



## CLONACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE GENES DE *Bouteloua gracilis* EXPRESADOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO

Perla Ordóñez-Baquera., Gerardo Aguado-Santacruz., Sigifredo Arévalo-Gallegos., Blanca Rivera-Chavira., Armando Segovia-Lerma., Carlos Calderón-Ligné, Quintín Rascón-Cruz\*. \*Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Cd. Universitaria s/n, CP 31070, Chihuahua, México. (614)414-4492 qrascon@uach.mx

*Palabras clave:* *Bouteloua*, EST's, estrés hídrico.

**Introducción.** La escasa precipitación que se presenta sobre la mayor parte de nuestro país, limita grandemente la producción agrícola en zonas de temporal. En consecuencia, la obtención de variedades de plantas con una mayor tolerancia al estrés hídrico ha sido uno de los objetivos fundamentales en el mejoramiento genético de plantas. En este sentido se identificó una especie de pasto con alto grado de resistencia a la sequía *Bouteloua gracilis*, lo que la convierte en un candidato ideal para el estudio del estrés hídrico, principalmente para la identificación de los genes que le confieren esta característica. En nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado una línea celular de pasto (a partir de células clorofílicas) que podría ser un excelente modelo para el análisis de los mecanismos celulares que capacitan a *B. gracilis* para enfrentar las condiciones limitantes de agua (1). Las bibliotecas sustractivas de cDNA son una herramienta con un gran potencial ya que ofrecen la ventaja de comparar dos poblaciones de mRNA y aislar los cDNA's de genes que son tanto sobre expresados o exclusivamente expresados en una de las dos poblaciones comparadas (2). El objetivo del presente trabajo consiste en la realización de bibliotecas sustractivas de *B. gracilis* y la clasificación en clusters de acuerdo a su función para una posterior identificación de los genes responsables de la resistencia a estrés hídrico.

**Metodología.** Se purificó mRNA utilizando Dynabeads (DynaL, OSLO) en dos condiciones de cultivo, 0% y 14% de Polietilenglicol. Se utilizó el kit para bibliotecas sustractivas Clontech PCR-Select (Clontech, USA). La secuenciación se realizó en el laboratorio de Genómica del CINVESTAV- Irapuato. Las secuencias resultantes filtradas, se compararon en la base de datos://ira.cinvestav/mazorka.html. Los niveles de mRNA se analizaron por Northern blot como se describe (3).

**Resultados y discusión.** La biblioteca sustractiva generada en condiciones de estrés osmótico produjo 261 clonas con secuencias filtradas de alta calidad. Los resultados de homología con la base de datos indican que de los 261 genes secuenciados; un alto porcentaje codifican para proteínas de función desconocida (44%), en las cuales probablemente encontremos los genes responsables de resistencia a estrés, el resto (56%) se clasificaron en 10 diferentes categorías, de acuerdo a su función (Figura 1). 184 genes (71%) se encontraron en uno de los 41 clusters que se formaron y 77 (29%) se encontraron de forma individual (Cuadro 1), lo que sugiere que los genes en clusters tienen un alto nivel de expresión debido probablemente a la carencia de agua.

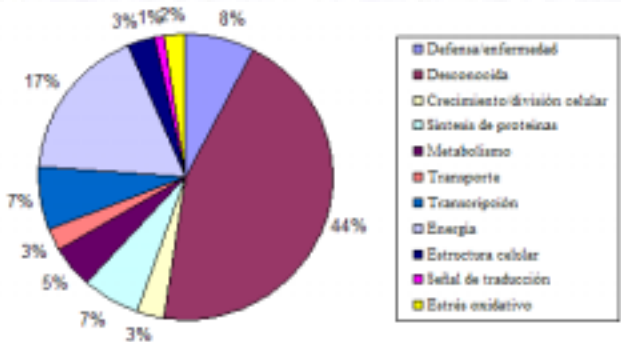


Figura 1. Clasificación de genes de B.g. de acuerdo a su función

Cuadro 1. Porcentaje de formación de clusters.

Genes	Número	%
Cluster	184	70.49
Individuales	77	29.51
<b>Total</b>	<b>261</b>	<b>100</b>

Los resultados del análisis de niveles de expresión de genes (mRNAs) para senescencia y clorofila a y b concuerdan con los datos de las bibliotecas, debido a que ambos genes fueron clasificados juntos y representan en número y expresión el grupo de genes mas importante en la biblioteca.

**Conclusiones.** Se clonaron y secuenciaron genes específicos de células clorofílicas de *B. gracilis* en condiciones de estrés hídrico. Se encontró correlación entre la clasificación de genes y los niveles de expresión de los mensajeros. Dentro de la clasificación 'desconocido' puede haber genes con potencial aplicación en biotecnología.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el apoyo otorgado por FCQ-UACH y CONCyTEG.

### Bibliografía.

- Aguado G., Cabrera J., Ramírez E., León, C., Rascón, Q., Herrera L. y Olalde, V. (2001). Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K) Lag. Ex Steud. Plant Cell Reports. (20):131-136.
- Yamamoto K. y Sasak T. (1997). Large-scale EST sequencing in rice. Plant Mol. Bio., (35):135-144.
- Rascón-Cruz, Q., Sinagawa-García S., Osuna-Castro J., Bohorova N. y Paredes-López O. (2004) Assembly, accumulation and digestibility of amarantine expressed in endosperm of transgenic tropical maize. Theor. Appl. Genet. 108:335-342.