

## ***Trailing plants, identification of T-DNA mutants and introgressions of *Antirrhinum linkianum* in *A. majus****

**R. Alcantud<sup>(1)</sup>, J. Weiss<sup>(1,2)</sup>, M. Egea-Cortines<sup>(1,2)</sup>**

<sup>(1)</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Paseo Alfonso XIII, 48, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203, Cartagena, España.

<sup>(2)</sup> Genética Molecular. Instituto de Biotecnología Agroalimentaria . Universidad Politécnica de Cartagena. 30202 Cartagena. ESPAÑA. raquelalcantudrodriguez@gmail.com

### **Resumen**

El objetivo planteado es la creación de una población mutagenizada de *Antirrhinum majus* y el seguimiento de una población segregante entre *Antirrhinum majus* y *Antirrhinum linkianum*. Para lograr la población mutagenizada en un primer paso se ha modificado un plásmido mediante técnicas moleculares seguido de su transformación en *Agrobacterium tumefaciens*. Este paso preliminar nos permite generar una población transformada T<sub>0</sub>. Las inserciones de T-DNA son aleatorias y van a crear una población T<sub>0</sub> transgénica en heterocigosis. Para la identificación de mutantes recesivos utilizaremos poblaciones T<sub>1</sub> segregantes que permiten identificar plantas transgénicas con un fenotipo de interés en homocigosis. Entre las mutaciones de interés prioritario destacan las involucradas en el ritmo circadiano, la floración y la arquitectura floral. El hecho que la secuencia de T-DNA sea conocida nos va a permitir amplificar la secuencia flanqueante mediante PCR. A continuación secuenciaremos el gen mutagenizado. Para analizar la segregación de un retrocruce entre *Antirrhinum majus* y *Antirrhinum linkianum* se han utilizado plantas procedentes de la línea isogénica 165E de *A. majus* y plantas tapizantes de *Antirrhinum linkianum*. Estas plantas procedían de una población RIL (Recombinant inbred line). Se está estudiando su comportamiento en siguientes poblaciones.

**Palabras clave:** T-DNA; mutagénesis insercional; ritmo circadiano; retrocruce; segregación;

### **Abstract**

The aim of our work is to create a mutagenized population of *Antirrhinum majus* and to check a segregating population between *Antirrhinum majus* and *Antirrhinum linkianum*. For obtaining the mutagenized population, first we modified a plasmid through molecular techniques, followed by its transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. This preliminary step allows us to generate a transformed population T<sub>0</sub>. T-DNA insertions are in a random system and are going to create a T<sub>0</sub> transgenic population in heterozygosity. For identifying recessive mutants we will use T<sub>1</sub> segregating populations, which will allow us identifying transgenic plants with an interesting phenotype in homozygosity. Among the most interesting mutations, we will highlight those involved in circadian rhythm, flowering and flower architecture. The fact that the T-DNA sequence is known, will allow us to amplify the nearby zone by PCR. Then we will sequence the mutagenized gene. For analyzing the segregation of a backcross between *Antirrhinum majus* and *Antirrhinum linkianum*, we have used plants from the isogenic line 165E of *A. majus* and trailing plants from *Antirrhinum linkianum*. These plants came from a RIL (Recombinant Inbred Line). We are studying their behavior in subsequent populations.

**Keywords:** T-DNA; insertional mutagenesis, circadian rhythm, backcross, segregation

### **1. Introducción**

Hoy en día junto con *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum* es uno de los modelos más utilizados para estudios de clonación de mutantes, y para los presentes trabajos de genética y desarrollo de plantas. En la actualidad los protocolos de

transformación y análisis fenotípicos están desarrollados en su totalidad [1] En el presente trabajo, aplicando estos protocolos, trabajaremos con *Antirrhinum majus* 165E y *Antirrhinum linkianum*. Los dos ensayos propuestos con sus objetivos son 1º Utilizando *Antirrhinum majus* realizaremos una inserción de

T-DNA utilizando *Agrobacterium*. A partir de la población T<sub>0</sub> con el T-DNA insertado, llegar a poblaciones T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> que permitan identificar mutaciones, en volátiles, ritmo circadiano, floración, análisis fenotipo. 2º Utilizando una población RIL (recombinant imbred line) entre *Antirrhinum majus* y *Antirrhinum linkianum* se hará un seguimiento de las siguientes poblaciones. Desde la F<sub>3</sub> realizar un retrocruce con silvestre 165E para observarla segregación en la siguiente generación y conocer el número de genes involucrados en el genotipo tapizante.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Materiales utilizados:

Para el ensayo 1º Se utilizó el plásmido pMDC100, introducido en la bacteria *E. Coli* obteniendo una bacteria transformada con el T-DNA en el plásmido, que se introdujo en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y con esta bacteria se insertó en la planta, *Agrobacterium* inserta su plásmido en la planta y una parte del mismo se integra por recombinación ilegítima en el genoma de la planta. Para el ensayo 2º Se utilizó la F<sub>3</sub> de las plantas de *A. majus* y *A. linkianum*.

### 2.2 Metodología utilizada

La metodología utilizada en la planta aplica un protocolo desarrollado en el departamento en el ensayo 1º Esterilización y germinación de semillas, introducción de T-DNA en hipocotilos, repicado de plantas a bandeja y transplante a maceta, observación y seguimiento de las plantas. En el ensayo 2º a partir del RIL (recombinant imbred lind) de *A. majus* y *A. linkianun* llegamos a la población F<sub>1</sub> se autopoliniza llegando a la población F<sub>2</sub> se autopoliniza llegando a la población F<sub>3</sub> aquí se realiza un retrocruce con la silvestre 165E llegando a la siguiente población que será objeto de estudio.

## 3. Resultados y Discusión

Para el ensayo 1º Ya se han obtenido segregantes transgénicas T<sub>1</sub> que resultan de una inserción de T-DNA. Teniendo T<sub>0</sub> unas 65 plantas y T<sub>1</sub> observación de segregantes entre 6 y 10 plantas, en el futuro poner T<sub>2</sub> y observar si se repite el fenotipo mutante e intentar secuenciar usando como anclaje la secuencia de T-DNA insertado en

**Figura 1.** Población segregante de *Antirrhinum majus*.

el gen. Para el ensayo 2º observar la nueva población para ver el desarrollo de plantas erectas o plantas tapizantes.

## 4. Conclusiones

En la actualidad se está realizando el seguimiento de las T<sub>2</sub> para el 1º ensayo y la F1 resultante del retrocruce.

## 5. Agradecimientos

Se agradece al departamento de Genética vegetal la colaboración de todos doctorandos, la utilización de equipos y materiales, y la tutela de los doctores Julia Weiss y Marcos Egea de la UPCT.

## 6. Referencias bibliográficas

- [1] Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J., & Egea-Cortines, M., 2012. Quantitative requirements of Deficiens and Globosa for late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant Journal*, 72, 294-307. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05080.x
- [2] Navarro, P.J., Fernández, C., Weiss, J., & Egea-Cortines, M. 2012. Development of a configurable growth chamber with a vision system to study circadian rhythm in plants. *Sensor*, 12 ((11)), 15365-15375.

## Tablas y Figuras

