

# Caracterización de una población de boca de dragón (*Antirrhinum majus*, L. 1753) transgénica

(Recibido: 01/04/2015; Aceptado: 21/05/2015)

Marta Isabel Terry López, Julia Weiss y Marcos Egea-Cortines Gutiérrez  
 Universidad Politécnica de Cartagena, Instituto de Biotecnología Vegetal, Genética Molecular.  
 Plaza del Hospital s/n, 30202, Cartagena  
 Teléfono: 868071085  
 Email: mitl0@alu.upct.es

**Resumen.** El reloj circadiano es un mecanismo que proporciona ventajas adaptativas y está presente en todos los seres vivos. En plantas superiores, y según el modelo establecido en *Arabidopsis thaliana*, este reloj se divide en una serie de bucles siendo los más relevantes el bucle de la mañana formado por los genes *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* y *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* entre otros, y el de la noche, en el que destaca *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*. Las plantas que presentan mutaciones en genes del reloj pueden mostrar fenotipo marcado como floración independiente del fotoperiodo o un tamaño inferior. En el presente trabajo, se estudian los posibles cambios fenotípicos en una población transgénica de *Antirrhinum majus* en la que se ha silenciado el gen *AmLHY*.

**Palabras clave.** *Antirrhinum majus*, late elongated hypocotyl (*LHY*), reloj circadiano.

**Abstract.** The circadian clock is a mechanism that provides adaptative advantages being present in all living organisms. In plants, this clock is divided into a series of loops being the most relevant morning loop formed by *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) CLOCK ASSOCIATED CIRCADIAN 1 (CCA1)* and night, which highlights *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*. Plants that have mutations may show marked phenotype independent of photoperiod flowering or smaller. In this paper, the possible phenotypic changes are studied in a transgenic population of *Antirrhinum majus* where *AmLHY* was silenced.

**Keywords.** *Antirrhinum majus*, circadian clock, late elongated hypocotyl (*LHY*)

## 1. Introducción

El reloj circadiano es un mecanismo autorregulado y endógeno presente en todos los organismos, desde bacterias hasta humanos, resultado de la alternancia del día y la noche como consecuencia de la rotación de la Tierra que proporciona una serie de ventajas adaptativas. En plantas los componentes más importantes de este reloj son *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATE HYPOCOTYL (LHY)* y *TIMING OF CAB2 EXPRESSION 1 (TOC1)*, *CCA1* y *LHY* están estrechamente relacionados y se expresan durante el día, plantas con ambos genes mutados muestran una floración temprana en condiciones normales de luz-oscuridad (LD) y un fenotipo “semi-enano” [1]. Por otro lado *TOC1* tiene su pico de expresión durante la noche estableciéndose así un complejo sistema de bucles de retroalimentación. La mutación en el gen *LHY* afecta a la regulación del reloj circadiano y causa que la floración sea independiente del fotoperiodo [2] aunque se pueden observar ciertas actividades circadianas en ciclos de luz-oscuridad (LD) lo que indica que existen otros elementos responsables de mantener el reloj circadiano [3]. En el presente trabajo, se caracteriza la segunda

generación, T2, de una población de plantas transgénicas, en la que se silenció el gen *LHY*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Condiciones de cultivo

Semillas de la línea transgénica T0 27 fueron sembradas y tres líneas T1 (27-15, 27-17 y 27-X) fueron seleccionadas para un análisis exhaustivo de las poblaciones T2 resultantes. Las semillas de la T2 se germinaron en vermiculita y se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura de 23°C y 18°C durante el día y la noche, respectivamente. Posteriormente, se trasladaron a uno de los invernaderos de la Finca Experimental Tomás Ferro donde se trasplantaron un total de 35 plantas (Tabla 1), utilizando una mezcla de perlita, vermiculita y turba en proporción 1:1:2

Tabla 1. Grupos pertenecientes a la línea 27.

|               | 27-15                      | 27-17   | 27-X     |
|---------------|----------------------------|---------|----------|
| Población (n) | 18                         | 6       | 11       |
| Nº de planta  | 2, 3, 6, 7, 11, 12, 13, 16 | 1, 3, 6 | 5, 7, 10 |

## 2.2. Mediciones

Se midió la altura total, altura al primer entrenudo y número de entrenudos de todas las plantas. Además, se anotó el número de plantas en floración y se midieron 11 parámetros florales distintos (numerados en este orden, del 1 al 11): longitud del tubo, longitud inferior, altura del pétalo, longitud del sépalo, anchura del tubo, longitud superior (total), expansión del pétalo inferior, expansión del pétalo superior, longitud del estambre, longitud del gineceo y paladar [ver esquema, 4], por triplicado, de 8 plantas de la línea 27-15 y 3 plantas de las líneas restantes (ver Tabla 1 "Nº de planta" para más detalles).

## 2.3. Estadística

El análisis de los datos se realizó con el entorno de programación para análisis estadístico y gráfico R, versión 3.1.3 [5].

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Medidas de las plantas

En la Fig. 1 se muestran los resultados obtenidos, en centímetros, altura total, altura al primer entrenudo y número de entrenudos, para los tres grupos y el promedio de la población. Se realizó una ANOVA para cada una de estas medidas, sólo la altura al primer entrenudo fue significativamente distinto en la línea 27-X (ver Tabla 2).

Tabla 2. ANOVA: altura al primer entrenudo.

|   | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr (>F)  |
|---|----|--------|---------|---------|----------|
| Alt. entr.  | 2  | 7,32   | 3,66    | 2,67    | 0,0846 . |
| Residuals   | 32 | 43,85  | 1,37    |         |          |
| Signif. Cod.: 0 '****' 0,001 '***' 0,01 '**' 0,05 '.' 0,1 '.' 1 |    |        |         |         |          |

Aunque se observaron diferencias en la altura total y en el tiempo de floración de algunos de los ejemplares, como se puede ver en la Fig. 2, no fue estadísticamente significativa por lo tanto, esta población no mostró un fenotipo "semi-enano" como el descrito en mutantes LHY de *Arabidopsis thaliana* [1, 6, 7].

En cuanto a la floración, de las 35 plantas, 29 presentaban flores (82.5%); en la línea 27-15 se observaron flores en el 77.77%, la línea 27-17, el 83.33% y finalmente, en la línea 27-X, el 90.90%. A lo largo del desarrollo de esta población no se observó un marcado retraso en la floración.

En cambio, se encontraron diferencias en el tamaño de las flores (ver ANOVA, Tabla 3), la longitud total (M6), longitud del estambre (M9), longitud del gineceo (M10) y paladar (M11), fueron mayores en las flores pertenecientes a la línea 27 X; paladar fue también mayor en la línea 27-17. En la Fig. 3 se muestran, expresadas en centímetros, las medidas de los once parámetros florales analizados.

Tabla 3. ANOVA: medidas flor.

|   | Df | Sum Sq  | Mean Sq  | F value | Pr (>F)  |
|---|----|---------|----------|---------|----------|
| Parám_M6  | 2  | 0,1157  | 0,05783  | 5,124   | 0,0268 * |
| Residuals   | 12 | 0,1241  | 0,01129  |         |          |
| Parám_M9  | 2  | 0,09162 | 0,04581  | 3,203   | 0,0801 . |
| Residuals   | 11 | 0,15731 | 0,01430  |         |          |
| Parám_M10   | 2  | 0,05899 | 0,029495 | 3,29    | 0,0759 . |
| Residuals   | 11 | 0,09861 | 0,008964 |         |          |
| Parám_M11   | 2  | 0,03848 | 0,019242 | 4,332   | 0,041 *  |
| Residuals   | 11 | 0,04886 | 0,004442 |         |          |
| Signif. Cod.: 0 '****' 0,001 '***' 0,01 '**' 0,05 '.' 0,1 '.' 1 |    |         |          |         |          |

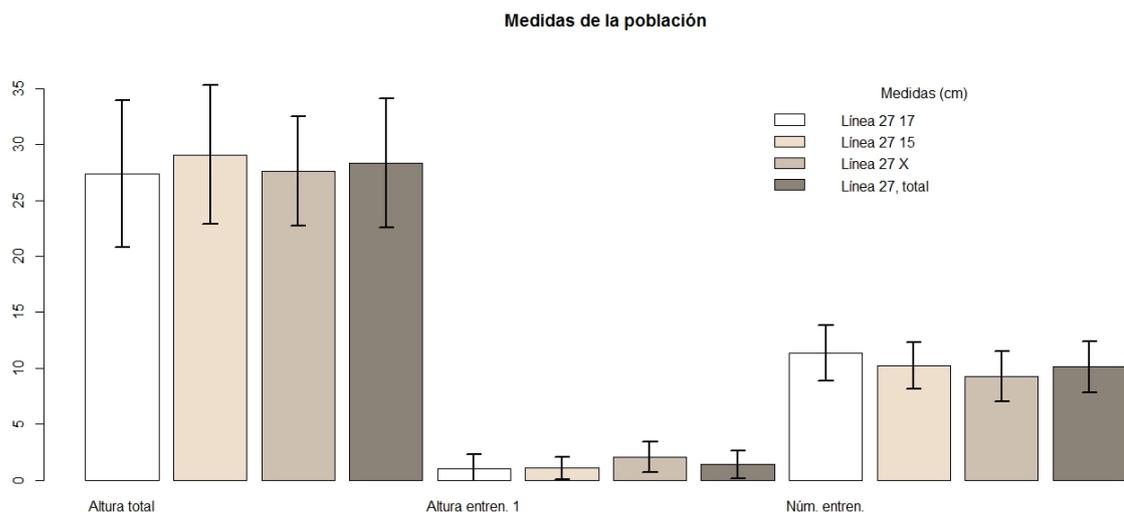


Fig.1. Medidas.



Fig.2. Ejemplares de *Antirrhinum majus* de la población, 27-15-5 (izquierda) y 27-17-4 (derecha).

En resumen, la altura y el periodo de floración no parecen estar afectados en esta población, además de *LHY*, otros genes circadianos como *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*, *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)* o *LUX ARRHYTHMO (LUX)* también intervienen en el desarrollo floral y en la regulación del crecimiento del hipocótilo [6, 7, 8]. Sin embargo, se han detectado cambios importantes en el tamaño floral, éste está controlado genéticamente, y se conocen varios mutantes en esta especie que presentan flores de menor tamaño [9] y determinados genes, como *AINTEGUMENTA (AtANT)*, que sobreexpresados causan un incremento en la longitud de la flor [10]. Por lo tanto, el fenotipo de silenciamiento del gen *LHY* no coincide con el fenotipo del mutante *LHY* de *Arabidopsis*. El mutante semienano y de floración temprana “nana” de *A. majus* posiblemente está relacionado con otros genes.

## Referencias

[1] Miyata, K., Calviño, M., Oda, A., et al. (2011). “Supresion of late-flowering and semi-dwarf phenotypes in the arabidopsis clock mutant *lhy-12;cca1-101* by *phyB* under continuous light”. *Plant Signaling & Behavior*, pp. 1-10, vol. 6 (8).

- [2] Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., et al. (1998). “The late elongated hypocotyl Mutation of *Arabidopsis* Disrupts Circadian Rhythms and the Photoperiodic Control of Flowering”. *Cell*, pp. 1219-1229, vol. 93.
- [3] Alabadí, D., Yanovski, M.J., Más, P., et al. (2002). “Critical Role for *CCA1* and *LHY* for Maintaining Circadian Rhythmicity in *Arabidopsis*”. *Current Biology*, pp. 757-761, vol. 12.
- [4] Bayo-Cahna, A., Delgado-Benarroch, L., Weiss, J., Egea-Cortines, M. (2007). “Artificial decrease of leaf area affects inflorescence quality but no floral size in *Antirrhinum majus*”. *Scientia Horticulturae*, pp. 383-386, vol. 113.
- [5] The R Project for Statistical Computing: <http://www.r-project.org>
- [6] Yoshida, R., Fekih, R., Fujiwara, S., et al. (2009). “Possible role of *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* in clock-dependent floral regulation by *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* in *Arabidopsis thaliana*”. *New Phytologist*, pp. 838-850, vol. 182 (4).
- [7] Song, H. (2012). “Interaction between the Late Elongated Hypocotyl (*LHY*) and Early flowering 3 (*ELF3*) genes in the *Arabidopsis* circadian clock”. *Genes & Genomics*, pp. 329-337, vol. 34.
- [8] Nusinow, D.A., Helfer, A., Hamilton, E.E., et al. (2011). “The *ELF4-ELF3-LUX* complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth”. *Nature*, pp. 398-402, vol. 475 (7356).
- [9] Weiss, J., Delgado-Benarroch, L., Egea-Cortines, M. (2005). “Genetic control of floral size and proportions”. *International Journal of Developmental Biology*, pp. 513-525, vol. 49 (5-6).
- [10] 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*, pp. 1053-1065, vol. 12 (8).

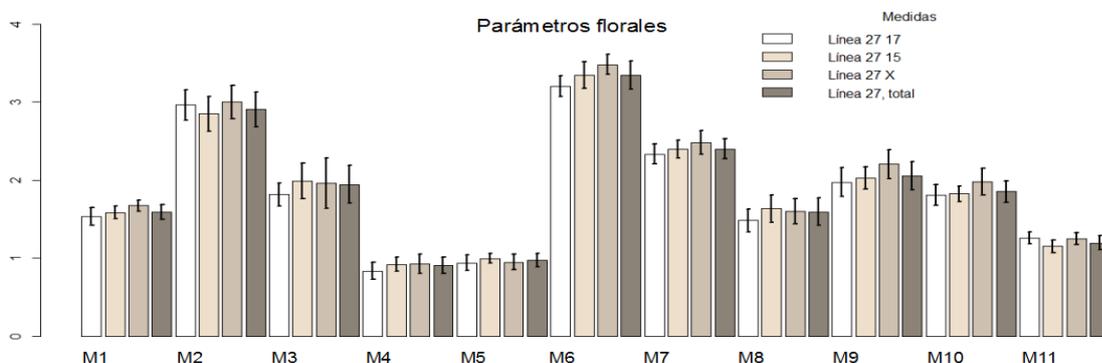


Fig.3. Parámetros florales.