
TRABAJO FIN DE MÁSTER

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
Universidad Politécnica de Cartagena

Determinación de alelos hipomórficos de
ocimeno sintasa en *Antirrhinum majus*



Máster en Ingeniería Agronómica

Autora: María del Carmen López Guerrero

Director: Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Codirectora: Julia Weiss

Cartagena, septiembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis directores del proyecto. Al Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines, por ser un gran profesional y por enseñarme tanto durante toda mi etapa universitaria, sin duda ha sido un honor poder disfrutar de sus clases y de su sabiduría. Y a la Dra. Julia Weiss, por ser una excelente científica y profesora ejemplar.

A todo el equipo del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Biotecnología Vegetal.

A M^a Victoria Ruiz Hernández, por estar siempre ahí, ayudarme y aconsejarme en diversos aspectos de mi vida. Ella ha sido un pilar fundamental en este proyecto, agradecerle todo lo que me ha enseñado de este campo. Es un auténtico honor haber podido disfrutar de su profesionalidad y haber compartido tantos momentos a su lado.

Darle las gracias a Marta Isabel Terry, por ayudarme en todo momento y enseñarme tanto del maravilloso mundo de la genética molecular, sin sus consejos este trabajo no hubiera sido lo mismo. A parte de una gran compañera se ha convertido en alguien muy especial para mí, y sé que llegará donde se proponga.

A Samsara Bautista, por ser la mejor compañera de ensayos y por ayudarme tanto. Gracias a sus consejos he aprendido mucho de este campo, su apoyo y ayuda han sido cruciales para mí. De esta experiencia sin duda me llevo una gran amiga.

Darle las gracias a Marina Martos, por ser un torbellino de alegría. Durante mi etapa universitaria, se ha convertido una persona muy importante para mí, gracias a su carisma y su cariño. Con esa sonrisa no habrá barrera que se le resista.

A Claudio Brandoli, porque ha sido un excelente compañero y una gran persona.

A Raquel Alcantud, por haber dedicado tanto tiempo y esfuerzo, tanto a mí como a mis compañeros.

A los técnicos del laboratorio, Álvaro Gutiérrez y María Beltrán, por ser un soplo de aire fresco, y ayudarme en todo momento.

A mis padres, porque sin su ayuda y apoyo no habría conseguido llegar donde estoy. Finaliza esta etapa universitaria llena de logros y alegrías, pero todo eso se lo debo a ellos. Agradecerles por toda la educación recibida, todos los desvelos, los cuidados y el cariño que me han aportado. Porque nunca me ha faltado de nada, siempre han luchado porque sus hijos tuvieran todo lo mejor. Ellos son lo más importante para mí y las personas que más quiero, sin ellos no sería lo que soy.

A mi hermano Raúl, por empaparme de su sabiduría. Agradecerle su confianza en mí. Estoy muy orgullosa de él y sé que llegará donde se proponga.

A mis amigos, que en estos años de universidad se han convertido en mi pequeña familia de Cartagena. En especial agradecerles a mi “Happy Family” por hacerme sentir especial y por ser los mejores amigos del mundo.

A mis seres queridos que se fueron, pero que están siempre conmigo en mi corazón.

Este trabajo se lo quiero dedicar a la mujer más maravillosa del mundo, porque no hay un día que no me acuerde de ella, mi abuelita Antonia. Sé que de donde esté se siente muy orgullosa de mí. Te echo mucho de menos y me haces mucha falta. Te quiero abuelita.

Con este proyecto finalizo una importante etapa para mí, han sido 6 años duros, llenos de impedimentos y de escalones que subir, pero he de decir que han merecido la pena. He madurado como persona y en este duro pero bonito camino he conocido a personas increíbles, que me han ayudado y apoyado. He tenido la suerte de tener grandes profesores que han sabido guiarme y aconsejarme, y de los que he aprendido muchísimo. Pero de esta experiencia, lo mejor que me llevo es haber conocido a Salvador Roca, que ha sido mi apoyo, mi aliento y un pilar fundamental durante este periodo universitario, sin duda una de las mejores personas que conozco y que más quiero. Agradecerle por haberme ayudado tanto durante este periodo de mi vida, por animarme en mis momentos de debilidad y por regalarme siempre una sonrisa.

1 ÍNDICE DE CONTENIDO

Agradecimientos	2
1 Resumen	10
2 Abstract	12
3 Introducción	14
3.1 Compuestos Orgánicos Volátiles en Plantas, COVs	14
3.2 Genes Implicados en los COV	15
3.3 Mutaciones	19
3.4 Género <i>Antirrhinum</i>	20
4 Objetivo	22
5 Material y Métodos	24
5.1 Material Vegetal	24
5.2 Extracción de ARN	25
5.3 Transcripción Inversa	26
5.4 La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	26
5.5 Purificación de Fragmentos Amplificados	29
5.6 Análisis Bioinformático	30
6 Resultados	32
6.1 Amplificación de <i>ama0a23</i> en <i>A. majus</i> 165E	32
6.2 Secuenciación de <i>ama0a23</i> en <i>A. majus</i> 165E	33
7 Discusión	40
8 Conclusión	42
9 Bibliografía	44

ANEXO I: Diseño de cebadores.....	50
ANEXO II: Alineamiento	52

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Alineamiento con ClustalX2 de los ADN complementarios de sintasa (E)- β -ocimeno sintasa (*ama0a23*) y mirceno sintasa (*ama1e20* y *ama0c15*) de *A. majus* cultivar Maryland True Pink. Las secuencias están depositadas en la base datos GenBank: AY195607.1 (*ama0a23*), AY195608.1 (*ama0c15*) y AY195609.1 (*ama1e20*). *Presenta el mismo nucleótido.....19
- Figura 2.** Detalle flores de *A. majus* 165E.....24
- Figura 3.** Planta 165 E.25
- Figura 4.** Flor de 165E en el estadio de máxima producción de aromas (día 4-6).26
- Figura 5.** Fragmentos amplificados esperados de la secuencia de ADNc de *ama0a23* con las distintas combinaciones de cebadores.....28
- Figura 6.** Gel de agarosa (1%) con los productos de PCR de dos muestras de 165E. A) Amplificados con los cebadores Amocs1f y Amocs4r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). B) Amplificados con Amocs4f y Amocs1r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). C) Amplificados con Amocs5f y Amocs5r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). D) Amplificados con los cebadores Amocs6f y Amocs6r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). E) Amplificados con los cebadores Amocs1f y Amocs5r. Orden (izquierda-derecha): C-(Control negativo)-165E1- Ladder. F) Amplificados con los cebadores Amocs6f y Amocs1r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-C- (Control negativo). G) Amplificados con los cebadores Amocs3f y Amocs3r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). H) Amplificados con UBI. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo).....33
- Figura 7.** Cromatograma de la segunda secuencia obtenida por el método automático de secuenciación de Sanger. Cuando aparece la letra N significa que no ha sido posible determinar el nucleótido existente en esa posición de la secuencia.34
- Figura 8.** Alineamiento con ClustalX2 de los cuatro fragmentos secuenciados con buena calidad de la línea 165E con la secuencia de ADNc de *ama0a23* de *A. majus* cultivar Maryland True Pink.36
- Figura 9.** Esquema de la secuencia de ADNc de *ama0a23* en *A. majus* donde se aprecia los fragmentos obtenidos de la secuenciación. La franja roja solapada por la secuencia 1 y 2 (881-1254 pb), y la verde por la 3 y 4 (1400-1850 pb).37
- Figura 10.** Detalle de la franja roja donde se alinean con ClustalX2 los fragmentos 1 y 2 (881-1254 pb) de la línea 165E con la secuencia del ADNc de *ama0a23* de *A. majus* cultivar Maryland True Pink. Las flechas naranjas indican que no ha sido posible determinar el nucleótido existente en esa posición

de la secuenciación y las negras una mutación por sustitución de una base. El signo * indica misma base.....37

Figura 11. Detalle de la franja verde donde se alinean con ClustalX2 los fragmentos 3 y 4 (1400-1850pb) de la línea 165E con la secuencia del ADNc de *ama0a23* de *A. majus* cultivar Maryland True Pink. Las flechas naranjas indican que no ha sido posible determinar el nucleótido existente en esa posición de la secuenciación y las negras una mutación por sustitución de una base. El signo * indica misma base.....38

Figura 12. Alineamiento de *AmUbi* frente a sus cebadores con el programa ClustalX2.52

Figura 13. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs1f y Amocs4r con el programa ClustalX2.....54

Figura 14. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs4f y Amocs1r con el programa ClustalX2.....56

Figura 15. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs5f y Amocs5r con el programa ClustalX2.....58

Figura 16. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs6f y Amocs6r con el programa ClustalX2.....60

Figura 17. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs1f y Amocs5r con el programa ClustalX2.....62

Figura 18. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs6f y Amocs1r con el programa ClustalX2.....64

Figura 19. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs3f y Amocs3r con el programa ClustalX2.....66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores específicos diseñados en base a la secuencia de *ama0a23*. La nomenclatura seguida es la siguiente: primero las siglas del material vegetal (*Am*, *Antirrhinum majus*) seguido del gen para el cual está diseñado el cebador, después el número es para diferenciarlos entre sí y finalmente si se trata del cebador directo (-f, forward) o del cebador inverso (-r, reverse).50

Tabla 2. Tamaño de amplificación esperado y condiciones de PCR de las diferentes combinaciones de cebadores.50

1 RESUMEN

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son el interfaz de interacción entre plantas y el resto de los organismos vivos. La modificación de los perfiles de volátiles presenta aplicaciones agrícolas como la búsqueda de métodos sostenibles para el control de plagas y defensa de las plantas. Los olores son combinaciones complejas de COVs. La estructura genética de los perfiles de volátiles está compuesta de genes estructurales y genes reguladores que codifican a enzimas y a factores de transcripción, respectivamente. El monoterpeno (E)- β -ocimeno es un COV que juega un papel fundamental en la capacidad de repulsión de plagas, así como en la atracción de polinizadores. En *Antirrhinum majus* se ha identificado el gen (E)- β -ocimeno sintasa (*ama0a23*) que codifica una enzima cuyo producto es (E)- β -ocimeno. En la línea 165E se encontraron pequeñas cantidades de éste volátil, indicando la presencia de un posible alelo hipomórfico. Se ha llevado a cabo una purificación y secuenciación del ADNc de *ama0a23* de la línea 165E. La pérdida incompleta de función del gen *ama0a23* en la línea 165E de *A. majus*, se puede deber a mutaciones por sustitución de nucleótidos en su secuencia, dando lugar a bajos niveles de emisión de (E)- β -ocimeno.

2 ABSTRACT

Volatile Organic Compounds (VOCs) are the interaction interface between plants and the rest of living organisms. The modification of volatile profiles present agricultural applications, such as the search for sustainable methods for plague control and plant defense. Scents are complex combinations of VOCs. The genetic structure of volatile profiles is composed by structural and regulatory genes that encode enzymes and transcription factors, respectively. The monoterpene (E)- β -ocimene is a VOC that plays a fundamental role in repulsion of pests, as well as attraction of pollinators. In *Antirrhinum majus*, the gene (E)- β -ocimene synthase (*ama0a23*), which encodes an enzyme whose product is (E)- β -ocimene, has been identified. In line 165E, low quantities of this volatile were found, indicating the presence of a possible hypomorphic allele. The purification and sequencing of the cDNA of *ama0a23* in line 165E has been performed. The complete loss of the gene *ama0a23* in *A. majus* line 165E might be due to a mutation by nucleotide substitution in its sequence, leading to low levels of (E)- β -ocimene emission levels.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN PLANTAS, COVs

Uno de los principales rasgos en las plantas es la producción de metabolitos secundarios, ya que puede considerarse una interfaz de interacción con organismos vivos, incluyendo bacterias, hongos, otras plantas y animales. Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) constituyen aproximadamente el 1% de los metabolitos secundarios conocidos en las plantas (Maffei et al., 2011). Tanto flores, frutos como hojas, emiten COVs, y éstos ocurren típicamente como una mezcla compleja de compuestos lipofílicos de bajo peso molecular derivados de diferentes rutas biosintéticas. Los COVs son producidos como parte de una estrategia de defensa contra el estrés biótico y abiótico, así como para contribuir a diversas funciones fisiológicas del organismo productor como la interacción planta-planta, la señalización entre organismos simbióticos, la atracción de polinizadores y dispersores de semilla (Maffei et al., 2011). La emisión de olor por las flores se considera un aspecto clave para atraer polinizadores y repeler posibles plagas (Schiestl, 2010).

Los COVs pertenecen a diversas clases de productos naturales como terpenoides, productos de degradación de ácidos grasos, productos derivados de ácidos, alcoholes, aldehídos y cetonas (Maffei et al., 2011). Los terpenos son un grupo diverso de compuestos que presentan una variedad de funciones en las plantas, que van desde la resistencia del estrés por calor, componente de la membrana celular, hormonas vegetales, hasta pigmentos fotorreceptores. También desempeñan un papel de defensa directa contra los herbívoros, así como indirecta atrayendo a los enemigos naturales de los mismos (Degenhardt & Lincoln, 2006). Éstos son unos compuestos orgánicos derivados del isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbonos. Los terpenos superiores a 15 carbonos (> C15) son generalmente no volátiles y están directa o indirectamente involucrados en procesos celulares importantes, como la estructura de la membrana (esteroles), fotosíntesis (clorofila, carotenoides), química (quinonas) y regulación del crecimiento (giberelinas, ácido abscísico). Los terpenoides que son volátiles son aquellos que presentan 5 carbonos C5 (hemiterpenos), 10 carbonos C10 (monoterpenos) y 15 carbonos C15 (sesquiterpenos), que son los componentes importantes del volatiloma de la planta. Además, estos compuestos son el principal constituyente de los aceites esenciales de algunas plantas y flores (Maffei et al., 2011). Los monoterpenos son componentes de los aromas florales que atraen a polinizadores y forman parte de los aceites esenciales de hierbas y especias, en los que componen hasta el 5% en peso de la planta seca, y sirven principalmente como compuestos de defensa directa o indirecta contra herbívoros y patógenos (Dudareva & Pichersky, 2004). Dentro de los monoterpenos se encuentran volátiles de gran importancia tales como linalol, limoneno, mirceno y β -ocimeno. Los isoprenoides, como (E)- β -ocimeno y mirceno, contribuyen significativamente a los olores florales de las especies vegetales. En *A. majus*, la fracción monoterpénica del aroma floral es dominada por (E)- β -ocimeno y mirceno que representa el 20 y el 8% de los volátiles florales totales, respectivamente (Dudareva et al., 2000). Sin embargo, la línea 165E de *A. majus* emite pequeñas cantidades de (E)- β -ocimeno, indicando la presencia de un posible alelo hipomórfico (Ruiz-

Hernández et al., 2017). Estos dos monoterpenos son derivados del geranil difosfato. La emisión de dichos volátiles está regulada por los ritmos diurnos controlados por un reloj circadiano (Dudareva et al., 2003).

Los ocimenes se hallan dentro de una gran variedad de plantas y frutas. Su fórmula química es $C_{10}H_{16}$. Pueden ser β -ocimeno y α -ocimeno, y éstos se diferencian en la posición del doble enlace aislado. El compuesto α -ocimeno también es denominado 3,7-Dimetil-1,3,7-octatrieno y β -ocimeno como 3,7-Dimetil-1,3,6-octatrieno. β -Ocimeno existe en dos formas estereoisoméricas, las formas *cis* (*cis*- β -ocimeno; (*Z*)- β -ocimeno) y *trans* (*trans*- β -ocimeno; (*E*)- β -ocimeno), con respecto al doble enlace central (NIST, 2017). Los ocimenes a menudo se encuentran como mezclas de ambas formas. Se trata de una pieza clave en la interacción planta-animales, incluyendo humanos al ser el componente principal de la albahaca en su aroma (Chalchat & Özcan, 2008). Estudios demuestran que juega un papel fundamental en la capacidad de repulsión de plagas y como protección contra patógenos (Arimura et al., 2004; Dudareva & Pichersky, 2000), así como en la atracción de polinizadores (abejorro *Bombus*) (Byers et al., 2014).

3.2 GENES IMPLICADOS EN LOS COV

Son de gran importancia los estudios en plantas que utilizan poblaciones naturales, ya que se han podido identificar numerosos genes involucrados en diferentes aspectos de las plantas, como floración o la producción de metabolitos secundarios (Alonso-Blanco et al., 2009). La bioquímica y la biología molecular de las sustancias volátiles de plantas son complejas, e implican la interacción de varias vías bioquímicas y cientos de genes, que conducen a la producción de una amplia gama de COVs. En su estructura genética también se encuentran genes reguladores y un gran número de enzimas. Todas las plantas son capaces de almacenar y emitir COVs, pero el proceso muestra una variación genotípica notable, así como plasticidad fenotípica (Maffei et al., 2011).

Los genes implicados en la emisión de COVs han sido estudiados en una variedad de plantas. Un claro ejemplo es el estudio de los compuestos responsables en el olor de las rosas como nerol, acetato de nerilo y acetato de genarilo, ya que son el resultado de uno o dos genes (Spiller et al., 2010). Los COVs también están implicados en el aislamiento reproductivo mediado por el polinizador, siendo éste un factor importante en la conducción de la diversificación de las plantas con flores. *Mimulus lewisii* polinizado por abejorro y *M. cardinalis* polinizado por el colibrí son un modelo para estudiar el aislamiento reproductivo a través de la preferencia de polinizadores (Byers et al., 2014). Estas dos especies difieren en tres volátiles terpenoides florales, D-limoneno, β -mirceno y (*E*)- β -ocimeno, que son atractivos a los abejorros polinizadores. Estas diferencias se deben probablemente a mutaciones en dos genes, *Limoneno-Mirceno Sintasa* (*MILMS*, *McLMS*) y *Ocimeno Sintasa* (*MIOS*, *McOS*). La baja emisión de volátiles en *M. cardinalis* puede venir causada por un alelo nulo en *McLMS* y por varias diferencias de secuencia de codificación de *McOS* que eliminan su capacidad de producir (*E*)- β -ocimeno (Byers et al., 2014). En el caso de *Antirrhinum* se ha realizado un análisis genético de la emisión de olores que abarca tres generaciones después de un cruce de *A. majus* y *A. linkianum* (Ruiz-hernández

et al., 2017). Ambas especies difieren en la producción de cuatro COVs: metilbenzoato, β -ocimeno, cinamato de metilo y acetofenona. Estos compuestos mostraron segregaciones mendelianas típicas para un solo gen o dos loci en la población F2. En dicha población se ha identificado un alelo nulo de *Benzoic Acid Carboxymethyl Transferase (BAMT)*, un gen implicado en la síntesis de benzoato de metilo (Ruiz-Hernández et al., 2017).

En el genoma de *Arabidopsis* hay varias secuencias de tipo AtTPS (Terpeno Sintasa de *Arabidopsis*) que comparten la mayor parte de la identidad con los genes TPS (Terpeno Sintasa), que participan en el metabolismo secundario en las especies de plantas que acumulan terpenoides. En esta planta modelo de genética molecular se ha caracterizado una mirceno/ocimeno sintasa AtTPS10 que convierte el difosfato de genarilo (C10) en los monoterpenos acíclicos β -mirceno y (E)- β -ocimeno y pequeñas cantidades de monoterpenos cíclicos (Bohlmann et al., 2000). También se conocen los monoterpenos sintasas especialistas en un solo compuesto principal, por ejemplo en el abeto (*Abies grandis*), ya que el único producto de la mirceno sintasa es el mirceno (Bohlmann et al., 1997). En *Antirrhinum* se han identificado tres genes monoterpenos sintasa, (E)- β -ocimeno sintasa (*ama0a23*) y dos mirceno sintasa (*ama1e20* y *ama0c15*) (Figura 1), siendo los productos de estas sintasas los dos isoprenoides dominantes en las flores de boca de dragón (Dudareva et al., 2003). Estos tres monoterpenos sintasas son muy similares entre sí y codifican proteínas de 66 a 67 kD. *Ama1e20* y *ama0c15* codifican proteínas casi idénticas excepto los 13 aminoácidos N-terminales. Pese a las diferencias dentro de los aminoácidos N-terminales, *ama1e20* y *ama0c15* codifican ambas a mirceno funcional. *Ama0a23* presenta una similitud del 92% con *ama1e20* y *ama0c15*, sin embargo, está especializado para una función bioquímica diferente, siendo el responsable de la producción, predominantemente, de (E)- β -ocimeno (97%), pero además también produce pequeñas cantidades de (Z)- β -ocimeno y mirceno (Dudareva et al., 2003). *Ama1e20* no se expresa en niveles significativos en los tejidos de pétalos de *A. majus*, por tanto sólo *ama0c15* y *ama0a23* contribuyen a la transcripción de terpenos sintasas (Dudareva et al., 2003). *Ama0c15* aporta 1,5 veces más (60%) que *ama0a23* (40%) al total de monoterpenos en los lóbulos tanto superior como inferior de los pétalos de las flores de *A. majus*. Sin embargo, las flores de boca de dragón emiten más (E)- β -ocimeno respecto al mirceno (20 y 8% del total de volátiles florales, respectivamente), y la actividad enzimática de monoterpenos sintasa forman una mezcla rica en (E)- β -ocimeno (80%) y baja de mirceno (20%), junto a menores cantidades de (Z)- β -ocimeno (Dudareva et al., 2003). Así pues, en *A. majus* el perfil aromático de monoterpenos puede estar definido por los correspondientes monoterpenos sintasas. β -ocimeno tiene distintas vías de síntesis, que varían entre especies (Arimura et al., 2004). Según un estudio, tanto (E)- β -ocimeno como (Z)- β -ocimeno, tienen una segregación en la que se ven involucrados, al menos, 2 genes, con funciones parcialmente redundantes (Ruiz-Hernández et al., 2017). Así pues la actividad de *ama0a23*, podría explicar la mayoría de la producción de (E)- β -ocimeno y parte de la producción de (Z)- β -ocimeno, ya que en la síntesis de estos compuestos podrían estar involucradas tanto sintasas especializadas, como una sintasa multifuncional (Dudareva et al., 2003).

Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	----- TGAGAGAAATACATCTTTAAATGGCAGTTTCAGGACTAGTTAAGCTCGTTTGTGTTTACTCATTAGCGGAGTTGTGAGTT	80
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	----- CTCCTATCGCTGAAGCTGCCATCCCATCGGCGACTGTCTTAAGCAGAACTCTCCATGCATTGGCTATGTCCTAAAGGGGG	160
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	----- GGTGTAGTCCCGCCTTCTGTGTGCACGGAGTAAAGCAGCCTATGGTGCAGTGAAGTCTTCAGCTGACATACAGTCCAT	240
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	----- CTGCAGCTGTTTGAAGACTATTAATCCTAGTGTAAAGGGCAATCCTGCCTTTGTCATAGCATCCCAGCAAAATGTAGTA	320
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	----- TCAACATTCCTTACAGTACAGCCCATCAATGACTGTTCAAAGGTACACTGATGAGACTTTCGACTCGTAATAAATTA	400
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	----- AAAATAGCTGTGGAGCCTTTTCTTCAGGAGCCACGGACTCTTTGTTTACTATCCAGGCTGCTTGCAATGATGTTAGCCTG TT	480 2
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	----- TTTTAAATCTTGTAAATAGTGTGGTGAATGATCTATATTTGGATCTGCTTTTATCTCCAAACTACTTTGCTTCCTTGT TTTTCTCAA AAAACGTATCATAACA AAATATCATTGTCATGGCA TTTTGCATTAAGTACTTAGTGCAGTGTCTCTTTT	48 560 82
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	***** TCAATTGAGTACTCGTACCAAAATCGCAATATGTCATAACACAGTAAACTACATCGTGTGCATATAAAAATCTTAGATG TCAATTGAGTACTCGTACCAAAATCGCAATATGTCATAACACAGTAAACTACATCGTGTGCATATAAAAATCTTAGATG TCAATTGAGTACTCGTACCAAAATCGCAATATTTTATAACACAGTAAACTATGCTGCATATAAAAATCTTAGATG	128 640 156
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	***** GAACATTCCC GGAGATGTCGGATCAACTCCCTCCCTCCCAAACTTCATCAGGCCTTTGCCTGAATGAACACAGTTTAA GAACATTCCC GGAGATGTCGGATCAACTCCCTCCCTCCCAAACTTCATCAGGCCTTTGCCTGAATGAACACAGTTTAA GAACATTCCC GGAGATGTCGGATCAACTCCCTCCCTCCCAAACTTCATCAGGCCTTTGCCTGAATGCACACAGTACAA	208 720 236
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	***** GTTGCATGGCTGAATTACCAATGGACTACGAAGGAAAAATAAAAAGAGACTAGACATTTATTACATTAAAAAGGTGAAAA GTTGCATGGCTGAATTACCAATGGACTACGAAGGAAAAATAAAAAGAGACTAGACATTTATTACATTAAAAAGGTGAAAA GTTGTATGGCTGAATTACCAATGGACTACGAAGGAAAAATAAAAAGGACTAGACATTTATTACATTAAAAAGGTGAAAA	288 800 316
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	***** GATCCTATAGAGAGCC TAA TTTTGTGGATGCCACCTGAGATTAGGTGTGAACCATCATTTTCGAAGGAGATTGAAAG GATCCTATAGAGAGCC TAA TTTTGTGGATGCCACCTGAGATTAGGTGTGAACCATCATTTTCGAAGGAGATTGAAAG GATCCTATAGAGAGCC TAA TTTTGTGGATGCCACACAGAGATTAGGGGTGAACCATCATTTTCGAAGGAGATTGAAAG	368 880 396
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	***** AATCTTCGAAAAAGTTATGCAACGATGAAAAGCCTTATTA TCTGCGAATACCATACTTTGCACGAAAGTTTCACTATTTT AATCTTCGAAAAAGTTATGCAACGATGAAAAGCCTTATTA TCTGCGAATACCATACTTTGCACGAAAGTTTCACTATTTT AATCTTCGAAAAAGTTACGCAACGATGAAAAGCCTTAGCATCTGCAAAATACCATACTTTGCACGAAAGTTTCACTATTTT	448 960 476
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	***** TCCGCTCTGATGAGACAACATGGACGCTACGTTCTGCAGATCTGTTTAAACAATTTCAAAGGGGAGAGTGGGAGGTTCAAA TCCGCTCTGATGAGACAACATGGACGCTACGTTCTGCAGATCTGTTTAAACAATTTCAAAGGGGAGAGTGGGAGGTTCAAA TCTGCTCTGATGAGACAGCATGGACGCTATGTTCTGCAGATCTGTTTAAACAATTTCAAAGGGGAGAGTGGGAGGTTCAAA	528 1040 556
Ama0c15 Ama1e20 Ama0a23	***** GAAGAACTAAAACGAGATACACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAAGCGGCCAACTAAGTTTTGAAGGAGAAGCTATACT GAAGAACTAAAACGAGATACACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAAGCGGCCAACTAAGTTTTGAAGGAGAAGCTATACT GAAGAACTAAAACGAGATACACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAAGCGGCCAACTAAGTTTTGAAGGAGAAGCTATACT	608 1120 636

Ama0c15	***** TGA TGAAGCAGAAAATTTAGCCGCCAAATTTCTCCATGGTAACTTAGCCGGCATGGAGGATAATTTGCGTAGAAGTGTAG	688
Ama1e20	TGA TGAAGCAGAAAATTTAGCCGCCAAATTTCTCCATGGTAACTTAGCCGGCATGGAGGATAATTTGCGTAGAAGTGTAG	1200
Ama0a23	TGA TGAAGCAGAAAATTTAGCCGTCAAATTTCTCCATGGTAACTTAGCCAGCATGGAGGATAATTTGCGTAGAAGTGTAG	716
Ama0c15	***** GTAACAACTAAGGTACCCGTTTCATACGAGCATGCAAGATTCCTGGAAGAAAATA TGA TGA TGA TCTGGAGGCCATG	768
Ama1e20	GTAACAACTAAGGTACCCGTTTCATACGAGCATGCAAGATTCCTGGAAGAAAATA TGA TGA TGA TCTGGAGGCCATG	1280
Ama0a23	GTAACAACTAAGGTACCCGTTTCATAAGAGCATGCAAGATTCCTGGAATAAACTATGA TGA TGA TCTGGAGGCCATG	796
Ama0c15	***** TACGAA TGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGA TTTGCAAGTAGAGGATCCGTATACCAAGAGGAGTTGCT	848
Ama1e20	TACGAA TGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGA TTTGCAAGTAGAGGATCCGTATACCAAGAGGAGTTGCT	1360
Ama0a23	TACGAA TGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGA TTTGCAAGTAGAGGATCCGTATACCAAGAGGAGTTGCT	876
Ama0c15	***** CCAAGTTTCCAAGTGGTGGAA TGA GCTAGGCTTATATAAAGAGCTAAATCTTGCAGGAAACAGCCATTCGAAATTTTATA	928
Ama1e20	CCAAGTTTCCAAGTGGTGGAA TGA GCTAGGCTTATATAAAGAGCTAAATCTTGCAGGAAACAGCCATTCGAAATTTTATA	1440
Ama0a23	CCAAGTTTCCAAGTGGTGGAA TGA GCTAGGCTTATATAAAGAGCTAACTCTTGCAGGAA TGA GCTAGGCTTCTATA	956
Ama0c15	***** CGTGGTCGATGGTTATACTAGCAGATTATATAAACTGTG CAGAGCAGAGAGTGGAGCTCAC TAACTCCGTGGCTTTTATT	1008
Ama1e20	CGTGGTCGATGGTTATACTAGCAGATTATATAAACTGTG CAGAGCAGAGAGTGGAGCTCAC TAACTCCGTGGCTTTTATT	1520
Ama0a23	TGTGGTCGATGGTTATACTAACAGATTATATAAACTGTG CAGAGCAGAGAGTGGAGCTCAC TAACTCCGTGGCTTTTATT	1036
Ama0c15	***** TACTTGATCGATGACATATTTGATGTGTACGGAA CACTAGATGAGCTCATTTATTTTACAGAACCGGTAAA CAAATGGGA	1088
Ama1e20	TACTTGATCGATGACATATTTGATGTGTACGGAA CACTAGATGAGCTCATTTATTTTACAGAACCGGTAAA CAAATGGGA	1600
Ama0a23	TACTTGATGATGACATATTTGATGTGTACGGAA CACTAGATGAGCTCATTTATTTTACAGAACCGGTAAA CAAATGGGA	1116
Ama0c15	***** CTATTCGCCACTGACACGTTGCCCGAAAACATGAAGATG TGTGCATGCCCTCTTGTATACAA TAAATGGGACTAGCC	1168
Ama1e20	CTATTCGCCACTGACACGTTGCCCGAAAACATGAAGATG TGTGCATGCCCTCTTGTATACAA TAAATGGGACTAGCC	1680
Ama0a23	CTATTCGCCACTGACACGTTGCCCGAAAACATGAAGATG TGTGCATGCCCTCTTGTATACCA TAAACGGGACTAGTC	1196
Ama0c15	***** AAAAAATTTATGAAAAATGGA TATAATCCGATTGACTCCCTCAAAA CAACTGGAAAAGTTGTGCAGTGCATTCCTA	1248
Ama1e20	AAAAAATTTATGAAAAATGGA TATAATCCGATTGACTCCCTCAAAA CAACTGGAAAAGTTGTGCAGTGCATTCCTA	1760
Ama0a23	AAAAAATTTATGAAAAATGGA CACAATCCGATTGACTCCCTCAAAA CAAGTGGAAAAGTTGTGTAGTGCATTCCTA	1276
Ama0c15	***** GTGGAGGCTAAATGGTCTGCCCTCCGGGAGCTGCCAAGCG CCAACGAGTATTTGGAGAACGGAAGGTGAGCTCAGGAGT	1328
Ama1e20	GTGGAGGCTAAATGGTCTGCCCTCCGGGAGCTGCCAAGCG CCAACGAGTATTTGGAGAACGGAAGGTGAGCTCAGGAGT	1840
Ama0a23	GTGGAGGCTAAATGGTCTGCCCTCCGGGAGCTGCCAAGCG CCAACGAGTATTTGGAGAACGGAAGGTGAGTT CAGGAGT	1356
Ama0c15	***** GTA TGTGGTGTAGTTCACCTTATTTGTCTTATGGGACTAGCCGGAAC TAGCAGAGGTTCAATCGAGCTAAATGACACAC	1408
Ama1e20	GTA TGTGGTGTAGTTCACCTTATTTGTCTTATGGGACTAGCCGGAAC TAGCAGAGGTTCAATCGAGCTAAATGACACAC	1920
Ama0a23	GTA TGTGGTGTAAATCATTATTTTCTTATGGGACTAGTGGAACTAA CAGAGGTTCAATCGAGTTAAATGACACAC	1436
Ama0c15	***** AGGAAC TTATGCTCCTATAGCTATAATTTTTCGCTTTGGAA TGA CTTGGGATCTGCTAAGAA TGA GAGCATCAAAATGGA	1488
Ama1e20	AGGAAC TTATGCTCCTATAGCTATAATTTTTCGCTTTGGAA TGA CTTGGGATCTGCTAAGAA TGA GAGCATCAAAATGGA	2000
Ama0a23	GGGAAC TTATGCTCCTATAGCTATAATTTTTCGCTTTGGAA TGA CTTGGGATCTGCTAAGAA TGA GAGCATCAAAATGGA	1516
Ama0c15	***** AAAAGATGGATCCTACTTAAAT TGTACAAGAAAGAGCATATAAA TCTAACAGCTGCACAAGCACATGAGCATGCCTGGA	1568
Ama1e20	AAAAGATGGATCCTACTTAAAT TGTACAAGAAAGAGCATATAAA TCTAACAGCTGCACAAGCACATGAGCATGCCTGGA	2080
Ama0a23	AAAAGATGGATCCTACTTAGAT TGTACAAGAAAGAGCATATAAA TCTAACAGCTGCACAAGTACATGAGCATGCCTGGA	1596
Ama0c15	***** ATTGGTAGCAATTGAATGGAACCGCCTCAATAAAGAA TCTTCAATCTAAA TCA TGA TCGGATCTTCTTTCAAGCAAG	1648
Ama1e20	ATTGGTAGCAATTGAATGGAACCGCCTCAATAAAGAA TCTTCAATCTAAA TCA TGA TCGGATCTTCTTTCAAGCAAG	2160
Ama0a23	ATTGGTAGCAATTGAATGGAACCGCCTCAATAAAGAA TCTTCAATCTAAA TCA TGA TCGGATCTTCTTTCAAGCAAG	1676
Ama0c15	***** CCGCTCTGAACTTGCAGGATGGTTCTCTTATGTATAGCTATGAT CACAATCAACGAGGCCAGTTCTTGAGGAGTAT	1728
Ama1e20	CCGCTCTGAACTTGCAGGATGGTTCTCTTATGTATAGCTATGAT CACAATCAACGAGGCCAGTTCTTGAGGAGTAT	2240
Ama0a23	CCGCTCTGAACTTGCAGGATGGTTCTCTTATGTATAGCTATGAT TAACAATCGACGAGGCCAGTTCTTGAGGAGTAT	1756

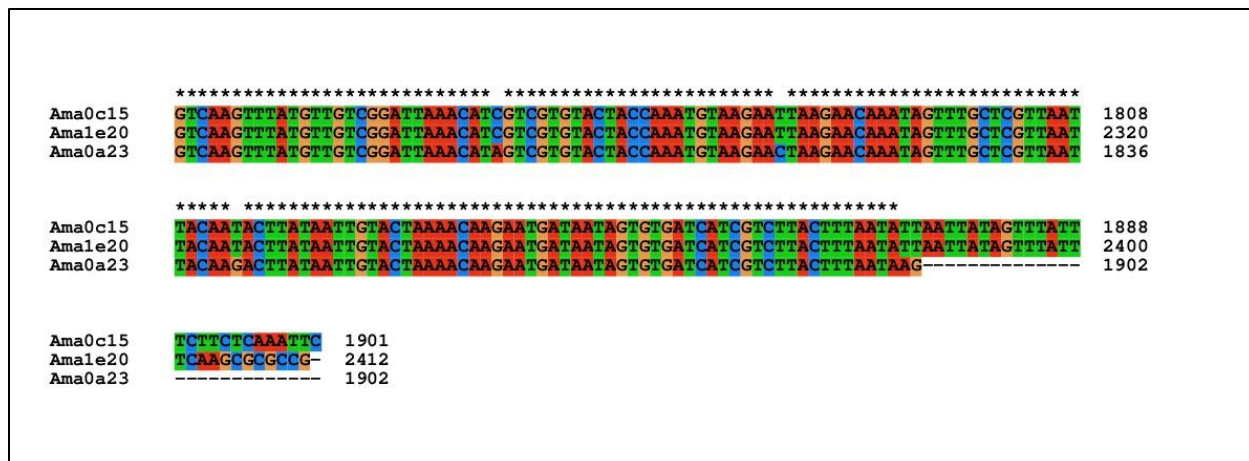


Figura 1. Alineamiento con ClustalX2 de los ADN complementarios de (E)-β-ocimeno sintasa (*ama0a23*) y mircene sintasa (*ama1e20* y *ama0c15*) de *A. majus* cultivar Maryland True Pink. Las secuencias están depositadas en la base de datos GenBank: AY195607.1 (*ama0a23*), AY195608.1 (*ama0c15*) y AY195609.1 (*ama1e20*). *Presenta el mismo nucleótido.

3.3 MUTACIONES

Las mutaciones a nivel molecular (denominadas génicas o puntuales) afectan a la constitución química de los genes. Estas mutaciones se originan por sustitución (se intercambia una base por otra), inversión (dos segmentos de nucleótidos de hebras complementarias se intercambian), translocación (desplazamiento de pares de nucleótidos complementarios de una zona del ADN a otra), inserción (se inserta uno o más nucleótidos) o deleción (se elimina uno o más nucleótidos). Estas mutaciones pueden dar lugar a una completa pérdida de la función del gen, dando lugar a un alelo nulo, como ocurre en *M. cardinalis*, comentado anteriormente. *M. cardinalis* contiene un alelo nulo en *McLMS* debido a una mutación sin sentido en el exón 3, (Byers, Vela, et al., 2014). En *A. linkianum* hay un alelo nulo en el gen *Benzoic Acid Carboxymethyl Transferase (BAMT)* responsable de la síntesis de benzoato de metilo (Ruiz-Hernández et al., 2017). El alelo nulo es el resultado de la inserción genómica mediada por un MITE, Elementos Transponibles Mínimos Repetidos Invertidos (Cartolano et al., 2007) junto con reordenamientos genómicos adicionales incluyendo una segunda inserción de secuencias genómicas con similitud con el locus *Venosa* (Schwinn et al., 2006).

Las mutaciones pueden dar lugar a un efecto negativo dominante, es decir, el producto del gen defectuoso interfiere con la acción del alelo normal, alelo antimórfico. También pueden alterar la función del gen, dando lugar a una ganancia de función, es el caso de los alelos hipermórficos y neomórficos. Otro tipo de mutaciones son aquellas que se traducen en una reducción de la función de un gen: haploinsuficiencia, alelo hipomórfico. En flores de *Chlorantha* pequeños cambios, como

deleciones de 4 pb, en el gen *deficiens* (*def^{ch}*), implicado en el control del pétalo y el desarrollo del estambre, pueden dar lugar a alelos hipomórficos débiles (Schwarz-Sommer et al., 1992).

3.4 GÉNERO *ANTIRRHINUM*

El género *Antirrhinum* comprende 28 especies distribuidas principalmente en todo el mediterráneo, en particular en el suroeste de Europa y el norte de África (Liberal et al., 2014; Vargas et al., 2009). Las especies varían ampliamente en morfología y ecología y se adaptan a diferentes hábitats (Hudson et al., 2008), sin embargo, todas son capaces de formar híbridos fértiles entre sí. Los estudios genéticos que se han realizado a las especies de éste género muestran diferentes tamaños en la población, distribuciones y sistemas de mejoramiento, desde la autofertilidad hasta el cruce obligatorio. Las especies con mayor extensión en la cuenca del mediterráneo son: *A. majus*, *A. latifolium*, *A. tortuosum*, *A. siculum*, y *A. mollisium*, entre otras (Vargas et al., 2009). En cambio, las principales especies que habitan en la Península Ibérica son: *A. linkianum*, *A. subbaeticum*, *A. charidemi* (Vargas et al., 2009). *Antirrhinum* consta de especies con crecimiento vertical, órganos grandes y flores rosadas o amarillas. Estos tienden a ser geográficamente generalizados y crecen en una variedad de hábitats (Hudson et al., 2008).

Pertenece al orden Lamiales, un pariente cercano del orden Solanales, que incluye otro modelo de especies como petunia y tomate. *Antirrhinum* se colocó recientemente en la familia Plantaginaceae tras una revisión de la clásica familia Scrophulariaceae (Sánchez & Guerra, 2011) basado en la variación de la secuencia de ADN.

Las especies *Antirrhinum* se desarrollan mejor en las regiones templadas, con temperaturas diurnas de 17-25°C y se caracteriza por ser una planta de día largo. Son plantas perennes, pero generalmente son tratadas como anuales. Normalmente tras los 3-4 meses de la siembra florecen, y se propagan fácilmente (Hudson et al., 2008). Se pueden cultivar tanto dentro como fuera del invernadero, aunque las flores cultivadas en el exterior, a pesar de que sus colores son más intensos, tienden a ser más sensibles a plagas y enfermedades.

Dentro del género, las especies tienen el mismo número cromosómico ($2n=16$). La mayoría de ellas son alógamas, aunque las líneas de *A. majus* cultivadas y algunas otras especies silvestres, pueden autopolinizarse (Hudson et al., 2008).

La más conocida de todas las especies del género, es *A. majus*, vulgarmente nombrada como boca de dragón o conejillos, entre otros. *A. majus* tiene varios siglos de historia de cultivo como una planta ornamental y su extensión es muy amplia a nivel mundial (Hudson et al., 2008). En la actualidad se cultiva intensamente durante todo el año, siendo de las plantas reproducidas por semillas más importantes en la producción de flor cortada para floristerías, además de comercializarse como planta ornamental en maceta y como planta de jardín. Es por ello, que esta especie es una de las plantas de flor cortada y en maceta de gran interés agronómico.

A. majus apareció como un organismo modelo durante los primeros estudios de herencia y mutación, ya que es susceptible a la genética clásica, debido a su herencia diploide, facilidad de cultivo y tiempo de generación relativamente corto (4 meses), reproducción autógama y por polinización cruzada, variación en la morfológica y el color de la flor (Hudson et al., 2008). Las líneas de laboratorio de *A. majus* se produjeron a partir de cultivares, y una recopilación de los mutantes que se habían acumulado durante el curso del siglo XX. Esta especie probablemente fue domesticada en el noreste España o el suroeste de Francia.

4 OBJETIVO

El objetivo del presente proyecto es purificar y secuenciar *ocimeno sintasa* (*ama0a23*) de la línea 165E de *A. majus*, con el fin de identificar un posible alelo débil de pérdida de función.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal que se ha utilizado ha sido *A. majus* 165E. Ésta es una línea homocigota que se obtuvo en el Reino Unido (Schwarz-Sommer et al., 2010).

Para la propagación de la línea de interés de *A. majus* (Figura 2 y 3), primero se sembraron en maceteros. Se cultivaron en el interior del invernadero de genética molecular en la Finca Tomás Ferro (La Palma) de la ETSIA, UPCT (Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena), hasta que presentaran los frutos maduros. El fruto es una cápsula que se endurece al madurar y se abre por tres orificios de la parte superior. Para su obtención, se autopolinizaron las flores de las plantas de las líneas 165E. Por otro lado, una vez que el fruto ya estaba maduro, se recolectaron las semillas de las cápsulas y se introdujeron en el interior de tubos de 1.5 ml, Eppendorf Tubes®, con algodón y bolitas de sílice, a fin de mantenerlos durante un largo periodo de tiempo.



Figura 2. Detalle flores de *A. majus* 165E.



Figura 3. Planta 165 E.

5.2 EXTRACCIÓN DE ARN

Con el objeto de analizar la presencia o ausencia de la enzima (E)- β -ocimeno sintasa (ama0a23) en la línea 165E, se tomaron muestras de los pétalos de las flores (Figura 4) en el estadio de máxima producción de aromas (día 4-6). Las muestras se ultracongelaron con nitrógeno líquido, para posteriormente extraer el ARN total para trabajar con el transcriptoma de 165E. Para la extracción de ARN se utilizó y se siguió el protocolo del kit: NucleoSpin® RNA Plant. Una vez obtenido el ARN, se midió la cantidad del mismo ng/ μ l de H₂O estéril en el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 2000.

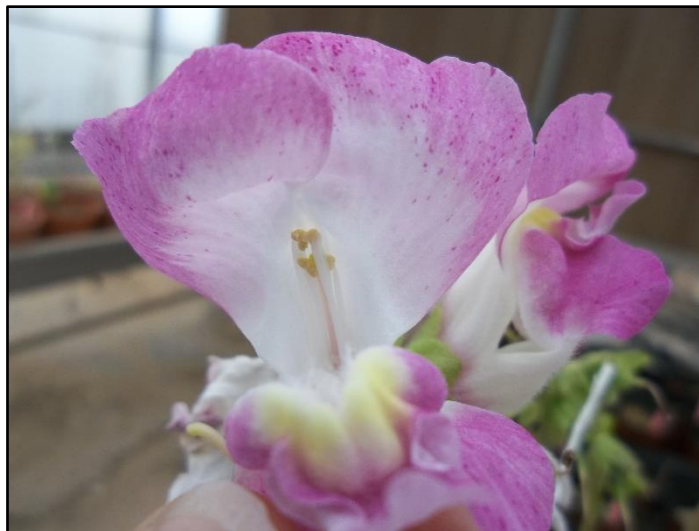


Figura 4. Flor de 165E en el estadio de máxima producción de aromas (día 4-6).

5.3 TRANSCRIPCIÓN INVERSA

Tras la obtención de ARN de las flores de 165E, se llevó a cabo la transcripción inversa, es decir, la síntesis de ADN complementario o ADNc, mediante el ARN total obtenido como plantilla, mediado por transcriptasas inversas. El ADNc es una hebra de doble cadena. El ADN producido por la transcriptasa inversa, debido a que se utiliza ARNm maduro como molde, carece de intrones. Para esto, se utilizó el Kit: Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis.

5.4 LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica básica de biología molecular con una multiplicidad de usos, incluyendo clonación y secuenciación del ácido desoxirribonucleico, análisis funcional de genes, diagnóstico de enfermedades, genotipado y descubrimiento de variantes genéticas (Untergasser et al., 2012) La técnica de PCR solo puede aplicarse a cadenas de ADN, es por ello que se realiza la transcripción inversa. El producto de PCR de ADNc, utilizando ARNm maduro como molde, es la zona codificante correspondiente a la enzima (no tiene intrones). Con el fin de identificar posibles cambios moleculares en el locus *ama0a23*, se realizó una amplificación del mismo. Para ello, se diseñaron cebadores específicos (Tabla 1, Anexo) para *ama0a23*, ya que su secuencia presenta un gran parecido con *ama1e20* y *ama0c15*, en base a la secuencia de *ama0a23* depositada en la base de datos GenBank AY195607.1 (Dudareva et al., 2003). Para el diseño de los mismos se utilizaron los programas Primer3Plus y Primer-BLAST.

Secuencia de *Ama0a23* (ADNc) en *A. majus* (Dudareva et al., 2003):

>AY195607.1 *Antirrhinum majus* (E)- β -ocimene synthase (0e23) mRNA,
complete cds

```
TTTTTCTCCAAAACGTATCATAACAAAATATCATTTCGTTCATGGCATTTCATGATTAGCTACTTA
GGTGCAGTGCTTCCTTTTTTCATTGAGTCCTCGTACCAAATTCGCAATATTTTCATAACACGAGTA
AACATGCTGCATATAAAACTTTGTAGATGGAACATTCCCCGAGATGTCGGATCAACTCCACCTCC
CTCCAAACTTCATCAGGCACTTTGCTTGAATGCACACAGTACAAGTTGTATGGCTGAATTACCA
ATGGACTACGAAGGAAAAATACAAGGGACTAGACATTTGTTACATTTAAAAGATGAAAATGATC
CAATAGAGAGCCTAATTTTTGTGGATGCCACACAGAGATTAGGGGTGAACCATCATTTTCAGAA
GGAGATTGAAGAAATTCCTCGAAAAAGTTACGCAACGATGAAAAGCCCTAGCATCTGCAAATAC
CATACTTTGCACGACGTTTTCACTATTTTTCTGTCTGATGAGACAGCATGGACGCTATGTGTCTG
CAGATGTGTTAACAATTTCAAAGGCGAGAGTGAAGGTTCAAAGAAGAACTAAAACGAGATAC
ACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAAGCGGCACAACCTAAGTTTTGAAGGAGAACGTATACTTGAT
GAAGCAGAAAATTTTAGCCGTCAAATTCCTCCATGGTAACTTAGCCAGCATGGAGGATAATTTGC
GTAGAAGTGTAGGTAACAACTAAGGTACCCGTTTCATAAGAGCATCGCAAGATTCCTGGAAT
AACTATGATGATGATCTTGGAGGCATGTACGAATGGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTG
ATGGATTTGCAAGTGGAGCGATCCGTATACCAAGAGGAGTTGCTCCAAGTTTCCAAGTGGTGG
ATGAGCTAGGCTTATATAAGAAGCTAACTCTTGCAAGGAATAGACCATTCGAGTTCTATATGTG
GTCGATGGTTATACTAACAGATTATATAAACTTGTGAGAGCAGAGAGTGGAGCTCACTAAATCC
GTGGCTTTTATTTACTTGATAGATGACATATTTGATGTGTACGGAACACTAGATGAGCTCATT
TTTTTACAGAAGCCGTAAACAAATGGGACTATTCTGCCACTGACACGTTGCCCGACAACATGAA
GATGTGTTACATGACCCTTCTTGATACCATAAACGGGACTAGTCAAAAAATTTATGAAAAATAT
GGACACAATCCGATTGACTCCCTCAAACAACGTGGAAAAGTTTGTGTAGTGCATTCCTAGTGG
AGGCTAAATGGTCTGCCTCCGGGAGTCTGCCAAGCGCCAACGAGTATTTGGAGAACGAGAAGGT
GAGTTCAGGAGTGTATGTGGTGCTAATACATTTATTTTTTCTTATGGGACTAGGTGGAACCTAAC
AGAGGTTCAATCGAGTTAAATGACACACGGGAACCTTATGTCTCCATAGCTATAATTGTTTCGTA
TTTGGAATGACTTGGGATGTGCTAAGAATGAGCATCAAAATGGAAAAGATGGATCCTACTTAGA
TTGCTACAAGAAAGAGCATATAAATCTAACAGCTGCACAAGTACATGAGCATGCACTGGAATTG
GTAGCAATTGAATGGAAACGCCCTCAATAAAGAATCTTTCAATCTAAATCATGATTCGGTATCTT
CTTTCAAGCAAGCCGCTCTGAATTTTGCAAGGATGGTTCCTCTTATGTATAGCTATGATAACAA
TCGACGAGGCCCGATTCTTGAGGAGTATGTCAAGTTTATGTTGTTCGGATTAACATAGTCGTGT
ACTACCAATGTAAGAATAAGAACAAATAGTTTGCTCGTTAATTACAAGACTTATAATTGTAC
TAAAACAAGAATGATAATAGTGTGATCATCGTCTTACTTTAATAAG
```

La secuencia de *ama0a23* presenta 1902 pb (1,9 kb), por tanto, es muy complejo amplificar todo el fragmento con un solo par de cebadores (Amocs1f y Amocs1r), ya que puede dar lugar a regiones inespecíficas. Es por ello, que se realizó con todos los cebadores diseñados, una combinación de pares de cebadores (Tabla 2, Anexo) para que amplificaran ciertos fragmentos de la secuencia de ADNc de ocimeno sintasa (Figura 5). Para el ensayo también se utilizaron los cebadores diseñados por Dudareva et al. en 2003.

Tras distintas pruebas se determinaron las condiciones de las PCRs con los distintos pares de cebadores (Tabla 2, Anexo). Para la realización de las PCRs se utilizó el Kit: KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit.

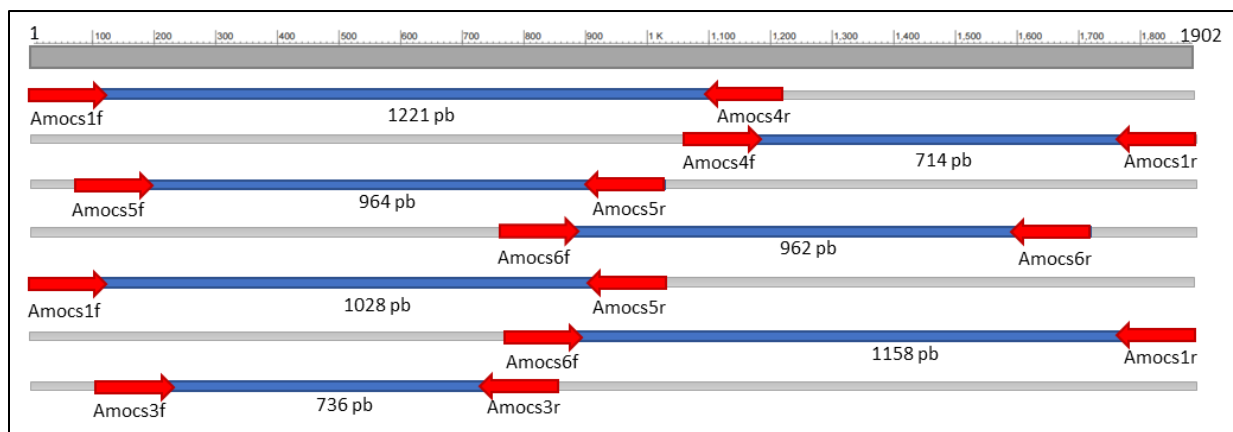


Figura 5. Fragmentos amplificados esperados de la secuencia de ADNc de *ama0a23* con las distintas combinaciones de cebadores.

El gen *Ubiquitin (UBI)* se ha utilizado como control positivo, ya que es un gen constitutivo (gen de referencia o *housekeeping gene*). Este gen se expresa de manera constitutiva, es decir, se expresa siempre, en todos los tejidos. Éste es el encargado del metabolismo básico de la célula involucrados en el buen funcionamiento celular. Los cebadores diseñados para *UBI* (Tabla 1, Anexo) amplifican para un tamaño de 326 pb tanto en ADNc como en DNA genómico. La secuencia de *UBI* está depositada en la base de datos GenBank AJ792039. Como control negativo de PCR se ha utilizado agua Milli-Q® autoclavada.

Secuencia de *UBI* en *A. majus* (Manchado-Rojo, et. al, 2014):

>AJ792039 Antirrhinum majus whole plant Antirrhinum majus cDNA
clone 018_2_10_g11, mRNA sequence

```
CGAGGAAGAGATTATGAGGGACTTCAAAGGTTGCAGCAGGACCCACCTGCGGGTATTAG
CGGTGCGCCACAGGATAACAATATTATGCTATGGAATGCTGTGATATTTGGCCCTGATGA
TACACCTTGGGATGGAGGTACGTTCAAATTGACCCTTCAATTCTCAGAAGATTATCCGAA
CAAGCCACCAACAGTCCGGTTTGTTCGCGAATGTTCCATCCAAATATTTATGCCGATGG
AAGTATATGTTTGGACATCCTTCAAATCAGTGGAGCCCCATATATGATGTTGCAGCTAT
ACTCACATCTGTTTCAGTCACTGCTGTGCGACCCGAACCCCAATTCTCCTGCAAATTCTGA
AGCTGCTCGGTTATATAGTGAGAATAAACGAGATTATAACCGCAAAGTTAGGGAAGTAGT
GGAGCAAAGCTGGGCAGCCGACTAACCTTGGTGTGGTGAATCACACAGGCAACTCGAAG
CCTAACCTGCTAAATTTGTTTCCGAAACTCAAGTTATGGTTTCGGTCCCTGTTGAGCTTC
TAGGTCTTGTAAGACTTGTCCACCCTGTATCATGTATATTAGAGTTTTTTTATGCAT
```

Una vez obtenido los productos de PCR se cargó en un gel de agarosa al 1%. Las condiciones de las electroforesis fueron de 85 V durante 30 minutos. Una vez completada la electroforesis se visualizó el gel bajo luz UV.

5.5 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Una vez obtenido el producto de PCR, con el ADNc amplificado, se procedió a la purificación del mismo. Para ello, se utilizó el siguiente protocolo. En primer lugar, se llevó el producto de PCR a 90 µl con H₂O. Después se añadió 10 µl de acetato sódico 3M (10%), 1 µl de glucógeno y 80 µl isopropanol. A continuación, se mezcló todo en el vórtex y se centrifugó a máxima velocidad durante 20 minutos. Posteriormente, se lavó el pellet (100 µl) con etanol al 70% (EtOH 70%) y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Finalmente, se añadió 25 µl de H₂O.

Una vez realizada la purificación, se cargó en un gel al 1%. Las condiciones de las electroforesis fueron de 85 V durante 30 minutos. Una vez completada la electroforesis se visualizó el gel bajo luz UV, para verificar que no se había perdido el ADNc.

Posteriormente, se envió a secuenciar al Servicio de Apoyo a la Investigación, Sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia. La secuenciación se ha realizado mediante la técnica de electroforesis capilar basada en la metodología de Sanger. Esta técnica implica una fragmentación del ADN a secuenciar y una amplificación de los mismos por medio de una PCR. Posteriormente, cada amplicón acabado en didesoxinucleótido se marca con un fluorocromo diferente. Después, cada fragmento marcado se separa por tamaño por medio de electroforesis capilar, y estos segmentos marcados fluorescentemente se detectan de manera automatizada, ofreciendo cromatogramas con la secuencia ordenada de los fragmentos.

5.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El diseño de cebadores fiables es crucial para una PCR exitosa, es por ello que se ha utilizado para el mismo, el software opensource Primer3Plus, debido a que se ha manejado ampliamente para aplicaciones de genómica de alto rendimiento. Este programa presenta modelos termodinámicos muy precisos en el proceso de diseño del cebador, tanto para mejorar la predicción de la temperatura de fusión como para reducir la probabilidad de que los cebadores formen horquillas o dímeros. También incluye un control muy preciso de la colocación de los primers para mejorar la especificidad del cebador (Untergasser et al., 2012). Para este trabajo, previamente se diseñaron manualmente varios cebadores para amplificar distintas zonas al ser una secuencia de gran tamaño. Una vez diseñados los mismos, se introdujeron en la interfaz del programa Primer3Plus (<http://primer3plus.com>) junto a las secuencias de ADNc de *ama0a23* (la secuencia objeto), *ama1e20* y *ama0c15* en *A. majus*, para comprobar la especificidad de los mismos, ya que la secuencia de *ama0a23* presenta un gran parecido con *ama1e20* y *ama0c15*. La amplificación específica del objetivo deseado requiere que los cebadores no tengan coincidencias con otros objetivos en ciertas orientaciones y dentro de ciertas distancias que permitan una amplificación no deseada. Primer3Plus nos ofrece información detallada y específica sobre los cebadores diseñados como el tamaño de los mismos, porcentaje de GC, temperatura de fusión, el tamaño de la secuencia amplificado y la ubicación de los cebadores, entre otros parámetros.

Para comprobar los resultados obtenidos con el programa anteriormente nombrado, también se manejó otro software denominada Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Esta herramienta combina BLAST con un algoritmo de alineación global para asegurar una alineación completa de cebador-objetivo y es lo suficientemente sensible para detectar objetivos que tienen un número significativo de desajustes con los cebadores. Primer-BLAST permite diseñar nuevos cebadores específicos del objetivo en un solo paso, así como verificar la especificidad de los cebadores preexistentes. Este programa también permite la exclusión de las localizaciones de polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en los primers (Ye et al., 2012).

Para poder trabajar con archivos de las secuencias con formato .ab1 se ha utilizado el programa Chromas. Éste es un visualizador de sondeo libre para proyectos simples de secuenciación de ADN que no requieren el ensamblaje de múltiples secuencias. Además, con este programa se ha exportado las secuencias en FASTA.

Para comprobar que la secuencia de nucleótidos es la que se esperaba se ha utilizado el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). BLAST es una herramienta bioinformática que compara una secuencia problema (query sequence) de nucleótidos con todas las secuencias de una Base de Datos para encontrar regiones de similitud local. También, calcula la significación estadística de los resultados proporcionados.

Las alineaciones de secuencias múltiples constituyen uno de los análisis bioinformáticos más ampliamente utilizados. Clustal W y Clustal X han sido los programas de alineación múltiple más utilizados desde finales de la década de 1990, siendo capaces de alinear los conjuntos de datos de

tamaño mediano muy rápidamente y con un fácil manejo (Larkin et al., 2007). En este trabajo, las alineaciones de las secuencias se han realizado con el programa Clustal X 2.0. Este software es la nueva versión de la herramienta de alineación gráfica Clustal X, que permite una alineación más rápida de conjuntos de datos muy grandes y aumenta la precisión de la misma (Larkin et al., 2007) Ésta versión tiene una interfaz gráfica y está disponible para Unix/Linux, Mac OS y Windows. Los alineamientos de parejas son computados con un método de comparación entre los fragmentos de la muestra y las similitudes son guardadas en una matriz. Se pueden alinear las secuencias usando las configuraciones por defecto, pero para este análisis se han personalizado los parámetros.

6 RESULTADOS

6.1 AMPLIFICACIÓN DE *AMA0A23* EN *A. MAJUS* 165E

Con la combinación de los diferentes cebadores diseñados se amplificaron distintos fragmentos de la secuencia de ADNc de *ama0a23*, con el fin de identificar posibles cambios moleculares en el locus. En la Figura 6 se observan los productos de PCR amplificados con las distintas combinaciones de cebadores. La banda amplificada con los cebadores Amocs1f y Amocs4r presenta el tamaño esperado 1221 pb (Figura 6A). En la Figura 6B se observa la banda amplificada de tamaño 714 pb con Amocs4f y Amocs1r. En la Figura 6C se aprecia la banda amplificada de tamaño 964 pb obtenida con los cebadores Amocs5f y Amocs5r. El fragmento amplificado con Amocs6f y Amocs6r presenta un tamaño de 962 pb (Figura 6D). En la Figura 6E se muestra la banda amplificada de tamaño 1028 pb con Amocs1f y Amocs5r. La banda amplificada con Amocs6f y Amocs1r presenta un tamaño dentro del rango esperado, 1158 pb (Figura 6F). También se utilizaron los cebadores diseñados por Dudareva et al. en 2003, en la Figura 6G se observa el tamaño del fragmento amplificado que se encuentra en el rango esperado 736 pb.

El gen *UBI* se ha utilizado como control positivo, ya que se expresa de manera constitutiva. Como se muestra en la Figura 6H este gen se expresa en las muestras de 165E, y amplifica el tamaño esperado de 326 pb.

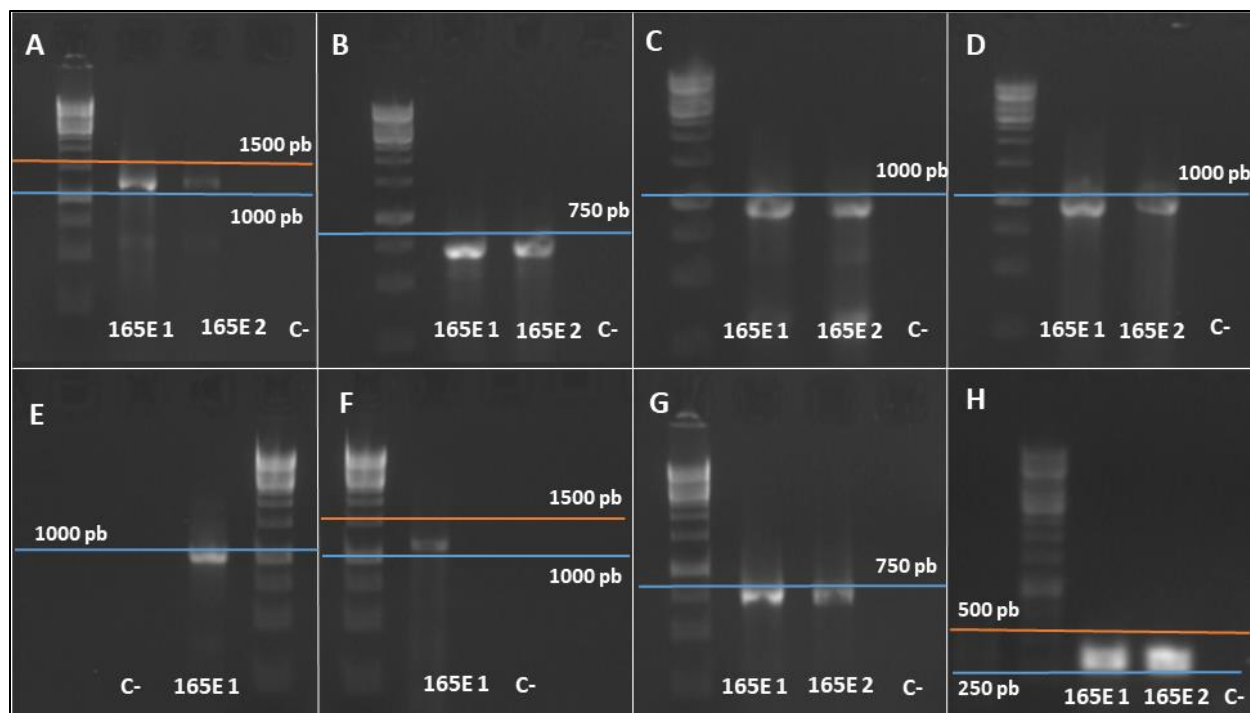


Figura 6. Gel de agarosa (1%) con los productos de PCR de dos muestras de 165E. A) Amplificados con los cebadores Amocs1f y Amocs4r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). B) Amplificados con Amocs4f y Amocs1r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). C) Amplificados con Amocs5f y Amocs5r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). D) Amplificados con los cebadores Amocs6f y Amocs6r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). E) Amplificados con los cebadores Amocs1f y Amocs5r. Orden (izquierda-derecha): C-(Control negativo)-165E1- Ladder. F) Amplificados con los cebadores Amocs6f y Amocs1r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-C-(Control negativo). G) Amplificados con los cebadores Amocs3f y Amocs3r. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo). H) Amplificados con UBI. Orden (izquierda-derecha): Ladder-165E1-165E2-C- (Control negativo).

6.2 SECUENCIACIÓN DE *AMA0A23* EN *A. MAJUS* 165E

De las muestras enviadas a secuenciar, solo se pudieron obtener cuatro pequeños fragmentos de una calidad aceptable (30-60), debido a la débil señal de la secuenciación. El parámetro calidad de secuenciación se refiere a la estimación de la probabilidad de que cada uno de los nucleótidos secuenciados sean erróneos. Una calidad de 30 es aceptable, ya que la probabilidad de error de lectura de esa base es de 1/1000. Por tanto, secuencias con calidades por debajo de este parámetro son rechazadas. En la Figura 7 se muestra un ejemplo del cromatograma de una secuencia obtenida por el método automático de secuenciación mediante electroforesis capilar, basado en la metodología de Sanger. Cuando aparece la letra N significa que no ha sido posible determinar el nucleótido existente en esa posición de la secuenciación. Los heterocigotos se suelen interpretar como N, esto también ocurre con los alelos hipomórficos.

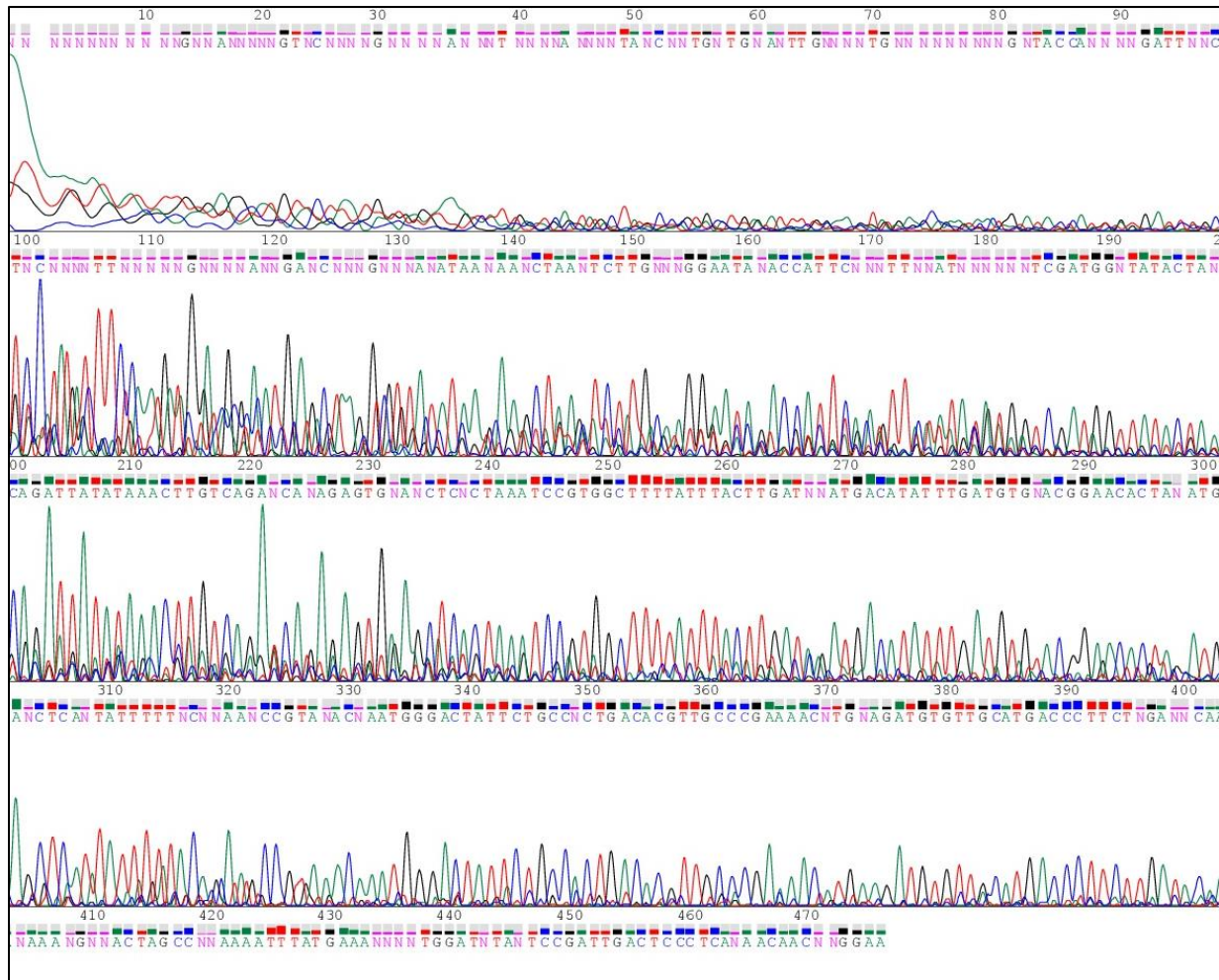


Figura 7. Cromatograma de la segunda secuencia obtenida por el método automático de secuenciación de Sanger. Cuando aparece la letra N significa que no ha sido posible determinar el nucleótido existente en esa posición de la secuencia.

En la Figura 8 se alinean los cuatro fragmentos secuenciados de la línea 165E con la secuencia del ADNc de *ama0a23* de *A. majus* cultivar Maryland True Pink (Ball Seed, West Chicago, IL) (Dudareva et al., 2003).

Ama0a23	TTTTCTCCAAAAAGTATCATACACAAATATCATTCGTCATGGCATTTTGCATTAGCTACTAGGTGCAGTCTTCCTT	80
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	TTTCATTCAGTCCTCGTACCAAAATGCAATTTTCATAAACAGGTAAACATCTGCATATAAACCTGTAGATGGAAC	160
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	ATTCCCGAGATGTCGGATCAACTCCACCTCCCTCCAAACTTCATCAGGCACTTTGGTTGAATGCACACAGTACAAGTTG	240
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	TATGGCTCAATTACCAGTGGCTACGAAGGAAAAATCAAGGCATAGACATTTGTTACATTTAAAAGATGAAAAATGATC	320
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	CAATAGAGAGCTAAATTTTGTGGATGCCACACAGAGTTAGGGGTGAACCATCATTTTCAAGAGGATGAGAAATTT	400
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	CTTCGAAAAAGTTACGCAACGATGAAGGCCCTAGCATCTGCAAAATCCATACCTTTCACGACGTTTCACTATTTTTCTG	480
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	TCATGATGAGACAGCATGGACCTATGTGTCGACAGTGTGTTAACAATTTCAAAGGCAGAGTGGGAGGTTCAAAGAAAG	560
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	AACTAAAAAGGATACACGAGGTTAGTGGAGTTATATGAAGCGGCACAACTAGCTTTTGAAGGAGAACGTATACTTGAT	640
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	GAAGCAGAAAAATTTTAGCCGTCAAAATTCACATGGTAACCTAGCCAGCATGGAAGATAATTTGGCTAGAAGTGTAGGTAA	720
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	CAAACTAAGGTACCCGTTTCATAAGAGCATCCAAGATTCACCTGGAAATAACTATGATGATGATCTTGGAGGCATGTACG	800
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	AATGGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGAATTTGCAAGTGGAGCGATCCGTATACCAGAGGAGTTGCTCCAA	880
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	
3Fragmento_Secuenciado	-----	
4Fragmento_Secuenciado	-----	
Ama0a23	CTTCCAAAGTGGTGGAAATCAGCTAGGCTTATAAAGAACTAACTCTTCCAAGGAATGACCAATTCGAGTCTATATGTG	960
1Fragmento_Secuenciado	-----	
2Fragmento_Secuenciado	-----	80
3Fragmento_Secuenciado	-----	44
4Fragmento_Secuenciado	-----	

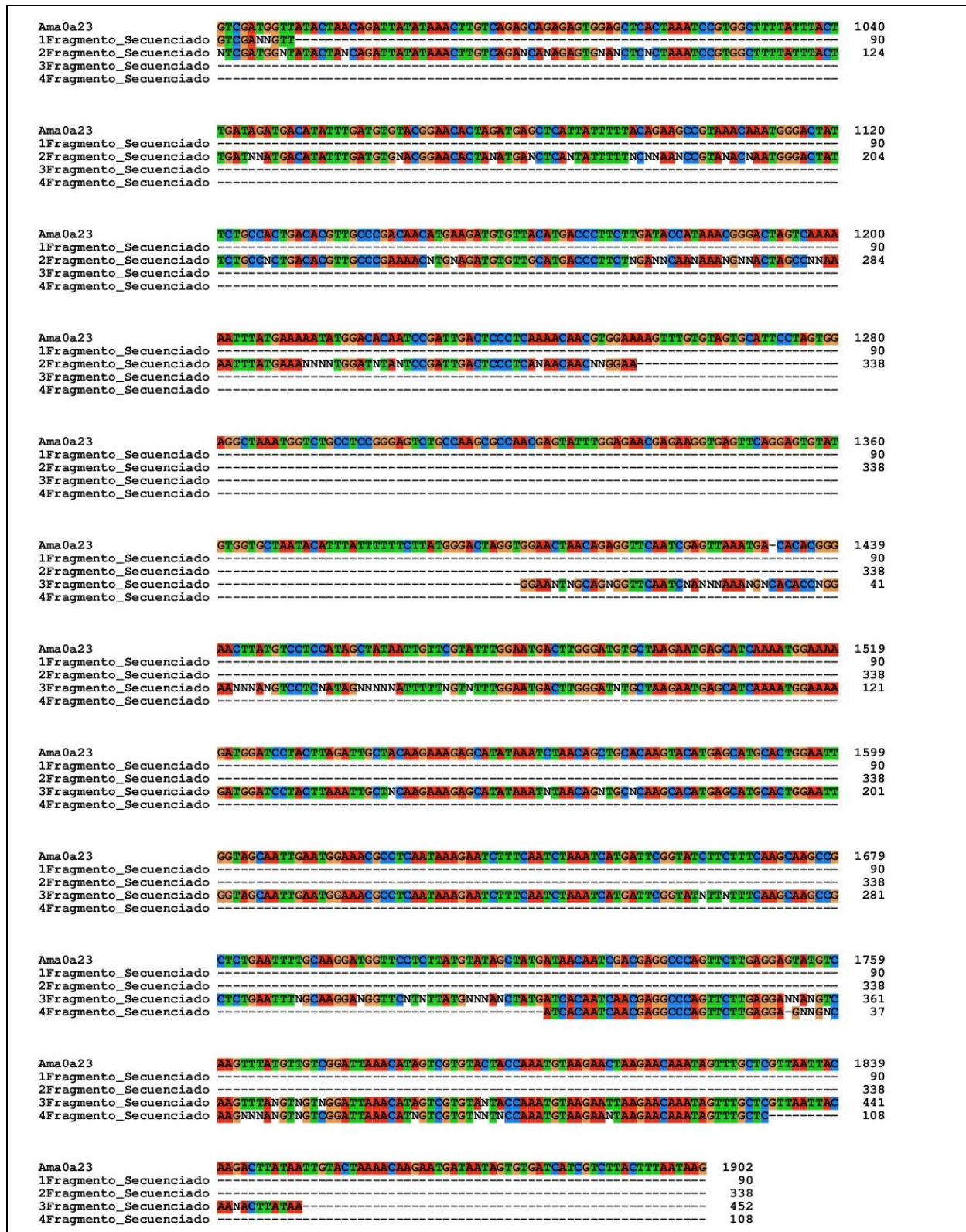


Figura 8. Alineamiento con ClustalX2 de los cuatro fragmentos secuenciados con buena calidad de la línea 165E con la secuencia de ADNc de (E)-β-ocimeno sintasa (*ama0a23*) de *A. majus* cultivar Maryland True Pink.

De la secuenciación se han obtenido dos zonas diferenciadas (Figura 9). La franja roja se encuentra solapada por la secuencia 1 y 2 (881-1254 pb), y la verde por la 3 y 4 (1400-1850pb).

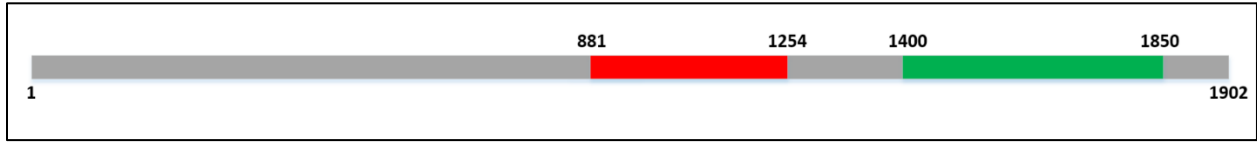


Figura 9. Esquema de la secuencia de ADNc de *ama0a23* en *A. majus* donde se aprecia los fragmentos obtenidos de la secuenciación. La franja roja solapada por la secuencia 1 y 2 (881-1254 pb), y la verde por la 3 y 4 (1400-1850 pb).

Si se aprecia en detalle la franja roja (Figura 10) se puede observar, indicado con flechas naranjas, que no ha sido posible determinar el nucleótido existente en esa posición de la secuenciación, ya que las dos secuencias solapantes se han interpretado con N. Las flechas negras muestran una mutación por sustitución. La franja verde (Figura 11) presenta características similares a la anterior, aunque por la base 35 las mutaciones pueden deberse a un error de secuenciación.

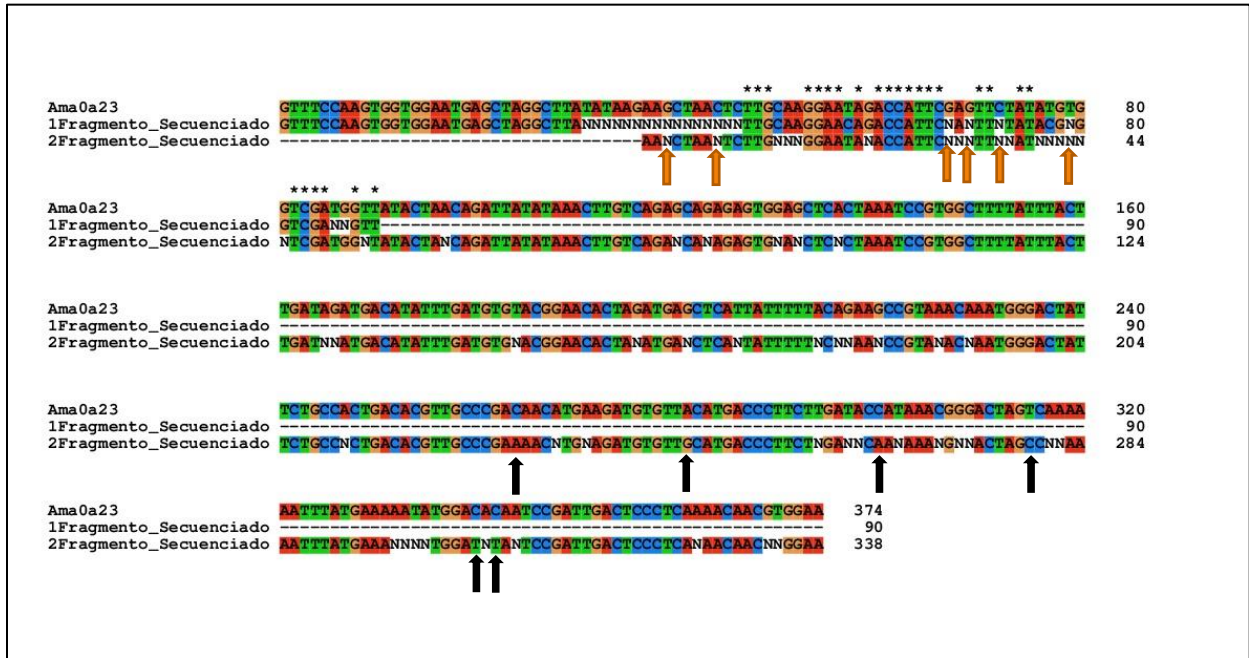


Figura 10. Detalle de la franja roja donde se alinean con ClustalX2 los fragmentos 1 y 2 (881-1254 pb) de la línea 165E con la secuencia del ADNc de *ama0a23* de *A. majus* cultivar Maryland True Pink. Las flechas naranjas indican que no ha sido posible determinar el nucleótido existente en esa posición de la secuenciación y las negras una mutación por sustitución de una base. El signo * indica misma base.

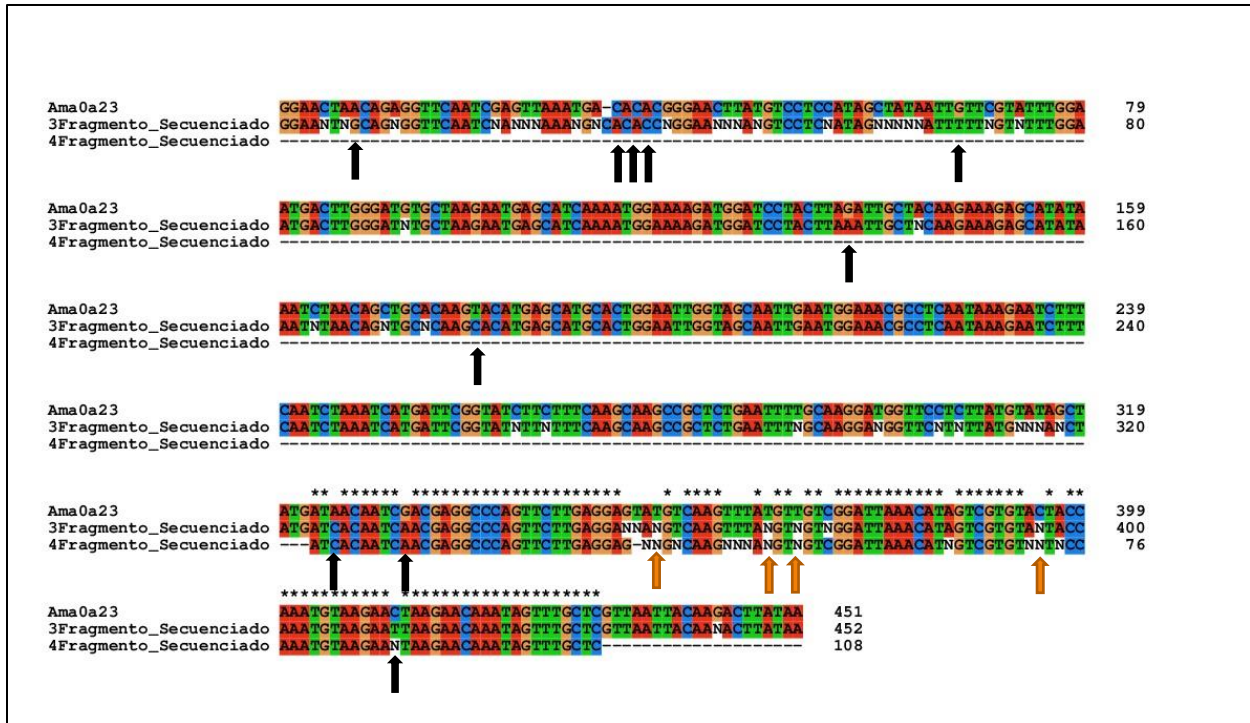


Figura 11. Detalle de la franja verde donde se alinean con ClustalX2 los fragmentos 3 y 4 (1400-1850pb) de la línea 165E con la secuencia del ADNc de *ama0a23* de *A. majus* cultivar Maryland True Pink. Las flechas naranjas indican que no ha sido posible determinar el nucleótido existente en esa posición de la secuenciación y las negras una mutación por sustitución de una base. El signo * indica misma base.

Para comprobar que la secuencia de nucleótidos de los 4 fragmentos obtenidos corresponde realmente a la secuencia esperada *ama0a23* se ha utilizado el programa BLAST. El primer fragmento presenta una identidad del 100% con (E) - β -ocimeno sintasa (*ama0a23*) y mirceno sintasa (*ama1e20* y *ama0c15*). El segundo se identifica con *ama0a23* en un 84%. El tercer producto secuenciado posee una similitud del 92% con *ama0a23* y del 89% con *ama1e20* y *ama0c15*. Por último, el cuarto segmento se identifica con *ama1e20* y *ama0c15* en un 87%. Este último, al no identificarse con (E) - β -ocimeno, los cambios de bases hallados se pueden deber a la diferencia entre estos tres genes, ya que *ama0a23* presenta una similitud del 92% con *ama1e20* y *ama0c15*.

7 DISCUSIÓN

La búsqueda de genes implicados en la síntesis de olor y COVs es un factor importante que se estudia en una variedad de plantas. La estructura genética implicada en el perfil de COVs está compuesta de genes estructurales, genes reguladores, como son los factores de transcripción (FT) (Klahre et al., 2011), y un gran número de enzimas.

En cultivos de interés agronómico, los aspectos relacionados con el olor, sabor y aroma son de gran importancia, ya que juegan un papel fundamental en el control de plagas y enfermedades, y en la atracción de polinizadores. Es por ello que se han realizado varias investigaciones relacionadas con la defensa biótica y abiótica en muchas plantas comerciales, como es el caso del arroz, *Oryza sativa* (Chehab et al., 2006) por ser uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial.

Dentro de los COVs, los monoterpenos son de gran interés en investigación, ya que son componentes de los aromas florales que atraen polinizadores, y una de sus funciones principales es de defensa directa o indirecta contra herbívoros y patógenos (Dudareva et al., 2014). Los isopropenoides (E)- β -ocimeno y mirceno son muy valorados a nivel agronómico y genético, ya que contribuyen a los olores florales de las especies vegetales (Dudareva et al., 2000). En *Antirrhinum* se han identificado tres genes monoterpenos sintasa: dos *mirceno sintasa* (*ama1e20* y *ama0c15*) y (*E*)- β -ocimeno sintasa (*ama0a23*) (Dudareva et al., 2003), cuyos productos de síntesis son mirceno y (E)- β -ocimeno. *Ama0a23* presenta una secuencia muy similar (92%) a otras dos sintasas de mirceno (*ama1e20* y *ama0c15*), codificando proteínas casi idénticas (Dudareva et al., 2003).

Se ha realizado un estudio en el que se analiza la estructura genética de la emisión de olores en dos especies de *Antirrhinum*, *A. majus* (la línea 165E) y *A. linkianum*, difiriendo en la emisión de cuatro COVs, benzoato de metilo, metilcinamato, acetofenona y β -ocimeno (Weiss et al., 2016). En una población de *A. majus* (la línea 165E) x *A. linkianum*, se muestra que los diferentes COVs anteriormente mencionados, mostraron segregaciones mendelianas atribuibles a uno o dos genes. En la emisión de β -ocimeno se encontró pequeñas cantidades de éste volátil, indicando la presencia de un posible alelo hipomórfico en 165E (Ruiz-Hernández et al., 2017). En dicho estudio se probó la hipótesis de un único gen segregado, teniendo en cuenta tres diferentes umbrales de emisión. Los más estrictos mostraron diferencias significativas respecto a una segregación mendeliana 3:1 ($p = 0,002953$). Un porcentaje menos conservador a niveles inferiores a $30 \mu\text{g} \cdot \text{flor}^{-1} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$ dio lugar a resultados estadísticos aceptables ($p = 0,9123$). Utilizando el umbral estricto por debajo de $10 \mu\text{g} \cdot \text{flor}^{-1} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$, también se encontró un posible modelo para una segregación 13:3 ($p = 0,1056$) en la que entrarían en juego dos genes (Ruiz-Hernández et al., 2017). La pérdida incompleta de la función, es decir, los alelos hipomórficos débiles, puede dar lugar a segregaciones difíciles de interpretar como establecer un umbral de emisión. De hecho, existen dos posibles modelos génicos para la síntesis de β -ocimeno, uno basado en un solo gen (*ama0a23*) (Dudareva et al., 2003), mientras que el segundo puede estar basado en dos genes (Ruiz-Hernández et al., 2017).

En este trabajo, se ha pretendido explicar la reducción de función del gen *ama0a23* en 165E, como responsable de los niveles bajos de emisión de (E)- β -ocimeno en esta línea. Los resultados obtenidos no han sido del todo reveladores, debido a que no se ha obtenido la secuencia completa. En los fragmentos analizados se han obtenido muchos puntos de baja calidad. Esto probablemente se debe a una amplificación de dos o tres genes con los mismos cebadores que dan en los puntos de polimorfismo un error de secuencia. También se han apreciado mutaciones por sustitución en una base, pudiendo explicar esto la pérdida parcial de función del gen. Uno de los fragmentos analizados no ha presentado similitud con *ama0a23*, si no con los dos mircenos; por tanto, los cambios de bases encontrados en esa franja pueden deberse a las diferencias de nucleótidos entre genes, al tratarse de genes distintos. Pero se debe de tener en cuenta que, al ser secuencias tan similares y codificar a proteínas casi idénticas, es muy complicado obtener unos resultados concluyentes debido a que, al amplificar una secuencia objeto, se corre el riesgo de amplificar la que no es de interés, a pesar de haber diseñado unos cebadores específicos. Debido al corto tiempo del TFM no se ha podido abordar un protocolo de clonación en vectores que hubiese permitido dilucidar los aspectos moleculares discutidos.

En conclusión, de las dos franjas secuenciadas (881-1254 pb y 1400-1850 pb) dentro de la secuencia de *ama0a23*, se pueden apreciar indicios de que estamos ante un alelo hipomórfico, debido a los cambios de bases detectados. En consecuencia, a causa de que de las muestras enviadas a secuenciar solo se pudieron obtener pequeños fragmentos de óptima calidad, no se ha podido conseguir la secuencia completa de *ama0a23* en 165E, por tanto no podemos concluir de manera certera que los cambios de bases observados revelen que estamos ante la presencia de un alelo hipomórfico en 165E. Así pues, este trabajo sirve como precedente para estudios posteriores, ya que es necesario realizar otros ensayos clonando los productos en un vector plasmídico, y poder así obtener una secuenciación completa sin ruido de fondo ni de productos similares que puedan oscurecer los resultados hallados.

8 CONCLUSIÓN

Los bajos niveles de emisión del COV (E)- β -ocimeno en la línea 165E de *A. majus* puede ser producto de la pérdida incompleta de función del gen *ama0a23*, debido a mutaciones por sustitución de nucleótidos en su secuencia.

A pesar de estas conclusiones, es necesario realizar estudios posteriores para poder recabar datos adicionales que permitan aceptar o rechazar la hipótesis de alelos hipomórficos en 165E.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-blanco, C., Aarts, M. G. M., Bentsink, L., Keurentjes, J. J., & Reymond, M. (2009). What Has Natural Variation Taught Us about Plant Development, Physiology, and Adaptation? *Plant Cell*. 21, 1877–1896. doi.org/10.1105/tpc.109.068114
- Arimura, G.-I., Ozawa, R., Kugimiya, S., Takabayashi, J., & Bohlmann, J. (2004). Herbivore-Induced Defense Response in a Model Legume. Two-Spotted Spider Mites Induce Emission of (E)-beta-Ocimene and Transcript Accumulation of (E)-beta-Ocimene Synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*. 135(4), 1976–1983. doi.org/10.1104/pp.104.042929.1976
- Bohlmann, J., Martin, D., Oldham, N. J., & Gershenzon, J. (2000). Terpenoid Secondary Metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of a Myrcene/(E)-β-Ocimene Synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 375(2), 261–269. doi.org/10.1006/abbi.1999.1669
- Bohlmann, J., & Steele, C. (1997). Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). *Journal of Biological Chemistry*. 272(35), 21784–21792. doi.org/10.1074/jbc.272.35.21784
- Byers, K. J. R. P., Bradshaw, H. D., & Riffell, J. A. (2014). Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*). *Exp.Biol.* 217, 614–623. doi.org/10.1242/jeb.092213
- Byers, K. J. R. P., Vela, J. P., Peng, F., Riffell, J. A., & Bradshaw, H. D. Jr. (2014). Floral volatile alleles can contribute to pollinator-mediated reproductive isolation in monkeyflowers (*Mimulus*). *Plant J.* 80, 1031–1042. doi.org/10.1111/tpj.12702
- Cartolano, M., Castillo, R., Efremova, N., Kuckenberg, M., Zethof, J., Gerats, T., Vandenbussche, M. (2007). A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nat.Genet.* 39(7), 901–905. doi.org/10.1038/ng2056
- Chalchat, J. C., & Özcan, M. M. (2008). Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. *Food Chemistry*. 110(2), 501–503. doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.018
- Chehab, E. W., Raman, G., Walley, J. W., Perea, J. V., Banu, G., Theg, S., & Dehesh, K. (2006). Rice HYDROPEROXIDE LYASES with Unique Expression Patterns Generate Distinct Aldehyde Signatures in *Arabidopsis* 1. *Plant Physiology*. 141, 121–134. doi.org/10.1104/pp.106.078592.1

- Degenhardt, D. C., & Lincoln, D. E. (2006). Volatile emissions from an odorous plant in response to herbivory and methyl jasmonate exposure. *Journal of Chemical Ecology*. 32(4), 725–743. doi.org/10.1007/s10886-006-9030-2
- Dudareva, N., Martin, D., Kish, C. M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Fäldt, J., & Bohlmann, J. (2003). (E)- β -Ocimene and Myrcene Synthase Genes of Floral Scent Biosynthesis in Snapdragon: Function and Expression of Three Terpene Synthase Genes of a New Terpene Synthase Subfamily. *Plant Cell*. 15, 1227–1241. doi.org/10.1105/tpc.011015.2
- Dudareva, N., Murfitt, L. M., Mann, C. J., Gorenstein, N., Kolosova, N., Kish, C. M., & Wood, K. (2000). Developmental Regulation of Methyl Benzoate Biosynthesis and Emission in Snapdragon Flowers. *Plant Cell*. 12, 949–961.
- Dudareva, N., & Pichersky, E. (2000). Update on Biochemistry Biochemical and Molecular Genetic Aspects of Floral Scents 1, *Plant Physiology*. 122, 627–633.
- Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of Plant Volatiles 1. *Plant Physiology*, 135, 1893–1902. doi.org/10.1104/pp.104.049981.1
- Hudson, A., Critchley, J., & Erasmus, Y. (2008). The Genus *Antirrhinum* (Snapdragon): a flowering plant model for evolution and development. doi:10.1101/pdb.emo100Cold Spring HarbProtoc.
- Klahre, U., Gurba, A., Hermann, K., Saxenhofer, M., Bossolini, E., & Guerin, P. M. (2011). Pollinator Choice in *Petunia* Depends on Two Major Genetic Loci for Floral Scent Production. *Curr. Biol*. 21, 730–739. doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.059
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2. 23(21), 2947–2948. doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404
- Liberal, I. M., Burrus, M., Suchet, C., Thébaud, C., & Vargas, P. (2014). The evolutionary history of *Antirrhinum* in the Pyrenees inferred from phylogeographic analyses. *BMC Evolutionary Biology*. 14(1), 146-160. doi.org/10.1186/1471-2148-14-146
- Maffei, M. E., Gertsch, J., & Appendino, G. (2011). Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural Product Reports*. 28(8), 1359–1380. doi.org/10.1039/c1np00021g
- Manchado-Rojo, M., Weiss, J., & Egea-Cortines, M. (2014). Validation of *Aintegumenta* as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnology Journal*. 12(8), 1053–1065. doi.org/10.1111/pbi.12212

- Muhlemann, J. K., Klempien, A., & Dudareva, N. (2014). Floral volatiles: From biosynthesis to function. *Plant Cell and Environment*. 37(8), 1936–1949. doi.org/10.1111/pce.12314
- NIST, (2017). Libro del Web de Química del NIST. Retrieved August 25, 2017, from <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Ruiz-Hernández, V., Hermans, B., Weiss, J., & Egea-cortines, M. (2017). Genetic Analysis of Natural Variation in *Antirrhinum* Scent Profiles Identifies BENZOIC ACID CARBOXYMETHYL TRANSFERASE As the Major *Locus* Controlling Methyl Benzoate Synthesis. *Front.Plant Sci.* 8, 1–13. doi.org/10.3389/fpls.2017.00027
- Sánchez, P., & Guerra, J. (2011). *Nueva Flora de Murcia. Plantas vasculares. Murcia. España. DM.*
- Schiestl, F. P. (2010). The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecol.Lett.* 13, 643–656. doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01451.x
- Schwarz-Sommer, Z., Gübitz, T., Weiss, J., Gómez-di-marco, P., Delgado-benarroch, L., Hudson, A., & Egea-cortines, M. (2010). A molecular recombination map of *Antirrhinum majus* A molecular . *BMCPlantBiol.* 10:275.
- Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P. J., Hansen, R., Tetens, F., & Sommer, H. (1992). Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBOJ.* 11, 251–263.
- Schwinn, K., Venail, J., Shang, Y., Mackay, S., Alm, V., Butelli, E., & Martin, C. (2006). A Small Family of MYB -Regulatory Genes Controls Floral Pigmentation Intensity and Patterning in the Genus *Antirrhinum*. *PlantCell.* 18, 831–851. doi.org/10.1105/tpc.105.039255.1
- Spiller, M., & Debener, T. (2010). Genetic dissection of scent metabolic profiles in diploid rose populations. *Theor.Appl.Genet.* 120, 1461–1471. doi.org/10.1007/s00122-010-1268-y
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3 — new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research.* 40(15), 1–12. doi.org/10.1093/nar/gks596
- Vargas, PabloGuzma, B., Amat, E., & Carrio, E. (2009). A geographical pattern of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae) speciation since the Pliocene based on plastid and nuclear DNA polymorphisms. *J. Biogeogr.* 36, 1297–1312. doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02059.x

- Weiss, J., Mühlemann, J. K., Ruiz-hernández, V., Dudareva, N., & Egea-cortines, M. (2016). Phenotypic Space and Variation of Floral Scent Profiles during Late Flower Development in *Antirrhinum*. *Front.Plant Sci.* 7:1903. doi.org/10.3389/fpls.2016.01903
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 12:134

Anexos

ANEXO I: DISEÑO DE CEBADORES

Tabla 1. Cebadores específicos diseñados en base a la secuencia de *ama0a23*. La nomenclatura seguida es la siguiente: primero las siglas del material vegetal (Am, *Antirrhinum majus*) seguido del gen para el cual está diseñado el cebador, después el número es para diferenciarlos entre sí y finalmente si se trata del cebador directo (-f, forward) o del cebador inverso (-r, reverse).

Cebadores	Secuencias	Referencia
Amocs1f	5´-TTTTTCTCCAAAAACGTATCATACACAAATATC-3´	Propio
Amocs1r	5´-CTTATTAAGTAAGACGATGATCACACTATTATC-3´	Propio
Amocs4f	5´-GACTAGTCAAAAAATTTATGAAAAATATGGACA-3´	Propio
Amocs4r	5´-TGTCCATATTTTTTCATAAATTTTTTGACTAGTC-3´	Propio
Amocs5f	5´-GGTGCAGTGCTTCCTTTTTTC-3´	Propio
Amocs5r	5´-CCACGGATTTAGTGAGCTCC-3´	Propio
Amocs6f	5´-GAGCATCGCAAGATTCCTG-3´	Propio
Amocs6r	5´-GAGGAACCATCCTTGCAAAA-3´	Propio
Amocs3f	5´-TATTTTCATAACACGAGTAAACATG-3´	(Dudareva et al., 2003)
Amocs3r	5´-ACTTGCAAATCCATCAGGGC-3´	(Dudareva et al., 2003)
AmUbif	5´-GCCGATGGAAGTATATGTTTG-3´	(Manchado-Rojo et al., 2014)
AmUbir	5´-CAAGTCTTACAAGACCTAGAAGCTC-3´	(Manchado-Rojo et al., 2014)

Tabla 2. Tamaño de amplificación esperado y condiciones de PCR de las diferentes combinaciones de cebadores.

Combinación de cebadores	Tamaño del producto (pb)	Condiciones PCR		
		Temperatura alineamiento (°C)	Tiempo extensión (s)	Nº Ciclos
Amocs1f-Amocs4r	1221	60	15	35
Amocs4f-Amocs1r	714	60	1	35
Amocs5f-Amocs5r	964	60	1	35
Amocs6f-Amocs6r	962	60	1	35
Amocs1f-Amocs5r	1028	60	15	35
Amocs6f-Amocs1r	1158	60	15	35
Amocs3f-Amocs3r	736	52	1	30

ANEXO II: ALINEAMIENTO

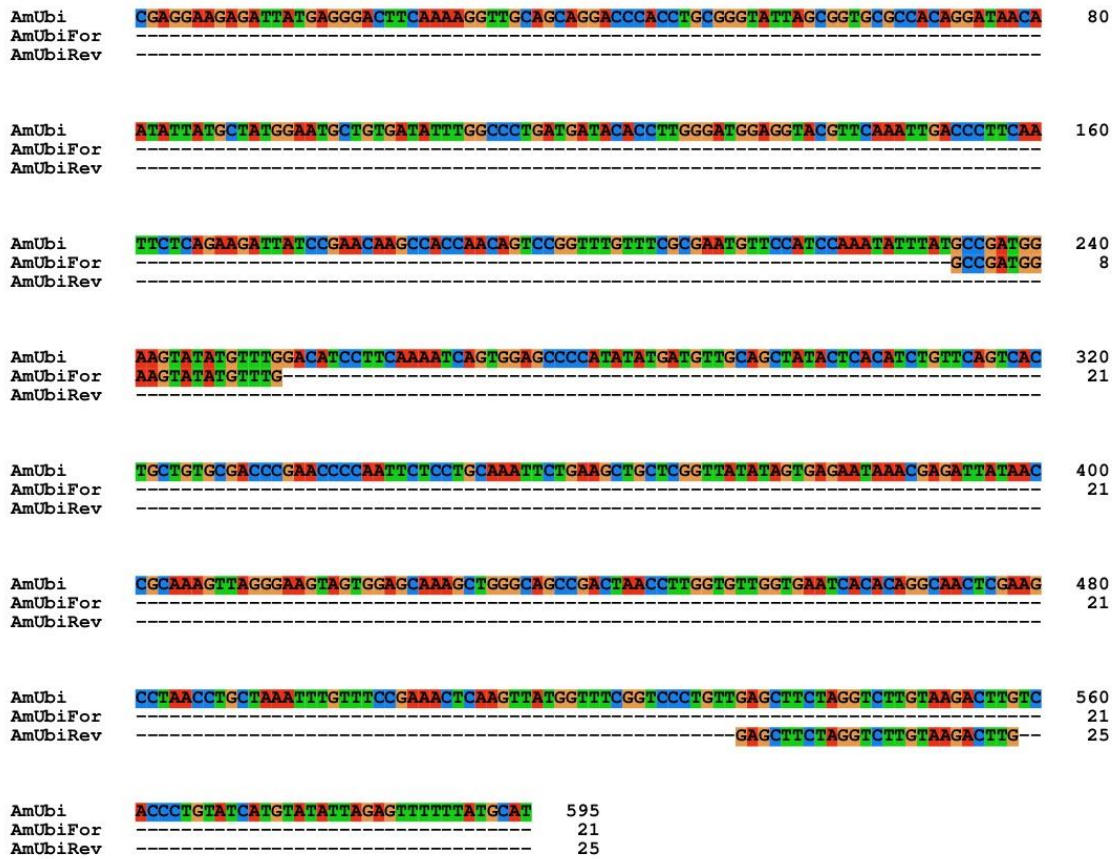


Figura 12. Alineamiento de *AmUbi* frente a sus cebadores con el programa ClustalX2.

Ama0a23	TTTTTCTCCAAAAACGTATCATACACAAATATCATTCGTCAATGGCATTTTGCATTAGCTACTTAGGTGCAGTGCCTCCCTT	80
Amocs1f-For	TTTTTCTCCAAAAACGTATCATACACAAATATC	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	TTTCATTGAGTCCCTGTACCAAATTCGCAATATTTTCATAACACGAGTAAACATGCTGCATATAAACTTGTAGATGGAAC	160
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	ATTCCCCGAGATGTCGGATCAAATCCACCTCCCTCCAACTTCAATCAGGCACTTTGCTTGAATGCACACAGTACAGTTG	240
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	TATGGCTGAATTAACCAATGGACTACGAAAGGAAAAATACAAAGGGACTAGACATTTGTACATTTAAAGATGAAAAATGATC	320
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	CAATAGAGAGCCTAATTTTGTGGATGCCACACAGAGATTAGGGGTGAACCATCATTTTCGAAGGAGATTGAAGAAATT	400
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	CTTCGAAAAAGTTACGCAACGATGAAAAACCCCTAGCATCTGCAAAATACCATACTTTGCACGACGTTTCACTATTTTCTG	480
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	TCTGATGAGACAGCATGGACGCTATGTGTCTGCAGATGTGTTTAACAATTTCAAAAGGCAGAGTGGAGGTTCAAGGAAG	560
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	AACTAAAAACGAGATACACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAACGGCACAACTAAGTTTGAAGGAGAACGTATACTTGAT	640
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	GAAAGCAGAAAAATTTTAGCCGTCAAAATCTCCATGGTAACTTAGCCAGCATGGAGGTAATTTGCGTAGAAGTGTAGGTAA	720
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	CAAACTAAGGTACCCGTTTCAATAAGAGCATCGAAGATTCACTGGATAAACATATGATGATGATCTTGGAGGCATGTAGC	800
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	AATGGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGATTTGCAAGTGGAGCGATCCGTATACCAAAGAGGAGTTGCTCCAA	880
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	GTTTCCAACTGGTGGAAATGAGCTAGGCTTATATAAGAACTAACTCTTGCAGGAAATAGACCATTGACTTCTATATGTG	960
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	GTCGATGGTTATACTAACAGATTATATAAACTTGTCAAGACAGAGGAGGGAGCTCACTAAATCCGTGGCTTTTATTACT	1040
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	
Ama0a23	TGATAGATGACATATTTGATGTGTACGGAACTAGATGAGCTCATATTTTTACAGAAAGCCGTAAACAAAATGGGCTAT	1120
Amocs1f-For	-----	33
Amocs4r-Rev	-----	

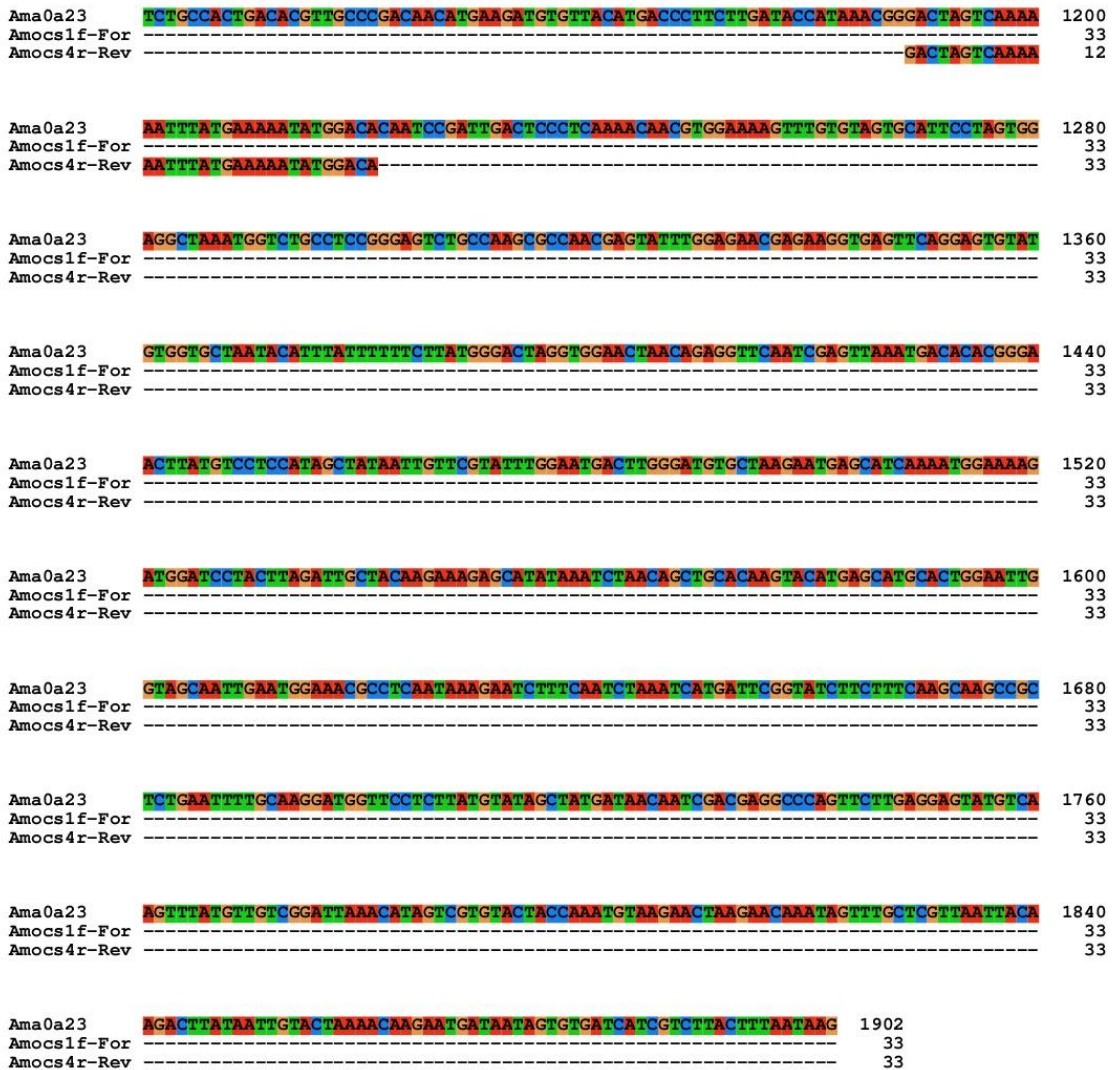


Figura 13. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs1f y Amocs4r con el programa ClustalX2.

Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	TTTTCTCCAAAACGTATCATACACRAATATCATTCGTATGGCATTTTGCATTAGCTACTTAGGTGCAGTGCCTCCTT	80
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	TTTCATTGAGTCCCTGTACCAAATTCGCAATATTTTCATAACACGAGTAAACATGCTGCATATAAACTTGTAGATGGAAC	160
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	ATTCCCCGAGATGTCGGATCAAATCCACCTCCCTCCAACTTTCATCAGGCACTTTGCTTGAATGCACACAGTACAGTTG	240
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	TATGGCTGAATTAACCAATGGACTACGAAAGGAAAAATACAAAGGGACTAGACATTTGTACATTTAAAGATGAAAAATGATC	320
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	CAATAGAGAGCCTAATTTTGTGGATGCCACACAGAGATTAGGGGTGAACCATCATTTTCGAAGGAGATTGAAGAAATT	400
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	CTTCGAAAAAGTTACGCAACGATGAAAACCCTAGCATCTGCAAAATACCATACTTTGCACGACGTTTCACTATTTTCTG	480
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	TCTGATGAGACAGCATGGACGCTATGTGTCTGCAGATGTGTTTAACAATTTCAAAAGGCAGAGTGGAGGTTCAAGGAG	560
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	AACTAAAACGGATACACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAACGGCACAACTAAGTTTGAAGGAGAACGTATACTTGAT	640
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	GAAAGCAGAAAATTTTAGCCGTCAAAATCTCCATGGTAACTTAGCCAGCATGGAGGTAATTTGCGTAGAAGTGTAGGTAA	720
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	CAAACTAAGGTACCCGTTTCATAAAGGCATCGCAAGATTCACTGGAATAAACATATGATGATGATCTTGGAGGCATGTAGC	800
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	AATGGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGATTTGCAAGTGGAGCGATCCGTATACCAAAGAGGAGTTGCTCCAA	880
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	GTTTCCAACTGGTGGAAATGAGCTAGGCCTTATATAAAGAACTAACTCTTGCAGGAAATAGACCATTGACTTCATATGTG	960
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	GTCGATGGTTATACTAACAGATTATATAAACTTGTCCAGACAGAGGAGGGAGCTCCTAAATCCGTGGCTTTTATTTACT	1040
Ama0a23 Amocs4f-For Amocs1r-Rev	TGATAGATGACATATTTGATGTGTACGGAACTAGATGAGCTCATATTTTTACAGAAAGCCGTAAACAAAATGGGCTAT	1120

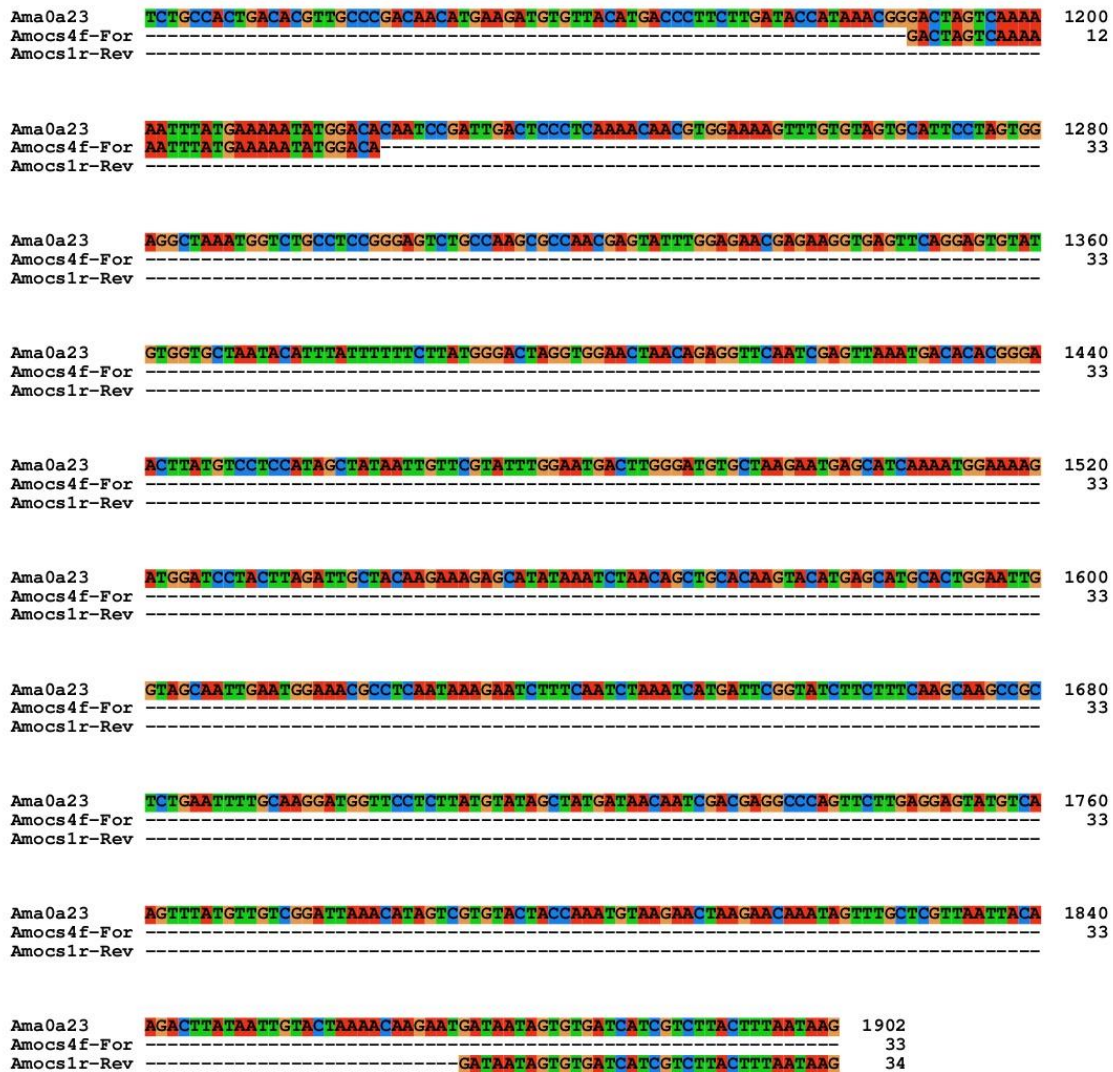


Figura 14. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs4f y Amocs1r con el programa ClustalX2.

Ama0a23	TTTTCTCCAAAAAGTATCATAACAAATATCATTCGTATGGCATTTCATTAGCTACTTAGGTGCGTCTCCCTT	80
Amocs5f-For	-----GGTGCAGTCTCCCTT	80
Amocs5r-Rev	-----	80
Ama0a23	TTTCATGAGTCCCTGTACCAAATTCGAATAATTCATAACAGGATAAACATGCTGCATATAAACTTGTAGATGGAAC	160
Amocs5f-For	TTTC	160
Amocs5r-Rev	-----	160
Ama0a23	ATCCCCGAGATGTCGGATCAACTCCACCTCCCTCCAACTTCATCAGGCACCTTGCTGAAAGCACACNGTACAAGTTC	240
Amocs5f-For	-----	240
Amocs5r-Rev	-----	240
Ama0a23	TATGGCTGAATTACCAATGCATACGAAGGAAAAATCAAGGGACTAGACATTTGTACATTTAAAGAAGAAAAATGATC	320
Amocs5f-For	-----	320
Amocs5r-Rev	-----	320
Ama0a23	CAATAGAGACCTAATTTTGTGGATGCCACACAGAGATAGGGGGAACCATCATTTTCAGAGGAGATTGAAGAAAT	400
Amocs5f-For	-----	400
Amocs5r-Rev	-----	400
Ama0a23	CTTCGAAAAAGTTACGCAACGATCAAAAGCCCTAGCATCTGCAAAATCCATACCTTGCAGCAGCTTCACTATTTTCTG	480
Amocs5f-For	-----	480
Amocs5r-Rev	-----	480
Ama0a23	TCTGATGAGACAGCATGGACCTATGTGTCTGCAGATGTGTTTAACTTTCAAAGGCGAGCTGGAAGGTCAAAGAAG	560
Amocs5f-For	-----	560
Amocs5r-Rev	-----	560
Ama0a23	AACATAAACGAGATACACGAGGTTTAGTGGAGTATATGAAGGGCCAACTAAGTTTGAAGGAGAACGTATACTGTAT	640
Amocs5f-For	-----	640
Amocs5r-Rev	-----	640
Ama0a23	GAAGCAGAAAAATTTAGCCGTCAAATTCCTCAATGGTAACTTAGCCAGCATGGAGGATAAATTCGGTAGAAGTCTAGGTAA	720
Amocs5f-For	-----	720
Amocs5r-Rev	-----	720
Ama0a23	CAAACTAAGGTACCCGTTTCATAAGAGCATCGCAAGTTCACATGGATAAACTATGATGATGATCTGGAGGCATGTACG	800
Amocs5f-For	-----	800
Amocs5r-Rev	-----	800
Ama0a23	AATGGGAAAAACATTAAGAGACTAGCCCTGATGGATTTGCAAGTGGAGCGATCCGATACCAAGAGGAGTTGCTCCAT	880
Amocs5f-For	-----	880
Amocs5r-Rev	-----	880
Ama0a23	GTTCCAGTGGTGGATGAGCTAGGCTTATATAAGAACTAACTCTGCAAGGAATAGACCATTGAGTTCATATGTG	960
Amocs5f-For	-----	960
Amocs5r-Rev	-----	960
Ama0a23	GTCCATGGTATATACTAACAGATTATATAAACTTGTCTAGACAGAGTGGAGTCACTAAATCCGAGGCTTTTATTTACT	1040
Amocs5f-For	-----	1040
Amocs5r-Rev	-----GGAGCTCACTAAATCCGTCG	1040
Ama0a23	TGATAGATGACATATTGATGCTGACGGAACTAGATGAGCTCATATTTTACAGAGCCGTAACAAATGGGACTAT	1120
Amocs5f-For	-----	1120
Amocs5r-Rev	-----	1120

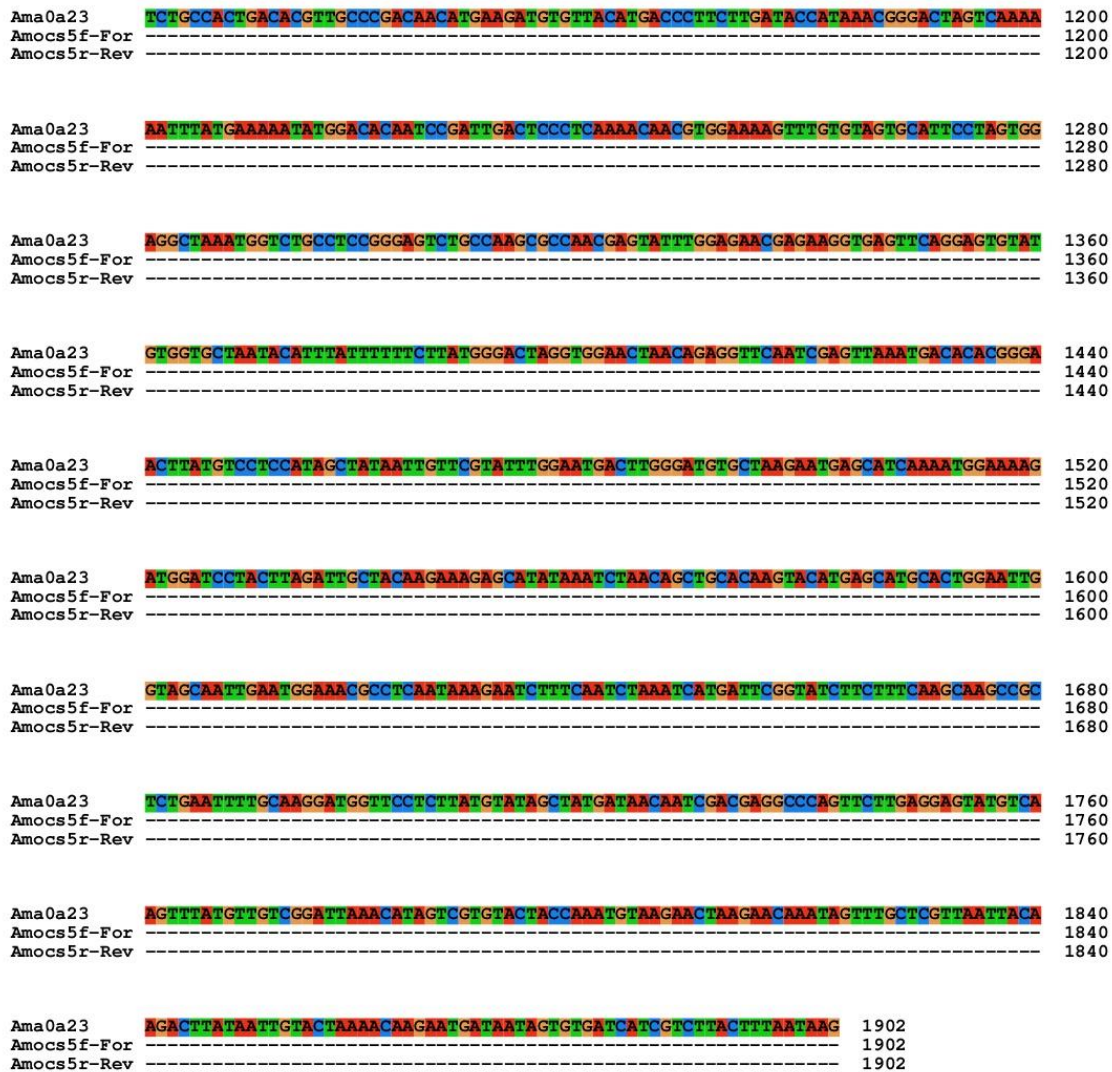


Figura 15. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs5f y Amocs5r con el programa ClustalX2.

Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	TTTTCTCCAAAACGTATCATACACRAATATCATTCGTCAATGGCATTTTGCATTAGCTACTTAGGTGCAGTGCCTCCTT	80
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	TTTCATTGAGTCCCTGTACCAAATTCGCAATATTTTCATAACACGAGTAAACATGCTGCATATAAACTTTGTAGATGGAAC	160
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	ATTCCCCGAGATGTCGGATCAAATCCACCTCCCTCCAACTTCAATCAGGCACTTTGCCTTGAATGCACACAGTACAGTTG	240
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	TATGGCTGAATTAACCAATGGACTACGAAAGGAAAAATACAAAGGGACTAGACATTTGTACATTTAAAGATGAAAAATGATC	320
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	CAATAGAGAGCCATAATTTTGTGGATGCCACACAGAGATTAGGGGTGAACCATCATTTTCGAAGGAGATTGAAGAAATT	400
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	CTTCGAAAAAGTTACGCAACGATGAAAACCCTAGCATCTGCAAAATACCATACTTTGCACGACGTTTCACTATTTTCTCG	480
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	TCTGATGAGACAGCATGGACGGTATCTGTCTGCAGATGTGTTTAACAATTTCAAAAGGCAGAGTGGAGGGTTCAAGGAAG	560
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	AACTAAAACGGATACACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAACGGCACAACTAAGTTTGAAGGAGAACGTATACTTGAT	640
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	GAAAGAGAAAAATTTAGCCGTCAAAATCTCCATGGTAACTTAGCCAGCATGGAGGATAATTTGCGTAGAAGTGTAGGTAA	720
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	CAAACTAAGGTACCCGTTTCATAAAGNGCATCGAAGATTCACCTGGAATAAACATATGATGATGATCTTGGAGGCATGTAGG GAGCATCGCAAGATTCACCTG	800 20
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	AATGGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGATTTGCAAGTGGAGCGATCCGTATACCAAAGAGGAGTTGCTCCAA	880 20
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	GTTTCCAACTGGTGGAAATGAGCTAGGCTTATATAAAGAACTAACTCTTGCAGGAAATAGACCATTCCGACTTCATATGTG	960 20
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	GTCGATGGTTATACTAACAGATTATATAAACTTGTCCAGACAGAGNGGGAGCTCACTAAATCCGTGGCTTTTATTTACT	1040 20
Ama0a23 Amocs 6f-For Amocs 6r-Rev	TGATAGATGACATATTTGATGTGTACGGAACTAGATGAGCTCATATTTTTACAGAAAGCCGTAAACAAAATGGGCTAT	1120 20

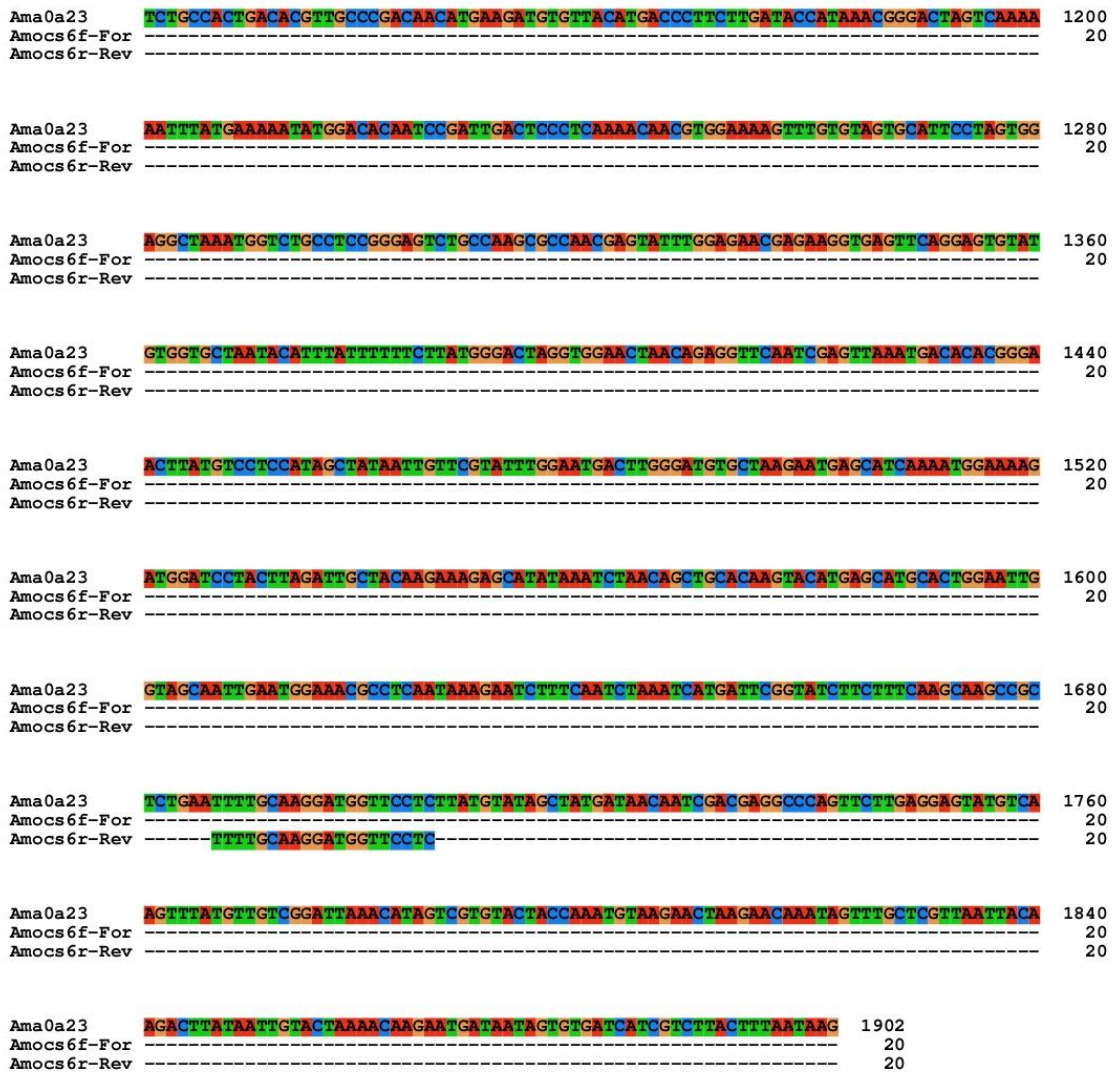


Figura 16. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs6f y Amocs6r con el programa ClustalX2.

Ama0a23	TTTTTCTCCAAAAACGTATCATACACAAATATCATTCGTCAATGGCATTTTGCATTAGCTACTTAGGTGCAGTGCCTCCCTT	80
Amocs1f-For	TTTTTCTCCAAAAACGTATCATACACAAATATC	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	TTTCATTGAGTCCCTGTACCAAATTCGCAATATTTTCATAACACGAGTAAACATGCTGCATATAAACTTGTAGATGGAAC	160
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	ATTCCCCGAGATGTCGGATCAAATCCACCTCCCTCCAACTTCAATCAGGCACTTTGCCTTGAATGCACACAGTACAGTTG	240
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	TATGGCTGAATTAACCAATGGACTAGCAAGGAAAAATACAAAGGGACTAGACATTTGTACATTTAAAGATGAAAAATGATC	320
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	CAATAGAGAGCCTAATTTTGTGGATGCCACACAGAGATTAGGGGTGAACCATCATTTTCGAAGGAGATTGAAGAAATT	400
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	CTTCGAAAAAGTTACGCAACGATGAAAAACCCCTAGCATCTGCAAAATACCATACTTTGCACGACGTTTCACTATTTTCTG	480
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	TCTGATGAGACAGCATGGACGCTATGTGTCTGCAGATGTGTTTAACAATTTCAAAAGGCGAGAGTGGAGGTTCAAGGAAG	560
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	AACTAAAAACGAGATACACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAACGGCACAACAAAGTTTGAAGGAGAACGTATACTTGAT	640
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	GAAAGCAGAAAAATTTTAGCCGTCAAAATCTCCATGGTAACTTAGCCAGCATGGAGGTAATTTGCGTAGAAGTGTAGGTAA	720
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	CAAACTAAGGTACCCGTTTCAATAAGAGCATCGCAAGATTCACTGGATAAACATATGATGATGATCTTGGAGGCATGTAGC	800
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	AATGGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGATTTGCAAGTGGAGCGATCCGTATACCAAAGAGGAGTTGCTCCAA	880
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	GTTTCCAACTGGTGGAAATGAGCTAGGCTTATATAAGAACTAACTCTTGCAGGAAATAGACCATTGCACTTCATATGTG	960
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	
Ama0a23	GTCGATGGTTATACTAACAGATTATATAAACTTGTTCAGAGCAGAGAGTGGAGCTCAGTAAATCCGTGGCTTTTATTACT	1040
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----GGAGCTCACTAAATCCGTGG	20
Ama0a23	TGATAGATGACATATTTGATGTGTACGGAACTAGATGAGCTCATATTTTTACAGAAAGCCGTAAACAAAATGGGCTAT	1120
Amocs1f-For	-----	33
Amocs5r-Rev	-----	20

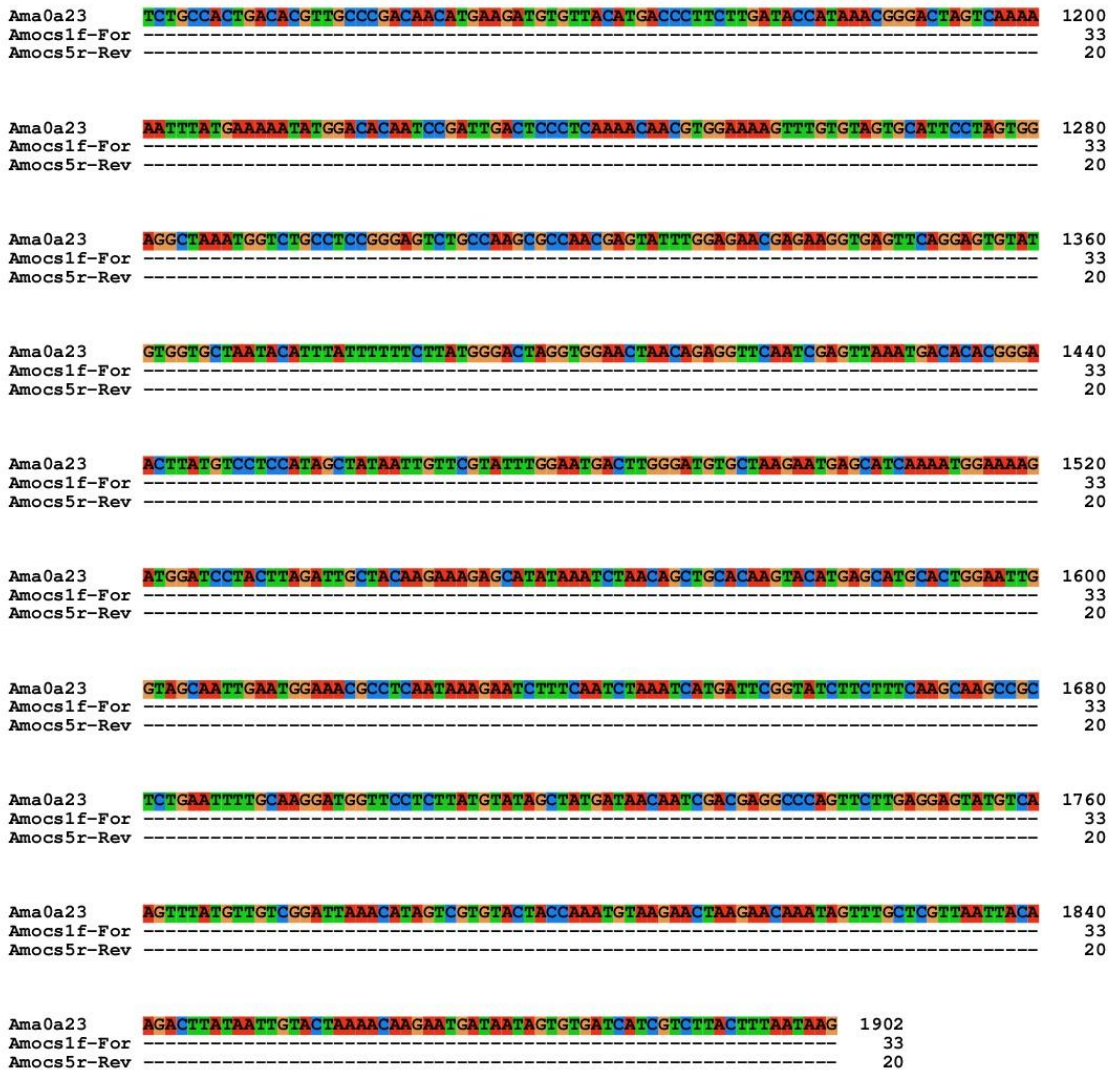


Figura 17. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs1f y Amocs5r con el programa ClustalX2.

Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	TTTTCTCCAAAACGTATCATACACRAATATCATTCGTCAATGGCATTTTGCATTAGCTACTTAGGTGCAGTGCCTCCTT	80
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	TTTCATTGAGTCCCTGTACCAAATTCGCAATATTTTCATAACACGAGTAAACATGCTGCATATAAACTTTGTAGATGGAAC	160
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	ATTCCCCGAGATGTCGGATCAAATCCACCTCCCTCCAACTTCAATCAGGCACTTTGCTTGAATGCACACAGTACAGTTG	240
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	TATGGCTGAATTAACCAATGGACTACGAAAGGAAAAATACAAAGGGACTAGACATTTGTACATTTAAAGATGAAAAATGATC	320
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	CAATAGAGAGCCTAATTTTGTGGATGCCACACAGAGATTAGGGGTGAACCATCATTTTCGAAGGAGATTGAAGAAATT	400
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	CTTCGAAAAAGTTACGCAACGATGAAAACCCTAGCATCTGCAAAATACCATACTTTGCACGACGTTTCACTATTTTCTG	480
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	TCTGATGAGACAGCATGGACGCTATGTGTCTGCAGATGTGTTTAACAATTTCAAAAGGCAGAGTGGAGGTTCAAGGAG	560
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	AACTAAAACGGATACACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAACGGCACAACTAAGTTTGAAGGAGAACGTATACTTGAT	640
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	GAAAGAGAAAAATTTAGCCGTCAAAATCTCCATGGTAACTTAGCCAGCATGGAGGTAATTTGCGTAGAAGTGTAGGTAA	720
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	CAAACTAAGGTACCCGTTTCAATAGNGCATCGAAGATTCAGTGAATAAACATATGATGATGATCTTGGAGGCATGTAGG GAGCATCGCAAGATTCACCTG	800 20
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	AATGGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGATTTGCAAGTGGAGCGATCCGTATACCAAAGAGGAGTTGCTCCAA	880 20
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	GTTTCCAACTGGTGGAAATGAGCTAGGCTTATATAAAGAACTAACTCTTGCAGGAAATAGACCATTGAGCTTCATATGTG	960 20
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	GTCGATGGTTATACTAACAGATTATATAAACTTGTCCAGAGCAGAGGAGGGAGCTCAGTAAATCCGTGGCTTTTATTTACT	1040 20
Ama0a23 Amocs6f-For Amocslr-Rev	TGATAGATGACATATTTGATGTGTACGGAACTAGATGAGCTCATATTTTTACAGAAAGCCGTAAACAAAATGGGCTAT	1120 20

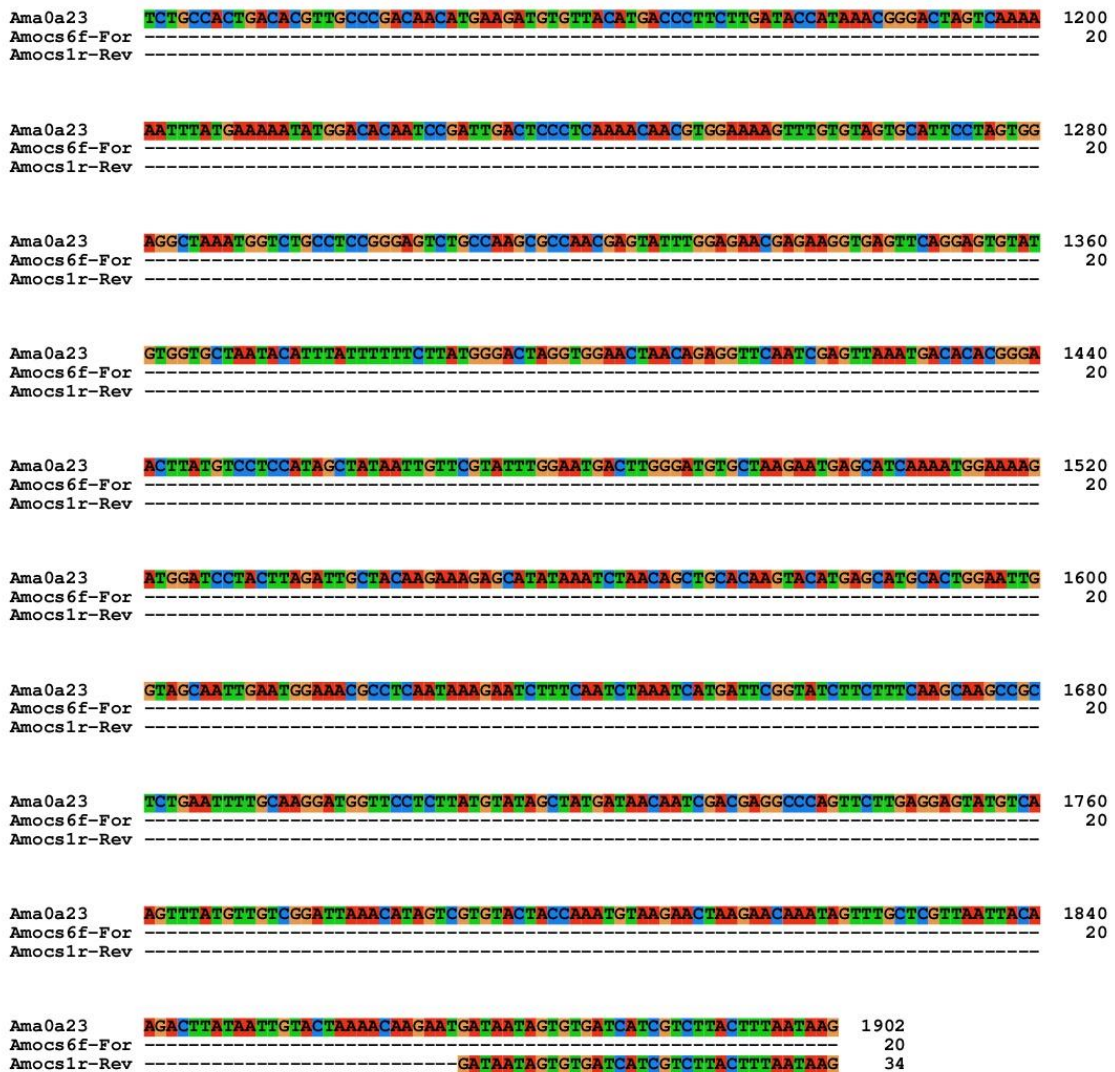


Figura 18. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs6f y Amocs1r con el programa ClustalX2.

Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>TTTTTCTCCAAAACGTATCATACACRAATATCATTCGTCAATGGCATTTTGCATTAGCTACTTAGGTGCAGTGCCTCCTT ----- ----- -----</pre>	80
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>TTTCATTGAGTCCCTGTACCAAATTCGCAATATTTTCATAACACGAGTAAACATGCTGCATATAAACTTGTAGATGGAAC ----- TATTTCAATAACACGAGTAAACATG ----- -----</pre>	160 24
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>ATTCCCCGAGATGTCGGATCAAATCCACCTCCCTCCAACTTTCATCAGGCACTTTGCCTTGAATGCACACAGTACAGTTG ----- ----- -----</pre>	240 24
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>TATGGCTGAATTAACCAATGGACTAGCAAGGAAAAATACAAAGGGACTAGACATTTGTACATTTAAAGATGAAAAATGATC ----- ----- -----</pre>	320 24
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>CAATAGAGAGCCTAATTTTGTGGATGCCACACAGAGATTAGGGGTGAACCATCATTTTCGAAGGAGATTGAAGAAATT ----- ----- -----</pre>	400 24
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>CTTCGAAAAAGTTACGCAACGATGAAAACCCTAGCATCTGCAAAATACCATACTTTGCACGACGTTTCACTATTTTCTG ----- ----- -----</pre>	480 24
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>TCTGATGAGACAGCATGGACGCTATGTGTCTGCAGATGTGTTTAACAATTTCAAGGGCAGAGTGGAGGTTCAAGAAAG ----- ----- -----</pre>	560 24
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>AACTAAAACGGATACACGAGGTTTAGTGGAGTTATATGAACGGCACAACAAAGTTTGAAGGAGAACGTATACTTGAT ----- ----- -----</pre>	640 24
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>GAAGCAGAAAAATTTAGCCGTCAAAATCTCCATGGTAACTTAGCCAGCATGGAGGTAATTTGCGTAGAAGTGTAGGTAA ----- ----- -----</pre>	720 24
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>CAAACTAAGGTACCCGTTTCAATAAGAGCATCGCAAGATTCACTGGATAAACATATGATGATGATCTTGGAGGCATGTAGC ----- ----- -----</pre>	800 24
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>AATGGGGAAAAACATTAAGAGAGCTAGCCCTGATGGATTTGCAAGTGGAGCGATCCGTATACCAAGAGGAGTTGCTCCAA ----- ----- CCCTGATGGAATTGCAAGT -----</pre>	880 24 20
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>GTTTCCAACTGGTGGAAATGAGCTAGGCTTATATAAGAACTAACTCTTGCAGGAAATAGACCATTGAGCTTCATATGTG ----- ----- -----</pre>	960 24 20
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>GTCGATGGTTATACTAACAGATTATATAAACTTGTCAGAGCAGAGGAGGGAGCTCCTAAATCCGTGGCTTTTATTTACT ----- ----- -----</pre>	1040 24 20
Ama0a23 Amocs3f-For Amocs3r-Rev	<pre>TGATAGATGACATATTTGATGTGTAGGGAACACTAGATGAGCTCATATTTTTACAGAAAGCCGTAAACAAATGGGCTAT ----- ----- -----</pre>	1120 24 20

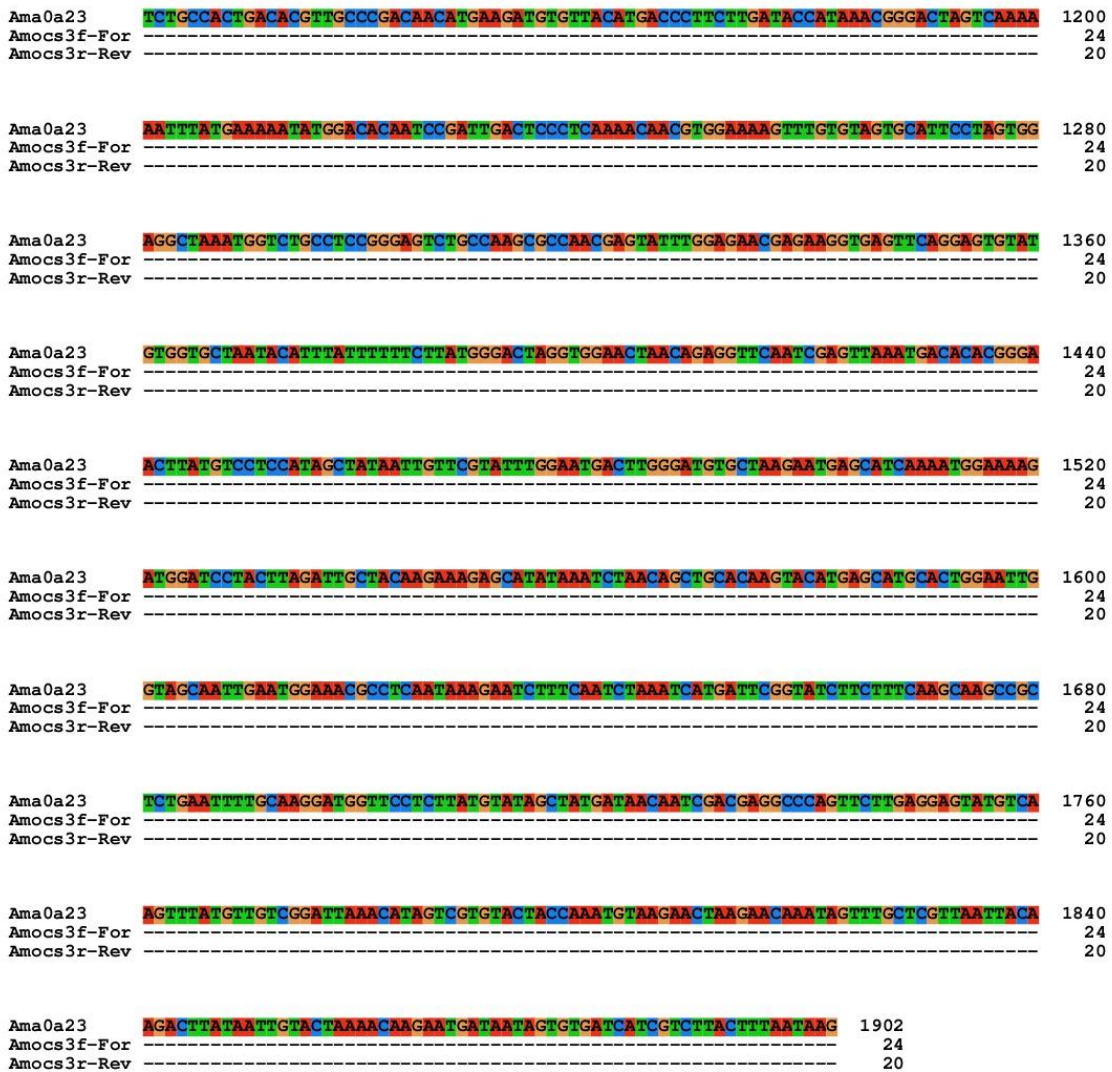


Figura 19. Alineamiento de *ama0a23* frente a los cebadores Amocs3f y Amocs3r con el programa ClustalX2.