

CLONACIÓN DE GENES ASOCIADOS A ESTRÉS HÍDRICO DE *Bouteloua gracilis*

F. J. Sandoval Domínguez¹, A. Aguado Santacruz², S. Arévalo-Gallegos¹, B. Rivera Chavira¹, Q. Rascón-Cruz¹.

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Cd. Universitaria s/n, CP 31170, Chihuahua, Chih., México. Tel (+52) 614414-4492. grascon@uach.mx ²Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km. 6.5, AP 112, CP 38010 Celaya Gto México.

INTRODUCCIÓN. Las regiones secas del mundo abarcan alrededor de 42 millones de km² lo cual equivale cerca del 30% de la superficie terrestre. En el norte México la cantidad de lluvia representa menos de 40% de la precipitación total del país, esta región es altamente vulnerable a impactos causados por sequías. En el Estado de Chihuahua, la precipitación pluvial es muy variable, se presentan años con cantidades normales o abundantes seguidos por otros escasos. Entre el año 1993 y 2004 la precipitación fue menor al promedio histórico (CNA, 2003). Existe una gran diversidad de flora en esta región, dentro de esta *Bouteloua gracilis* comúnmente conocida como “navajita azul”, resulta la gramínea más importante de los pastizales semiáridos de México. Esta planta tiene la capacidad de crecer en zonas con condiciones climáticas extremas y poca precipitación. *B. gracilis* constituye una buena fuente de forraje para todas las clases de ganado y fauna silvestre de esas áreas (Stubbenieck et al., 1986). Una forma de entender los mecanismos mediante los cuales tiene resistencia al estrés hídrico, es estudiar su genotipo y compararlo con especies muy similares las cuales no presentan esta resistencia.

METODOLOGÍA. Se extrajo RNA total de tejido de *B. gracilis* utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) y posteriormente se purificó el mRNA utilizando perlas magnéticas Dynabeads (Biotech). Se obtuvo el cDNA de los genes SOD, G3P, BAGH y CMO del mRNA por medio de RT-PCR en dos pasos (High Fidelity RT-PCR Kit, MasterAmp™), utilizando juegos de primers basando su diseño en genoma de maíz. Se reparan los extremos de los cDNA y se clonaron utilizando el Kit pMOS Blue Blunt Ended Cloning (GE Healthcare) y se introducen a células competentes *E. coli* DH5α por choque térmico (protocolo del Kit pMOS Blue) o electroporación (BIO-RAD MicroPulser). Se extrae el plásmido y se verifica el tamaño del inserto por PCR, se secuencian y se introduce en un banco de genes (NCBI) para su identificación. Posteriormente se subclona en un vector de expresión pET-32 (Novagen) y se induce la expresión con IPTG, se extrae las proteínas para analizar la proteína por SDS-PAGE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. Se diseñaron los primers para los diferentes genes basándose en el genoma del maíz reportado en el CNBI (Cuadro 1). En la fig 1 se muestra el mRNA concentrado tanto de *Z. mays* como *B.*

gracilis y en la fig 2 la amplificación de SOD por PCR con el juego de primers SOD.

Cuadro 1: Primers diseñados a partir de genoma de maíz publicado en el banco de genes NCBI.

Primer	Secuencia	NCBI
BADH 5'	GATGATGGCCTCGCAAGC	AY587278
BADH3'	TCCAAGCTGTAAACTGGCAA	AY587278
CMO 5'	GACCCCTGTGCGCACTCGT	DQ864498
CMO 3'	TGGACGCATCTTGCAAAGT	DQ864498
G3P 5'	CGTCGTCTCTAGCTCCT	BT016419
G3P 3'	TGTTCAAGACCCAGTAGGGG	BT016419
SOD 5'	CCTCCCAAAGTCCCAAAGG	BT041068
SOD 3'	TCCATTGTAGGTTGCTCGC	BT041068

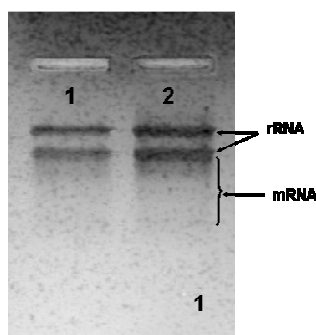


Fig 1: Carril 1: mRNA de *Z. mays* y carril 2: mRNA de *B. gracilis*.

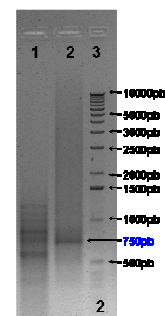


Fig 2: carril 1: PCR para SOD con mRNA de *Z. mays*, carril 2: PCR para SOD con mRNA de *B. gracilis* y carril 3: MPM 1Kb.

CONCLUSIONES. La amplificación obtenida con los primers para SOD se encuentra ligeramente arriba de lo esperado que son 630pb para el *sod* de *Z. mays* por lo que para confirmar que sea el gen deseado se debe secuenciar y comparar con la secuencia de maíz.

BIBLIOGRAFÍA

1. CNA (Comisión Nacional del Agua). 2003. Programa Hidráulico Regional 2002-2006 Región VI Río Bravo. 1ª Edición. México, D. F. 242 p.
2. Stubbenieck. J., Hatch, S. and Hirsch, K., 1986., North America Range Plants Third ed., University of Nebraska Press. 465p.