

Aislamiento y Caracterización de Genes de la Biosíntesis de Ligninas de *Brachiaria decumbens* Stapf



C.P. Flórez¹, M. Emmerling², G. Spangenberg² y Z. Lentini¹



¹Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) - AA 6713 Cali-Colombia

²Agriculture Victoria - La Trobe University, Plant Biotechnology Centre Victoria 3086 Australia

Introducción

Las especies de *Brachiaria* constituyen un importante componente dentro de las pasturas sembradas en las tierras húmedas – bajas de las zonas tropicales de América, Asia, África, el Pacífico Sur y Australia. Los cultivares más utilizados en estas regiones son: *B. decumbens* cv Basilisk, *B. brizantha* cv Marandú, *B. humidicola* cv Humidicola y *B. dictyoneura* cv Llanero. Particularmente *B. decumbens* posee características excepcionales tales como excelente adaptación a suelos ácidos, agresividad y buena calidad nutricional. Hasta hace algún tiempo el mejoramiento genético de *Brachiaria* se basaba en la selección de genotipos existentes en la naturaleza. Por largo tiempo la recombinación genética entre las especies de éste género fue prácticamente imposible debido a su reproducción apomítica y a los diferentes niveles de ploidía existentes entre ellas. No obstante, debido al entendimiento de la citogenética de este género y a la creación de un tetraploide sexual de *B. ruziziensis*, hoy en día es posible la recombinación genética dentro del grupo de *B. decumbens* y *B. brizantha*, utilizando como puente *B. ruziziensis* (Miles & do Valle, 1996).

Recientes avances en la manipulación genética de plantas han generado evidencia convincente que sugiere que esta poderosa tecnología puede complementar los programas de mejoramiento tradicional de gramíneas forrajeras. El mejoramiento molecular para calidad nutricional basado en la transgénesis, puede ser enfocado en características individuales relacionadas tales como digestibilidad de la materia seca, contenido de carbohidratos solubles y metabolitos secundarios. La mayoría de estos parámetros de calidad están asociados con rutas metabólicas específicas y por tanto con la producción de proteínas determinadas. Esto permite que dichas proteínas puedan ser identificadas, los correspondientes genes aislados y su expresión manipulada en plantas transgénicas. Se sabe que pequeños cambios en la calidad nutricional de cultivos forrajeros lideran un gran cambio en la producción animal (Casler & Kaeppeler, 2001).

Por tal razón, CIAT con la colaboración del Plant Biotechnology Centre – Australia en el aislamiento y caracterización de genes de calidad nutricional involucrados en la biosíntesis de ligninas (fig. 1) de *B. decumbens*.

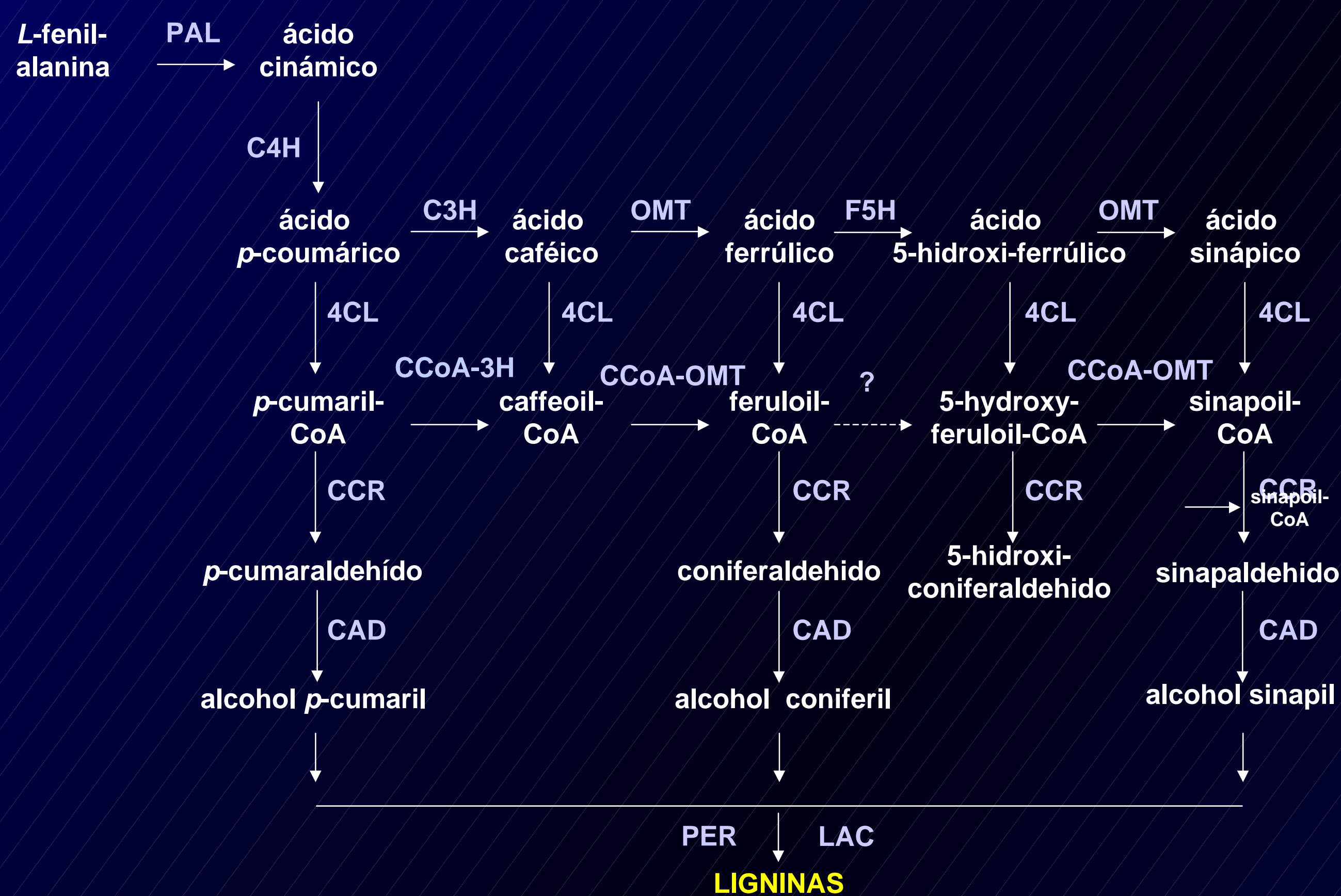


Figura 1. Ruta de la biosíntesis de ligninas

Metodología

⇒ Extracción de ARN total y Purificación de ARNm

Se aisló ARN total de raíces y hojas de plántulas de 10 días de *Lolium perenne* y *B. decumbens* de acuerdo al protocolo establecido por Chang *et al.*, 1993. Se limpió el ARN total utilizando el Kit de QIAGEN RNEasy. El RNAm se aisló usando el kit Oligotex mRNA de QIAGEN.

⇒ Análisis Northern Blot

Se utilizaron de 15 – 20 µg de ARN por línea. Se utilizaron como sondas los ADNc de los clones *OMT-1*, *4CL-2*, *CCR-1* y *CAD-1* de *L. Perenne*.

⇒ Construcción y Evaluación de la Librería de ADNc Uni-ZAO XR

Para la construcción de la librería direccionada de ADNc se utilizó el kit de Stratagene cDNA Synthesis. Para el empaquetamiento de la librería se escogió el kit de Stratagene GigaPack Gold III. La librería fue evaluada con las sondas *OMT-1*, *4CL-2*, *CCR-1* y *CAD-1* de *L. Perenne* marcadas con dCTP[P³²]. Se evaluaron un total de 2,5 x 10⁵ pfu para cada una de las sondas escogidas. Los insertos de ADNc fueron escindidos y recircularizados usando el fago ExAssist – Helper con la cepa SOLR (Stratagene) como describe el fabricante.

⇒ Secuenciación del ADN

Los clones seleccionados se secuenciaron siguiendo el método de Sanger usando los cebadores M13r y M13f. Para secuenciar la parte interna del gen se diseñaron cebadores a partir de la secuencias previamente determinadas. Para la reacción de secuencia se utilizó el kit ABI BigDye Terminator Version 3. La secuencia de nucleótidos fue alineada usando el programa SeqEd (ABI).

Resultados

⇒ Aislamiento de genes de la biosíntesis de ligninas de *Brachiaria*

El análisis Northern se realizó para determinar la homología existente entre los genes de la biosíntesis de ligninas de *L. perenne* y los de *Brachiaria*. Los resultados indican que los transcritos *OMT-1*, *4CL-2* y *CCR-1* están presentes en hojas y raíces jóvenes de *B. decumbens* (Figura 2). Estos transcritos se expresan mayormente en raíces que en hojas. Se confirma la presencia de genes endógenos *OMT*, *4CL* y *CCR* en *Brachiaria*.

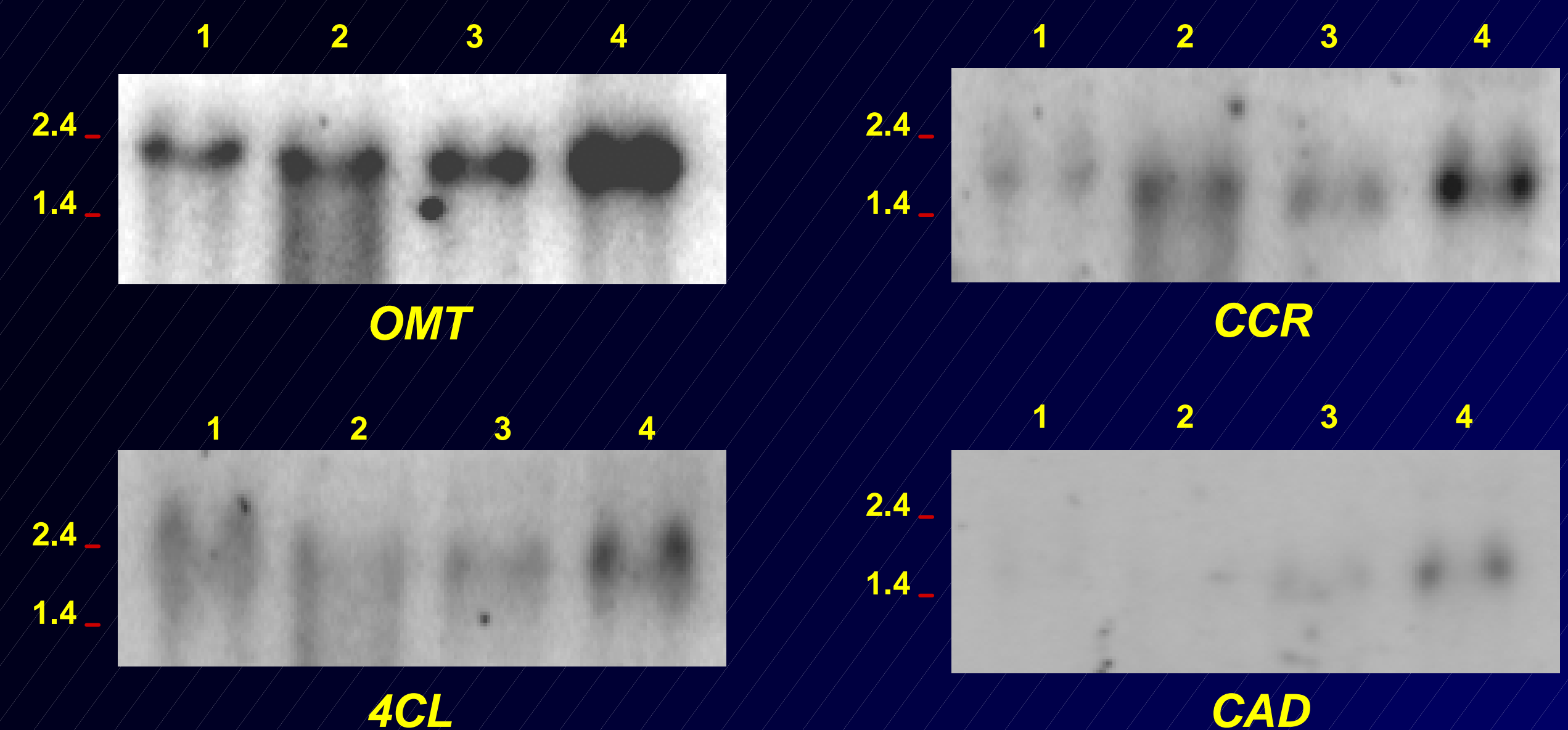


Figura 2. Hibridación Northern. 1. 2. Hojas y raíces de plántulas de 10 días de *B. decumbens* 3. 4. Hojas y raíces de plántulas de 10 días de *L. perenne*.

⇒ Aislamiento del gen *OMT* de *Brachiaria*

Se aisló y secuenció completamente un gen de la O-MetilTransferasa de *B. decumbens* (*BdOMT*). Este gen tiene un tamaño de 1,410 bp con un marco de lectura (ORF) de 1,083 bp, una región no codificante en 5' de 62 bp y en 3' de 256 pb incluyendo la polyA. Dentro de la región codificante *BdOMT* presenta una identidad en la secuencia de aminoácidos del 89%, 88%, 77% y 87% con los O-MTs identificados en caña de azúcar (So), sorgo (Sb), Lolium (Lp) y maíz (Zm) respectivamente. Se destaca la clara separación entre los O-MTs aislados de plantas mono y dicotiledóneas (Figura 3).

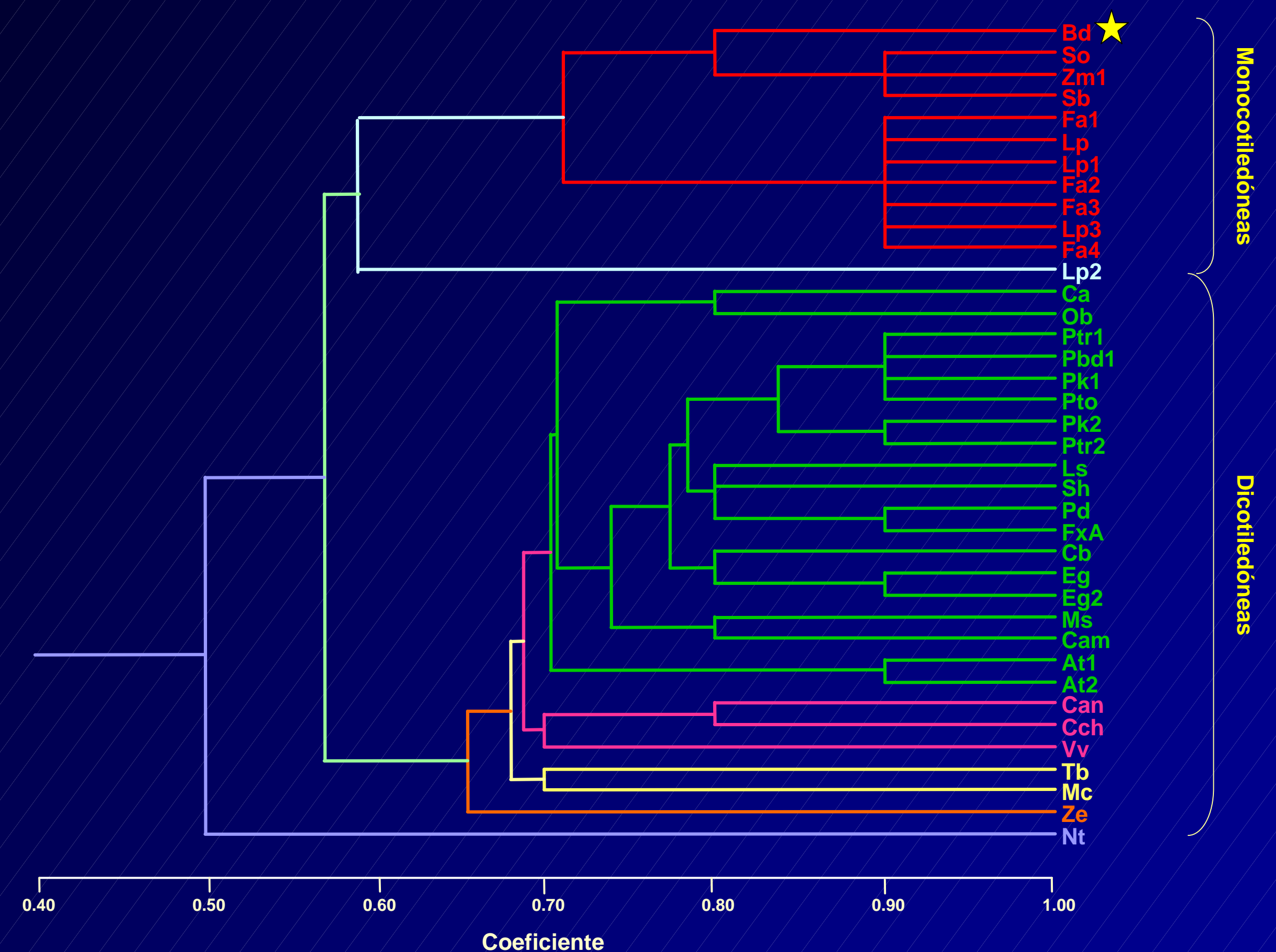


Figura 3. Dendrograma de similaridad genética que muestra la relación existente entre las secuencias de aminoácidos de OMTs de plantas.

Perspectivas

- ⇒ Clonar el gen *BdOMT* en vectores para *Agrobacterium* y biolística
- ⇒ Regular la expresión del *BdOMT* en plantas transgénicas de *Brachiaria* y tabaco.

REFERENCIAS

CASLER, M.D. y KAEPLER, H.F. 2001. Molecular Breeding of Forage Crops. Kluwer Academic Publishers. p 175-188
CHANG, PURYEAR y CAIRNEY. 1993. Plant Mol. Bio. Rep. 11 (2) p 113 – 116.
MILES, J. W. y VALLE, C. B. do. 1996. *Brachiaria*: Biology, Agronomy and Improvement. CIAT. p 164 - 167.