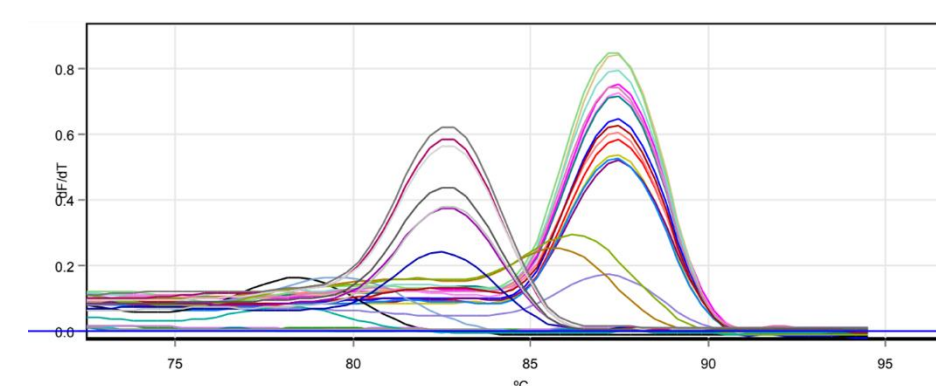


Fig. 2 : Curva de fusión (melting peak) de *AmCHS* y *AmUBI* en muestras de pétalos oscuros.

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

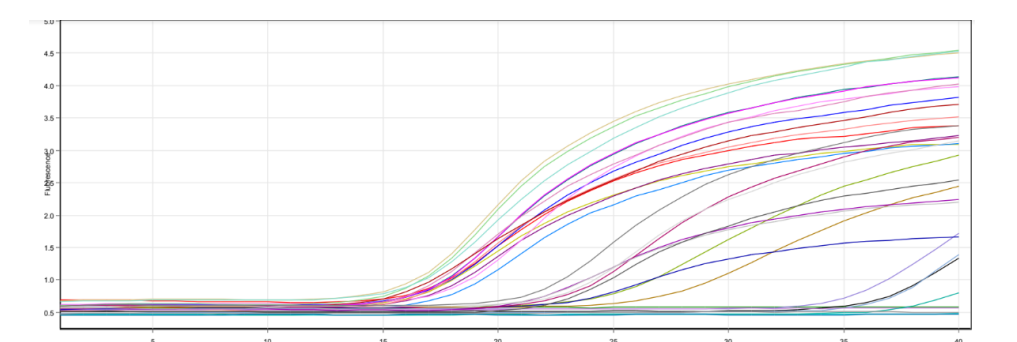


Fig. 4 : Curva de fusión (melting peak) de *AmCHS* y *AmUBI* en muestras de pétalos pálidos

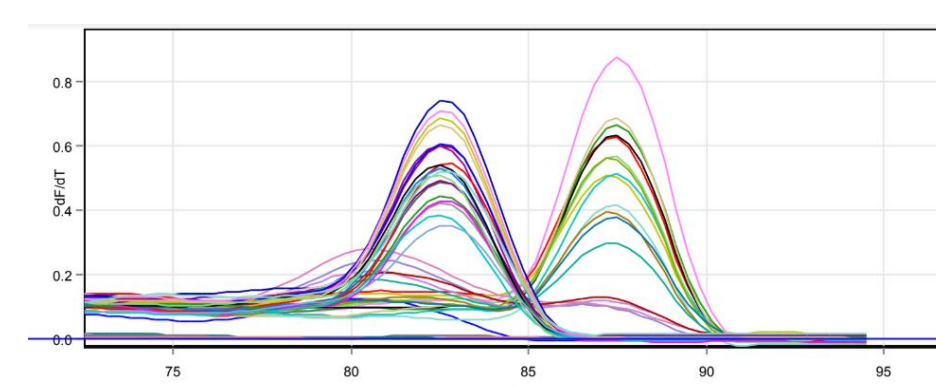


Fig. 5 : Curva de amplificación de *AmCHS* y *AmUBI* en muestras de pétalos pálidos.

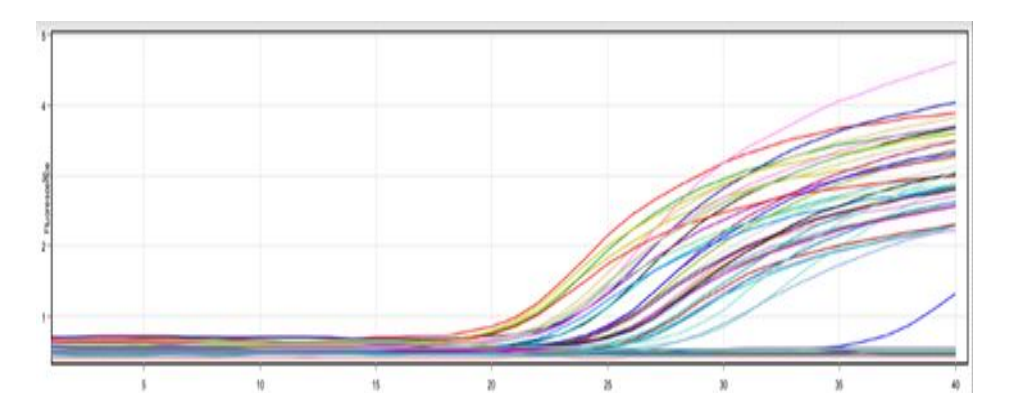


Fig. 6 : Media y desviación estándar de cantidades de antocianinas totales en flores pálidas y oscuras según la ecuación: $(A530 - 0.25 \times A657) \times MF-1$ (Masa fresca)

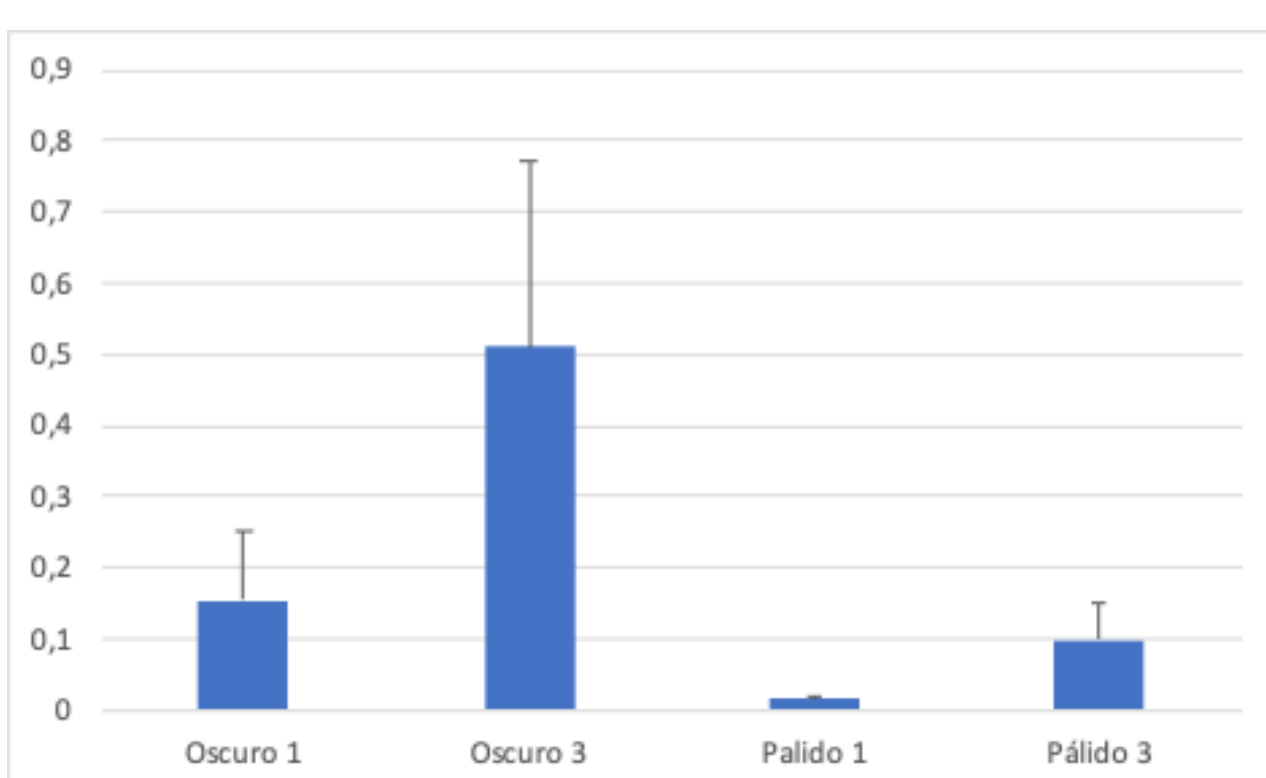


Fig. 7 : Nivel de expresión de *AmCHS* en muestras de flores oscuras y pálidas durante 3 estadios de apertura floral.

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 pálidos: 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.