

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS DE GENES
EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN *Brachiaria decumbens* Sttapff cv.
Basilisk, ASOCIADOS A LA RESISTENCIA AL ESTRÉS POR ALUMINIO (Al^{+3})
EN SUELOS ACIDOS**



MARTIN EMILIO RODRIGUEZ-MOSQUERA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA DE POSGRADO

PALMIRA

2008

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS DE GENES
EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN *Brachiaria decumbens* Sttapff cv.
Basilisk, ASOCIADOS A LA RESISTENCIA AL ESTRÉS POR ALUMINIO (Al^{+3})
EN SUELOS ACIDOS**

MARTIN EMILIO RODRIGUEZ-MOSQUERA

meromoskera@yahoo.es

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en CIENCIAS AGRARIAS,
AREA FITOMEJORAMIENTO**

DIRIGIDO POR:

Manabu Ishitani. Ph.D.

Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT

Idupulapati M. Rao. Ph.D

Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT

Karina López López. Ph.D.

Universidad Nacional de Colombia sede Palmira

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA DE POSGRADO

PALMIRA

2008

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Palmira, 25 Octubre de 2008

La facultad y los jurados de tesis no se harán responsables de las ideas emitidas por el autor.

Artículo 24, resolución 04 de 1974

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. FORMULACION DE HIPOTESIS.....	2
3.....	3
4. OBJETIVOS	3
OBJETIVO GENERAL:	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	3
5. MARCO DE REFERENCIA.....	4
GÉNERO <i>Brachiaria</i>	4
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk.	4
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandú (Hochst. ex A. Rich.) Stapf.	5
<i>Brachiaria ruziziensis</i> cv. Kennedy.	5
EL ALUMINIO.....	5
EL ALUMINIO EN SUELOS ACIDOS.....	6
EFECTOS DEL ALUMINIO EN EL TEJIDO VEGETAL.....	7
MECANISMOS DE TOLERANCIA Y/O RESISTENCIA AL ESTRÉS POR ALUMINIO	9
RELACIÓN ENTRE ALUMINIO Y FÓSFORO.....	11
LAS ENZIMAS HIDROLASAS EN LA RESISTENCIA A ALUMINIO.....	13
ANTECEDENTES EN EL AISLAMIENTO DE GENES	15
GENÓMICA FUNCIONAL	18
LIBRERÍAS SUBSTRACTIVAS.....	18
HIBRIDACIÓN SUBSTRACTIVA POR SUPRESIÓN (SSH).....	19
DIFERENCIAL DISPLAY.....	19
PCR EN TIEMPO REAL O PCR CUANTITATIVO (qPCR).....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Lugar de trabajo	21
Material Vegetal	21
Esterilización del Material Vegetal.....	21
Germinación de Semillas de <i>Brachiaria</i>	21
Análisis Fisiológico	22
Variación genotípica en la resistencia a aluminio	23
Diferentes concentraciones de aluminio	23

Estrés por Cloruro de Sodio (NaCl)	24
Influencia del pH en el crecimiento radicular	24
Extracción y purificación de ácidos nucleicos de <i>B. decumbens</i>	24
Extracción de DNA genómico	24
Aislamiento de ARN Total.....	25
Síntesis de cDNA de <i>Brachiaria</i>	26
Purificación de bandas de DNA desde geles de agarosa.....	26
Ligación de fragmentos de DNA	26
Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	27
Extracción y purificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	27
Análisis de expresión de 18 genes candidatos con PCR en tiempo real	27
Amplificación Rápida de los Extremo 3' del cDNA (RACE)	28
Amplificación Rápida de los Extremo 5' del cDNA (RACE)	28
Análisis de Datos.....	31
7. RESULTADOS	32
Análisis Fisiológico	32
Respuesta de <i>Brachiaria</i> a otros factores que causan estrés.....	35
Análisis Molecular	37
Extracción de ácidos nucleicos.....	37
Análisis de expresión de 18 genes candidatos relacionados con la resistencia al estrés por aluminio.....	38
Análisis de expresión de 7 genes candidatos en puntas de raíces.....	43
Análisis de expresión de 7 genes candidatos en tejido foliar.....	49
Análisis de expresión de 7 genes candidatos en presencia de NaCl.....	49
Amplificación Rápida de los Extremo 5' y 3' de cDNA (RACE).....	¡Error! Marcador no definido.
Evaluación de otros genes de tolerancia al Al aislados en otras especies	57
Secuencia parcial de un homologo de <i>ALMT1</i>	58
8. DISCUSION.....	64
9. CONCLUSIONES	75
10. PERSPECTIVAS	76
11. BIBLIOGRAFIA.....	77
12. ANEXOS.....	90

LISTA DE FIGURAS

ILUSTRACIÓN 1 MONTAJE PARA EVALUACION FISIOLÓGICA	23
ILUSTRACIÓN 2 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ POR ALUMINIO	32
ILUSTRACIÓN 3 CRECIMIENTO DE RAÍCES DE BRACHIARIA EN CULTIVOS HIDROPÓNICOS EN PRESENCIA DE ALUMINIO	34
ILUSTRACIÓN 4 CRECIMIENTO RADICULAR DE DOS ESPECIES DE BRACHIARIA SOMETIDAS A DOS PH DIFERENTES	36
ILUSTRACIÓN 5 CRECIMIENTO RADICULAR DE DOS ESPECIES DE BRACHIARIA SOMETIDAS A DOS CONCENTRACIONES DIFERENTES DE CLORURO DE SODIO	36
ILUSTRACIÓN 6 FOTOS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	37
ILUSTRACIÓN 7 PRUEBA DE CONTAMINACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CDNA CON ADN	38
ILUSTRACIÓN 8 EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES ACTIVADOS POR ESTRÉS DE ALUMINIO EN BRACHIARIA	40
ILUSTRACIÓN 9 NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN ALBDEC3 EN RAÍCES DE PLÁNTULAS DE BRACHIARIA SOMETIDAS A ESTRÉS POR ALUMINIO	44
ILUSTRACIÓN 10 NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN ALBDEC5 EN RAÍCES DE PLÁNTULAS DE BRACHIARIA SOMETIDAS A ESTRÉS POR ALUMINIO	45
ILUSTRACIÓN 11 NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN ALBDEC8 EN RAÍCES DE PLÁNTULAS DE BRACHIARIA SOMETIDAS A ESTRÉS POR ALUMINIO	45
ILUSTRACIÓN 12 NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN ALBDEC8 EN RAÍCES DE PLÁNTULAS DE BRACHIARIA SOMETIDAS A ESTRÉS POR ALUMINIO	46
ILUSTRACIÓN 13 NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN ALBDEC14 EN RAÍCES DE PLÁNTULAS DE BRACHIARIA SOMETIDAS A ESTRÉS POR ALUMINIO	47
ILUSTRACIÓN 14 NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN ALBDEC15 EN RAÍCES DE PLÁNTULAS DE BRACHIARIA SOMETIDAS A ESTRÉS POR ALUMINIO	48
ILUSTRACIÓN 15 NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN ALBDEC16 EN RAÍCES DE PLÁNTULAS DE BRACHIARIA SOMETIDAS A ESTRÉS POR ALUMINIO	48
ILUSTRACIÓN 16 NIVELES DE EXPRESIÓN DE 7 GENES CANDIDATOS EN HOJAS DE PLÁNTULAS DE BRACHIARIA SOMETIDAS A ESTRÉS POR ALUMINIO	51
ILUSTRACIÓN 17 NIVELES DE EXPRESIÓN DE 7 GENES CANDIDATOS EN RAÍCES SOMETIDAS A 100MM DE NaCl	52

ILUSTRACIÓN 18 FRAGMENTOS DE CDNA DEL GEN ALBDEC10 OBTENIDOS CON RACE-----	54
ILUSTRACIÓN 19 RESULTADO DEL ALINEAMIENTO DE LAS DOS SECUENCIAS ORF DEL GEN ALBDEC10 -----	55
ILUSTRACIÓN 20 SECUENCIA CONSENSO DEL GEN ALBDEC10 -----	56
ILUSTRACIÓN 21 ALINEAMIENTO DE LA PROTEÍNA HIPOTÉTICA DHH DE ORYZA SATIVA (CULTIVAR INDICA) Y LA HIPOTÉTICA DEL GEN ALBDEC10 DE B. DECUMBENS -----	58
ILUSTRACIÓN 22 SECUENCIA PARCIAL DEL GEN HOMOLOGO DE TAALMT1 OBTENIDA EN B. DECUMBENS -----	59
ILUSTRACIÓN 23 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DE B. DECUMBENS CON SECUENCIAS DEL GEN ALTM1 OBTENIDAS EN TRITICUM AESTIVUM, SECALE CEREALE Y HORDEUM VULGARE -----	59
ILUSTRACIÓN 24 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN HOMOLOGO TAALMT1 EN B. DECUMBENS Y EN B. RUZIZIENSIS.-----	60
ILUSTRACIÓN 25 RESULTADO DEL ANÁLISIS BLAST CON EL GEN HOMOLOGO STOP1 AISLADO DESDE B. DECUMBENS COMPARADO CON O. SATIVA Y A. THALIANA -----	61
ILUSTRACIÓN 26 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN HOMOLOGO STOP1 EN B. DECUMBENS (BARRAS NEGRAS), EN B. BRIZANTHA Y EN B. RUZIZIENSIS -----	62
ILUSTRACIÓN 27 RESULTADO DEL ANÁLISIS BLAST CON EL GEN HOMOLOGO HVAACT1 AISLADO DESDE B. DECUMBENS-----	63

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 GENES EXPRESADOS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA AL ALUMINIO.....	17
TABLA 2 SECUENCIAS DE PRIMERS Y ADAPTADORES USADOS EN RACE.	29
TABLA 3 SECUENCIAS DE PRIMERS USADOS EN PCR EN TIEMPO REAL ...	30
TABLA 4 TABLA 4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS Y LAS PUBLICADAS EN LAS BASES DE DATOS.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

°C:	Grados Celsius
µl:	Microlitro
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
Al:	Aluminio
AlCl ₃ :	Cloruro de aluminio
ALMT1:	Gen transportador de Malato en presencia de aluminio (1)
AP:	Fosfatasa alcalina
ATP:	Trifosfato de adenosina
Bdec:	<i>Brachiaria decumbens</i>
Bruz	<i>Brachiaria ruzizensis</i>
Ca:	Calcio
CaCl ₂ :	Cloruro de Calcio
cDNA:	ADN copia
DAG:	Diacilglicerol
dATP:	desoxi Trifosfato de adenosina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético
g:	Gramos
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trifosfato
IPTG:	Isopropiltiogalactósido

Kb	Kilobases
L:	Litro
M:	Molar
Mg:	Magnesio
min:	Minutos
ml:	Mililitro
mM:	Milimolar
Mn:	Manganeso
mRNA:	ARN mensajero
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
N:	Normalidad
ng:	Nanogramo
OD:	Densidad óptica
ORF:	Marco abierto de lectura
P:	Fósforo
Pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi:	Fosfatos inorgánicos
PIP ₂ :	Fosfatidilinositol-4,5-disfosfato
ppm:	Partes por millón
RNA:	Ácido ribonucleótido
rpm:	Revoluciones por minuto
rRNA:	ARN ribosómico
SSH:	Librería sustractiva por supresión

STOP1: Sensitive to Proton rhizotoxicity

TAE: EDTA tris-acetato

TBE: EDTA tris-borato

U: Unidades

v: Voltios

RESUMEN

La toxicidad por aluminio es uno de los factores más limitantes de la producción agrícola en los suelos ácidos. En este sentido es claro que la agricultura mundial requiere, para mantener y aumentar las producciones actuales, cultivares con alta tolerancia o resistencia a la toxicidad por aluminio que se presenta en nuestros suelos ácidos.

Algunas especies de *Brachiaria* han mostrado alto grado de resistencia al estrés por aluminio. Para su caracterización se han hecho varias aproximaciones como caracterización fenotípica, mapeo genético y QTLs entre otras. En nuestro grupo de trabajo se seleccionaron 18 secuencias parciales de genes involucrados en la resistencia a partir de una librería sustractiva por supresión desde puntas de raíces usando *B. decumbens* (Al-resistente) y *B. ruziziensis* (Al-sensible). Siete de estas secuencias mostraron expresión diferencial en las raíces mediante la técnica de PCR en tiempo real

Nosotros, seleccionamos una de ellas (*AlBdec10*) para obtener la secuencia completa del gen. El análisis bioinformático nos mostró que este gen corresponde o tiene alta homología con una secuencia aislada de arroz, de *Arabidopsis*, de uva y de algunas otras plantas pero que aún no ha sido caracterizada biológicamente. Por sus características aminoacídicas este gen ha sido incluido en una gran familia de proteínas de fosfoesterasas, las cuales tienen como particular un motivo DHH (Asp-His-His) que las distingue de otras fosfoesterasas.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman una vez más que la resistencia al estrés por aluminio en *B. decumbens* es una característica bastante compleja que probablemente, depende de varios mecanismos.

SUMMARY

Aluminium toxicity is one of the most restrictive factors in agricultural production under acidic soils. In this sense it is clear that global agriculture requires, maintaining and increasing current production, cultivars with high resistance to aluminum toxicity that occurs in our acid soil. Some species of Brachiaria have shown high degree of resistance to stress in aluminium. Several approaches like phenotypic characterization and genetic mapping QTLs among others has been done for the description of this resistance. In this study 18 partial sequences of genes involved in resistance from a bookstore by subtractive removal from root tips using *B. decumbens* (Al-resistant) and *B. ruziziensis* (Al-sensitive) were selected. Seven of these sequences showed differential expression in the roots using the PCR real time technique.

One of them (AlBdec10) was selected to obtain the complete sequence of the gene. The bioinformatics analysis showed that this gene corresponds or have high homology with a sequence of isolated rice, arabidopsis, grape and some other plants but has not yet been characterized biologically. Due to its characteristics aminoacide this gene has been included in a large family of proteins fosfoesterasas, which have particularly as a source DHH (Asp-His-His) that distinguishes them from other fosfoesterasas.

The results of this study confirm once again that resistance to aluminum stress in *B. decumbens* is a rather complex feature that probably depends on several mechanisms.

1. INTRODUCCIÓN

El aluminio (Al) es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre y existe en todos los suelos del mundo. La mayor parte del aluminio se encuentra inmovilizado en el suelo en forma de silicatos de aluminio que no pueden ser absorbidos por las plantas (Driscoll et al., 1988), sin embargo la acidez del suelo invierte esta situación haciendo que el aluminio se presente en forma soluble y por lo tanto, pueda ser absorbido por las plantas causando un efecto tóxico. Los primeros síntomas del daño causado por aluminio son la reducción del crecimiento de las raíces y su posterior deformación estructural, evitando que el sistema radicular desarrolle su función biológica (absorción de agua y de nutrientes), lo cual disminuye drásticamente los rendimientos de cosechas para los cultivos que presenten susceptibilidad.

Aunque la acidez del suelo se puede corregir usando enmiendas orgánicas y algunos tipos de cal (Espinosa, 1994), esta práctica no ha sido efectiva en países en vía de desarrollo, por los altos costos que constituye su aplicación (Pandey et al. 1994) y por su ineficacia en el mediano y largo plazo ya que esta acidez se presenta por condiciones naturales del suelo, la presencia de lluvias ácidas y las diferentes prácticas agrícolas desarrolladas por el hombre (ejemplo, altas y continuas fertilizaciones con amonio). Esto se convierte en un gran problema de tipo mundial ya que cerca del 50% del suelo cultivable del mundo es significativamente ácido y se encuentra en las regiones más deprimidas económicamente, como la zona tropical.

A raíz de esto, la investigación actual en este campo se ha enfocado en buscar información genética necesaria para saber porque y como algunas plantas son capaces de resistir al estrés por aluminio en suelos ácidos. Este conocimiento es esencial para poder llegar a desarrollar cultivos más productivos que puedan ser cultivados en suelos bajo estas condiciones. Es así como se han hecho varias aproximaciones con el esfuerzo de muchos investigadores (Mao et al., 2004, Kochian et al., 1995), pero aún se conoce muy poco acerca de los mecanismos y los genes que favorecen la resistencia a este fenómeno.

Actualmente se han detectado materiales vegetales que presentan resistencia y/o tolerancia a los suelos ácidos lo cual presenta una buena oportunidad de hacerle frente a esta gran problemática. Es el caso del género *Brachiaria* donde se han descubierto especies y biotipos que presentan diferentes grados de resistencia y tolerancia a la presencia de iones de aluminio solubles en el suelo. Con el presente proyecto se pretende contribuir en el avance del entendimiento de este o estos mecanismos, al aislar y caracterizar genes involucrados en la resistencia o tolerancia que presenta la especie *Brachiaria decumbens* al estrés por aluminio.

2. FORMULACION DE HIPOTESIS

La metodología de Librerías Sustractivas (SSH), complementada con PCR en tiempo real (qPCR), permite aislar genes que están diferencialmente expresados en una especie resistente al estrés por Aluminio (*B. decumbens*) con respecto a otra susceptible (*B. ruzizensis*) cuando son sometidas a iones de este metal.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Identificar y caracterizar secuencias de genes expresados diferencialmente en plantas de *Brachiaria decumbens* asociados al estrés por aluminio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Verificar la expresión diferencial en *B. decumbens* de 18 secuencias de genes asociados a la resistencia al estrés por aluminio comparada con *B. ruziziensis*.

Aislar la secuencia completa del cDNA del gen o de los genes que presenten expresión diferencial en *B. decumbens*.

Determinar funciones putativas de cada uno de los genes expresados diferencialmente, mediante la comparación con otros genes usando las bases de datos disponibles en la actualidad.

4. MARCO DE REFERENCIA

GÉNERO *Brachiaria*

Brachiaria es el género de pastos forrajeros más extendido y cultivado en el trópico, tiene cerca de 100 especies dispersadas principalmente en África (Miles, *et al.* 1996). El género pertenece a la familia Poaceae del orden cyperales. Esta familia está compuesta por más de 500 géneros y aproximadamente 8000 especies de plantas que no presentan crecimiento secundario. Entre los géneros más destacados por su interés o importancia económica a nivel mundial se encuentran: *Triticum* (trigo), *Oryza* (arroz), *Zea* (maíz), *Saccharum* (caña de azúcar), *Sorghum* (sorgo), *Hordeum* (cebada), *Brachiaria*, *Urochloa*, *Panicum*, *Eragrostis*, entre otros (Judd *et al.* 1999).

El gran interés de tipo agronómico que despierta este género se basa en el hecho que genera pasturas de gran calidad, aumentando la eficiencia en la producción de carne de ganado, principalmente el vacuno. Se dice que en América del sur cubre más de 250 millones de hectáreas y su potencial está en aumento. Brasil es el país de la región con la mayor cantidad de superficie sembrada (40 millones de hectáreas). En Colombia, actualmente *Brachiaria* es el género de gramíneas más cultivado por sus bondades agronómicas (Rivas y Holmann, 2004).

Las especies de *Brachiaria* que más han sido utilizadas para establecer pasturas debido a sus bondades agronómicas son: *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. humidicola*, *B. brizantha*, y *B. ruziziensis* y últimamente el híbrido Mulato (un cruce entre *B. brizantha*, y *B. ruziziensis*).

***Brachiaria decumbens* cv. Basilisk.**

Es una especie tetraploide ($2n=4X=36$), introducida a Australia desde Uganda en 1930 (Miles *et al.* 1996). En Brasil, se introdujo por primera vez en el año de 1952, con el nombre equivocado, la accesión ingresó con la identificación de *B. brizantha*. Se adapta muy bien a diferentes ecosistemas, crece en zonas que están desde el nivel del mar hasta 1800m y con precipitaciones entre 1000 y 3500 mm por año (Peters, *et al.* 2003). Esta especie ha sido ampliamente adoptada por los agricultores de la región por su alta productividad y su excelente adaptación a suelos ácidos ($pH < 5,5$), además que responde muy bien a la fertilización, es persistente y se mantiene verde en condiciones de sequía, siendo además resistente al daño causado por Aluminio. Su reproducción apomíctica ofrece diversas ventajas debido a la fijación del vigor híbrido en sus semillas, asegurando la preservación de su constitución genética original en su descendencia (Do Valle y Savidan, 1998).

Brachiaria brizantha cv. Marandú (Hochst. ex A. Rich.) Stapf.

Esta especie es predominantemente poliplóide (tetraploide) y apomíctica, tiene dos nombres sinónimos: *Urochloa brizantha* y *Panicum brizanthum*. Los nombres más comunes con los que se conoce esta especie es beard grass, signal grass, palisadegrass brizantha, braquiarão, brizantão, capim marandú, marandú, pasto alambre, pasto señal, zacate señal, (Miles, *et al.* 1996). *B. brizantha* es una especie que presenta rizomas cortos y erectos; el tallo es de 60-150 cm y ligeramente decumbente, su calidad nutricional es similar a *B. decumbens* (Miles, *et al.* 1996). Tiene amplio rango de adaptación a diferentes condiciones de clima y de suelos (Peters, *et al.* 2003).

La distinción entre algunos materiales de esta especie y algunos de *B. decumbens* es muy difícil de hacer. La principal diferencia se da a nivel del hábito de crecimiento y de la forma del raquis. Crece en suelos con pH entre 4-8 y fertilidad variable, sin importar mucho los niveles de aluminio soluble. Sin embargo, para tener pasturas muy productivas es necesario que el suelo tenga una fertilidad en niveles de medio a alto. La tolerancia a Manganeseo (Mn) varía de acuerdo al material usado. Así mismo responde al estrés por inundación, siempre y cuando este no supere los 30 días (Peters, *et al.* 2003). El cultivar “Toledo” es un material que puede soportar periodos cortos de inundación, pero “Marandú” es menos tolerante (Thomas *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 2003).

Brachiaria ruzizensis cv. Kennedy.

Es nativa del Valle Ruzi de Zaire y Burundi y se ha difundido ampliamente en los países tropicales. Ruzi, como es conocida popularmente, proporciona forraje de alto valor nutritivo y produce abundante semillas. Exige suelos fértiles, de buen drenaje; es susceptible a suelos ácidos con altos niveles de aluminio, al salivazo y es menos productivo que *B. decumbens*. Su reproducción es sexual (diploide $2n=2x$) y se modificó artificialmente, en Brasil en la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA), con Colchicina para la obtención de una especie tetraploide ($2n=4x$) que pudiera cruzarse con las especies apomícticas de *B. decumbens* y *B. brizantha* con el fin de obtener híbridos que combinaran la persistencia, productividad, y adaptación a suelos de baja fertilidad (Lapointe y Miles, 1992).

EL ALUMINIO

Según Gutiérrez, (1991) el aluminio es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre y el primero a nivel metálico. Se encuentra ampliamente distribuido y constituye aproximadamente el 8.8% de la corteza terrestre. Su número atómico es 13 y se encuentra en el grupo 13 de la tabla periódica.

Generalmente se encuentra combinado con otros elementos como por ejemplo oxígeno y sílice. En estado puro es muy liviano y de un color blanco-plateado. Su densidad es 2.7, a temperatura ambiente es sólido con un punto de ebullición y de fusión de 2.467 °C y 660 °C, respectivamente.

A pesar que está asociado a varias enfermedades importantes en los humanos (ej: Alzheimer), su uso en las industrias es evidente y tiende a aumentar en el tiempo. Se usa en el tratamiento de aguas como sulfato de aluminio (alumbre) y en productos de consumo tales como antiácidos, astringentes, aspirina con cubierta entérica, aditivos para alimentos y desodorantes. El aluminio metálico en polvo se usa a menudo en explosivos y fuegos artificiales.

EL ALUMINIO EN SUELOS ACIDOS

La acidez del suelo es uno de los problemas mas graves en la producción de los cultivos básicos en nuestro país; puede definirse como la concentración de iones de hidrógeno en el suelo, los cuales afectan a muchas plantas, impidiéndole su normal desarrollo. La acidez de los suelos se da de forma natural en regiones con altos índices de pluviosidad. (Espinosa, 1994). También pueden acidificarse por la acción de lluvias y partículas ácidas ocasionadas por procesos industriales y por la quema de combustibles fósiles, como ocurre en las centrales térmicas, aumentando la presencia de óxidos de azufre y nitrógeno en la atmósfera, los cuales son precipitados hacia el suelo y el subsuelo mediante las lluvias.

Otra forma importante de acidificación del suelo es la causada por la misma actividad agrícola. Por ejemplo, el uso de sulfato de amonio, como fertilizante, puede alterar el pH del suelo de una manera drástica en el tiempo, por lo que su utilización debe ser cuidadosamente controlada (Espinosa, 1994). Una de las principales consecuencias de la acidez del suelo es la disminución de Fósforo (P) disponible para el sistema radicular y de elementos alcalinos y alcalinotérreos como el Calcio (Ca) y el Magnesio (Mg). Además, en los suelos ácidos también hay un aumento de la disponibilidad de otros metales como el Manganeso (Mn) que al igual que el Al, en cantidades altas (2–3 ppm en suelos con pH < 5.5), causa fitotoxicidad (Lora 1994; Rao *et al.* 1998).

La toxicidad por aluminio es el principal limitante en la productividad de los cultivos en los suelos ácidos (Espinosa, 1994; Kochian *et al.*, 2005; Kochian *et al.*, 2004). Bajo condiciones de suelo con pH neutro (5.5-7.0) el aluminio, no afecta el desarrollo normal de las plantas por que se encuentra en forma insoluble haciendo parte de óxidos y silicatos (Kochian *et al.*, 2005). No obstante, este metal se solubiliza y se torna tóxico a valores de pH bajos (<5.5). En estos casos, el porcentaje (%) de Al se incrementa a medida que baja el pH, tornándose mucho más tóxico. En el mundo, dicho problema impacta a más del 50% de las tierras cultivables en áreas tropicales, principalmente en países como Brasil, Venezuela, Colombia y México (Marschner, 1991; Rao *et al.*, 1998).

El valor del pH del suelo al cual el Al se vuelve tóxico no es igual para todas las especies, dependerá del tipo y edad de la planta y de otros factores del suelo como lo son la clase y cantidad de arcillas, el contenido de materia orgánica y la presencia de otros cationes y aniones, entre otros (Fassbender, 1994).

Los estudios de las interacciones del Al con Ca y Mg han demostrado que este puede desplazar al Ca en la membrana y actuar como antagonista con el Mg. La toxicidad del Al puede inducir deficiencia en Ca y P y un exceso en otros iones como es el caso del Mn. El déficit de P se traduce en una disminución del crecimiento y coloración verde-azulosa en las hojas. Al igual que el déficit de P, el exceso de Mn causa reducción en el crecimiento de la planta y daños en la parte aérea en la que se observan manchas necróticas en el tallo, en las hojas se observan manchas que se rodean de un halo de necrosis y estas hojas se arrugan por un mecanismo llamado "*leaf*". Otros efectos indirectos son la reducción en absorción de agua y nutrientes ya que el daño en las raíces actúa de manera negativa sobre la exploración de las raíces en el suelo en busca de estos elementos (Rao *et al.*, 1998).

EFFECTOS DEL ALUMINIO EN EL TEJIDO VEGETAL

Según González y Gutiérrez (1985), los mecanismos de toxicidad de los elementos metálicos en organismos vivos son muy variados y pueden resumirse, en forma general, en tres grupos: 1) por bloqueo de los grupos biológicos esenciales de las biomoléculas (proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y aminoácidos). 2) por desplazamiento o reemplazo de iones metálicos esenciales para el funcionamiento de las biomoléculas o 3) por alteración de la conformación estructural de las biomoléculas afectando su actividad biológica.

El aluminio es un elemento bastante tóxico que causa serios trastornos metabólicos en la mayoría de los vegetales. El efecto tóxico del aluminio en las plantas puede originarse cuando este interactúa con la membrana celular y desestabiliza el citoesqueleto. El catión Al^{3+} afecta a las membranas alterando su fluidez, probablemente, cuando se pega a las cargas negativas de los fosfolípidos y causa cambios en sus propiedades físico-químicas (Sivaguru *et al.*, 2003) trastornando sus funciones biológicas.

Se ha postulado que el aluminio se puede unir específicamente a las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana celular, al enlace fosfodiéster de la fosfatidil serina o a algunas proteínas de membrana como la calmodulina (Garzón 2003). Esta unión aumenta la permeabilidad y la rigidez de dicha membrana por compactación de fosfolípidos, lo cual conlleva a un desbalance en la absorción de cationes y aniones que es una de las funciones importantes que ella realiza.

Así mismo, el daño causado por este metal, se da cuando penetra en el interior de las células y llega hasta el núcleo, donde se une a los grupos fosfatos de los

ácidos nucleicos (ADN y ARN) afectando la división celular, la transcripción (Rout *et al.*, 2001; Vitorello *et al.*, 2005) y por ende la traducción de la información genética. Igualmente, cuando interactúa con los grupos carboxilo, sulfato, fosfato de proteínas y enzimas esenciales.

Según los resultados obtenidos por Arango (2004), la tinción con hematoxilina de raíces de *Brachiaria* reveló una acumulación significativa de aluminio en las plantas susceptibles al nivel de la exodermis y endodermis que en consecuencia indujo el rompimiento de las células de la superficie radical, mostrando así la importancia de la matriz extracelular en la resistencia a Al. En cambio, la acumulación en el material resistente solo se dio a nivel exodérmico.

Muchos autores resaltan que el efecto tóxico de este metal en la mayoría de las plantas es inmediato y origina síntomas bastantes visibles como es el de la reducción de la tasa del crecimiento radicular. Las consecuencias nocivas se acentúan en las plantas jóvenes cuyo proceso vegetativo de crecimiento está en pleno transcurso. Según Vitorello *et al.*, (2005), este efecto puede verse en muy poco tiempo. Una vez se somete la planta al estrés, los síntomas pueden empezar a verse a los 30 minutos; aún en presencia de bajas concentraciones de Al^{+3} (micromolar). Esta rapidez con que sucede la interacción aluminio/planta ha hecho pensar que es el apoplasto el primer punto de ataque y de allí pasaría lentamente al interior de la célula, por lo que se plantea que el metal se acumula tanto en la pared como en la membrana celular (Garzón, 2003) a través de las cargas negativas como se planteó anteriormente.

El pobre crecimiento longitudinal de la raíz puede darse a dos niveles. Primero puede haber una inhibición en el alargamiento o crecimiento celular y segundo, la inhibición puede darse a nivel de la división celular. Foy (1992) reportó que el aluminio reduce el crecimiento radicular por que interfiere en el proceso de división celular interactuando con los fosfatos del ADN, lo cual aumenta la inflexibilidad de la doble hélice e imposibilita la acción enzimática que en este actúan. Además, por que obstaculiza fuertemente la elongación celular en las puntas de las raíces ya que aumenta la rigidez de la pared celular a través de polímeros de pectinas, posiblemente por el desplazamiento del Calcio (Garzón, 2003; Jones *et al.* 1998).

A raíz de todo lo anterior podemos subrayar que la presencia del aluminio causa cambios importantes en la homeostasis del calcio, interactúa con iones de fósforo y grupos fosfatos haciéndolo menos disponibles para las plantas, interfiere con algunas enzimas de la pared celular y con otras que están involucradas en diferentes procesos fisiológicos (Copeland and De Lima (1992), Hamilton (2001), Haug (1984), Husaini and Rai (1992), Peixoto (1999), Slaski (1990)). De igual forma, obstaculiza la absorción de agua y de algunos nutrientes esenciales como Calcio, Magnesio, Potasio y Fósforo.

MECANISMOS DE TOLERANCIA Y/O RESISTENCIA AL ESTRÉS POR ALUMINIO

Los mecanismos de resistencia pueden agruparse en dos grupos, internos y externos. Taylor (1995) define que los mecanismos de resistencia internos son aquellos que operan dentro del simplasma a nivel celular y actúan desintoxicando o inmovilizando los iones de aluminio que han penetrado dentro de las células. Los externos serían los que actúan por fuera del simplasma.

Numerosos trabajos de investigación han demostrado que muchas especies vegetales tienen una gran variabilidad de respuesta al estrés por Al (Kochian *et al.* 2004; Vitorello *et al.* 2005), aunque aún no se sabe definitivamente cual es o cuales son los mecanismos responsables de estas respuestas (Kochian *et al.* 2005; Raman *et al.* 2005).

Kochian *et al.* (2004), han realizado una recopilación de hechos que revelan o mejor, dan luces sobre ciertos mecanismos que usan las plantas para tolerar el efecto dañino que tiene el aluminio sobre ellas. Según Kochian *et al.* (2005), hasta el momento, existen dos mecanismos fisiológicos evidentes que pueden ser propuestos como responsables de la resistencia al aluminio presente en algunos genotipos de plantas: el primero se da vía exclusión del aluminio desde el ápice de la raíz por exudación de ácidos orgánicos y el segundo es más de tipo tolerante y se da por la eliminación o desactivación del aluminio tóxico vía intracelular dentro del simplasto con aniones de carboxilatos.

El mecanismo de secreción de ácidos orgánicos es el que mejor evidencia ha tenido. Varios autores han demostrado que la resistencia en muchas especies de plantas (ej: trigo, maíz, sorgo, soya, centeno) está asociada a la secreción o flujo de ácidos orgánicos, tales como malato, citrato, succinato y oxalato entre otros (Ezaki *et al.* 2007; Ma *et al.* 2001). Estos ácidos protegen los ápices de las raíces por que quelan el aluminio nocivo (Al^{+3}) alrededor de la rizósfera formando complejos de aluminio-carboxilatos y así evitar su entrada a la raíz (Kochian *et al.* 2005).

En este sentido, Sasaki *et al.* (2004; 2006) identificaron el primer gen de tolerancia a aluminio que codifica una proteína de membrana que facilita el flujo de aniones de malato en trigo denominado TaALMT1. Raman *et al.* (2005) determinaron que este gen está compuesto por 6 exones interrumpidos por 5 intrones. Así mismo, que ALMT1 por lo menos tiene 6 alelos, los cuales no están correlacionados con el nivel de tolerancia al estrés por aluminio. Esto depende más es del nivel de expresión de cada uno de ellos (Raman *et al.* 2006).

En maíz, en contraste con lo observado en trigo, el mecanismo de liberación de citrato no explica totalmente la resistencia que presentan algunos genotipos.

Piñeros, *et al.* (2005), encontraron que el grado de resistencia al aluminio de seis genotipos evaluados, estaba directamente correlacionado con el contenido de aluminio en las puntas de raíces y no con el volumen exudado de citrato y malato. En este sentido, ellos suponen un mecanismo de exclusión de aluminio en las raíces, como el responsable de la resistencia en estos seis genotipos, pero sin relacionarlo directamente con la exudación de ácidos orgánicos. Para estos autores la exudación del ácido cítrico desde las raíces (estimulado por aluminio (Al^{3+})), podría dar un nivel basal de resistencia en muchos genotipos de maíces pero no en todos, es decir que este no es el único mecanismo existente en este cultivo.

Estos resultados concuerdan con los hallados por Wenzl, *et al.* (2001), quienes encontraron que la gran resistencia que presentan algunas especies de *Brachiaria* no puede ser explicada desde el mecanismo de liberación de ácidos orgánicos. Los contenidos de ácidos orgánicos (particularmente citrato y malato) en la especie resistente (*B. decumbens*) y la susceptible (*B. ruziziensis*) son casi idénticos lo cual muestra que la diferencia en la respuesta al aluminio entre estas dos especies no es dada por ellos. A pesar de esto, los autores concluyen que estos ácidos orgánicos si están involucrado en el alto nivel de resistencia que presenta este género, en especial el citrato ya que fue el ácido que se unió en más alta proporción al aluminio (Grundy, *et al.* 2001)

De acuerdo a Arango (2004), en *Brachiaria* existe un mecanismo de resistencia que impide la unión del aluminio al apoplasto de las células, ya que la acumulación de aluminio en las raíces de los genotipos resistentes se concentró únicamente en la exodermis, sin causar efectos adversos en el crecimiento de la raíz. Esto quizás es debido, a que la pared celular impide el paso y movimiento del aluminio a través de la membrana plasmática. Por lo anterior se puede pensar que el mecanismo de resistencia de *B. decumbens* al estrés por aluminio podría ser muy heterogéneo y bastante complejo.

Dentro de la exploración de mecanismos que expliquen la resistencia de algunas plantas al efecto tóxico del aluminio, se han retomado algunos que ya han sido establecidos o están relacionados con otros efectos dañinos para los vegetales. Autores como Cobbet (2000) han planteado que las fitoquelatinas conceden a las plantas gran tolerancia a los metales pesados. En este sentido, se podría pensar que algunas de estas podrían estar involucradas en la tolerancia o resistencia que tienen algunos materiales vegetales al efecto adverso del aluminio. Sin embargo, para Larsen, *et al.* (1996) es poco probable que las fitoquelatinas funcionen con el aluminio ya que la quelación o unión entre ellos no es tan efectiva, como sucede con los grupos fosfatos y carboxílicos.

Otro mecanismo de resistencia al aluminio ha sido la exudación de fosfatos inorgánicos (Pi) desde las raíces (Pellet, *et al.* 1996), para formar complejos Al-Pi en la rizósfera (Taylor, 1991) el cual no es toxico para las raíces. Zheng y

colaboradores (2005), sostienen que el alto nivel de resistencia que tiene la especie buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) está directamente relacionada a la inmovilización y destoxificación del aluminio por fósforo en las raíces. Según Slaski *et al.* (1996), en muchas plantas, la tolerancia al aluminio está muy asociada con el uso eficiente del fósforo. En este mismo sentido, Rout y otros (2000), plantean que los cultivares tolerantes al aluminio toman y utilizan más eficientemente el calcio y el fósforo que sus parientes susceptibles.

Existen otro tipo de plantas llamadas plantas acidófilas, las cuales presentan resistencia a muy altas concentraciones de aluminio. Estas plantas transportan el aluminio en forma de quelatos (ácidos orgánicos y aluminio) hacia las vacuolas de diferentes tejidos de los rebrotes (Ma and Hiradate, 2000) donde les resulta inocuo. Un ejemplo de estas son las plantas de té, que acumulan el aluminio en sus hojas una vez que este es quelado por el malato (malato de Al), el cual es sacado hacia el floema donde no tiene efecto nocivo para la planta

A forma de conclusión, podemos sintetizar que aunque probablemente múltiples mecanismos de tolerancia estén operando en la resistencia de las plantas al aluminio, en el momento existen dos grandes clases de mecanismos fisiológicos para explicar dicha resistencia: 1) desintoxicación interna: cuando la planta permite que el aluminio ingrese al simplasto y allí es inmovilizado o quelado y 2) exclusión de aluminio: cuando la planta excluye el aluminio desde las puntas de las raíces previniendo su entrada al sistema biológico, mediante la excreción de componentes orgánicos.

RELACIÓN ENTRE ALUMINIO Y FÓSFORO

Como ya se ha mencionado, existe una gran interacción entre los iones de aluminio y los de fósforo sobre todo en condiciones ácidas. Este hecho se pone en evidencia en suelos ácidos donde el fósforo forma compuestos insolubles con cationes de aluminio y hierro, haciéndose poco disponible para las plantas (Begur, *et al.*, 2006).

Por lo anterior, la aluminio-toxicidad también puede ocasionar estrés por deficiencia de fósforo (Foy, 1988, Gessa *et al.* 2005). Ante este evento, las plantas han desarrollado diferentes estrategias para usar el fósforo y así evitar el estrés por deficiencia de este elemento. Uno, es bajando los requerimientos de fósforo a nivel celular y otro es reciclar eficientemente el P existente en la planta, por lo que se denominan plantas eficientes en el uso del fósforo (Kochian *et al.* 2004).

Algunos autores plantean que en muchas plantas la tolerancia a aluminio está muy asociada con el uso eficiente del fósforo. La prevención de la formación de Aluminio-fosfatos mediante quelación del aluminio con ácidos orgánicos, resulta

en una mayor disponibilidad de fósforo en las células de las raíces, por lo tanto la planta tiene menor demanda en la adquisición de fósforo (Mossor-Pietraszewska, 2001). Wenzl *et al.* (2002a), encontraron que la exposición a aluminio no afectó las concentraciones de fósforo en la zona apical de la raíz de *B. decumbens*, en contraste con lo que ocurrió con *B. ruziziensis*, donde se presentó una disminución del 70% en el contenido de fósforo en el ápice, con aumento de este en los tejidos viejos de las raíces, después de 13 días de estrés.

Por otro lado, el flujo de fósforo inorgánico desde las raíces es considerado otro mecanismo de resistencia al aluminio por la formación de Aluminio-Pi en la rizosfera (Taylor, 1991). De acuerdo con Matsumoto (2000), existe una buena correlación entre la cantidad de aluminio y el fósforo presente en la pared celular, lo cual refleja que allí se puede dar la precipitación de aluminio-fosfatos evitando así la entrada del metal al tejido de la estela. De forma similar, este mismo autor plantea que el aluminio se pega a la membrana celular. El mecanismo planteado consiste en que el aluminio se pega a los grupos fosfatos de los fosfolípidos, aprovechando la carga negativa que ellas poseen. Esta interacción aluminio/fosfolípidos induce cambios estructurales en la membrana celular y en la carga electrofisiológica de la raíz, pasando de negativa a positiva, con la consecuencia de trastornar la selección, captación y transporte de algunos iones.

Se ha visto que las membranas de cultivares resistentes al efecto detrimental del aluminio en trigo, se despolariza rápida y significativamente, bajo la exposición a diferentes concentraciones de aluminio, mientras que en plantas susceptibles, las membranas solo fueron ligeramente despolarizadas (Matsumoto, 2000); tal vez por que el aluminio induce cambios en la composición lipídica de la membrana celular.

Este cambio ha sido plasmado en el trabajo de Andersson *et al.* (2003), quienes plantean que el crecimiento de plantas de avena en un ambiente sin fosfatos, resultó o indujo el reemplazo de los fosfoglicerolípidos de la membrana plasmática por glicolípidos digalactosildiacilglicerol, que son lípidos que no contienen grupos fosfatos. Ellos encontraron (Andersson *et al.* 2005), que la deficiencia en fósforo, también provocó cambios similares en la composición lipídica del tonoplasto y estimuló la producción de por lo menos cuatro polipéptidos, entre los cuales se encuentra un fósfortransportador y una fosfoesterasa de tipo bacteriana con actividad fósfolipasa tipo D.

En vista que la toxicidad por aluminio genera síntomas de deficiencia de fósforo (Rout *et al.* 2001) y activa genes que son activados bajo estas mismas condiciones (Ezaki *et al.* 1995), podríamos pensar en mecanismos de resistencia interrelacionados para las dos adversidades.

LAS ENZIMAS HIDROLASAS EN LA RESISTENCIA A ALUMINIO

Por definición, las enzimas son sustancias proteicas que catalizan reacciones bioquímicas, cuando estas son termodinámicamente posibles. Ellas actúan sobre uno o varios sustratos, produciendo diferentes productos sin que ellas sean alteradas en el proceso.

Inicialmente las enzimas se nombraron de acuerdo al sustrato sobre el que actuaban, añadiéndole el sufijo -asa o haciendo referencia a la reacción catalizada (Ureasa, Lipasa, ADNasa, etc.). Pero debido al gran número de enzimas conocidas en la actualidad, se ha acogido una clasificación y nomenclatura más sistemática, en la que cada enzima tiene un número de clasificación que la identifica (EC) y da idea de su actividad química. Las enzimas han sido clasificadas en seis grandes grupos de acuerdo al tipo de reacción que catalizan (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>):

1. Oxidorreductasas: Catalizan reacciones de transferencia de electrones. Ej. EC 1.1.1.251* alactitol-1-fosfato 5-deshidrogenasa

2. Transferasas: Transfieren grupos funcionales o activos hacia otras sustancias receptoras. Ej. EC 2.1.1.134* *myo*-inositol 6-O-metiltransferasa.

3. Hidrolasas: Reacciones de hidrólisis de polímeros con la consiguiente obtención de monómeros. Ej. EC 3.1.3.67* fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.4.11* fosfoinositide fosfolipasa C.

4. Liasas: Adicionan dobles enlaces eliminando grupos como CO₂, H₂O y NH₃. Ej. EC 4.1.1.74* indol-3-il-piruvato carboxi-liasa.

5. Isomerasas: Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición. Ej. EC 5.1.1.1* proteína-serina epimerasa.

6. Ligasas: Se conocían como sintetetasas. Participan en la formación de enlaces con hidrólisis de ATP. Ej. EC 6.3.2.25* α -tubulina-L-tirosina ligasa.

Como ya se mencionó, las hidrolasas son enzimas hidrolíticas que catalizan el rompimiento de los enlaces: éster, glicosil, péptido, amida y algunos otros enlaces, incluyendo enlaces de fosfoéster. Algunas de estas no sólo catalizan la eliminación hidrolítica de un grupo particular de sus sustratos, sino también, la transferencia de este grupo a una molécula aceptora. Por esta razón, todas las enzimas hidrolíticas podrían ser clasificadas dentro del grupo de las transferasas, ya que la hidrólisis puede considerarse como la transferencia de un grupo específico con la intervención de moléculas de agua.

Ciertas hidrolasas (especialmente algunas de las esterasas y glicosidasas) plantean problemas porque tienen una especificidad muy amplia y no es fácil decidir si dos preparaciones descritas por diferentes autores, tal vez a partir de diferentes fuentes, tienen las mismas propiedades catalíticas, o si deben ser incluidos en entradas separadas. Los dos primeros números del código indican la naturaleza del enlace a hidrolizar (EC 3,1 son las esterasas; EC 3,2, glicosilasas y así sucesivamente). La tercera cifra normalmente, especifica la naturaleza del sustrato; por ejemplo: en las esterasas para el éster-carboxílico-hidrolasas es EC 3.1.1, para tiolester-hidrolasas EC 3.1.2, para fosfórico-monoéster-hidrolasas EC 3.1.3; en las glicosilasas, para la O-glicosidasas EC 3.2.1, para N-glicosilasas EC 3.2.2, etc.

A lo largo de diferentes estudios, se ha visto que el estrés por aluminio induce diferentes cambios en la expresión de algunos genes que codifica para diferentes enzimas. Algunos de estos genes de enzimas inducidos por aluminio han conferido resistencia a estrés oxidativo cuando han sido sobre expresados en plantas transgénicas de *A. thaliana* (Ezaki *et al.* 2000). De acuerdo con Simonovicova *et al.* (2004), la exposición de raíces de plantas de cebada a altas concentraciones de aluminio causa un aumento en la actividad enzimática de la superóxido dismutasa, la ascorbato-peroxidasa, la peroxidasa y la NADH-peroxidasa. La primera al parecer, estuvo involucrada en mecanismos de desintoxicación de altas dosis de aluminio. Las otras estarían implicadas en la inhibición del crecimiento radicular (mecanismos de aluminio toxicidad), a excepción de la NADH-peroxidasa, que probablemente estaría involucrada en señales de traducción ante estrés oxidativo.

De igual forma, Tamás *et al.* (2005) reportaron que el aluminio indujo una elevada actividad de dos esterasas en las puntas de raíces de plantas de cebada. Ellos dicen que aunque la mayoría de estas enzimas no tienen una función biológica específica conocida, algunas han sido relacionadas con resistencia a enfermedades y fijación de nitrógeno. Estos autores proponen que la actividad de estas enzimas, posiblemente contribuya a la formación de más sitios de pegado que inmovilizan el aluminio, mediante el incremento de grupos carboxilos libres en los materiales de la pared celular, lo cual demora la entrada de este, al tejido radicular.

En otro trabajo en variedades de cebada (Huttová, *et al.* 2002), encontraron altos incrementos en la actividad de la enzima fosfatasa ácida durante el tratamiento con aluminio, tal como ocurre en plantas sometidas a estrés por deficiencia de fósforo (Duff, *et al.* 1994). Huttová, *et al.* 2002, plantean que el fósforo apoplástico puede jugar un papel importante en el mecanismo de tolerancia por precipitación del aluminio y que las fosfatasas intracelulares tendrían una función importante en la movilización de este fósforo desde reservas en la célula durante el estrés y además, ayudarían a reducir el estrés por deficiencia de fósforo inducido por el aluminio.

En un Híbrido de *Brachiaria* (Mulato) y un cultivar de arroz, Nanamori *et al.* (2004), reportaron que la deficiencia de fósforo induce la actividad de varias fosfotransferasas, las cuales actuarían como recicladoras de fósforo. Ellos sugieren que el reciclaje interno de fósforo desde fosfatos orgánicos podría ser un importante mecanismo que contribuye a la gran eficiencia en el uso del fósforo que presenta este híbrido, y como se ha planteado anteriormente, esta característica podría estar involucrada en la resistencia al efecto nocivo de iones de aluminio.

Cambios en la actividad enzimática por causa del aluminio, igualmente fueron hallados por Schmohl y Horst (2002). Los resultados de estos autores mostraron que el aluminio inhibe la exudación de fosfatasa ácida y más generalmente de proteínas, afectando las propiedades tanto de la pared como de la membrana celular. Tales propiedades serían principalmente la permeabilidad para macromoléculas y la actividad de enzimas apoplásticas, modificando así, la sensibilidad al estrés por aluminio.

Por otra parte, algunos trabajos han relacionado el efecto de toxicidad del aluminio con componentes de la vía de señales de transducción de los fosfoinosítidos. Los cuales son definidos como fosfolípidos que contienen inositol o lípidos similares en los que grupos hidroxilo del inositol se encuentran esterificados a uno o dos grupos fosfatos (Salisbury and Ross, 1992). Según Matsumoto (2000), el fosfatidilinositol-4,5-disfosfato (PIP₂) es, probablemente, un sitio de interacción para iones de este metal. El PIP₂ se encuentra en la membrana plasmática y está involucrado en señales de traducción. De acuerdo con Kochian *et al.* (1995) el potencial de unión entre este y el Aluminio es mucho mayor que el del Calcio lo cual causa una inhibición en la señal del fosfatidilinositol-trifosfato. Se cree que esto es a raíz de que para la hidrólisis del PIP₂ en Inositol-1, 4,5-trifosfato (IP₃) y Diacilglicerol (DAG) se requiere la acción de la fosfolipasa C, pero esta actividad enzimática es inhibida por el aluminio de manera dosis-dependiente (Matsumoto 2000).

ANTECEDENTES EN EL AISLAMIENTO DE GENES

Los estudios moleculares de la interacción planta/aluminio, han mostrado que este metal induce la expresión de varios genes en algunos cultivares de diferentes especies, los cuales están relacionados con la resistencia a su efecto tóxico. Este hecho ha sido el pilar de muchas investigaciones que tratan de identificar y clonar el gen o los genes responsables de la resistencia de aluminio en varios cultivos de interés económico (tabla 1), para el entendimiento de los mecanismos que conllevan al fenómeno tanto de fitotoxicidad como de resistencia que presentan algunos genotipos de estos cultivos (Arango, 2004; Chen, 2006; Kochian, *et al.* 2005; Kochian, *et al.* 2004; Mao, *et al.* 2004; Rosero Ortegón, 2005; Snowden and Gardner, 1993; Vitorello *et al.* 2005).

Algunas investigaciones han mostrado que la resistencia (o en algunos casos tolerancia), es una característica monogénica. Basu *et al.* (1997) muestran que la tolerancia en trigo al estrés por aluminio, al parecer, está controlada por un solo gen dominante, al igual que en plantas de cebada (Tang *et al.*, 2000). En el 2004 Sasaki *et al.*, clonaron el gen transportador de Malato conocido como *ALMT1*, el cual ha sido conocido como el responsable de la tolerancia al estrés por aluminio en algunas plantas de trigo, ya que es el garante de la exudación del malato. Sin embargo, para algunas especies y cultivares, los resultados de varias investigaciones insinúan que son más los genes involucrados en la característica de resistencia.

Chen (2006) plantea que en vista de la complejidad que presentan los efectos fisiológicos del aluminio en las plantas, es poco probable que la tolerancia a este estrés esté basada en un solo gen. Por el contrario, se requiere de la co-expresión de múltiples genes para producir plantas transgénicas con altos niveles de tolerancia. En centeno por ejemplo, se ha sugerido que la resistencia depende, por lo menos, de tres genes independientes y dominantes que están ubicados en diferentes loci cromosómico (Matos, 2005). Así mismo, los trabajos en Arroz, Maíz y *Arabidopsis* han mostrado que la resistencia al estrés por aluminio es una característica de tipo cuantitativo (Kochian, *et al.*, 2004), aunque en muchos trabajos se han encontrado combinaciones variables, es decir, genes mayores que explican más del 40% combinados con otros de menor cuantía.

De hecho, el fenómeno que ocurre en trigo es una evidencia de la multiplicidad de genes en la responsabilidad de la resistencia al estrés por aluminio. En este cultivo, se ha aislado, hasta el momento, el gen que más directamente está relacionado con la resistencia, por lo cual algunos autores han planteado que la resistencia en trigo al aluminio es dada por un solo gen dominante (Riede y Anderson, 1996), sin embargo existen evidencias de otros genes que también podrían estar involucrados en este proceso (Guo, *et al.*, 2007; Hamilton, *et al.*, 2001).

En términos generales, más de 50 genes asociados a experimentos con estrés por aluminio en diferentes cultivos han sido aislados (*Arabidopsis thaliana*, Arroz (Nguyen *et al.*, 2001), Caña de Azúcar (Drummond *et al.*, 2001), Maíz (Sibov *et al.*, 1999), Cebada (Ma *et al.*, 2004), y Trigo (Delhaize *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 1994)), sin embargo, en la mayoría de estos genes no ha sido posible demostrar su responsabilidad directa en la resistencia al aluminio. Ellos han estado más correlacionados a la toxicidad, que a la tolerancia. Es más, en su mayoría, estos genes también se han expresado bajo otras condiciones de estrés diferentes a la causada por el aluminio (Ezaki, *et al.* 1995; Wang, *et al.*, 2006).

La identificación, clonación y evidencias de funcionalidad de genes asociados al estrés por aluminio puede ser logrado mediante el uso de técnicas de genómica funcional, las cuales han tenido un gran desarrollo en las últimas décadas.

Tabla 1: Genes expresados en plantas transgénicas para incrementar la tolerancia al Aluminio.

Tabla 1 Genes expresados en plantas transgénicas para incrementar la tolerancia al Aluminio

Gene	Origin	Recipient	Outcon
ALR1 (Mg transporter)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	+
AtBCB (blue copper binding protein)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	+
AtBPI (protease inhibitor)	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	=
AtPOX (peroxidase)	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	=
Citrate synthase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Carica papaya</i>	+
Citrate synthase	<i>A. thaliana</i>	<i>Daucus carota</i>	+
Citrate synthase	<i>P. aeruginosa</i>	<i>N. tabacum</i>	=
Citrate synthase	<i>A. thaliana</i>	<i>Brassica napus</i>	+
HSP150 (heat shock protein)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	=
Malate dehydrogenase	<i>Medicago sativa</i>	<i>M. sativa</i>	+
Mn SOD	<i>Triticum aestivum</i>	<i>B. napus</i>	+
NtGDI (GDP dissociation inhibitor)	<i>N. tabacum</i>	<i>A. thaliana</i>	+
NtPOX (anionic peroxidase)	<i>N. tabacum</i>	<i>A. thaliana</i>	+
parA	<i>N. tabacum</i>	<i>A. thaliana</i>	=
parB (Glutathione S-transferase)	<i>N. tabacum</i>	<i>A. thaliana</i>	+
PEP carboxylase	<i>M. sativa</i>	<i>M. sativa</i>	=
Phosphatidylserine synthase	<i>T. aestivum</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>A. thaliana</i> <i>N. tabacum</i>	+
wak1 (wall-associated kinase)	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	+
Wali5 (protease inhibitor)	<i>T. aestivum</i>	<i>A. thaliana</i>	=

Fuente: Kochian *et al.* 2004.

GENÓMICA FUNCIONAL

En los últimos años la biotecnología molecular ha tenido un gran impacto en muchas de las disciplinas del conocimiento, particularmente en las ciencias biológicas. Con la ya secuenciación de genomas completos de varios organismos, se abre una enorme ventana para el entendimiento de muchos procesos fisiológicos desconocidos o mal conocidos hasta hoy. Es en este paso donde la genómica funcional viene a prestarnos una gran ayuda con toda la metodología desarrollada para el entendimiento de la expresión y localización de genes (Zhang and Mian, 2003).

El objetivo primordial de la genómica funcional es ubicar todos los genes de un genoma dentro de una estructura funcional (Livesey and Hunt, 2000), donde además de la estructura del genoma (genómica estructural) se conozcan las proteínas codificadas y sus respectivas funciones.

La genómica funcional se basa en algunas técnicas claves desarrolladas por diferentes grupos de investigadores, las cuales permiten estudiar patrones de expresión génica en un tejido u órgano específico en un tiempo o etapa dada. Entre las técnicas más representativas tenemos: Hibridación Substractiva, cDNA-AFLP, Diferencial Display, Perfiles de Expresión, Secuenciación de Etiquetas Expresadas (EST), RDA (*representational difference análisis*), Análisis serial de la expresión de genes (SAGE), SSH (*suppreession subtractive hybridization*), micro arreglos, entre otras (Livesey and Hunt, 2000; Vedoy, et al 1999; Yang, et al. 1999).

LIBRERÍAS SUBSTRACTIVAS

Esta técnica fue desarrollada hace más de dos décadas con el objetivo de construir librerías de cDNA de genes expresados diferencialmente. Una librería substractiva se puede definir como la librería que contiene cDNAs correspondientes a mRNAs presentes en un tejido pero no en otro, o cDNAs presentes en un material vegetal sometido a un estímulo y excluidos en ausencia del estímulo (Wu et al. 1997; Yang, et al. 1999).

Este tipo de librerías permite aislar transcripto que son exclusivamente o selectivamente expresados en ciertos tejidos o durante algunas etapas fisiológicas o en un estado de enfermedad o desorden fisiológico (Akopian and Wood, 2000) sin tener conocimiento previos de su secuencia o identidad. Existen numerosos protocolos para la construcción de librerías substractivas, siendo el principio general el mismo. Consiste en la hibridación de cDNA proveniente de una muestra prueba y de una muestra control, los cDNA presentes en ambas muestras formaran híbridos de cDNA, mientras que los cDNA diferencialmente expresados

en la muestra prueba permanecerán en forma de cadena sencilla. La separación de las cadenas dobles y las sencillas se realiza usando cromatografía de *hydroxyapatite* o *streptavidinbiotin* (Vedoy, et al. 1999).

HIBRIDACIÓN SUBSTRACTIVA POR SUPRESIÓN (SSH)

La SSH es una metodología de substracción de cDNA basada en PCR que busca identificar genes regulados positiva o negativamente en determinados tejidos u órganos. Es usada para comparar dos poblaciones de mRNA y obtener cDNA de genes que están sobre expresados o expresados exclusivamente en la población prueba (tester) comparada con la población control (*driver*). Las ventajas que tiene esta metodología con respecto a otras que también emplean la substracción de cDNA son: 1) elimina los pasos de separación física de cDNA de cadena sencilla de los de cadena doble. 2) requiere de una sola ronda de hibridación. 3) incorpora un paso de hibridación que normaliza (igual) la abundancia diferencial de secuencias, es decir genes con alto y bajo número de copias. Esto incrementa significativamente la probabilidad de obtener cDNAs expresados diferencialmente en baja abundancia (genes raros) en tejidos específicos en un momento dado (Desai *et al.* 2000; Yang, *et al.* 1999).

DIFERENCIAL DISPLAY

Es un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa, donde la secuencia blanco proviene de un cDNA y sirve para detectar genes que se expresan de manera diferencial entre organismos o tejidos (Liang and Pardee, 1992; Sokolov and Prockop, 1994). Es un método relativamente simple, sensible, sistemático y reproducible. Fue desarrollado con la combinación de tres poderosos y simples métodos de la biología molecular: PCR, electroforesis y clonación. Esta metodología presenta varias desventajas con respecto a otros para estudios de expresión diferencial: 1) presenta altas tasas de falsos positivos. Esto depende de muchos factores entre los cuales podemos mencionar los siguientes, diseño y longitud de *primers*, diseño de experimento, calidad y cantidad de RNA y el tipo de termociclador. 2) el proceso de verificación consume mucho tiempo (Cho and Liang, 2000).

PCR EN TIEMPO REAL O PCR CUANTITATIVO (qPCR)

En la era de la genómica funcional, la medición de los niveles de expresión de los genes ha inducido la generación de nuevas metodologías.

El PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica molecular semicuantitativa que permite la amplificación logarítmica de una secuencia pequeña de ADN, generando un gran número de copias. Sin embargo, en muchos casos, la cantidad de producto final no siempre está relacionada con la cantidad inicial de ADN, lo que lo hace una herramienta cualitativa muy buena para detectar presencia o ausencia de una secuencia particular, más no para evaluar niveles de expresión.

Para cuantificar la expresión de los genes, el Real Time PCR o PCR cuantitativo es una técnica muy sensible y reproducible (Yuan *et al.* 2006). En principio, es igual que un PCR tradicional, la diferencia se basa en la inclusión de fluorocromos en la mezcla de reacción y un termociclador especial para la detección de fluorescencia, la cual es proporcional a la cantidad de producto de PCR producido a partir de una inicial (Gibson *et al.*, 1996). Estos fluorocromos incluyen moléculas que se pegan dentro del surco menor del ADN de las cadenas dobles durante la fase exponencial del PCR (i.e. *SYBR®Green*) (Muller *et al.*, 2002) o secuencias específicas que se utilizan como sondas (i.e. *Molecular Beacons* or *TaqMan® Probes*) (Heid *et al.* 1996).

El *SYBR® Green* es un químico que funciona igual que el Bromuro de etídio por lo tanto no requiere del conocimiento total de la secuencia de importancia, solo de las zonas donde se diseñarían los *primers*. Cuando se usa *SYBR®Green*, este se intercala en moléculas del ADN de doble cadena emitiendo fluorescencia a medida que se va produciendo la síntesis, es decir, la fase exponencial en la reacción de PCR (Yuan *et al.* 1996). Esta metodología exige buen diseño de los *primers* y una excelente estandarización de las condiciones del PCR, para evitar ruido en los datos debido a amplificaciones no específicas. En este sentido, la metodología cuenta con la posibilidad de detectar cuando hay ruido por amplificadores no específicos mediante la curva de denaturación térmica o curva de “*Melting*”. La cual nos muestra por comparaciones gráficas cuantos amplificadores hubo en cada reacción (Ririe, 1997).

La medida de la expresión de los genes se hace en base a dos estrategias: la medición en términos absolutos y/o la deducción en términos relativos. La cuantificación en términos absolutos relaciona la señal de fluorescencia del PCR con el número de copia usando una curva de calibración. La curva es altamente específica, sensible y reproducible, pero esta reproducibilidad depende mucho de las condiciones y la eficiencia de amplificación. En este sentido, la cuantificación relativa es mucho más fácil de realizar por que no requiere curva de calibración. Se basa en la expresión de un gen de interés versus uno o varios genes de referencia o control (*housekeeping*) donde no necesariamente se tienen que conocer las concentraciones de las muestras y por lo tanto las unidades no tienen ninguna relevancia. Esta última manera de cuantificar, es adecuada para la mayoría de estudios que tienen que ver con la investigación en los cambios fisiológicos a nivel de expresión de gene (Pfaffl, 2004).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Km 17 vía Palmira-Cali (Valle del Cauca). Ubicado a 900 m.s.n.m. 3°30' N, 76°21' W.

Material Vegetal

Las semillas de los materiales empleados en este estudio fueron compradas en casas comerciales del país. Para *B. decumbens* cv. Basilisk (AI-resistente) se usó un material comprado en Semillas & Semillas (semillasysemillas@epm.net.co), para *B. brizantha* cv. Marandú de Agroindustrial de Semillas (www.agroindustrialdesemillas.com), para Mulato II (Híbrido de *Brachiaria*) fue Semillano (ventas@semillano.com) y *B. ruziziensis* (AI-sensible) se compró en Agrosemillas (agrosemillas@epm.net.co). En todos los análisis solo usamos *B. decumbens* y *B. ruziziensis*, excepto para el análisis de la variación genotípica, donde usamos las cuatro especies.

Esterilización del Material Vegetal

La esterilización de las semillas se llevó a cabo de la siguiente manera: se pesaron aproximadamente 200 g de semillas las cuales se lavaron con una solución de etanol al 70 % durante 2 minutos. Luego se lavaron con abundante agua y después se sumergieron durante 15 minutos en una solución detergente. Por último se volvieron a lavar con abundante agua para quitar la solución de detergente. El agua que se utilizó siempre fue desionizada estéril.

Solución de detergente:

Reactivo	Conc. Final	1 litro
Hipoclorito de sodio	2%	20 ml
Triton- 100	1%	1 ml
H ₂ O		979 ml

Germinación de Semillas de *Brachiaria*

Una vez esterilizadas las semillas, se pusieron en bolsitas de tela (algodón o malla) y se dejaron durante 24 horas dentro de recipientes con agua desionizada. Transcurrido este tiempo, se retiró el agua y se dejaron secar otras 24 horas a

temperatura ambiente. Luego, las semillas fueron puestas a germinar en una solución de cloruro de calcio (200 μM CaCl_2 ; pH 4.2) por 3-4 días en condiciones de invernadero en Bandejas plásticas de 20 litros (figura 1). Las bandejas fueron cubiertas, en su interior, con una bolsa plástica negra y llenadas con 15.68L de agua desionizada más 320ml de una solución de Cloruro de Calcio (50 X). Después se puso la cama de icopor (figura 1) dentro de la solución y en cada celda de la cama, se ubicaron cerca de 50 semillas. La germinación y el crecimiento de las plántulas fue aireado durante día y noche con un sistema de aireación constante impulsado por un compresor de aire. Pasados tres o cuatro días, las plántulas con raíces entre 4 y 5cm de longitud fueron seleccionadas y transferidas a bandejas plásticas para los respectivos tratamientos (en soluciones de 200 μM CaCl_2 ; pH 4.2 con y sin, 200 μM de AlCl_3) tanto para los análisis fisiológicos como para los moleculares (figura 1).

Solución de Cloruro de Calcio (CaCl_2)-HCl 50X:		
Reactivo	Conc. final	20 litros
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50X (200 μM)	29.404 g
HCl de 1 N		66 ml
H_2O		19,934 L

Análisis Fisiológico

El análisis fisiológico se llevó a cabo con el fin de confirmar los resultados de resistencia y susceptibilidad que presentan algunas especies del género *Brachiaria* al estrés por aluminio. Como principal parámetro para esta evaluación se utilizó la medición de la raíces de cada una de las 10 plántulas sembradas en las bandejas para este fin. La medición se realizó antes y después de cada tratamiento, usando una regla transparente de 50 cm. Para cada uno de los experimentos se usaron dos tratamientos. Un tratamiento control o testigo, donde el cultivo hidropónico (16 L) solo estaba compuesto por 200 μM de CaCl_2 , es decir 0 μM de aluminio; y un tratamiento con aluminio donde el medio hidropónico (16L) estaba compuesto por 200 μM de AlCl_3 . En ambos casos el pH fue ajustado a 4.2 (-/+ 0.5). Además, en los casos donde se ameritaba, por tiempo (48 y 72 horas), la solución fue cambiada día por medio. La susceptibilidad al efecto del aluminio fue tomada como el porcentaje de inhibición que sufrió el crecimiento radicular en cada uno de los materiales evaluados. Matemáticamente de la siguiente manera: $\text{IR} = ((\text{CtoA} - \text{CtoB}) / \text{CtoA}) * 100$, donde CtoA= al promedio de crecimiento radicular sin aluminio y CtoB= al promedio de crecimiento radicular con aluminio.



Ilustración 1 Montaje para evaluación fisiológica

Figura 1. Montaje para la evaluación Fisiológica de los distintos materiales de *Brachiaria* en presencia y ausencia de aluminio.

Variación genotípica en la resistencia a aluminio

Este ensayo se montó con el objeto de tener tejido para hacer extracción de ARN y conocer mediante qPCR el comportamiento de los genes que fueron diferencialmente expresados en la librería sustractiva en diferentes especies de *Brachiaria* (*B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú, *B. ruziziensis* y el Híbrido Mulato). El ensayo se montó bajo las condiciones anteriormente descritas, es decir, un tratamiento testigo (0 μM de AlCl_3 y 200 μM de CaCl_2) y el tratamiento de interés (200 μM de AlCl_3 más 200 μM de CaCl_2). Los datos fueron tomados al momento de montar los tratamientos y a las 3, 6, 24, 48 y 72 horas.

Diferentes concentraciones de aluminio

Para ratificar que el daño en las raíces de *Brachiaria* es aluminio-dependiente, se hizo un ensayo con diferentes concentraciones de aluminio. Los tratamientos en principio fueron iguales a los anteriormente descritos, la diferencia estuvo en las concentraciones iónicas. El tratamiento testigo fue con 50 μM , 100 μM , 200 μM y 500 μM de CaCl_2 sin aluminio a un pH de 4.2, mientras que el tratamiento de interés tenía, a demás de estas concentraciones de CaCl_2 , 50 μM , 100 μM , 200

μM y $500 \mu\text{M}$ de AlCl_3 , respectivamente. Los datos se tomaron en el momento de seleccionar las plántulas y a las 24 horas de haber sido sometidas a los diferentes tratamientos. Para las mediciones se hicieron cuatro repeticiones en el tiempo con 10 plantas en cada una de ellas y 70-90 plantas para los análisis moleculares.

Estrés por Cloruro de Sodio (NaCl)

Para ver que pasaba con la expresión de los genes seleccionados cuando eran sometidos a otro tipo de estrés, se montó un ensayo con NaCl y otro con diferentes pH. El primer experimento consistió en cambiar el AlCl_3 por NaCl. Se hizo un tratamiento control donde el medio tenía tan solo $200 \mu\text{M}$ de CaCl_2 y dos tratamientos más, pero adicionando cloruro de sodio (NaCl), uno con 100 mM y el otro con 200 mM . En este ensayo hicimos tres repeticiones en el tiempo con 10 plantas en cada uno de ellos para la medición radicular y 80 plantas más, para los análisis moleculares.

Influencia del pH en el crecimiento radicular

En este ensayo las plantas fueron crecidas en una solución de $200 \mu\text{M}$ de CaCl_2 , a dos pH diferentes, pH: 4,2 y pH 6,0. En una bandeja se ajustó el pH a 6.0 con KOH y en la otra el pH: 4.2, fue ajustado con HCl y KCl, tratando de que en ambas las cantidades de K, fueran equivalentes, para que este no fuera a introducir diferencia en el crecimiento de la raíz. El ensayo se repitió tres veces en el tiempo y las medidas fueron tomadas igual que en los experimentos anteriores.

Análisis Molecular

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, utilizando la técnica de librerías substractivas por supresión, se aislaron 18 secuencias parciales de genes candidatos relacionados con la resistencia al estrés por aluminio en *B. decumbens* (Salcedo *et al.* 2005). A estos 18 genes candidatos, se les hizo análisis de expresión génica para validar su expresión diferencial obtenido por SSH y aislar su secuencia completa (*full lenght*).

Extracción y purificación de ácidos nucleicos de *B. decumbens*

Los ácidos nucleicos se extrajeron tanto de tejido foliar como de puntas de raíces sometidas a los diferentes tratamientos fisiológicos anteriormente descritos.

Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se extrajo de los tejidos foliares usando el método descrito por Dellaporta *et al.* 1983 con algunas pequeñas modificaciones (ver anexo A).

Aislamiento de ARN Total

A raíz que las RNAsas son enzimas muy estables a factores extremos (i.e. altas temperaturas, variaciones de pH), el trabajo con ARN requiere mantener unos cuidados específicos para evitar la presencia de estas en los materiales de trabajo.

En vista de esto, todas las soluciones se trataron con DEPC (Dietilpirocarbonato, SIGMA), excepto las soluciones que contenían Tris. Las puntas para pipetas, tubos y demás materiales fueron auto-clavados tres veces a 15 p.s.i. durante 15 minutos cada vez. Una cámara de electroforesis y su respectiva bandeja y peine se destinó exclusivamente para trabajar con ARN. Para su lavado, estas últimas se introducían dentro de una solución de hidróxido de Sodio al 0.5 M durante toda la noche y luego se lavaban con agua bidestilada estéril con DEPC.

Para la extracción del ARN total de las puntas de raíces de *B. decumbens*, se usó el protocolo que viene adjunto con el reactivo Trizol[®] (Invitrogen, USA), con algunos ajustes del laboratorio. Para este objetivo nosotros cortamos las puntas de raíces (\approx 0.5cm de longitud) de las diferentes especies de *Brachiaria* con cuchillas bisturís totalmente estériles y limpiadas con el RNAsa-out (SIGMA). Estas puntas fueron guardadas en tubos eppendorf de 1.5 ml y transportadas en nitrógeno líquido. Luego fueron guardadas a -80 °C hasta que se procedió a macerarlas en morteros con nitrógeno líquido y la aplicación del respectivo protocolo del Trizol para la obtención del ARN (anexo B).

Para eliminar contaminaciones de ADN, el ARN fue tratado con la enzima DNaseI (Invitrogen, USA). La solución de digestión estuvo constituida por: 1 μ g de ARN, 1 X de Buffer (provisto por la casa comercial de la enzima), 2 U de DNaseI en un volumen final de 10 μ l. Esta mezcla se dejó incubando a 37 °C durante 30 minutos, luego se le agregó 1 μ l de 25 mM de EDTA y se puso a 65 °C por 10 minutos para inactivar la enzima DNaseI. La calidad del ARN fue confirmada por electroforesis en geles de agarosa.

Electroforesis de ARN Total

La visualización del ARN se llevó a cabo en un gel desnaturizante de agarosa al 1.2 % corrido a 50 v durante \approx 25 min. El gel fue preparado de la siguiente manera:

1.2 g de Agarosa
10 ml de Buffer MAE 10X
1.8 ml de Formaldehído (12.3M) al 37%
1 μ l de Bromuro de Etidio (10 mg/ml)
Hasta un volumen final de 100 ml. Se deja polimerizar 45 minutos.

Buffer MAE 10X: 200 mM 3-[N-morpholino] propanesulfonic acid (MOPS), 50 mM Acetato de Sodio; 10 mM EDTA a pH a 7.0.

RNA Loading Buffer 5X: 16µl de una solución acuosa de Azul de bromofenol saturada; 80 µl 500 mM de EDTA, pH: 8.0; 720 µl 37% (12.3M) formaldehído; 2 ml 100% Glicerol; 3.084 ml Formamida y 4ml Buffer MAE 10X.

Síntesis de cDNA de *Brachiaria*

El cDNA fue sintetizado con la enzima “*SuperScript III reverse transcriptase*” (Invitrogen USA) siguiendo las especificaciones dadas por esa compañía con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio (anexo C). Para el proceso de transcripción reversa, se usó una estrategia conocida como “*co-amplification reverse transcription*” (Co-RT) para cebar el RNA y así poder empezar la síntesis del cDNA, la cual consiste en combinar *primers* oligo-(dT) con *primers* específicos con el objeto de amplificar RNA mensajeros (mRNA) que no tienen cola poli-A como es el caso de los genes del 18S-RNA (Zhu and Altmann 2005). Este 18S-RNA fue el gen que nosotros usamos como control interno (*Housekeeping*) para hacer la cuantificación relativa.

Purificación de bandas de DNA desde geles de agarosa

Cada uno de los productos de PCR que necesitaban ser clonados, se corrieron durante aproximadamente 2-3 horas a 80V en geles de agarosa al 1.2 %. Las bandas de interés se visualizaron sobre un transiluminador UV, se cortaron con un bisturí y se purificaron con el Kit de extracción *NucleoTrap® Gel* de la empresa *Biosciences Clontech* (anexo D).

Ligación de fragmentos de DNA

Los fragmentos provenientes de PCR (DNA y cDNA) fueron clonados en el vector *pGEMT-Easy* usando el kit de la casa comercial Promega. Este vector tiene en sus extremos un residuo de timina (T) lo cual evita que el plásmido se recircule o sea que vuelva a pegarse en sus extremos. Esto también evita que haya necesidad de usar enzimas de corte para linealizar el vector y desforforilar los extremos dejados por ellas. Algunas enzimas, como la taq DNA polimerasa, adicionan al final del PCR un residuo de adenina que es compatible con el de timina del vector, lo cual facilita y aumenta la eficiencia de la ligación.

La ligación se realizó mezclando en un tubo eppendorf de 1.5 ml, 1X de Buffer de ligación, 50 ng de vector, 200 a 500 ng del Producto de PCR y 3U de T4 ADN Ligasa con volumen final de 10 µl. Esta mezcla se dejó a 4°C durante toda la noche para obtener el máximo número de bacterias transformadas.

Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* (DH5 α) es descrita en el anexo E. La transformación con el plásmido *pGEMT-Easy* de Promega® mediante electroporación, se hizo básicamente así: se tomaron 2 μ l de la solución de ligación y se mezclaron con 23 μ l de células competentes de *E. coli* (DH5 α) en cámara de flujo laminar. Luego se ubicaron en el electroporador (*Cell porator* GIBCO BRL) a 4 K Ω de voltaje y 330 μ F de capacitancia. Después de la descarga, se pusieron a crecer en 1 ml de medio LB líquido sin antibiótico por 1 hora a 37 °C con agitación constante (150 rpm). Pasado este tiempo, 100 μ l de esta suspensión se expandieron en cajas petris con medio selectivo (LBagar+carbenicilina+X-Gal+IPTG) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al otro día se seleccionaron las colonias blancas, que son las colonias con los plásmidos recombinantes.

Extracción y purificación de DNA plasmídico de *E. coli*

Una vez se seleccionaron las colonias positivas (con el fragmento de interés) se pusieron a crecer en medio LB líquido+ carbenicilina. El DNA plasmídico se preparó a partir de 5ml de cultivo bacteriano con el kit *Wizar Minipreps*® de Promega, siguiendo el protocolo descrito por ellos. Para confirmar que las colonias eran positivas, después de la extracción de los plásmidos estos fueron cortados con enzimas de restricción (EcoRI ó Not I). Los fragmentos resultantes fueron separados por electroforesis en geles de agarosa y según su tamaño se determinó la construcción plasmídica deseada.

Análisis de expresión de 18 genes candidatos con PCR en tiempo real

Inicialmente, para confirmar la expresión diferencial de los 18 genes candidatos, solo se usaron cDNAs proveniente de puntas de raíces de *B. decumbens* y *B. ruzizensis* en 0, 6 y 24 horas. Con estas condiciones se seleccionaron 7 secuencias que mostraron expresión diferencial con la metodología de qPCR (PCR en tiempo real) usando *primers* específicos diseñados con el software Vector NTI de Invitrogen para cada una de las 18 secuencias candidatas (tabla 3).

Posteriormente, estas siete secuencias fueron sometidas a análisis de expresión usando cDNA sintetizado desde ARN de puntas de raíces de *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. ruzizensis* y el Híbrido Mulato sometidas a aluminio durante 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas.

Condiciones de Amplificación del cDNA de los 18 genes candidatos

El qPCR se llevó a cabo en un termociclador MJ research opticon II, el cual captura la fluorescencia que es emitida de acuerdo a la cantidad existente de una determinada secuencia en un momento dado del PCR. En este trabajo nosotros

usamos el *SYBR Green I kit* (Stratagene), que es un colorante que emite luminiscencia cuando se adhiere al surco menor del ADN de doble cadena. Tres réplicas técnicas se llevaron a cabo para cada muestra en cada uno de los genes. Al igual que para el gen 18S-RNA que nosotros usamos como gen control o *housekeeping*.

Para la reacción del qPCR se preparó una mezcla de 10µl de *Maxter mix* (provisto por el *SYBR Green I kit*), 150 pM de cada uno de los cebadores y 50 ng de cDNA en un volumen final de 20 µl. El ciclo térmico consistió en:

Un ciclo inicial de 95°C durante 10 minutos

- | | | |
|--|---|-----------|
| 1) 95 °C por 20 segundos | } | 42 ciclos |
| 2) 52-62 °C* por 30 segundos | | |
| 3) 72 °C por 30 segundos | | |
| 4) 72 °C por 2 segundos (lectura) | | |
| 5) 83 °C por 1 segundo (lectura) | | |
| 7) 72 °C por 5 | | |
| 8) Hacer una curva de <i>melting</i> o curva de denaturación térmica con gradiente de temperatura entre 65 y 95 °C, tomando lecturas del plato cada 0,2 °C. Esta curva se hace con el fin de mirar la calidad de los datos de la fluorescencia, es decir, es un control para evaluar si los datos obtenidos provienen del amplificado de interés o si está influenciado por amplificados inespecíficos o por <i>primers-dimers</i> . | | |

* dependió de la *T_m* del *primer* usado

Amplificación Rápida de los Extremo 3' del cDNA (RACE)

Nosotros escogimos una secuencia parcial de uno de los siete genes (*AIBdec10*), para obtener la secuencia completa de dicho gen. La razón de la escogencia de este gen para RACE, fue su correspondencia en las bases de datos con enzimas fosfoesterasas (fosfatasas), las cuales, ya han sido relacionadas en la resistencia al estrés por aluminio por otros autores. Las otras 6 secuencias están siendo analizadas en convenio, por colegas en Japón. La obtención del extremo 3' de la secuencia del gen *AIBdec10*, cuya expresión está correlacionada con la resistencia al estrés por aluminio, fue realizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante del *kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification* (Catalogo 634914) de *BD Biosciences Clontech* (anexo F). Las secuencias de los cebadores específicos usados tanto para el la síntesis del extremo 5' como para el extremo 3' están en la tabla 2.

Amplificación Rápida de los Extremo 5' del cDNA (RACE)

Nosotros intentamos obtener el extremo 5' de la secuencia del gen *AIBdec10* con el *kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification* (Catalogo 634914) de *BD*

Biosciences Clontech, al igual que el extremo 3', pero tuvimos problemas para obtener el 5' completo. A raíz de esto nos pasamos al *kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA End*, versión 2.0 de la casa comercial Invitrogen. En este caso, es necesario diseñar mínimo dos *primers* específicos (GSP) para el extremo 5'. El primero es para hacer la síntesis del cDNA y el otro para amplificar la secuencia específica de interés. El protocolo de esta metodología se puede revisar en el anexo G.

Los fragmentos de cDNA-RACE purificados, fueron subclonados en vectores *pGEM-T Easy* (Promega) aprovechando el residuo de adenina que deja la combinación de Taq DNA-Polimerasa en los extremos 3' y los de timina presentes en el vector. Los clones positivos, es decir que tuvieran el fragmento cDNA-RACE, fueron secuenciados y posteriormente fueron unidos o ensamblados para obtener la secuencia consenso completa del gen, mediante el programa *emssambly* de NTI vector.

Tabla 2: Secuencias de *Primers* y adaptadores usados en RACE

Tabla 2 Secuencias de Primers y adaptadores usados en RACE

<i>AlBdec10</i> .Arev	GCTCCCTCGTAGGTCTTGT
<i>AlBdec10</i> rev3	CCGAGCGCCTCGTCGCAGTGGAAGCT
<i>AlBdec10</i> rev4	GGATCATAGACACCACCAACATCAAGC
<i>AlBdec10</i> frw7	TGTCACAGCGAGCCGTCACGTC
<i>AlBdec10</i> rev8	TGGTAATGAGCTAGAAGGTGACAA
<i>AlBdec10</i> rev13	TGCCTTGGTTCAATCAGCATTTTCAGAG
5' RACE Abridged Anchor Primer (AAP)	GCCACGCGTCTGACTAGTACGGGIIGGGII GGGIIG
3' RACE CDS- <i>primer A</i>	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC (T) ₃₀ -VN*
5' RACE CDS- <i>primer A</i>	TTT(T) ₂₂ -VN*
BD SMART II TM A Oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC GGG
<i>Primer UPM</i> (Universal Primer A Mix)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCA
<i>Primers NUP</i> (Nested Universal Primer A)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

* N=A, C, G o T; V=A, C o G H=A, C o T D=A, G o T R=A o G Y=C o T M=A o C

Tabla 3: Secuencias de *Primers* usados en PCR en tiempo real

Tabla 3 Secuencias de Primers usados en PCR en tiempo real

Nombre	5' –Secuencia- 3'
AIBdec1 frw1	TATCCCTGAGAAGGTTCTGACTC
AIBdec1 rev1	CCAGCTTCTGCAACAACCTT
AIBdec2 frw1	AGAGGTTACGATCTCCATGATGT
AIBdec2 rev1	GTGTAAAATTGCGAGGAACTGA
AIBdec3 frw1	GTGGGGCGTCTATTTGTCCT
AIBdec3 rev1	CGATGGCACCAGATGTTACATC
AIBdec4 frw1	GTGCCCACTGAGTGAAGTGA
AIBdec4 rev1	GCTAGCTAACCAACATCAGAGC
AIBdec5 frw1	GTGCAGCACCTGCTGAAGAG
AIBdec5 rev1	GCAGACTGGCGAGGATACAC
AIBdec6 frw1	TGAAGTATGACCCGGCAAAC
AIBdec6 rev1	AAGGATGAGGTTGCATGGAA
AIBdec7 frw1	GAAGTCTTGTGAAAGCATTCTCC
AIBdec7 rev1	AAAGGCTCAAGATCCCTCAA
AIBdec8 frw1	TGCTGGATCCATCTTCCTGAT
AIBdec8 rev1	GCTGGTGTCCACAACATTGAAT
AIBdec9 frw1	TTCTTTTACCACACTCATGGCG
AIBdec9 rev1	TGAGATCTGGGCGTGTTTGT
AIBdec10 frw1	GAGAGCTGCTCTGAAGTTCTGA
AIBdec10 rev1	CTGCGTAATGCACTGCTGAA
AIBdec11 frw1	GATTAAGCTCCTCTATGGGTTCAAT
AIBdec11 rev1	TGAGCAAAGTCTGGAATCTTCTATT
AIBdec12 frw1	ATCTAGGGGAGCACTACTAGCAGTCT
AIBdec12 rev1	AGGGGGAAATGGATCATCTG
AIBdec13 frw1	ACATCCAGATCTCCAAGAACCA
AIBdec13 rev1	TCCAGACCCTGATAGATCCATC
AIBdec14 frw1	GGGTGGTGTGTGAGCACAAG
AIBdec14 rev1	CCGCCTACAAACCAATGAGC
AIBdec15 frw1	GGGCATGAAGTTGTTGCTGA
AIBdec15 rev1	GCAGCTAAACCATCGGACAC
AIBdec16 frw1	TCACGCGACATGATGAGTTG
AIBdec16 rev1	TTCGAGACCTCAGGTAATCCA
AIBdec17 frw1	GCGTATGTCAACATCCTTTCC
AIBdec17 rev1	GCAAAGGACTCCATGAAGACTA
AIBdec18 frw1	GATTAAGCTCCTCTATGGGTTCA
AIBdec18 rev1	CAAGCACTTGAAAGAAATGAGC
Hv MATEFw1	CTTCGTCATGAACATCAGGAGCGT
Hv MATERev2	TGCTGCGCCAGTGACACCCATGTGGCA
STOPMer fow2.1	GGATGCACATGAGGGGCCATGGAG
STOPMer rev3.1	GAGAACTTCTTGGTGTGCAACGGCTGCA
PALTM1 fow3	ACCGTCGTCGTCGTCATGGAGT
PALTM1 rev1	GAAGACGGTGGTGCAGAGGCA

Análisis de Datos

Los datos fisiológicos fueron analizados mediante estadística sencilla usando la herramienta de Excel, según se ameritaba en cada caso.

El análisis y manipulación de las secuencias de los genes candidatos se hizo con el software Vector NTI (Invitrogen USA) y el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de NCBI (*National Centre for Biotechnological Information*) (www.ncbi.nlm.gov) y GRAMENE database (www.gramene.org).

Los datos del análisis de la expresión relativa de cada uno de los 18 genes candidatos fueron analizados mediante el software qBase v1.3.5 (Hellemans & Vandesompele, Website:<http://medgen.ugent.be/qbase>). Este software emplea un modelo de cuantificación relativa usando un delta-Ct con corrección por la eficiencia del PCR y uno o varios genes de referencia para la normalización.

En nuestro caso, nosotros estimamos la eficiencia del PCR de cada gen, haciendo una curva estándar para cada uno en cada experimento. La curva estándar se prepara a través de diluciones seriadas de cDNA o de plásmidos transformado con ADN de cada uno de las 18 secuencias candidatas. Como gen *housekeeping* o gen de referencia para la normalización nosotros usamos el gen 18S-rRNA.

6. RESULTADOS

Análisis Fisiológico

Para confirmar el diferencial de resistencia al estrés por aluminio en dos especies del género *Brachiaria*, nosotros realizamos una serie de ensayos hidropónicos bajo condiciones de invernadero. Como ya ha sido publicado por muchos autores, nosotros relacionamos la tasa de crecimiento radicular como el principal carácter fisiológico de la resistencia. Los resultados en términos generales mostraron que efectivamente existe un gradiente de resistencia entre las diferentes especies de este género e insinúan que también dentro de cada una de ellas. Estas diferencias, igualmente, fueron reportadas por los trabajos de Wenzl *et al.*, 2006; Arango, 2004 y Buitrago, 2003.

En la figura 2 se muestra la variación en el porcentaje de inhibición causada por las diferentes dosis de aluminio. Los resultados provienen del promedio de 10 plantas en cada una de las cuatro repeticiones en el tiempo. La figura muestra como *B. ruziziensis* siempre fue más susceptible que *B. decumbens* en cada punto evaluado (50, 100, 200 y 500 μ M).

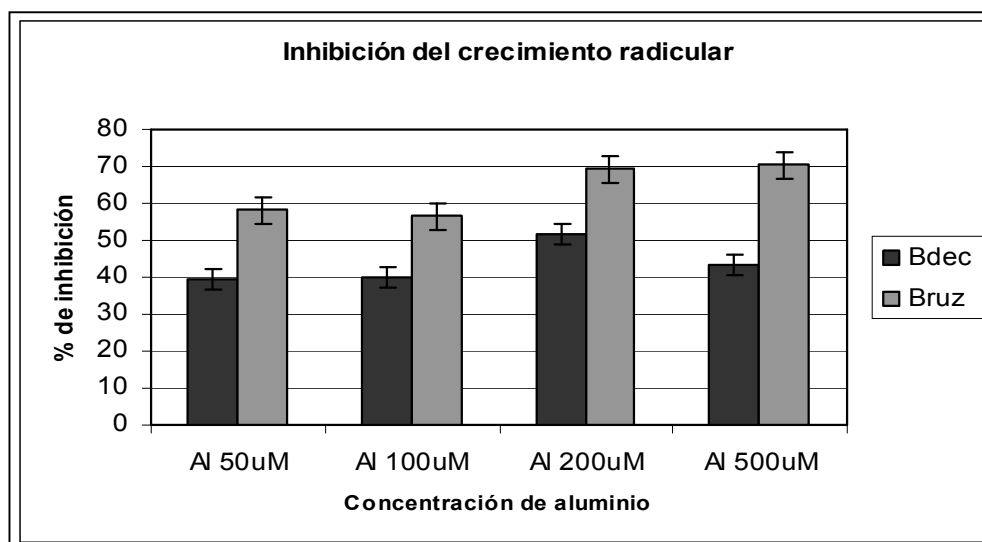


Ilustración 2 Inhibición del crecimiento de la raíz por aluminio

Figura 2. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de la raíz causada por diferentes dosis de aluminio a las 24 horas. Bdec= *B. decumbens*. Bruz= *B. ruziziensis*.

El bajo porcentaje de inhibición en el crecimiento radicular de *B. decumbens* a 500 μ M de aluminio observado en este trabajo puede ser causado por varios motivos. Uno de ellos, es que esta tergiversación en los resultados (generalmente

se espera que el daño sea mayor a mayor concentración de aluminio) se deba única y exclusivamente a la variación de resistencia intrínseca dentro de la misma especie o a variaciones en las condiciones ambientales dadas a nivel de invernadero (Dr. Rao, comunicación personal)..

Otra razón bien fuerte, podría ser que la alta concentración de calcio esté contribuyendo de alguna manera a proteger la raíz de *B. decumbens*, al daño causado por el aluminio, mientras que en *B. ruziziensis* esta protección no sea tan efectiva. Se debe tener claro que en cada experimento la cantidad de calcio fue la misma que la cantidad de aluminio, es decir, que para 50 μM de aluminio la concentración de calcio fue 50 μM , para 100 μM de aluminio fue 100 μM de Ca y así sucesivamente.

Según algunos autores, el uso externo de ciertos elementos, como el calcio, disminuye el daño causado por iones de aluminio. Esto corrobora los resultados obtenidos cuando usamos 500 μM de calcio correspondiente al experimento de 500 μM de aluminio. Brady *et al.* 1993, dicen que el calcio mejora o tiene efectos benéficos en cierta medida, a los efectos tóxicos del aluminio en el crecimiento de la raíz. Ellos plantean que el aumento en la concentración del calcio en solución reduce los efectos perjudiciales del aluminio sobre la elongación de la raíz principal y el desarrollo de raíces laterales. En este mismo sentido, Rengel (1992) reporta que suplementar el medio con calcio alivia el efecto deletéreo del aluminio de forma directa, por que actúa como un antagonista del aluminio y además, plantea que la actividad de la relación aluminio/calcio tiene mayor influencia en la determinación de los efectos dañinos del aluminio que el mismo aluminio. Esto es de gran importancia si se tiene en cuenta que el trastorno en la homeostasis del calcio es considerado uno de los desencadenantes de la aluminio-toxicidad en las plantas (Rengel, 2003).

En la figura 3a se muestra el crecimiento de la raíz de las cuatro especies de *Brachiaria* cuando fueron sometidas a los tratamientos sin y con aluminio a 200 μM . Los resultados muestran que después de 24 horas, el crecimiento radicular de *B. ruziziensis* en el tratamiento control es significativamente mayor que el de las otras especies. El híbrido Mulato II fue el que menos crecimiento tuvo, tanto en el tratamiento control (sin aluminio) como en el tratamiento con 200 μM de aluminio.

El crecimiento de *B. decumbens* y *B. brizantha* fue muy similar, como se observa en la figura 3a. Este hecho, nos indica que estos dos materiales son resistentes al efecto dañino de los iones de aluminio. En comunicación personal con el Dr. Rao (CIAT), se planteó que los dos extremos de resistencia en estas especies serían *B. decumbens* (resistente) y *B. ruziziensis* (susceptible), los otros dos materiales tendrían unos niveles de resistencia intermedios. Según el análisis de inhibición (figura 3b), para las especies extremas la diferencia es bastante clara. Su comportamiento en el tiempo (hasta 72 horas) es consistente, es decir, los niveles

de resistencia de *B. decumbens* con respecto a *B. ruziziensis* se mantienen en cada uno de los puntos evaluados. Sin embargo, para las resistencias intermedias esto no es tan evidente ya que en algunos puntos estos materiales superan tanto los niveles de resistencia como de susceptibilidad como en el caso del híbrido Mulato II.

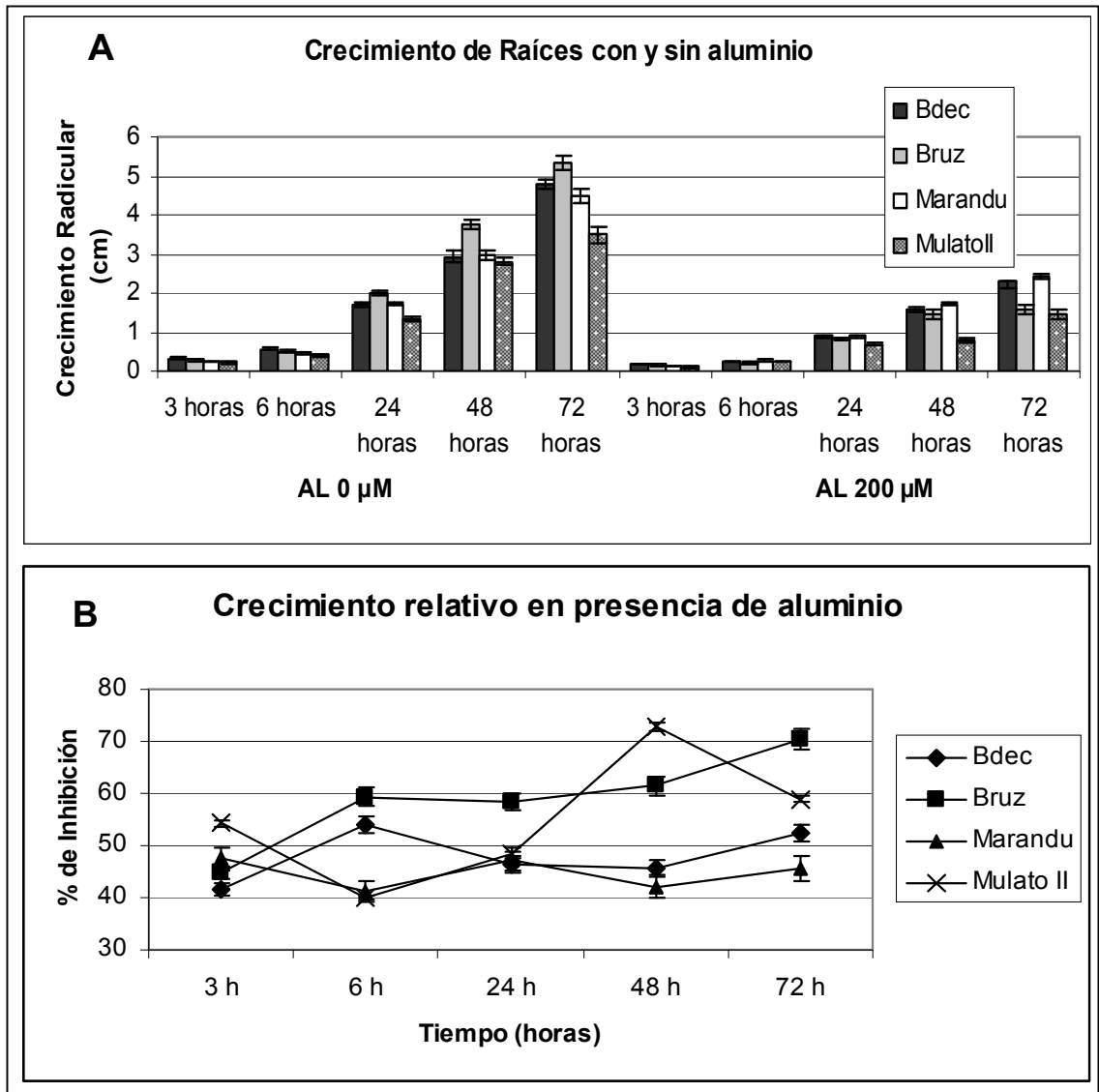


Ilustración 3 Crecimiento de raíces de *Brachiaria* en cultivos hidropónicos en presencia de aluminio

Figura 3. Crecimiento de raíces de *Brachiaria* en cultivos hidropónicos en presencia de aluminio. A) muestra el crecimiento en cm de las raíces en ausencia ($0\mu\text{M}$ de aluminio) y presencia de aluminio ($200\mu\text{M}$ de aluminio). B) porcentaje de inhibición del crecimiento radicular por la presencia de aluminio. Los resultados provienen del promedio de 10 plantas en cada punto y 6 repeticiones biológicas en el tiempo.

El resultado nuestro contrasta con el obtenido por Wenzl *et al.*, (2006). Ellos encontraron que el crecimiento de la raíz en *B. brizantha* fue mucho menor que el obtenido con *B. decumbens*, y solo superó ligeramente al crecimiento de *B. ruziziensis*. Esta diferencia esta dada posiblemente a varios factores que enunciaremos en breve. Primero ellos usaron para el análisis, propágulos vegetativos que entre otras diferencias, sufrieron algunos tratamientos para mejorar el enraizamiento, mientras que nosotros empleamos semillas. El solo hecho de usar fuentes diferentes de material vegetal, constituye una diferencia significativa por que aunque, ambos usamos condiciones hidropónicas sin suplemento nutricional, las reservas de nutrientes de las semillas son diferentes a los presentados en otros tejidos como los usados por ellos. Así mismo los tiempos de evaluación fueron totalmente diferentes. Mientras que nosotros lo hicimos en etapas tempranas (hasta 72 horas), ellos lo hicieron midiendo la longitud de la raíz cada tercer día hasta el día 21. Lo interesante es que los dos trabajos, al igual que otros, muestran que *B. decumbens* es mucho más resistente al estrés por aluminio que *B. ruziziensis* y que la variación encontrada entre ellas y dentro de ellas puede darse por variaciones intrínsecas de la misma especie, como ya se mencionó antes.

Respuesta de Brachiaria a otros factores que causan estrés

Con el ánimo de ver que pasa con la expresión de los genes candidatos seleccionados, cuando se someten a otro tipo de estrés, se implementaron otros dos experimentos. Uno consistió en crecer las plántulas de *B. decumbens* y *B. ruziziensis* a dos pH diferentes (4.2 y 6.0) (figura 4) y otro fue someter plántulas a Cloruro de Sodio (NaCl) (figura 5). Los resultados mostraron que el pH no afectó significativamente el crecimiento radicular. La longitud radical no estuvo influenciada de manera drástica por ninguno de los dos estados de pH. En este sentido podemos asegurar que estas dos especies de Brachiaria, además de ser resistente al efecto dañino de los iones de aluminio, también presentan resistencia o tolerancia a pH ácidos del suelo.

Kidd y Proctor (2001) encontraron en diferentes poblaciones de *Holcus lanatus* L. y *Betula pendula* que las tolerantes al estrés por aluminio no necesariamente eran tolerantes a toxicidad por acidez (H^+), con lo cual ellos demuestran que estas tolerancias tienen origen diferentes.

En cuanto a los resultados fisiológicos encontrados con NaCl, podemos notar que esta sal puede causar inhibición en el crecimiento radicular en ambas especies. Cuando se usó cloruro de sodio a una concentración de 200mM, la inhibición del crecimiento fue total, es decir no hubo crecimiento alguno durante las 24 horas de tratamiento (figura 5a), mientras que a 100mM, la reducción fue cerca del 50% en las dos especies evaluadas (figura 5b).

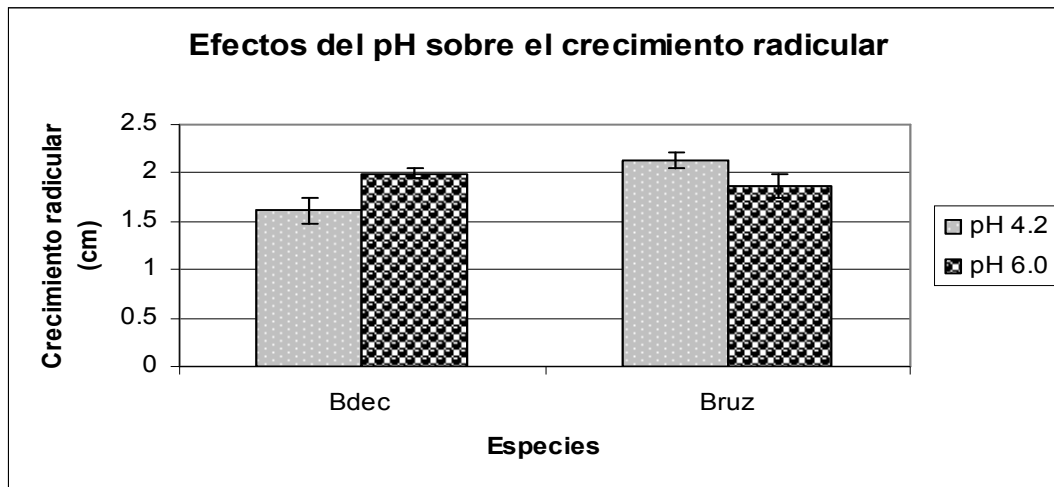


Ilustración 4 Crecimiento radicular de dos especies de *Brachiaria* sometidas a dos pH diferentes

Figura 4. Crecimiento radicular de dos especies de *Brachiaria* sometidas a dos pH diferentes. La barra gris representa el crecimiento de las raíces a pH: 4.2. La barra de bolas negra al crecimiento en pH: 6.0. Bdec= *Brachiaria decumbens*. Bruz= *B. ruziziensis*.

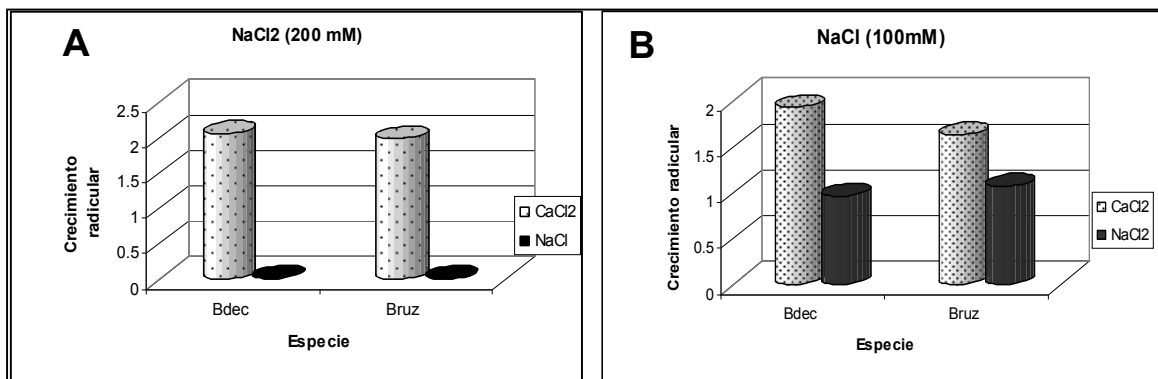


Ilustración 5 Crecimiento radicular de dos especies de *Brachiaria* sometidas a dos concentraciones diferentes de cloruro de sodio

Figura 5. Crecimiento radicular de dos especies de *Brachiaria* sometidas a dos concentraciones diferentes de cloruro de sodio. A, resultados con 0 y 200 mM de NaCl. B, resultados con 0 y 100 mM de NaCl. Las barras negras representan el crecimiento de las raíces en presencia de NaCl. Las barras grises representan al crecimiento en ausencia de NaCl. Bdec= *Brachiaria decumbens*. Bruz= *B. ruziziensis*

Análisis Molecular

Extracción de ácidos nucleicos

La cantidad y calidad de los ácidos nucleicos obtenidos fue muy buena. Los distintos protocolos usados en este trabajo para la extracción de ADN y ARN total de tejidos de *Brachiaria* y ADN plásmídico de *E. coli* dieron los resultados esperados (ver figura 6). En cada uno de los geles se evidencia la integridad de los ácidos nucleicos. Así mismo, el índice de pureza obtenido mediante la relación de las mediciones en el espectrofotómetro a 260nm y 280nm (A_{260}/A_{280}) se mantuvo dentro del rango óptimo, lo cual evidencia poco o nada de contaminación con otros componentes biológicos o residuos de reactivos del proceso de extracción.

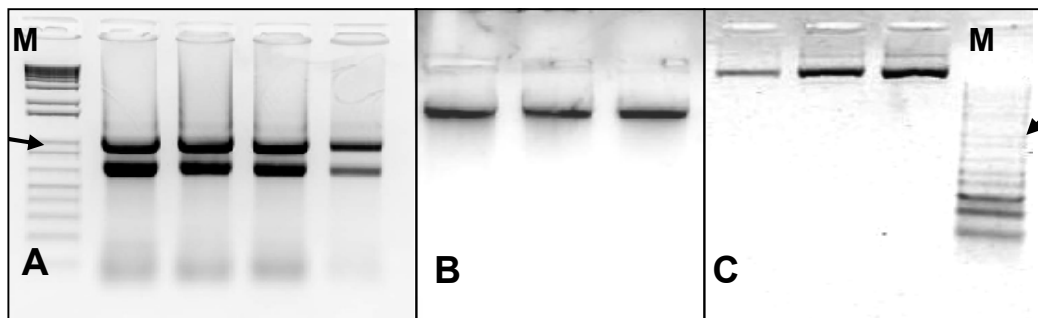


Ilustración 6 Fotos de ácidos nucleicos

Figura 6. Fotos de ácidos nucleicos. El panel A, muestra la buena calidad y cantidad de ARN corrida en un gel desnaturalizante de agarosa (1.2%). B, foto de ADN de hojas de *Brachiaria*. C, foto de ADN de plásmido. M= 1 kb marcador de peso. La flecha indica el fragmento de 500 pb.

Para el análisis con cDNA es esencial que la muestra de ARN esté totalmente libre de cualquier contaminación de ADN, por lo tanto una vez extraído el ARN la solución se sometió a digestión con DNAsas. Para confirmar el buen desempeño de esta última, se realizó una prueba de contaminación de ADN. La cual se efectuó mediante PCR usando un par de cebadores diseñados sobre la secuencia del gen GAPDH, incluyendo un intron. Por lo tanto, si el cDNA está libre de ADN la secuencia amplificada tendría un tamaño más pequeño (≈ 450 pb), si por el contrario, dentro de la reacción hay presencia de moléculas de ADN, el amplificado sería mucho mayor (≈ 1050 pb) (figura 7).

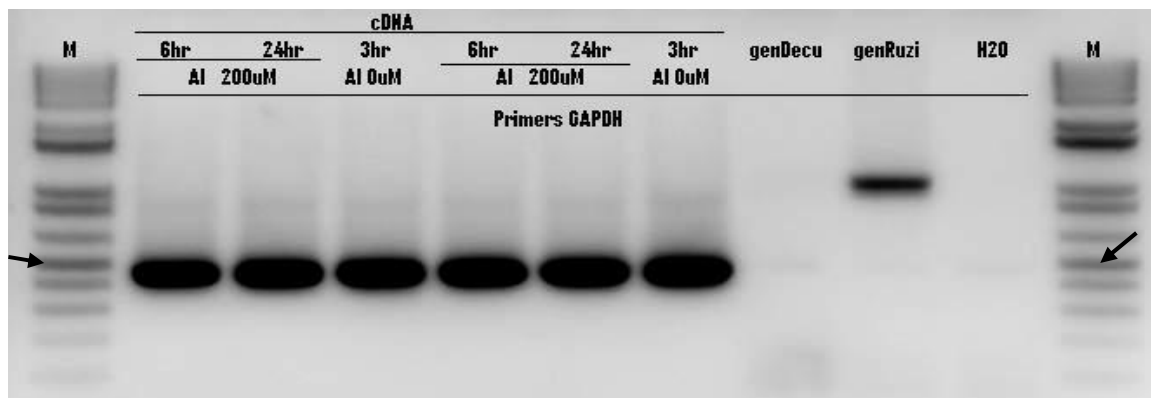


Ilustración 7 Prueba de contaminación de la solución de cDNA con ADN

Figura 7. Prueba de contaminación de la solución de cDNA con ADN. Las muestras de cDNA amplificaron un fragmento de ≈ 450 pb. El ADN genómico de ruzi amplificó en ≈ 1050 pb. M= marcador de peso 1Kb ladder. Las flechas indica el fragmento de 500 pb.

Análisis de expresión de 18 genes candidatos relacionados con la resistencia al estrés por aluminio

En un trabajo previo se preparó una librería sustractiva por supresión que produjo 18 genes candidatos para aluminio-resistencia. El ARN para la obtención del cDNA que se usó en la construcción de la librería, fue obtenido desde puntas de raíces tanto de *B. decumbens* cv Basilisk, como de *B. ruzizensis*, bajo las mismas condiciones descritas en materiales y métodos. El cDNA se creó usando la mezcla de ARN mensajero de varios tiempos (3, 6, 24, y 72 horas) y el *SMART cDNA synthesis kit* (Takara-Clontech, USA). Para seleccionar los genes diferencialmente expresados se usaron los reactivos y el protocolo que viene con el kit *PCR-Select cDNA subtraction kit* (Takara-Clontech, USA).

La metodología fue implementada usando a *B. decumbens* como censor (*tester*) y *B. ruzizensis* como conductor (*driver*) de modo que los genes obtenidos son expresados diferencialmente en *B. decumbens*. Para conformar la librería sustractiva, los fragmentos obtenidos con la metodología de expresión diferencial fueron clonados dentro del vector *pGEMT-Easy* (Promega, USA) en *Escherichia coli* DH5 α . Esta librería fue chequeada con *PCR-Select Differential Screening Kit*

(Takara-Clontech, USA) con el protocolo dado por ellos, usando sondas radioactivas marcadas con (α - 32 P)-dATP. El principal resultado de este trabajo fue la selección de los 18 genes candidatos para la resistencia al estrés por aluminio (Salcedo *et al.*, 2005).

Estos 18 clones fueron secuenciados y a partir de estas secuencias se hicieron análisis por comparación en las bases de datos y se diseñaron una serie de *primers* para realizar el análisis de expresión. Las secuencias de los 18 genes fueron sometidas a análisis BLAST en NCBI y en GRAMENE, para determinar mediante estudios comparativos la función de dichas secuencias (Tabla 4).

Inicialmente nosotros hicimos un primer experimento con PCR en tiempo real con solo tres puntos temporales (0, 6 y 24 horas) en las dos especies de Brachiaria, con el objetivo de comprobar la expresión diferencial de estos 18 genes en dichas especies. En este estudio previo se comprobó que siete genes (AIBdec3, AIBdec5, AIBdec8, AIBdec10, AIBdec14, AIBdec15, AIBdec16) tenían efectivamente expresión diferencial. Con estos siete genes se amplió el análisis de expresión como se mencionó arriba.

En la figura 8 se muestran dos gráficos como ejemplo de los resultados de expresión de los 18 genes candidatos en la especie *B. decumbens* (resistente) y *B. ruziziensis* (sensible) a 0, 6 y 24 horas. En el eje Y, la escala de expresión relativa está dada en valores logarítmicos, para mejorar la interpretación de algunos genes, cuya diferencia de expresión fue muy grande. El término de expresión relativa hace referencia a que la expresión de los genes está dada en términos del gen con la expresión de menor valor en cada uno de los análisis, la cual se toma como uno.

La figura 8a muestra al gen AIBdec3, el cual fue uno de los 7 genes seleccionados. En *B. decumbens* la expresión en el tiempo de 0-6 horas aumentó y se mantuvo a 24 horas, mientras que en *B. ruziziensis* aumentó a las seis horas

pero volvió a caer a las 24. En la figura 8b, por el contrario, se muestra la expresión relativa del gen AIBdec2 que no esta correlacionada con los niveles de resistencia al estrés por aluminio, al menos en las primeras 24 horas. Como se puede observar en la gráfica, en el tiempo 0, la expresión es alta pero cae significativamente a las 6 y vuelve y progresa a las 24 horas en ambas especies, siendo mayor en el material susceptible. Este comportamiento, bajo nuestro criterio, no está relacionado con la resistencia que presenta la especie resistente.

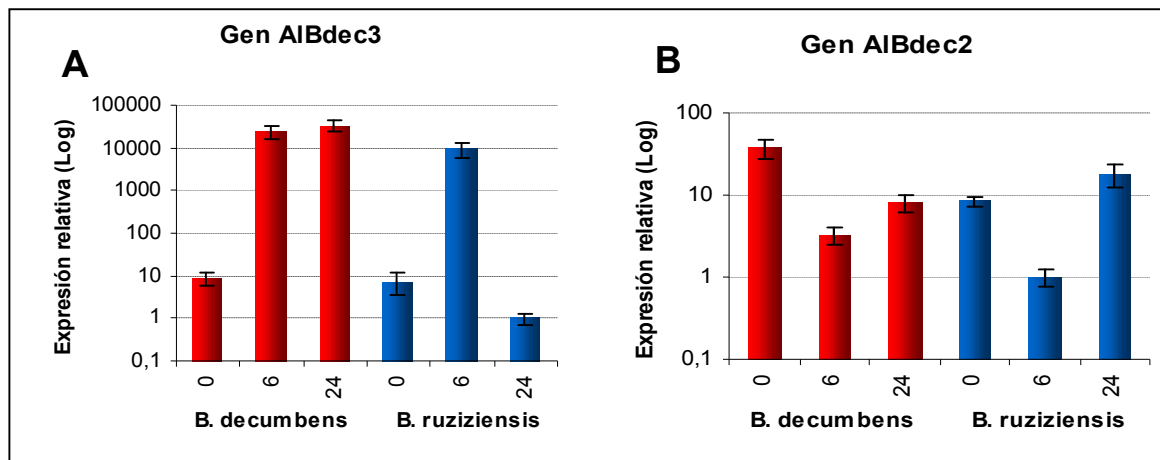


Ilustración 8 Expresión relativa de genes activados por estrés de aluminio en *Brachiaria*

Figura 8. Expresión relativa de genes activados por estrés de aluminio en *Brachiaria*. Las Barras representan la expresión relativa de dos genes en *B. decumbens* y en *B. ruziziensis*. La evaluación inicial se hizo en tres tiempos, 0, 6 y 24 horas.

De acuerdo al análisis comparativo en NCBI, podemos agrupar los genes en tres categorías. La primera, está compuesta por 7 genes (AIBdec3, AIBdec4, AIBdec11, AIBdec12, AIBdec14, AIBdec15 y AIBdec16) que no dieron hit, es decir que no tuvieron un valor *E-value* significativo (tabla 4). El *E-value* es el valor de significancia estadística del alineamiento, es decir la probabilidad de que el alineamiento se haya hecho al azar; entre más cercano a cero, mayor es la significancia en la similitud real de las secuencias. En pocas palabras, dos secuencias con *E-value* = 0 son idénticas.

La falta de valores de *E-values* significativos puede presentarse por varias razones, una de las cuales, podría ser el tamaño y la composición de la secuencia conocida. Las secuencias con tamaños muy pequeños y/o con series de nucleótidos repetidas tienden a no dar *E-values* significativos. Otra razón para esto, es que la secuencia no haya sido reportada.

Tabla 4 Tabla 4. Resultados del análisis comparativo entre las secuencias obtenidas y las publicadas en las bases de datos.

Nombre	ID	Organismo	E-value	Score (Bits)	Descripción
AIBdec1 (604bp)	gi 32975611 dbj AK065593.1 ^	<i>O. sativa</i>	4e-136	489	Proteína desconocida.
	gi 30695011 ref NM_104034.3 ^	<i>A. thaliana</i>	7e-54	216	Proteína desconocida. (AtMYB23 MYB transcription factor target down-regulation, gene expression array-based count)
AIBdec2 (835bp)	gi 50932627 ref XP_475841.1	<i>O. sativa</i>	1e-39	167*	Putativa fosfoetanolamina N-metiltransferasa
	gi 15221909 ref NP_175293.1	<i>A. thaliana</i>	5e-35	150*	S-adenosilmetionina-dependiente metiltransferasa
AIBdec3 (262bp)	X	X	X	X	No alineó (No hit)
AIBdec4 (366bp)	X	X	X	X	No alineó (No hit)
AIBdec5 (356bp)	gi 57471717 gb AY846829.1	<i>T. aestivum</i>	2e-04	56.0	Proteína ribosomal P1
AIBdec6 (635bp)	gi 42570489 ref NM_180364.2	<i>A. thaliana</i>	2e-16	95.6	ATP binding / protein serine/treonina kinasa/ (AFC1) mRNA
	gi 2911280 gb AAC04324.1	<i>N. tabacum</i>	5e-64	247*	Proteína kinasa PK12.
AIBdec7 (581bp)	gi 50935122 ref XM_477089.1	<i>O. sativa</i>	6e-60	240	Putativa proteína ribosomal S15
AIBdec8 (247bp)	gi 77556203 gb ABA98999.1	<i>O. sativa</i>	8e-16	87*	Protein hipotética: LOC_Os12g38650
AIBdec9 (284bp)	gi 13194667 gb AF325717.1 AF325717	<i>Pennisetum ciliare</i>	2e-19	105	Proteína desconocida.
AIBdec10 (548bp)	gi 50911579 ref XP_467197.1	<i>O. sativa</i>	3e-35	151*	Familia de proteínas hidrolasas metal-dependiente. Proteína putative GAMM1 GAM1, HAF1.
AIBdec11 (223bp)	X	X	X	X	No alineó (No hit)
AIBdec12 (228bp)	X	X	X	X	No alineó (No hit)
AIBdec13 (466bp)	gi 32972197 dbj AK062179.1 ^	<i>O. sativa</i>	4e-82	310	Proteína kinase C-receptor/G-proteína.
	gi 32813929 gb BU102606.1 ^	<i>Saccharum officinarum</i>	2e-168	596	Similar a guanine nucleotide-guanine nucleotide-binding protein.
AIBdec14 (275bp)	X	X	X	X	No alineó (No hit)
AIBdec15 (242bp)	X	X	X	X	No alineó (No hit)
AIBdec16 (271bp)	X	X	X	X	No alineó (No hit)
AIBdec17 (426bp)	gi 54291606 dbj BAD62529.1	<i>O. sativa</i>	2e-13	77.0*	Proteína semejante a un dedo de zinc. Proteínas que se pegan a lípidos de membranas vía interacción con fosfatidilinositol -3-fosfato, PI3P.
AIBdec18 (321bp)	gi 54111529 gb AAV28627.1	<i>Zea mays</i>	2e-05	50.8*	Proteína putativa del 60S ribosomal L31

^ = The NCBI GEO BLAST page

* = [Blastx](#)

El hecho del tamaño y el contenido de la región están reflejados en la secuencia AIBdec11 y AIBdec18, cuyo análisis reflejó que se trata de la misma secuencia, pero la primera no dio *hit* por que su tamaño y contenido nucleotídico no es lo suficientemente grande para dar un *E-value* significativo.

El segundo grupo de secuencias está conformado por 3 fragmentos que tuvieron un hit significativo pero con proteínas desconocidas. En este grupo se encuentran las secuencias AIBdec1, AIBdec7 y AIBdec9. El tercer grupo estuvo compuesto por secuencias homologas con proteínas hipotéticas o con funciones putativas (AIBdec2, AIBdec5, AIBdec6, AIBdec8, *AIBdec10*, AIBdec13, AIBdec17 y AIBdec18).

En muchos trabajos de expresión de genes para resistencia al estrés por aluminio se han encontrado varias secuencias de proteínas con funciones desconocidas. Watt (2003) en su trabajo con caña de azúcar, reportó varias secuencias que tuvieron similitud con proteínas de función y nombre desconocidos. La mitad de los cDNA (28 de 50) obtenidos por él, dieron similaridad con proteínas de función desconocida, hipotéticas y en algunos casos no hubo similitud con ninguna proteína conocida. Los otros 22 estuvieron involucrados en asuntos de regulación de expresión de genes, en eventos de traducción de señales y en procesos metabólicos básicos.

Algunas de nuestras secuencias, a pesar de que dieron hit con proteínas desconocidas, han sido aisladas a partir de experimentos bajo diferentes condiciones de estrés, entre los que se cuentan estrés salino, de sequía y hasta de estrés con tratamientos hormonales, como es el caso de la secuencia del clon AIBdec1, al igual que la del gen *AIBdec10*. En otros casos las secuencias han sido obtenidas en plantas sometidas a estrés por frío y luz, como en el caso de la secuencia AIBdec2. El gen AIBdec13 tuvo homología con el transcrito obtenido en hojas de plántulas de caña de azúcar expuestas a frío en diferentes tiempos: 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas.

Los diferentes estudios para hallar genes responsables de la resistencia o tolerancia al estrés por aluminio en diferentes especies vegetales, han mostrado que esta característica es bastante compleja y que no es un solo mecanismo el responsable de ella. Las evidencias actuales parecen mostrar que hay una relación muy fuerte entre los genes responsables de la resistencia a este metal y genes involucrados en otros procesos biológicos. Es así como en la mayoría de los casos se han encontrado genes que están regulados por la presencia de iones de aluminio y por otros eventos. Ezaki *et al.* (2000), demostraron que los genes BCB (*blue-copper-binding*) de *Arabidopsis*, Glutathione-S-Transferasa, NtGDI1 (*GDP-dissociation inhibitor*), NtPox (peroxidasa) de tabaco confieren cierto nivel de resistencia al estrés por aluminio en *Arabidopsis* ecotipo Landsberg erecta, además de que algunos de ellos están involucrados en estrés oxidativo. Por esta

razón, los autores plantean que existe cierto ligamiento entre el estrés por iones de aluminio y el estrés oxidativo en plantas.

Análisis de expresión de 7 genes candidatos en puntas de raíces

Con los resultados iniciales obtenidos por PCR en tiempo real, se eligieron siete genes que fueron *Up-reguled*, es decir, que tuvieron mayor expresión en *B. decumbens* que *B. ruziziensis* y se evaluaron los cuatro genotipos de Brachiaria y en cinco tiempos: 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas. El PCR en tiempo real se llevó a cabo a partir de cDNA proveniente de 600ng de ARN libre de ADN obtenido desde puntas de raíces sometidas a las diferentes condiciones experimentales. Los genes seleccionados fueron AIBdec3, AIBdec5, AIBdec8, *AIBdec10*, AIBdec14, AIBdec15 y AIBdec16 (tabla 4).

El gen AIBdec3 tuvo una expresión relativa bastante alta en *B. decumbens* (figura 9). A la hora cero fue superior a toda la expresión que tuvo en el punto más alto de *B. ruziziensis* (48 horas). Tendió a aumentar a medida que pasaba el tiempo (de 0 a 72 horas). Sin embargo, tuvo una disminución significativa transcurrida tres horas, la cual volvió a elevarse a las 6. La expresión en la especie *B. ruziziensis* inicialmente tuvo la misma tendencia que la aluminio-resistente, a la hora cero la expresión fue mayor que a las 3 hora, destacando que el nivel de expresión fue mucho menor que en *B. decumbens*. El resultado de expresión, en términos generales, mostró en una escala logarítmica una diferencia de expresión de más de 10.000 veces en *B. decumbens* con respecto a *B. ruziziensis*. La máxima expresión de este gen en la especie susceptible se dio a las 48 horas de exposición tratamiento, pero a las 72 horas, vuelve y cae a niveles cercanos a los presentados a las 24 horas. Los niveles de expresión de los otros dos materiales (híbrido Mulato II y *B. brizantha*), estuvieron dentro de lo esperado, es decir con niveles intermedios.

Con los datos obtenidos en otros trabajos, se había predeterminado que la resistencia a aluminio de estos dos genotipos era intermedia (Dr Rao, comunicación personal), lo cual es corroborado con los niveles de expresión de este gen. La expresión en estos dos últimos cultivares tiene una tendencia a disminuir con las horas de exposición, siendo un poco más estable en *B. brizantha*, la cual es más resistente que Mulato II y por ende que *B. ruziziensis*.

De acuerdo con los análisis comparativos, esta secuencia (AIBdec3) no tuvo un *E-value* aceptable o significativo para determinar cual podría ser su función biológica de acuerdo con las secuencias ya publicadas en las bases de datos. Es de anotar que el tamaño pequeño de esta secuencia (262 pb) podría ser la razón de la falta de *hit* o de un *E-value* con valores no significativos. En términos generales, secuencias que tuvieron tamaños menores a 300 pb no presentaron homología con secuencias ya publicadas, a excepción de la secuencia AIBdec8.

AIBdec3 -Diversity analysis of aluminum

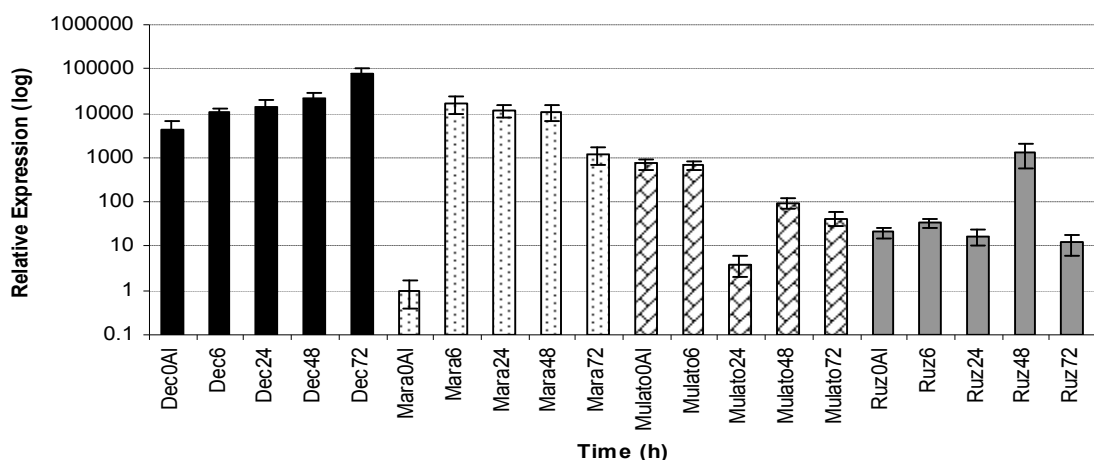


Ilustración 9 Niveles de expresión del gen AIBdec3 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio

Figura 9. Niveles de expresión del gen AIBdec3 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio. Las barras negras representan a *B. decumbens*, las punteadas a *B. Brizantha*, las rayadas a el híbrido mulato y las barras grises a *B. ruziziensis*. Los tiempos evaluados fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas.

En la figura 10 podemos mirar el resultado de la expresión relativa del gen AIBdec5. Es interesante la tendencia progresiva de expresión que tiene este gen en la especie susceptible a medida que pasa el tiempo de exposición a iones de aluminio. Sin embargo, el nivel de expresión en los otros tres materiales es muy superior. Como se observa en la gráfica, la expresión del gen en los materiales de resistencia intermedia, al igual que en el resistente, no muestra una tendencia de expresión creciente claramente definida por el tiempo de exposición. Los niveles de expresión se mantienen en el tiempo y son superiores a los niveles expresados por *B. ruziziensis*. De acuerdo con el análisis de bioinformática este gen tiene homología (*E-value* de $2e-04$) con la secuencia nucleotídica de la proteína ribosomal P1 aislada en *T. aestivum*.

Las proteínas ácidas ribosomales (P0, P1 y P2) son fosfoproteínas eucarióticas que están localizadas dentro de la subunidad ribosomal 60S y están, al parecer, involucradas en la síntesis de proteínas (Hasler *et al.* 1991) y su región carboxil-terminal juega un importante rol en la interacción del ribosoma con factores de elongación (Uchiumi *et al.* 1990). Así mismo, estas fosfoproteínas estarían envueltas en la reparación del DNA y funcionarían como importantes antígenos en enfermedades autoinmunes y en infecciones causadas por protozoos y hongos (Tchórzewski, 2002)

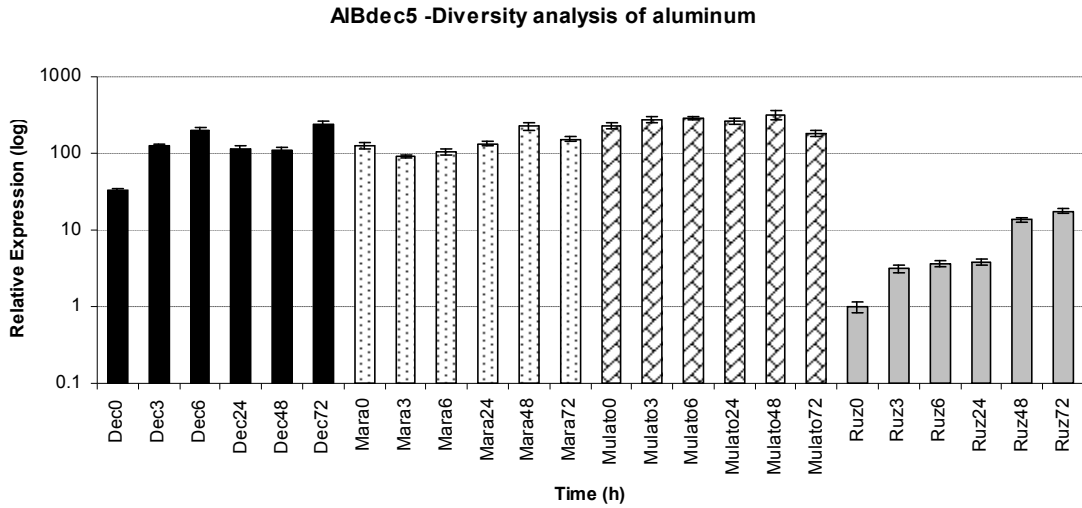


Ilustración 10 Niveles de expresión del gen AIBdec5 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio

Figura 10. Niveles de expresión del gen AIBdec5 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio. Las barras negras representan a *B. decumbens*, las punteadas a *B. Brizantha*, las rayadas a el híbrido mulato y las barras grises a *B. ruziziensis*. Los tiempos evaluados fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas.

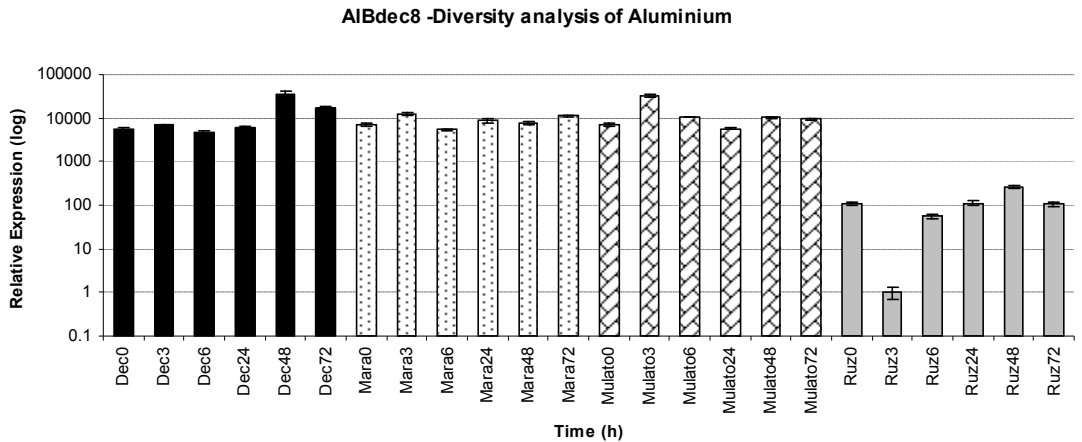


Ilustración 11 Niveles de expresión del gen AIBdec8 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio

Figura 11. Niveles de expresión del gen AIBdec8 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio. Las barras negras representan a *B. decumbens*, las punteadas a *B. Brizantha*, las rayadas a el híbrido mulato y las barras grises a *B. ruziziensis*. Los tiempos evaluados fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas.

La misma tendencia que tuvo el AIBdec5 se mantuvo en los genes AIBdec8, AIBdec10, AIBdec16 con algunas diferencias pequeñas. En el gen AIBdec8, no

hubo una tendencia dependiente del tiempo de exposición en *B. ruziziensis*, como ocurrió en el gen AIBdec5. Por el contrario, hubo una reducción de 100 veces en la expresión del gen desde la hora 0 a la hora 3, la cual se recuperó a las 6 horas y se mantuvo, con un ligero ascenso hasta las 48 horas y luego se redujo sutilmente a las 72 horas (figura 11).

De acuerdo con los niveles de expresión relativos obtenidos con PCR en tiempo real, el gen *AIBdec10* es el que muestra menor diferencia de expresión entre el material susceptible y los otros (figura 12). La diferencia nunca fue superior a 10 veces, valor que fue ampliamente superado con otros genes como es el caso del gen AIBdec8, AIBdec14, AIBdec16 donde la diferencia fue superior a 1000 veces, alcanzando en algunos casos valores cercanos a las diez mil veces.

La comparación de esta secuencia en las bases de datos mostró que este gen codifica una proteína bastante conservada en varias especies. Sin embargo esta proteína pertenece a una gran familia que no ha sido caracterizada. La gran familia está conformada por hidrolasas metal dependientes.

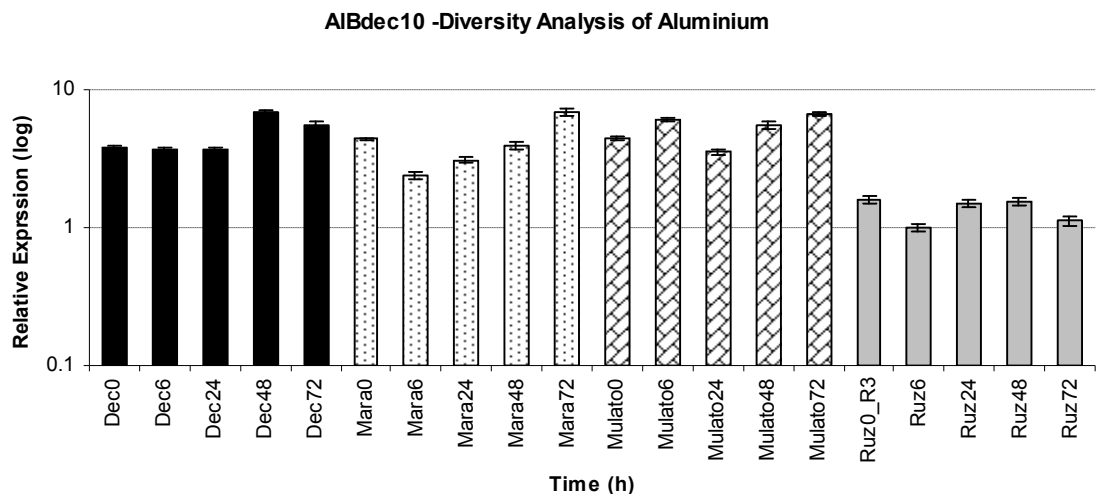


Ilustración 12 Niveles de expresión del gen AIBdec8 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio

Figura 12. Niveles de expresión del gen AIBdec8 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio. Las barras negras representan a *B. decumbens*, las punteadas a *B. Brizantha*, las rayadas a el híbrido mulato y las barras grises a *B. ruziziensis*. Los tiempos evaluados fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas.

El gen AIBdec14 muestra un aumento paulatino en el nivel de expresión en la especie tolerante y sus valores siempre son mayores a los presentados por las especies intermedias, quienes mantienen casi inalterada su expresión en el tiempo (figura 13). La expresión de este gen en *B. ruziziensis* fue menor en todos los casos. A las 3 horas tuvo una reducción con respecto a la hora 0, pero se

recuperó después de las 6 horas de tratamiento. El nivel de expresión de AIBdec14 en la especie resistente fue de 1000 veces más que en la especie susceptible, llegando a un máximo de casi 10000 a las 72 horas de tratamiento con aluminio. Al igual que el gen AIBdec15 y AIBdec16, este gen no tuvo hit cuando se hizo el análisis BLAST en las diferentes bases de datos de la Web.

El gen AIBdec16 tuvo un comportamiento de expresión muy similar al obtenido con el gen AIBdec14 (figura 15), inclusive, también presenta la misma reducción en la expresión a las tres horas de tratamiento en la especie susceptible, al igual que los genes AIBdec3, AIBdec8 y AIBdec10.

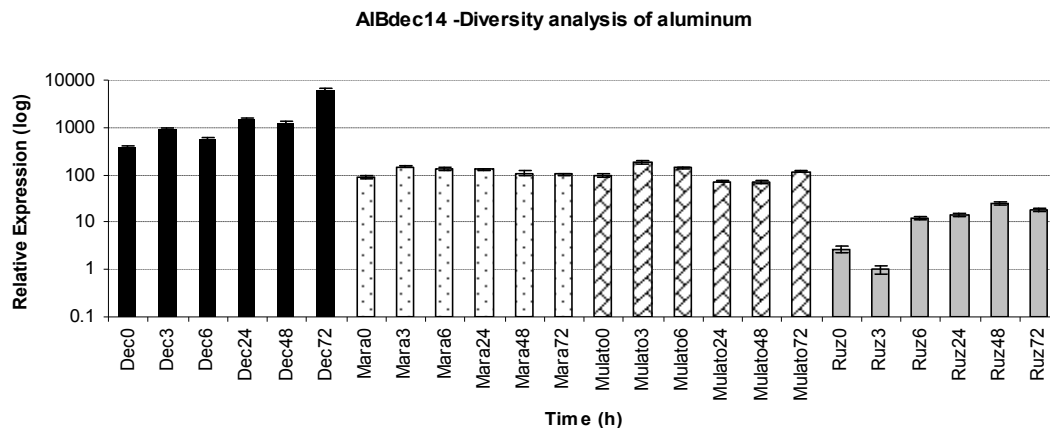


Ilustración 13 Niveles de expresión del gen AIBdec14 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio

Figura 13. Niveles de expresión del gen AIBdec14 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio. Las barras negras representan a *B. decumbens*, las punteadas a *B. Brizantha*, las rayadas a el híbrido mulato y las barras grises a *B. ruziziensis*. Los tiempos evaluados fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas.

El gen AIBdec15 presentó una expresión diferente con respecto a los otros genes evaluados. Como se ve en la figura 14, la expresión del gen en *B. brizantha* (resistencia intermedia) fue en términos generales menor que la expresión dada en *B. ruziziensis* (susceptible). En este material, la expresión tuvo una tendencia a disminuir hasta las 24 horas, tiempo en el cual empieza la recuperación en los valores de expresión aunque nunca alcanza a superar los niveles dados en la especie susceptible. A pesar de las diferencias en la expresión enunciadas arriba, la expresión de este gen en la especie resistente fue mayor que en la especie susceptible

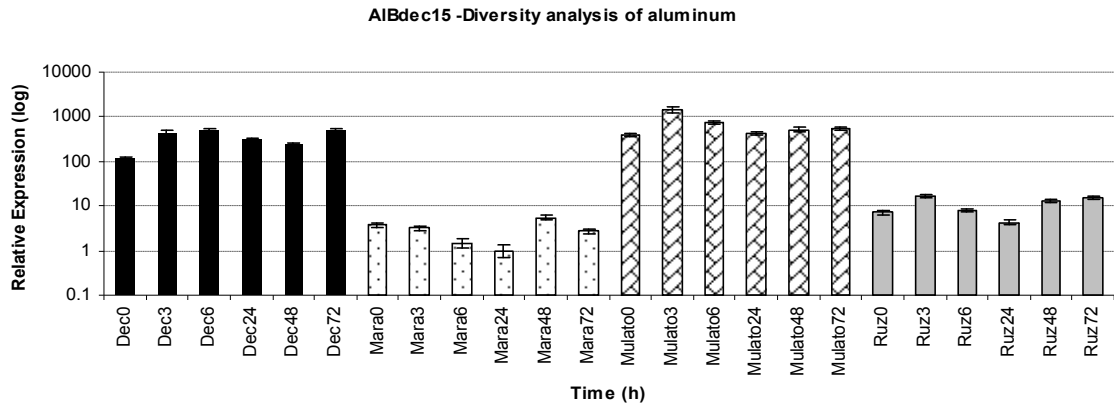


Ilustración 14 Niveles de expresión del gen AIBdec15 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio

Figura 14. Niveles de expresión del gen AIBdec15 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio. Las barras negras representan a *B. decumbens*, las punteadas a *B. Brizantha*, las rayadas a el híbrido mulato y las barras grises a *B. ruziziensis*. Los tiempos evaluados fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas.

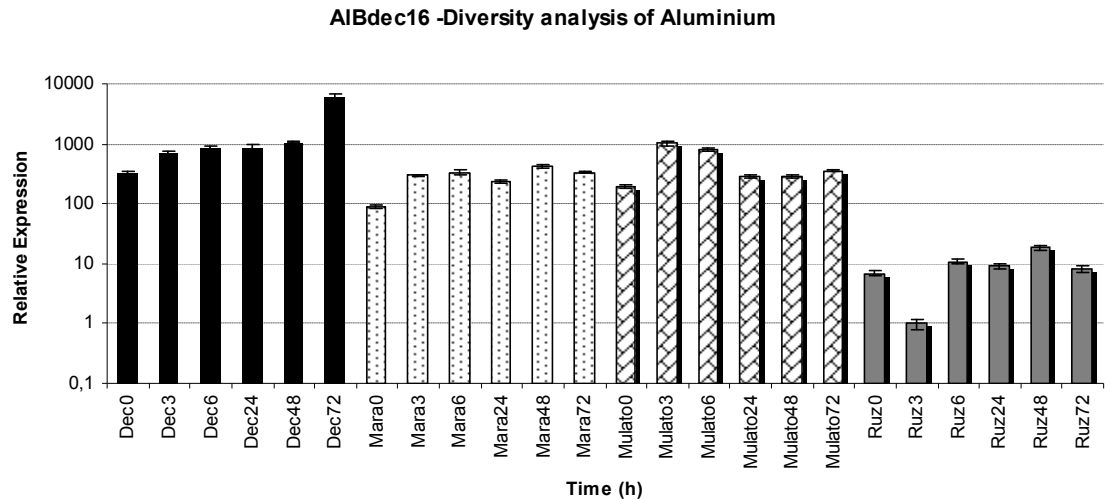


Ilustración 15 Niveles de expresión del gen AIBdec16 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio

Figura 15. Niveles de expresión del gen AIBdec16 en raíces de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio. Las barras negras representan a *B. decumbens*, las punteadas a *B. Brizantha*, las rayadas a el híbrido mulato y las barras grises a *B. ruziziensis*. Los tiempos evaluados fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas.

Análisis de expresión de 7 genes candidatos en tejido foliar

Con el fin de conocer si la expresión diferencial de estos genes en las puntas de raíces de la especie aluminio-resistente era igual en otros tejidos, se realizó una colecta de tejido foliar de plántulas de *B. decumbens* (resistente) y *B. ruziziensis* (susceptible), sometidas a 200µM de aluminio a las 0, 6, 24 y 48 horas. El ARN proveniente de estas hojas fue convertido a cDNA y con ellos se montó varios ensayos de PCR en tiempo real, bajo las mismas condiciones descritas en materiales y métodos.

Los resultados en términos generales mostraron diferencias en los modelos de expresión con respecto a los obtenidos en puntas de raíces. Mientras que en raíces la expresión de estos genes siempre fue mayor en la especie resistente, en hojas no se mantuvo esta tendencia de forma clara. En los genes AIBdec3 y AIBdec5, la tendencia general estuvo representada en la disminución de la expresión relativa a través del tiempo, a excepción de este último en *B. ruziziensis*, donde por el contrario tuvo un aumento de expresión a través del tiempo (figura 16A y 16B). El gen AIBdec8 tuvo un comportamiento análogo al que tuvo AIBdec16 (figura 16C y 16G). En estos dos, los niveles de expresión en *B. decumbens* se mantuvieron prácticamente inalterados en el tiempo y fueron muy superior a los de *B. ruziziensis*.

La expresión de los genes AIBdec14 y AIBdec15 en *B. ruziziensis* fue la más baja de este experimento (figura 16E y 16F). La del gen AIBdec14 no se alcanzó a amplificar en la reacción de PCR en tiempo real, hasta las 48 horas, donde alcanzó una leve expresión. La del otro gen, aunque si se detectó en todos los tiempos, su expresión fue en muy bajos niveles (figura 16F). En cuanto a sus expresiones en *B. decumbens*, podríamos decir que tuvieron un comportamiento de cierta manera contradictorio. Mientras que el primero tuvo una tendencia a aumentar sus niveles a través del tiempo, AIBdec15 presentó una disminución desde las 0 a 24 horas, aumentando significativamente a las 48 horas, tiempo en el cual superó todos los niveles anteriores (figura 16F).

El gen *AIBdec10* en la especie resistente, mostró cierta elevación de los niveles de expresión, alcanzando su máximo valor a las 24 horas. Después de este tiempo (48 horas) presentó una leve reducción que se mantuvo por encima de los valores encontrados en *B. ruziziensis*, cuya expresión tuvo una tendencia a la disminución, ya que en la hora 0 presentó su máximo nivel (figura 16D).

Análisis de expresión de 7 genes candidatos en presencia de NaCl

En varios trabajos publicados se ha señalado que el aluminio puede activar genes que están relacionados con la resistencia y toxicidad causado por otros agentes. Los que más se han mencionado son los que causan estrés oxidativo (Basu *et al.*, 2001, Ezaki *et al.*, 1996, Yamamoto *et al.*, 2002). Con el fin de ver que pasa en la

expresión de estos 7 genes en la presencia de otros factores causantes de estrés, nosotros hicimos un experimento donde cambiamos el aluminio por 100mM de Cloruro de Sodio (NaCl).

Los tiempos evaluados fueron a las 0 y a las 24 horas. Como tratamiento control usamos dos ensayos, uno fue cosechando puntas de raíces en el momento de montar los tratamientos (tiempo 0) y el otro fue cosechando las puntas desde plántulas crecidas en medios hidropónicos sin sodio a las 24 horas, lo mismo que las sometidas al tratamiento con 100mM de NaCl (figura 17). A excepción del gen AIBdec5 y del AIBdec8 no hubo diferencia significativa entre la expresión de los dos tratamientos controles (datos no mostrados).

El gen AIBdec3 presentó un incremento significativo en la expresión en raíces de *B. decumbens* al igual que en *B. ruzizensis*. Sin embargo la expresión en esta última fue menor, incluyendo la dada en el tiempo 0 (figura 17A). Este mismo comportamiento tuvo el AIBdec15 pero solo en la especie resistente. En la susceptible no hubo cambio perceptible (figura 17E). El gen AIBdec14 por su parte, no presentó cambios apreciables en ninguna de las dos especies al pasar de 0 a 24 horas (figura 17D).

Amplificación Rápida de los Extremo 5' y 3' de cDNA (RACE)

Mediante la técnica RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) se obtuvo la secuencia completa del gen *AIBdec10* proveniente del cDNA de *B. decumbens*. Inicialmente nosotros tratamos obtener el gen completo con la metodología y los reactivos del *kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification Biosciences Clontech* (Catalogo 634914). Sin embargo con este kit solo se pudo obtener el extremo 3'. Con la obtención del extremo 5', tuvimos inconvenientes y fue imposible sintetizar el codón de inicio de dicho gen. Bajo esta situación se decidió cambiar a la metodología del *kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA End*, versión 2.0 de Invitrogen.

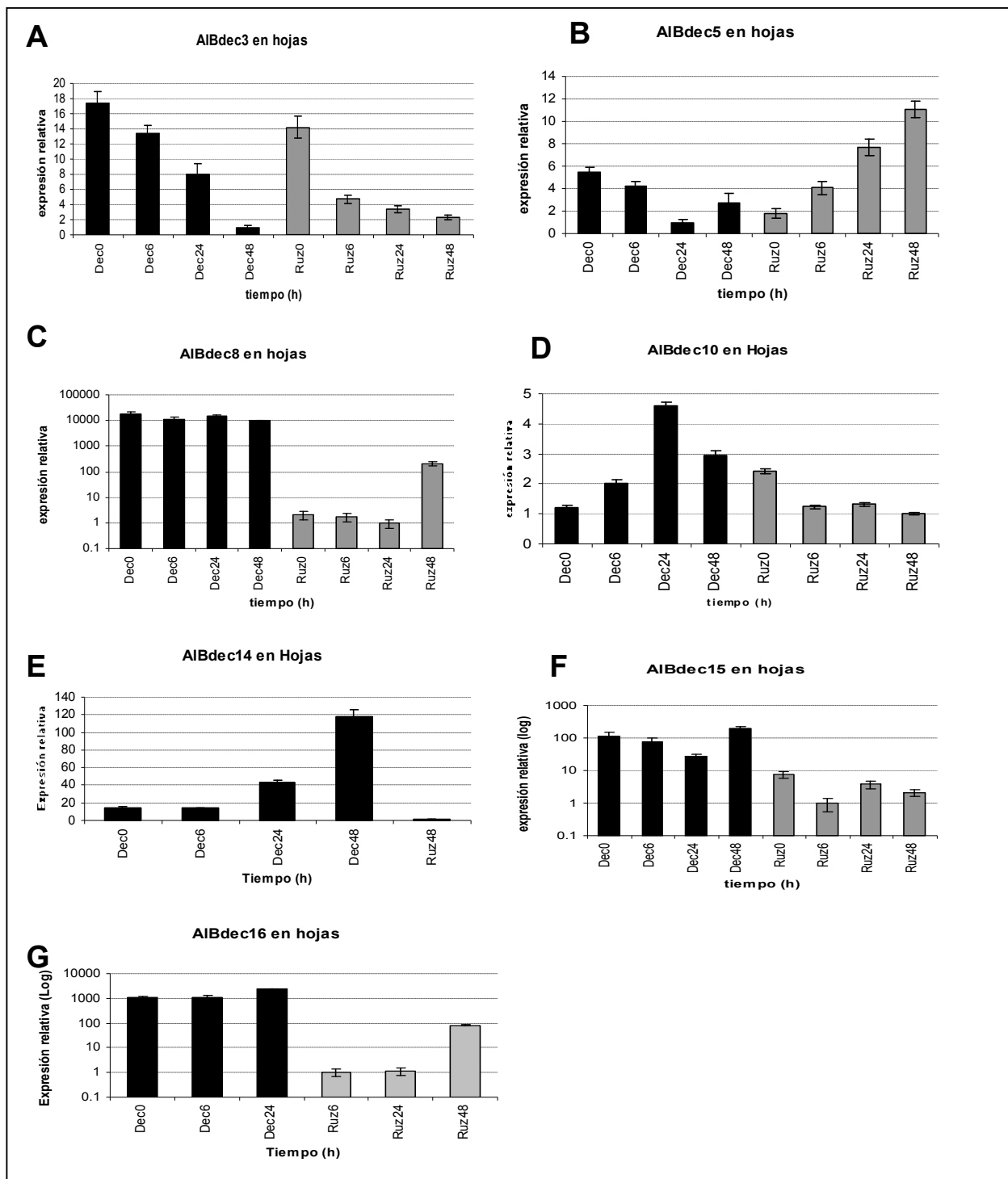


Ilustración 16 Niveles de expresión de 7 genes candidatos en hojas de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio

Figura 16. Niveles de expresión de 7 genes candidatos en hojas de plántulas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio. Las barras negras representan a *B. decumbens* y las barras grises a *B. ruziziensis*. Los tiempos evaluados fueron 0, 6, 24 y 48 horas.

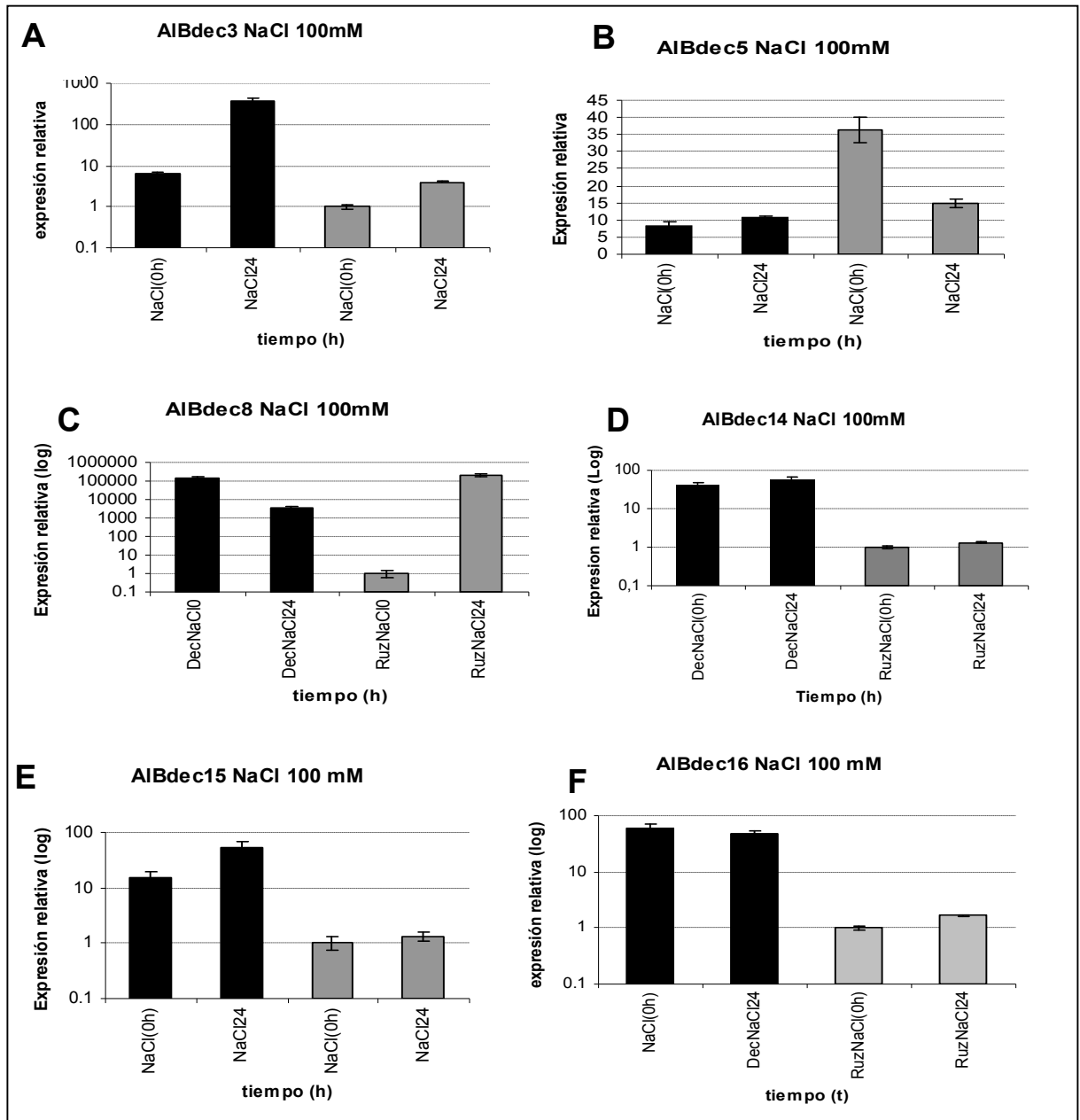


Ilustración 17 Niveles de expresión de 7 genes candidatos en raíces sometidas a 100mM de NaCl

Figura 17. Niveles de expresión de 7 genes candidatos en raíces sometidas a 100mM de NaCl. Las barras negras representan a *B. decumbens*. Las barras grises representan a *B. ruziziensis*. La primera barra representa la expresión en tiempo 0. La segunda es la expresión en el tratamiento con NaCl a las 24 horas.

Siguiendo los fundamentos del protocolo del *BD SMART™ RACE cDNA Amplification*, nosotros obtuvimos el fragmento 3' del gen *AIBdec10*. Esta metodología nos permitió obtener diferentes fragmentos que fueron clonados en el vector *pGEMT-Easy* (Promega) como se describió en materiales y métodos. Estos clones fueron secuenciados y analizados para confirmar su correspondencia con la secuencia del gen *AIBdec10*.

El análisis bioinformático, nos mostró que esta secuencia efectivamente correspondía al extremo 3' del gen *AIBdec10*, por que contenía la secuencia ya conocida y además tenía el codón de parada y una cola poli A. algunos clones presentaron mutaciones puntuales, pero nosotros creemos que la mayoría de estos cambios se deben más a artefactos causados en el PCR por la *Taq polimerasa*, si bien es probable que algunos sean reales y sean efectivamente parte de alelos diferentes.

Así mismo, se obtuvieron diferentes fragmentos 5'RACE (figura 18) con primers diseñados a partir de la secuencia del extremo 3' y de la secuencias de los genes publicados en genbank que dieron *hit* cuando hicimos el análisis comparativo con el extremo 3' en NCBI y GRAMENE. Como ya se mencionó, el extremo 5' fue obtenido con la metodología 5' RACE de la compañía Invitrogen. Esta metodología generó diferentes fragmentos que fueron clonados en el vector *pGEMT-Easy* (figura 18), secuenciados y analizados con diferentes herramientas bioinformáticas. La secuenciación de diferentes fragmentos clonados en el plasmido *pGEMT-Easy* mostró, al igual que el extremo 3', algunas variaciones puntuales que se editaron, siempre que fue posible, con la alineación de todos los fragmentos secuenciados. Finalmente nosotros amplificamos el marco abierto de lectura o ORF (*Open reading frame*) (figura 18), usando la *Platinum® Pfx DNA polymerase* de alta especificidad y cebadores diseñados sobre las secuencias del extremo 3' y 5' del gen (tabla 2). Esta *Taq-polimerasa* se usó por que elimina los posibles errores puntuales introducidos por la *Taq DNA polimerasa* común. Con esta *taq-polimerasa* logramos tener 2 secuencias con diferencias en algunos nucleótidos, lo que podría indicar que efectivamente hay por lo menos dos copias diferentes de este gen en *B. decumbens*. Además, Es de aclarar que la secuenciación del ORF(*Open reading frame*) fue realizada en 6 clones diferentes y en ambos sentidos, lo cual apoya la hipótesis que efectivamente se trataría de fragmentos diferentes y no de artefactos del PCR.

Los Paquetes bioinformáticos *DNAMAN Sequence Analysis Software* y el *Vector NTI*, nos permitieron hacer un ensamble de cada una de los *contigs* secuenciadas del ORF, ya que el sistema de secuenciación no permite hacer reacciones directas de más de 500-600pb en una sola reacción. Por lo tanto necesitamos hacer varias reacciones para secuenciar el fragmento completo. Este sistema de secuenciación recibe el nombre de *walking*, consiste en hacer una reacción y a partir de esta diseñar nuevos cebadores y así sucesivamente hasta terminar toda la secuencia.

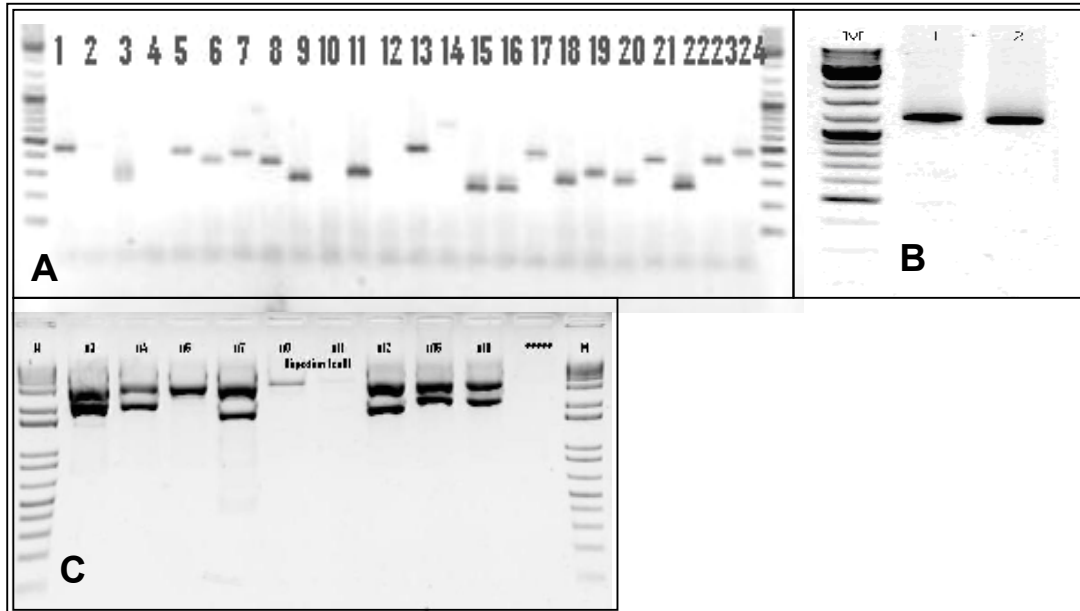


Ilustración 18 Fragmentos de cDNA del gen *AIBdec10* obtenidos con RACE

Figura 18. Fragmentos de cDNA del gen *AIBdec10* obtenidos con RACE. A) diferentes fragmentos 5' de cDNA obtenidos con el *kit* 5' RACE de Invitrogen. B) fragmentos ORF de *AIBdec10*. C) plasmidos *pGEMT-Easy* digerido con *EcoRI* conteniendo fragmentos ORF.

En la figura 19 se muestra las secuencias completas (*Full length*) de los dos ORF del gen *AIBdec10* obtenidos mediante la técnica RACE y sus respectivas mutaciones puntuales

Estas mutaciones puntuales producen cambios al nivel de amino ácidos solo en cuatro ocasiones de las 12 diferenciales que hay en las dos secuencias ORF, las otras no representan ningún cambio a nivel de proteína.

La figura 20, se muestra la secuencia consenso (ensamblada) de los ORF y de los extremos 5' RACE y 3' RACE del gen *AIBdec10*.

El codón de inicio del gen *AIBdec10* se determinó, por comparación con los genes que mostraron alta similitud como fue el caso de un gen aislado de arroz y uno de *Vitis vinifera*. De cierta manera, se confirmó que este es efectivamente el codón de inicio al comparar las secuencias satélites vecinas donde el se encuentra inmerso, ya que estas son conservadas en muchos individuos eucarióticos (Lütcke *et al.*, 1987; McBratney and Sarnow, 1996).

MERZ10CGGGCGATCCCAAAATTCGGAACCCCTTCCCCACC	34
MERZ4	TGTCACAGCGAGCCGTCACGTCTCCTCTCCTTGGCATCGCGGGCGATCCCAAAATTCGGAACCCCTTCCCCACC	74
MERZ10	ATGGCGTCTCTCTCGCCGGCAGCCGCTCCTCGCCCAAGAGGCTGCGGGTCTACTCGTCCGCTCCACCCCCAC	108
MERZ4	ATGGCGTCTCTCTCGCCGGCAGCCGCTCCTCGCCCAAGAGGCTGCGGGTCTACTCGTCCGCTCCACCCCCAC	148
MERZ10	CGACGGCGACGGGAGCGGCAAGCGCGTGGGGACCCATAACGGCAGCTTCCACTGCGACGAGGGCGCTCGGCTGCT	182
MERZ4	CGACGGCGACGGGAGCGGCAAGCGCGTGGGGACCCATAACGGCAGCTTCCACTGCGACGAGGGCGCTCGGCTGCT	222
MERZ10	TTCTCATCCGCTCACCTCCAGTTTACCAGGCGCCGACGCTCGTCCGACCCCGGACTCGCAGATCCTTGATACT	256
MERZ4	TTCTCATCCGCTCACCTCCAGTTTACCAGGCGCCGACGCTCGTCCGACCCCGGACTCGCAGATCCTTGATACT	296
MERZ10	CTGGATGCTGTGCTTGATGTGCGTGGTGTCTATGATCCCAAGCAGCATCGATATGATCATCACCAGAAGGGTTT	330
MERZ4	CTGGATGCTGTGCTTGATGTGCGTGGTGTCTATGATCCCAAGCAGCATCGATATGATCATCACCAGAAGGGTTT	370
MERZ10	CAGCGAGGCTTTGGCCATGGATTCAACACAAAACCTAGCAGTGTGGCTTGCTTACAAGCATTTTGGTAAGG	404
MERZ4	CAGCGAGGCTTTGGCCATGGATTCAACACAAAACCTAGCAGTGTGGCTTGCTTACAAGCATTTTGGTAAGG	444
MERZ10	AGATAATTGCTAAGGAGCTTGGGGTTAATGAGGATCAGCAAGACGTTTCACCGCTGTATCTTGAATATATAAA	478
MERZ4	AGATAATTGCTAAGGAGCTTGGGGTTAATGAGGATCAGCAAGACGTTTCACCGCTGTATCTTGAATATATAAA	518
MERZ10	AGCTTTGTTGAGGCACTTGATGCAATTGACAATGGAATCAATCAATATGACACAGACCAACCACAAAGTTTGT	552
MERZ4	AGCTTTGTTGAGGCACTTGATGCAATTGACAATGGAATCAATCAATATGACACAGACCAACCACAAAGTTTGT	592
MERZ10	GAACAATACACACTTGTCTTACGCGTGGGGCTTAAATCCGGACTGGACTGATCCAGACCAGTACCTGAGA	626
MERZ4	GAACAATACACAACTTGTCTTACGCGTGGGGCTTAAATCCGGACTGGACTGATCCAGACCAGTACCTGAGA	666
MERZ10	AGGAGAACGCCGATTTCAACAGGCCATGACGCTAGCTGGAAGTGAATTTATGGAGAGTGTTCGCTTTTATGTT	700
MERZ4	AGGAGAACGCCGATTTCAACAGGCCATGACGCTAGCTGGAAGTGAATTTATGGAGAGTGTTCGCTTTTATGTT	740
MERZ10	AAATCATGGTTACCTGCAAGATCTATTGTCTGGAGTGTATTATTATCTAGAGGAAAGGTTGACCAAGTGGAGA	774
MERZ4	AAATCATGGTTACCTGCAAGATCTATTGTCTGGAGTGTATTATTATCTAGAGGAAAGGTTGACCAAGTGGAGA	814
MERZ10	AATCATGGTTTTGGATAGATTCTGCCCGTGAAGCTTCATCTTTTTGAGCTTGAAGAGGACTGAAGACTGATC	848
MERZ4	AATCATGGTTTTGGATAGATTCTGCCCGTGAAGCTTCATCTTTTTGAGCTTGAAGAGGACTGAAGACTGATC	888
MERZ10	CTCTGACCAAGTATGCGCTGTATCAGGATGAGAGGAGCAAGAGCTGGCGAGTGAAGCCGTTGCTGTTGCTCCC	922
MERZ4	CTCTGACCAAGTATGCGCTGTATCAGGATGAGAGGAGCAAGAGCTGGCGAGTGAAGCCGTTGCTGTTGCTCCC	962
MERZ10	GACAGGTTGAGAGCCGAAAGGCTCTGCCAGAGAAGTGGAGGGGCATGAGAGACGATGAACTGTCTGCAGAAAC	996
MERZ4	GACAGGTTGAGAGCCGAAAGGCTCTGCCAGAGAAGTGGAGGGGCATGAGAGACGATGAACTGTCTGCAGAAAC	1036
MERZ10	TGGCATTCCCGCTGTGTGTTGTCCATATGAGCGGTTTCATTGGGGCAACAAGACCTACGAGGGAGCGTTGG	1070
MERZ4	TGGCATTCCCGCTGTGTGTTGTCCATATGAGCGGTTTCATTGGGGCAACAAGACCTACGAGGGAGCGTTGG	1109
MERZ10	AAATGGCAAGAGCTGCTCTGAAATGCTGATTGAACCAAGGCACTTACAGTAACAGTCTTTCCCCATGTTACCAT	1144
MERZ4	AAATGGCAAGAGCTGCTCTGAAATGCTGATTGAACCAAGGCA.....	1151
MERZ10	TGGTTTAGTAAACACATCAGAGTTTCAGCAAAACAGTCTGAAATGGGCCTTCGCCATGTTATCTTTGACCCAT	1218
MERZ4	1151
MERZ10	CTTCGTAGCTAACATTGAGAATACTCATTCTGTTATCTTCGTCTTACAGAAGAGGCTTAAATTAATTTTCCG	1292
MERZ4	1151
MERZ10	CCTTTGATTATCTGGTAATGAGCTAGAAGGTGACAA	1329
MERZ4	1151

Ilustración 19 Resultado del alineamiento de las dos secuencias ORF del gen *AIBdec10*

Figura 19. Resultado del alineamiento de las dos secuencias ORF del gen *AIBdec10*. Los bloques verdes representan las secuencias iguales en ambos ORF. Los cuadrados son cambios o mutaciones puntuales. Los cuadrados azules representan las diferencias que generan cambios a nivel de aminoácidos. Los bloque amarillos corresponden a diferencias del lugar donde fueron diseñados los cebadores para la síntesis de cada ORF.

Algunos autores han propuesto que el codón de inicio (AUG) usado o reconocido como el iniciador de la traducción para la síntesis de proteínas, está influenciado por la composición de sus nucleótidos adyacentes. Kozak (1987), propone que la secuencia del codón de inicio debe estar internamente en el motivo 5'-CC(A/G)CCAUGG-3', donde se pegan algunos factores de transcripción (McBratney and Sarnow, 1996).

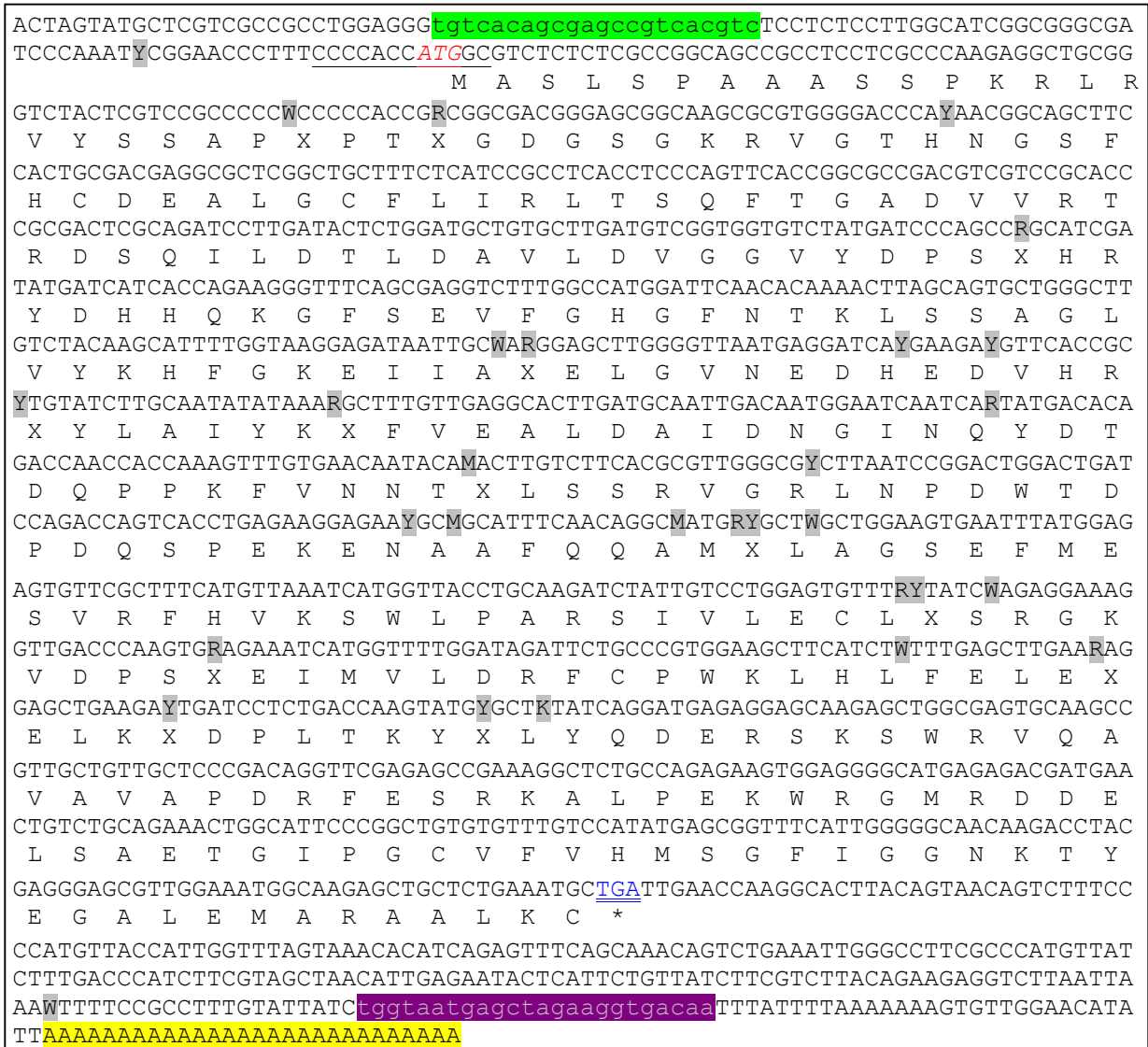


Ilustración 20 Secuencia consenso del gen *AIBdec10*

Figura 20. Secuencia consenso del gen *AIBdec10*. El codón de inicio ATG (Metionina), está subrayado y en itálica. El de parada (TGA) Doblemente subrayado. Las letras individuales representan la secuencia aminoacídica con un * indicando el codón de parada. Las letras resaltadas en gris, simbolizan las diferentes mutaciones o ambigüedades puntuales, M= A o C, R= A o G, W= A o T, Y= C o T y K= G o T. La secuencia subrayada, es una secuencia que normalmente acompaña al codón de inicio. El cebador con sentido o *forward* y el antisentido o *reverse* están en letras minúsculas. Al final se encuentran las adeninas que componen la cola poli A

Esta secuencia del gen *AlBdec10* fue analizada en diferentes bases de datos usando los programas BLASTN y TBLASTX de NCBI y GRAMENE, para determinar por comparación las posibles funciones biológicas que tendría este gen por homología con otros genes ya caracterizados. Los resultados de la búsqueda en estas bases de datos, mostraron que la secuencia de este gen tiene secuencias homólogas en arroz, en maíz, en arábido y en uva (*Vitis vinifera*), con altos valores de similitud.

Lastimosamente, la proteína codificada en estas especies aún no ha sido caracterizada y por lo tanto su función no ha sido determinada. Sin embargo mediante análisis bioinformático se ha podido establecer que este gen, bastante conservado de acuerdo a la alta homología que presenta en las diferentes especies, pertenece a una familia de proteínas denominada hidrolasa metal dependiente, cuyos miembros aún no tiene una función biológica determinada.

Una de las características de esta familia es que la secuencia aminoacídica de la proteína contienen un gran número de residuos de unión a metales. Los análisis mediante programas bioinformáticos de la secuencia del gen tanto de arroz como de arábido, muestran que tienen un motivo DHH y sugieren una función fosfoesterasa, bastante interesante, para el análisis nuestro por que algunos trabajos en resistencia a aluminio han mostrado que algunas fosfatasa podrían estar relacionadas con esta resistencia.

El análisis Blast, también arrojó que esta secuencia tiene similitud con un gen aislado de arroz que putativamente codifica una proteína GAMM1, con un E-value de $4e-169$ y una identidad de 90% (311/345) (figura 21). De igual forma, presentó hit con un gen aislado desde *Arabidopsis thaliana* que codifica una proteína semejante a GAMM1, E -value de $2e-141$ y una identidad de 74% (253/338).

Evaluación de otros genes de tolerancia al Al aislados en otras especies

La fitotoxicidad del aluminio ha motivado a muchos grupos de investigación en plantas a generar estudios para la resistencia a este metal. Como resultado se han obtenido algunos genes que tienen bastante relación con la resistencia o tolerancia al estrés causado por iones de aluminio. En este trabajo nosotros quisimos evaluar si la resistencia que tiene el género *Brachiaria* esta relacionada con la presencia y expresión de alguno de estos genes. Por esta razón hicimos una serie de reacción de PCR con *primers* o cebadores (tabla 3) diseñados a partir de las secuencias publicadas por cada uno de los grupos que reportaron la asociación entre estos genes y la resistencia o tolerancia al estrés por aluminio.

protein OsI	..MAAA ¹ AAAS ² SPKRLRVYSS ³ VS ⁴ GDGR ⁵ SAN ⁶ CA ⁷ GSGKRVGTHNGSFHCDEALGC ⁸ YLIRLTSQF ⁹ AGADVVRTR	68
AlBdec10 con	MA ¹ SLSE ² AAAS ³ SPKRLRVYSS ⁴ AP ⁵ TPT ⁶ D ⁷ ... ⁸ GD ⁹ GSGKRVGTHNGSFHCDEALGC ¹⁰ YLIRLTSQF ¹¹ T ¹² GADVVRTR	67
protein OsI	DE ¹ QILD ² TLDAVLDVGGVYDPS ³ R ⁴ HR ⁵ YD ⁶ HH ⁷ QKGF ⁸ NE ⁹ VFGHG ¹⁰ FNTK ¹¹ LSSAGLVYKHF ¹² GKEI ¹³ I ¹⁴ AKEL ¹⁵ EV ¹⁶ SE ¹⁷ DHE	138
AlBdec10 con	DS ¹ QILD ² TLDAVLDVGGVYDPS ³ Q ⁴ HR ⁵ YD ⁶ HH ⁷ QKGF ⁸ SE ⁹ VFGHG ¹⁰ FNTK ¹¹ LSSAGLVYKHF ¹² GKEI ¹³ I ¹⁴ AKEL ¹⁵ GV ¹⁶ NE ¹⁷ DHE	137
protein OsI	DVHRLYLAIYKSFVEALDA ¹ VD ² NGINQYD ³ TDQPPK ⁴ Y ⁵ VN ⁶ NTHLSSRVGR ⁷ LNP ⁸ DW ⁹ TD ¹⁰ PD ¹¹ QSP ¹² EKENAA ¹³ FQQAM	208
AlBdec10 con	DVHRLYLAIYKSFVEALDA ¹ VD ² NGINQYD ³ TDQPPK ⁴ Y ⁵ VN ⁶ NTHLSSRVGR ⁷ LNP ⁸ DW ⁹ TD ¹⁰ PD ¹¹ QSP ¹² EKENAA ¹³ FQQAM	207
protein OsI	VL ¹ AGSE ² FMESV ³ RFH ⁴ VK ⁵ SWL ⁶ PAR ⁷ SIV ⁸ LE ⁹ CLLS ¹⁰ RGK ¹¹ VDPS ¹² EE ¹³ IMV ¹⁴ LDR ¹⁵ FC ¹⁶ PW ¹⁷ KLHL ¹⁸ FE ¹⁹ LEE ²⁰ EEL ²¹ K ²² LD ²³ P ²⁴ LTK ²⁵ Y ²⁶ V	278
AlBdec10 con	TL ¹ AGSE ² FMESV ³ RFH ⁴ VK ⁵ SWL ⁶ PAR ⁷ SIV ⁸ LE ⁹ CLLS ¹⁰ RGK ¹¹ VDPS ¹² EE ¹³ IMV ¹⁴ LDR ¹⁵ FC ¹⁶ PW ¹⁷ KLHL ¹⁸ FE ¹⁹ LEE ²⁰ EEL ²¹ K ²² LD ²³ P ²⁴ LTK ²⁵ Y ²⁶ A	277
protein OsI	LY ¹ Q ² DE ³ RSK ⁴ SW ⁵ RVQAV ⁶ GV ⁷ AP ⁸ DR ⁹ FES ¹⁰ RK ¹¹ EL ¹² PE ¹³ K ¹⁴ WR ¹⁵ GM ¹⁶ RD ¹⁷ DE ¹⁸ LS ¹⁹ ND ²⁰ IG ²¹ PG ²² CV ²³ FV ²⁴ H ²⁵ MSG ²⁶ FIG ²⁷ G ²⁸ NK ²⁹ TY ³⁰ E ³¹ GA ³² LEM	348
AlBdec10 con	LY ¹ Q ² DE ³ RSK ⁴ SW ⁵ RVQAV ⁶ GV ⁷ AP ⁸ DR ⁹ FES ¹⁰ RK ¹¹ AL ¹² PE ¹³ K ¹⁴ WR ¹⁵ GM ¹⁶ RD ¹⁷ DE ¹⁸ LS ¹⁹ AE ²⁰ IG ²¹ PG ²² CV ²³ FV ²⁴ H ²⁵ MSG ²⁶ FIG ²⁷ G ²⁸ NK ²⁹ TY ³⁰ E ³¹ GA ³² LEM	347
protein OsI	ARAA ¹ L ² K ³ C[Oryza s	355
AlBdec10 con	ARAA ¹ L ² K ³ Ctranslation	354

Ilustración 21 Alineamiento de la proteína hipotética DHH de *Oryza sativa* (cultivar indica) y la hipotética del gen *AlBdec10* de *B. decumbens*

Figura 21. Alineamiento de la proteína hipotética DHH de *Oryza sativa* (cultivar indica) y la hipotética del gen *AlBdec10* de *B. decumbens*. El motivo DHH está resaltado por un cuadrado punteado.

Secuencia parcial de un homólogo de *ALMT1*

La producción y liberación de aniones orgánicos desde las raíces de plantas ha sido uno de los mecanismos de resistencia al daño causado por iones de aluminio más estudiado en la actualidad. Sasaki *et al.*, (2004) han mostrado que el gen *ALMT1* (*Aluminium Activated malate transporter*) es el responsable de la tolerancia que tiene las plantas de trigo a este metal y fue el primero en ser clonado para la resistencia a aluminio. La eficacia de este gen en la resistencia al estrés está reportada por Delhaize *et al.*, (2007).

Para examinar si en *Brachiaria* existe un homólogo de este gen (transportador de malato activado por iones de aluminio) y si es este el responsable de la expresión diferencial de resistencia entre *B. decumbens* (resistente) y *B. ruzisiensis* (susceptible), nosotros diseñamos *primers* desde la secuencia del homólogo *TaALMT1* e hicimos algunos análisis moleculares.

Como resultado, nosotros amplificamos fragmentos del gen, los clonamos y lo secuenciamos. La secuenciación de varios clones nos mostró que *B. decumbens* probablemente posee diferentes alelos del gen, ya que obtuvimos dos secuencias que diferían en algunos nucleótidos puntuales. En la figura 22 se destacan los sitios de los cebadores usados para amplificar el fragmento y algunas mutaciones puntuales.

En la secuencia se observan mutaciones, que indican que las secuencias de este gen en *B. decumbens* no es idéntica a la del gen en *Triticum aestivum* (Trigo), lo cual de cierta manera es lo más normal ya que estamos hablando de dos especies muy diferentes aunque pertenezcan al mismo grupo genético de las Poaceae.

GAAGACGGTGGTGCAGAGGCA GATGGCGACGCCGACGAAGATGGTTCGAGATGCGCTGGAGC
 GCGAGGGGCATGAGCTCCTCGACGCGGTAGCTCGAGACGGCGACGAGGCTGAAGGTGAGTA
 TGAAGATGCTGACGCCGTAGTCGAATCTCGCCTTGATCTCCGGGATGAACCGCGAGAAGGTC
 GCAGCCGACGCTACAAAGAAGACGAAGACGACAAGCAGTATGAACTCCGCCTGTTCACTTGTT
 GGGACGATGAGGCTAGCGAGCTCATGAGCTCCGATGGCGAGGGAAGTGGCCACCAGCGTCG
 CCAGAGCTCTGTTGAGGCCTTTACTCAGCGTCGCGCCTGCAAATAATTGAGCATATATATAATG
 CATATTTGCATTTGTCTGCAGGTGCAGCAAGCCTAAACAATAATGTATTTGTACATAAGTATAAT
 CGATTCAAACATACCGACGGTGAAGTCCATGACGACGACGACGGT

Ilustración 22 Secuencia parcial del gen homólogo de *TaALMT1* obtenida en *B. decumbens*

Figura 22. Secuencia parcial del gen homólogo de *TaALMT1* obtenida en *B. decumbens*. El color oscuro corresponde al cebador en sentido 5'-3' (*primers forward*) y el gris al cebador en sentido 3'-5' (*primers reverse*). Las letras resaltadas indican algunas mutaciones puntuales.

En la figura 23 se muestra el resultado del análisis comparativo de las secuencias parciales de ALTM1 de *B. decumbens* y las de tres especies más, a nivel de aminoácidos.

Una de las secuencias de *B. decumbens* difirió, tanto de la secuencia proveniente de esta misma especie como de las otras en un motivo (TVVVVMXTV) que dentro de este análisis es bastante conservado ya que fue igual en las cuatro especie evaluadas. Otro cambio en la secuencia de aminoácidos entre estas dos secuencia se dio en el número 110 donde se cambió una Serina (S) por una Treonina.

T. aestivum	TVVVMEYTVGATLSKGLNRALATLVAGCLAVGAHQLAELAERCGDQCEPIMLTVLVFFV	148
Secale cerea	TVVVMEFTV GATLSKGLNRALATLVAGCLAVGAHQLAELTERCSDQCEPVMMLTVLVFFV	141
B. decumbens	MQYIYAQLFAGATLSKGLNRALATLVASSLATGAHELASLIVPTSECAEFILLVVEVFFV	94
B. decumbens	TVVVMEFTV GATLSKGLNRALATLVASSLATGAHELASLIVPTSECAEFILLVVEVFFV	60
H. vulgare	TVVVMEYTVGGTLSKGLNRALATLVAGFTAVGAHQVAN...RCGAQCEPILLAIIVFFL	157
T. aestivum	ASAATFLRFIPEIKAKYDYGVTIFILTFGLVAVSSYRVEELIQLAHQRFYTIIVGVFTICL	208
Secale cerea	ASAATFLRFIPEIKAKYDYGVTIFILTFGLVAVSSYRVEELIQLAHQRFYTIIVGVFTICL	201
B. decumbens	ASAATFSRFIPEIKARFDYGVSI FILTFSLVAVSSYRVEELMPLALQRISTIFVGVATICL	154
B. decumbens	ASAATFSRFIPEIKARFDYGVSI FILTFSLVAVSSYRVEELMPLALQRIITIFVGVATICL	120
H. vulgare	ASAATFSRFIPEIKARYDYGVTIFILTFSLVAVSSYRVEELIQLAHQRFSTIVIGVLTICL	217
T. aestivum	CTTVF	213
Secale cerea	CTTVF	206
B. decumbens	CTTVF	159
B. decumbens	CTTVF	125
H. vulgare	CTTIF	222

Ilustración 23 Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de *B. decumbens* con secuencias del gen ALTM1 obtenidas en *Triticum aestivum*, *Secale cereale* y *Hordeum vulgare*

Figura 23. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de *B. decumbens* con secuencias del gen ALTM1 obtenidas en *Triticum aestivum*, *Secale cereale* y *Hordeum vulgare*.

De acuerdo con los resultados comparativos obtenidos podemos pensar que efectivamente la secuencia del gen *TaALMT1* si tiene homólogos en *B. decumbens*, y su expresión relativa en las dos especies tanto en la resistente

como en la susceptible tuvo una tendencia creciente en el tiempo. En *B. decumbens*, aumentó hasta las 6 horas, luego se redujo a las 24, tuvo un repunte significativo a las 48 horas, alcanzando el nivel máximo y luego se redujo un poco a las 72 horas (figura 24). En *B. ruziziensis* la expresión del gen homólogo a las 3 y 24 horas fue superior a la especie resistente y aunque a las 48 y 72 horas presentó aumentos estos nunca fueron superiores a los niveles presentados por esta última (figura 24). La diferencia de expresión del gen homólogo de *TaALMT* entre estas dos especies no fue indicadora de la responsabilidad de este gen en la resistencia diferencial que existe entre la especie resistente y la susceptible, sobre todo en las primeras horas del estrés por que como ya se mencionó, a las 3 y 24 horas la expresión en la especie susceptible fue mayor que en la especie resistente. A pesar de todo, podemos acotar que este gen podría estar aportando cierto grado de resistencia al estrés por aluminio como lo sugirió Wenzl, *et al.*, en el 2002b.

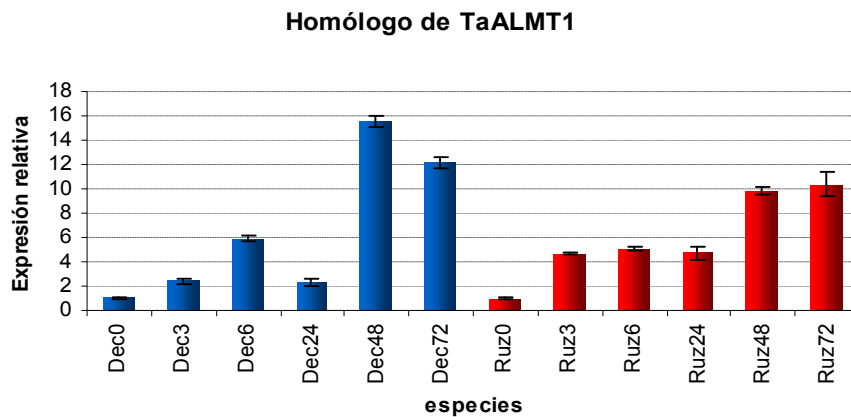


Ilustración 24 Expresión relativa del gen homólogo TaALMT1 en *B. decumbens* y en *B. Ruziziensis*.
 Figura 24. Expresión relativa del gen homólogo *TaALMT1* en *B. decumbens* y en *B. Ruziziensis*. Dec= *B. Decumbens* y Ruz= *B. Ruziziensis*.

Secuencia parcial homóloga del gen STOP1

El gen *STOP1* (*Sensitive to Proton rhizotoxicity*) es un factor de transcripción que contiene un dedo de zinc (*zinc finger*) del tipo Cys₂.His₂, el cual funciona como un agente de regulación para el gen *AtALMT1*, quien es homólogo del gen *TaALMT1* hallado en *Arabidopsis*. El trabajo de Iuchi *et al.*, (2007) mostró que este factor de transcripción ayuda a las plantas a que toleren iones de aluminio y protones en suelos ácidos. Ellos evaluaron el nivel de expresión del gen *STOP1* en varios pH y diferentes concentraciones de aluminio (2, 4 y 10 μM) en plantas de *Arabidopsis* Col-0 (WT) por medio de la técnica RT-PCR cuantitativo. La conclusión de este trabajo fue que el gen *STOP1* juega un rol importante en la tolerancia de *Arabidopsis* a factores críticos de estrés en suelos ácidos.

A raíz de este interesante hallazgo, nosotros quisimos saber si algún homólogo del gen *STOP1* se encontraba en plantas de *Brachiaria* y como era la expresión de este gen cuando se sometían dichas plantas a estrés por iones de aluminio.

Como resultado se encontró una secuencia homóloga del gen *STOP1* desde el cDNA proveniente de ARN de *B. decumbens*. Los *primers* (tabla 3) para el PCR, se diseñaron a partir de secuencias consensos de este gen encontradas en diferentes especies y publicadas en geneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Una vez terminada la reacción de PCR, los fragmentos se separaron en una matriz de agarosa, se limpiaron y se clonaron en el vector *pGEMT-Easy*. Estos últimos se secuenciaron y se sometieron a análisis comparativo con Blast, Blastx y Tblastx en NCBI. Los resultados mostraron que los fragmentos obtenidos efectivamente correspondían a secuencias homólogas del gen *STOP1* y presentaban alta similitud con homólogos aislados en arroz y en *A. thaliana* (figura 25). Los niveles de expresión relativa se muestran en la figura 26.

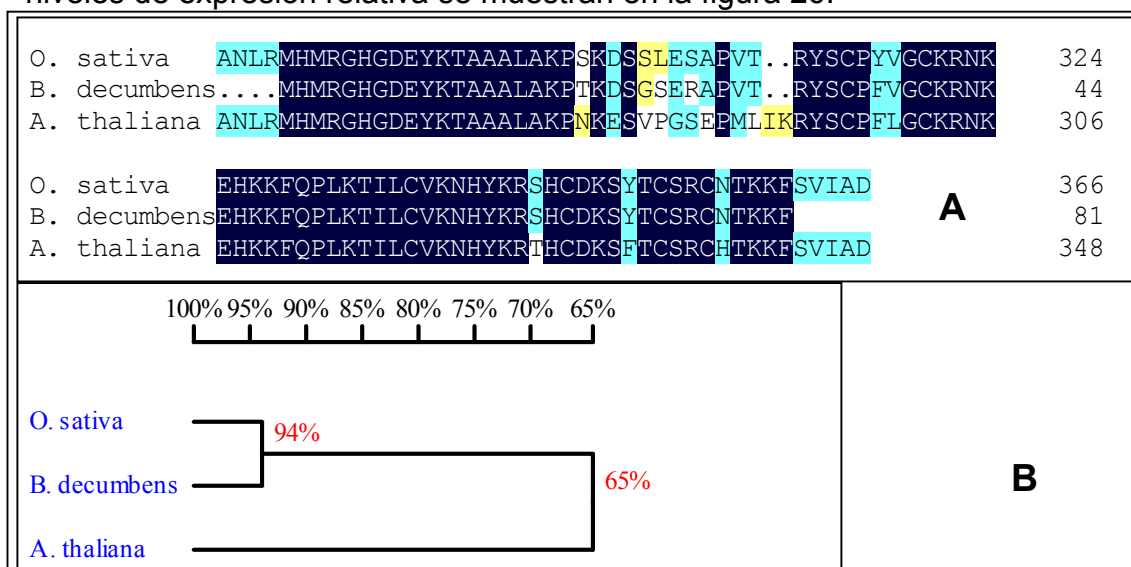


Ilustración 25 Resultado del análisis Blast con el gen homólogo *STOP1* aislado desde *B. decumbens* comparado con *O. sativa* y *A. thaliana*

Figura 25. Resultado del análisis *Blast* con el gen homólogo *STOP1* aislado desde *B. decumbens* comparado con *O. sativa* y *A. thaliana*. A)-muestra el alineamiento a nivel de secuencias de proteínas. B)-Dendrograma de similitud.

Como se puede ver en la figura 26, la expresión relativa de este gen fue mayor en la especie susceptible, sobre todo a las 24 y 48 horas. En ambas especies, la tendencia de expresión con el tiempo de exposición fue de aumentar. *B. brizantha* tuvo una expresión muy parecida a la presentada por *B. decumbens*, aunque hubo una diferencia bastante notable a las 3 horas, momento en el cual *B. brizantha*, tuvo su máxima expresión. Este nivel máximo superó en todos los tiempos a los presentados por *B. decumbens*.

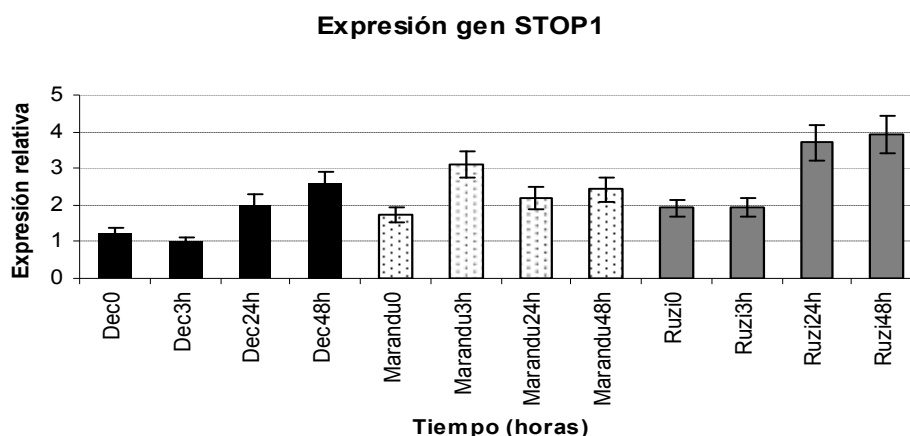


Ilustración 26 Expresión relativa del gen homólogo STOP1 en *B. decumbens* (barras negras), en *B. brizantha* y en *B. ruziziensis*

Figura 26. Expresión relativa del gen homólogo STOP1 en *B. decumbens* (barras negras), en *B. brizantha* (barras punteadas) y en *B. ruziziensis* (barras grises).

Secuencia parcial homóloga del gen HvAACT1

Nosotros identificamos en *B. decumbens* un producto de PCR homólogo a el gen *HvAACT1* (*Aluminum-Activated Citrate Transporter*) (figura 27), el cual es el responsable de la secreción de citrato activada por iones de aluminio en cebada (*Hordeum vulgare*) (Furukawa *et al.*, 2007). Este gen pertenece a la familia MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) y fue constitutivamente expresado en las raíces de los cultivares aluminio-resistentes de cebadas (Furukawa *et al.*, 2007) y de ápices de raíces de *Vigna umbellata* (Yang *et al.*, 2006).

Este hallazgo está de acuerdo con lo obtenido por Wenzl *et al.* (2002b), quienes aseguraron que en las especies de Brachiaria también hay un mecanismo de producción de citrato y otros ácidos orgánicos que estarían involucrados en la desintoxicación de aluminio dentro de los ápices de raíces de las plantas.

La comparación de las secuencias de los fragmentos obtenidos con los cebadores diseñados desde la secuencia del gen *HvAACT1*, es mostrada en la figura 27. Como se puede ver, hay una gran similitud entre la secuencia obtenida desde cDNA de puntas de raíces de *B. decumbens* y las publicadas para *O. sativa* y *H. vulgare*.

Lastimosamente por el deterioro del cDNA, no fue posible llevar a cabo los análisis de expresión de este gen en las especies de Brachiaria.

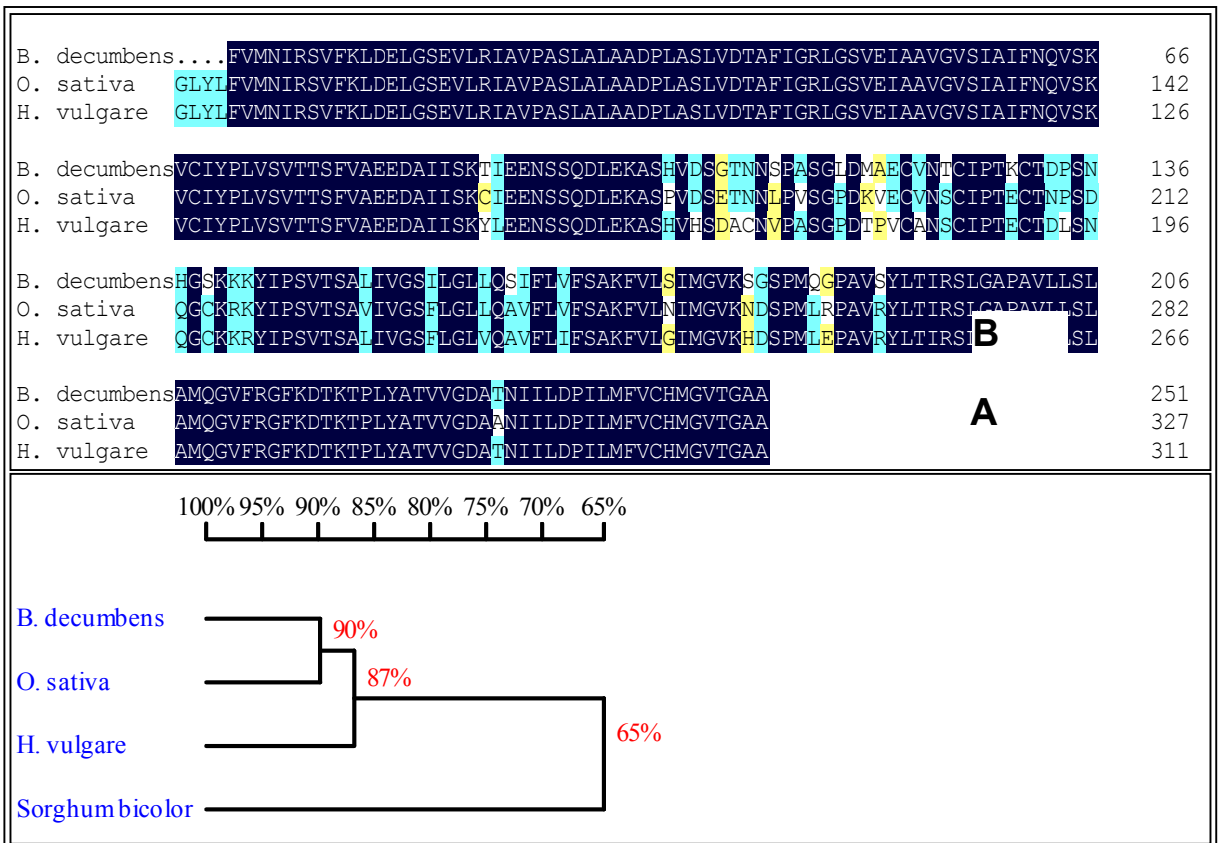


Ilustración 27 Resultado del análisis Blast con el gen homólogo HvAACT1 aislado desde *B. decumbens*

Figura 27. Resultado del análisis *Blast* con el gen homólogo *HvAACT1* aislado desde *B. decumbens*. A)-muestra el alineamiento a nivel de secuencias de proteínas de *B. decumbens*, *O. sativa* y *H. vulgare*. B)-Dendrograma de similitud *B. decumbens*, *O. sativa*, *H. vulgare* y *sorghum bicolor*.

7. DISCUSION

En muchos trabajos se ha demostrado que *Brachiaria* es un género de planta que presenta altos niveles de resistencia a los efectos dañinos causados por iones de aluminio. El trabajo de Wenzl *et al.* (2001), mostró que los niveles de resistencia de *B. decumbens* son mucho mayores que los alcanzado por otras especies como centeno, *arabidopsis*, trigo y maíz. Es más, la especie que tenemos como susceptible, *B. ruzizensis*, tuvo en este estudio valores de resistencia iguales o en algunos casos mayores a los presentados por los genotipos resistentes de estas cuatro especies. Bajo estos criterios se puede pensar que el o los mecanismos de resistencia que presenta este género es o son mucho más efectivos a la hora de conferir resistencia a iones de aluminio que los presentados por las plantas anteriormente enunciadas.

En los últimos años se han hecho innumerables esfuerzos para dilucidar el mecanismo por el cual algunas plantas se desintoxican de los iones de aluminio. Esto ha conllevado a la descripción de varios mecanismos en diferentes especies vegetales. En *B. decumbens* a pesar que se han hecho varias aproximaciones, aún no se ha podido aclarar el principal mecanismo que le confiere resistencia diferencial al estrés por aluminio con respecto a *B. ruzizensis*.

En este sentido se elabora el trabajo aquí presentado, con el fin de identificar y caracterizar secuencias de genes expresados diferencialmente en plantas de *B. decumbens* asociados al estrés causado por iones de aluminio para aportar en el entendimiento de la forma como esta especie resiste el daño ocasionado por este estrés.

El mecanismo más conocido y aceptado actualmente para la resistencia al estrés por aluminio, es el de la exclusión a través de la exudación de ácidos orgánicos y en algunos casos de fosfatos. Sin embargo, según Wenzl *et al.* (2001), este mecanismo no es el responsable directo del alto nivel de resistencia diferencial entre las dos especies de *Brachiaria*, ya que la cantidad de ácidos orgánicos secretado por las raíces de la especie resistente solo fue ligeramente mayor que la producida por Ruzi y fue mucho menor que las segregadas por las plantas resistentes de *Fagopyrum esculentum*, maíz y trigo cuyo valor de resistencia es mucho menor que las de *B. decumbens*. Así mismo, estos autores encontraron que el flujo de fosfato en *B. decumbens* no fue lo suficientemente alto para explicar los niveles de resistencia de esta especie, por el contrario, el nivel fue menor que el producido por Ruzi, que es la especie susceptible. El flujo de fosfato en esta última, en presencia de aluminio fue hasta cuatro veces mayor que el de las plantas resistentes.

Estos hallazgos indican que la manera como las plantas de *Brachiaria* resisten los daños causados por aluminio, probablemente, no involucren de manera importante la desintoxicación externa de cationes de este metal por agentes quelantes como fosfatos y ácidos orgánicos. Wenzl *et al.* (2002b), sugieren que estos últimos estarían involucrados en los mecanismos de resistencia de estas plantas, por desintoxicación interna debido a la acumulación que presentan en el interior del tejido radicular, más como una contribución que como los responsables directos de dicha resistencia.

Wenzl *et al.* (2002b), postularon que mecanismos internos serían un componente integral del principio de la resistencia al aluminio. Debido a esto, ellos evaluaron si el patrón de acumulación de ácidos orgánicos en ápices de raíces estresadas con aluminio era consistente con el patrón de desintoxicación interna involucrado en los niveles de resistencia presentados por este género. Los autores encontraron que ambas especies acumularon altas concentraciones de aluminio en sus raíces y que cerca de dos terceras partes estaban unidas a ligandos solubles de bajo peso molecular, como los ácidos orgánicos.

De igual forma, ellos encontraron que el estrés por aluminio incrementó la producción de ácidos orgánicos en ambas especies cuando se evaluó la raíz completa. Cuando la evaluación fue realizada sólo en las puntas radiculares, el aumento de ácidos orgánicos, únicamente se presentó en los procedentes de *B. decumbens* y no en los de *B. ruzizensis*.

Los principales ácidos encontrados en ambas especies fueron citrato, trans-aconitato, malato y oxalato que constituyeron cerca del 97% de todos los ácidos orgánicos identificados en todos los tejidos en ambas especies (Wenzl *et al.* 2002b).

Ellos hallaron que el estrés por aluminio incrementaba la concentración de complejos de aluminio y ácidos orgánicos en ápices de *B. decumbens* pero no en los de *B. ruzizensis*, aunque esta última presentó altos niveles basales. Según estos autores, la acumulación de citrato sugerida por una regresión lineal, mostró que se sintetizaron 0.5 moléculas de este ácido por cada ion de aluminio acumulado en el ápice de la raíz, independientemente de la especie de *Brachiaria* valorada. Para malato hubo una tendencia opuesta entre las dos especies, es decir, mientras para *B. decumbens* aumentaba para Ruzi disminuía.

Estos resultados son, de cierta manera, consistentes con los resultados obtenidos por nosotros, al evaluar la expresión del gen homólogo a *TaALMT1*, sobre todo a las 6, 48 y 72 horas, donde la expresión de este gen en la especie resistente supera la expresión en la susceptible. Según los datos de Wenzl *et al.* (2002b), en *B. decumbens*, por cada ion de aluminio acumulado se aumenta la síntesis de malato en aproximadamente 2.8 moléculas, mientras que para Ruzi esta síntesis disminuye.

En nuestro trabajo los resultados mostraron que en *Brachiaria* existe un gen homólogo del gen malato, el cual fue descubierto en trigo (*TaALMT1*). La amplificación de este gen se hizo usando unos cebadores diseñados en secuencias consensos de genes homólogos encontrados en diferentes especies publicados en la Web de NCBI.

Este resultado parece estar de acuerdo con lo divulgado por Wenzl *et al.*, (2002b), quienes muestran la presencia de este ácido orgánico en las raíces de dos especies de *Brachiaria*. A pesar de esto, los resultados obtenidos por nosotros al nivel de expresión de ARN mensajero difieren un poco con los hallados por estos autores, ya que como se mencionó arriba, ellos encontraron que la síntesis de malato de acuerdo a la concentración de aluminio era opuesta en las dos especies, mientras que en la resistente aumentaba, en la susceptible disminuía. En cambio en nuestro trabajo, la tendencia general tanto en la especie resistente como en la susceptible, fue de aumentar en el tiempo, aunque la expresión en *B. decumbens*, disminuyó un poco a las 72 horas (figura 24).

Esta diferencia puede estar basada en el tipo de tejido usado y además en el tiempo de evaluación. Nosotros usamos puntas de raíces de plántulas obtenidas directamente de semillas y evaluamos en diferentes tiempos hasta el tercer día a nivel de expresión de ARNm, mientras que ellos lo hicieron a partir de puntas de raíces adventicias y evaluaron los contenidos de ácidos orgánicos a los 13 días.

Según estos autores, el citrato sería más importante para la resistencia a aluminio que el propio malato, ya que este último aunque captura aluminio, su unión con iones de aluminio no es tan fuerte como la que ocurre entre el aluminio y el citrato (Wenzl *et al.*, 2002b). Este caso que es de cierta manera corroborado en el trabajo de Grundy *et al.* (2001), quienes mostraron que una parte del citrato obtenido desde puntas de raíces de estas dos especies, estuvo unido a iones de aluminio mientras que el malato obtenido no estaba ligado a estos cationes. Por esta razón, los autores han manifestado que el citrato es el ácido orgánico más importante en el mecanismo de resistencia al estrés por aluminio que tienen las plantas de *Brachiaria*, sin que esta cantidad de citrato pueda explicar la diferencia existente entre las plantas resistentes (*B. decumbens*) y las susceptibles (*B. ruziziensis*).

La importancia de los ácidos orgánicos en la resistencia basal de *Brachiaria* al aluminio, por lo tanto, es manifiesta. Sin embargo la forma como estos actúan no es por secreción, sino por acumulación de estos en los ápices radiculares donde probablemente neutralizan los efectos dañinos causado por los cationes de este metal (Watanabe *et al.*, 2006; Wenzl *et al.*, 2002b).

En *A. thaliana* Hoekenga *et al.* (2006), plantean que para que exista resistencia al estrés por aluminio, es necesario la presencia del gen *AtALMT1* (malato) y un factor genético o proteínico que interactue con el gen para su activación. El gen

que codifica este factor aún se desconoce y se cree que podría estar involucrado en la traducción de una señal para *AtALMT1*.

Furukawa y otros (2007), encontraron que las plantas de cebada evitan el daño de sus raíces causado por iones de aluminio, exudando moléculas de citrato. Él y sus colaboradores lograron identificar el gen responsable de la secreción de citrato activado por la presencia de aluminio, usando las técnicas de mapeo fino y de análisis de microarreglos. El gen denominado *HvAACT1* pertenece a la familia MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*) y fue expresado principalmente y de manera constitutiva en las raíces de las plantas del cultivar resistente. Ellos sobre expresaron este gen en tabaco y hallaron buena correlación entre la resistencia a aluminio, la expresión del gen y la secreción de citrato, con lo cual llegaron a la conclusión que el gen *HvAACT1* es un transportador de citrato activado por aluminio responsable de la resistencia a este metal en cebada y en otras especies (Pellet *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2000).

Nosotros también aislamos un homólogo de este gen en *B. decumbens* (figura 27), el cual presentó alta homología con el gen de cebada (87%) y un homólogo de arroz con el que tuvo el mayor valor de similitud (90%) (figura 27b). Dentro de este mismo análisis, se incluyó la secuencia de un homólogo aislado en plantas de *Sorghum bicolor*, cuyo valor de similitud según el dendrograma es del 65%, siendo el más disímil entre ellos. La presencia de este gen en *B. decumbens* pone de manifiesto lo expuesto por Wenzl *et al.*, (2002b), quienes como se ha mencionado, divulgaron que el aluminio estimuló un incremento en la concentración de ácidos orgánicos, principalmente citrato, malato y oxalato, en las puntas de raíces de *B. decumbens* y no en las de *B. ruziziensis*, aunque esta última presentó altos niveles basales.

El citrato fue el ácido carboxílico más importante del estudio de Wenzl *et al.* (2002b), ya que fue el de mayor presencia en las raíces y su acumulación en ápices radiculares fue dependiente de la cantidad de aluminio usado en el medio de crecimiento para ambas especies. En *B. decumbens*, la acumulación estuvo acompañada de la acumulación de malato, mientras que en *B. ruziziensis* su acopio fue a expensa de malato. Ellos plantean que el ácido cítrico o citrato es usado por *B. decumbens* para la desintoxicación interna de aluminio dentro de los ápices y no como ocurre en otras especies donde la desintoxicación se realiza de manera externa. Resultados parecido se han encontrado en otras especies como *Cassia tora* (Ma, *et al.*, 1997), *Rumex acetosa* (Tolrá *et al.*, 2005) y soya (Yang, *et al.* 2000)

Lastimosamente nosotros no pudimos corroborar estos resultados con el gen homólogo al *HvAACT1* a nivel de expresión de ARN mensajero en ninguna de las especies por inconvenientes de tiempo.

Los resultados obtenidos por Arango (2004), Buitrago (2003), Rosero (2005), Wenzl *et al.* (2002b), Wenzl *et al.* (2001) y otros autores que han abordado el estudio de la resistencia de las plantas de *Brachiaria* al estrés por aluminio, sustentan que el mecanismo de resistencia en estas plantas no depende únicamente de la intervención de los ácidos orgánicos. Al parecer, esta característica tiene muchos más componentes genéticos de los ya conocidos.

En este sentido, aislar genes involucrados en la resistencia al estrés por aluminio por expresión diferencial entre el material resistente y susceptible, toma mayor relevancia por que podría ser el camino para dilucidar nuevas maneras de resistencia al daño ocasionado por iones de aluminio.

El aislamiento de genes asociados directa o indirectamente con la tolerancia o resistencia al estrés por aluminio ya ha sido abordado en diferentes especies pero su confirmación o su rol en esta tolerancia, en la mayoría de los casos no ha sido confirmada, entre otras cosas, por que se desconoce su interacción génica y su tipo de herencia.

La mayoría de estudios sobre la herencia de la resistencia al estrés por aluminio se han hecho en muy pocas plantas; el énfasis ha estado enfocado en plantas económicamente importantes como arroz, maíz y trigo entre otras (Kochian *et al.*, 2005). Muchos esfuerzos también han sido orientados a conocer los mecanismos y el tipo de herencia de los genes responsables de la resistencia o tolerancia que presentan algunos ecotipos de la planta modelo *A. thaliana* en presencia de cationes de aluminio.

En algunos cultivos esta resistencia ha presentado una herencia de tipo simple, es decir que está dominada por uno o unos pocos genes. En otras plantas, en cambio, parece ser una característica dominada por muchos genes, lo que se conoce como característica cuantitativa. Al parecer, la resistencia al daño ocasionado por iones de aluminio en arroz, maíz y *Arabidopsis* es una característica de este tipo (Kochian *et al.*, 2004). Hoekenga *et al.*, (2003) planteó que la diferencia en resistencia entre dos accesiones de *A. thaliana* (una resistente y otra susceptible) esta dada por el flujo de malato y algunos QTLs que contribuyen el fenotipo resistentes. De igual manera, Tang *et al.*, (2002) reportó que algunos genotipos de trigo muestran patrones de tolerancia que se identifican con característica dependientes de varios genes, aunque otros estudios lo muestran como una característica monogénica (Kochian *et al.*, 2004; Sasaki *et al.* 2004). En *Brachiaria* se han hecho algunas aproximaciones con QTL y los resultados también sugieren que esta característica es muy compleja (Rosero, 2005)

El progreso de nuevas metodologías biotecnológicas ha permitido, en la actualidad, generar estudios para la activación o desactivación de genes cuando los genotipos son sometidos a alguna condición especial durante su desarrollo.

Estas técnicas han permitido tener una visión más general sobre lo que sucede en la batería génica durante estas etapas y ampliar la manera como abordar la interacción genotipo/estimulo.

Estas tecnologías ya han sido usada en varios trabajos para el estudio de la interacción planta/aluminio. Como lo indica Kumari *et al.*, (2008), varios genes y transcripto han sido identificados como respuesta al estrés por aluminio por diferentes métodos de análisis. Entre las técnicas que mencionan se encuentran los EST (*expressed sequence tag*), librerías genómicas, librerías de cDNA, *differential display*, cDNA-AFLP, poblaciones mutantes y estudios transgénico para sobre-expresar genes específicos.

Últimamente está cogiendo auge el uso de microarreglos para el estudio de la interacción planta-aluminio. El trabajo de Kumari *et al.*, (2008) es un ejemplo de esto. Los resultados obtenidos por ellos mostraron que el aluminio activó un gran número de genes con diferentes funciones biológicas entre los que se destacan los transcripto de algunas fosfatasas.

Los genes obtenidos en cada uno de estos estudios, han sido relacionados con diferentes funciones y de manera general han sido agrupados así: grupo 1) estaría integrado por los genes involucrados en la vía de estrés oxidativo; grupo 2) por transportadores de membranas; grupo 3) por genes relacionados en el metabolismo primario; grupo 4) metabolismo de pared celular y polisacáridos; grupo 5) genes del metabolismo de proteínas; grupo 6) hormonas de señal y grupo 7) factores de transcripción (Kumari *et al.*, 2008).

Como se mencionó arriba, nuestro trabajo partió de la construcción de una librería sustractiva por supresión que inicialmente generó 35 clones (Salcedo *et al.*, 2005), los cuales fueron reducidos a 18 mediante análisis bioinformático. Los 18 genes se sometieron a amplificación por PCR en tiempo real para confirmar su expresión diferencial en la especie *B. decumbens*. Este análisis arrojó que de estos 18 genes, solo siete tenían expresión diferencial a las 24 horas.

De estos siete genes, cuatro (AIBdec3, AIBdec14, AIBdec15, AIBdec16) no alinearon con ninguna secuencia de las reportadas en los sitios especializados en la Web, el gen AIBdec5 dio hit con una secuencia proveniente *T. aestivum* reportada como proteína ribosomal P1. La secuencia AIBdec8, lo hizo con una proteína hipotética de arroz, cuya función se desconoce, al igual que la del *AIBdec10*.

La secuencia completa del gen *AIBdec10* fue aislada a partir de puntas de raíces de *B. decumbens* sometidas a estrés por aluminio usando la metodología RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). El patrón putativo de aminoácidos y los motivos conservados de la secuencia del gen *AIBdec10* lo ubicó en la superfamilia DHH (Asp-His-His) de las fosfoesterasa (Aravind and Koonin, 1998; Middelhaufe

et al. 2007). Este gen representa un desafío para el análisis dentro de los mecanismos de resistencia a aluminio, ya que la familia al cual pertenece (DHH) según análisis bioinformático, no ha sido caracterizada y su función biológica permanece desconocida.

Esto último es bastante interesante si se tiene en cuenta que muchos trabajos han asociado la resistencia al estrés por aluminio con la interacción entre cationes de este metal e iones de fósforo y fosfatos.

Los resultados de Wenzl *et al.* (2002a), mostraron que la exposición de raíces de *B. decumbens* a aluminio no inhibe la concentración de fósforo dentro de los ápices radiculares, mientras que en *B. ruziziensis* la reducción es evidente y alcanza valores cercanos a el 70%. En *Cowpea* (*Vigna unguiculata* L.), la acumulación de fósforo fue significativamente reducida tanto en la especie resistente como en la susceptible por la aplicación de aluminio, pero la reducción fue mayor en la especie susceptible (Martin, *et al.*, 2007).

De acuerdo con estos resultados parecería que tanto *B. decumbens* como *Cowpea* tienen un mecanismo de resistencia al aluminio que involucra la toma y la concentración de fósforo en las puntas de sus raíces, ya que la presencia de este último en mayor cantidad, en algunos materiales de estas dos especies, se encuentra relacionado con el mayor grado de resistencia que presentan.

Estos mismos resultados fueron encontrados por Zheng *et al.*, (2005), quienes encontraron que en trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) después de varios días de estar sometido a estrés por aluminio las plantas del cultivar resistente al aluminio (Jiangxi) acumulaban más fósforo y aluminio en sus raíces que el cultivar sensible (Shanxi). Ellos encontraron, que al igual que en los genotipos de *Brachiaria*, la variación en los niveles de resistencia de los diferentes materiales de *Fagopyrum esculentum*, no podían ser explicado a partir de las cantidades de secreción de ácidos orgánicos. Interesantemente, la acumulación de fósforo y aluminio fue dos veces más alta en el material resistente que en el susceptible.

A raíz de los resultados, estos últimos autores sugieren que la resistencia al aluminio en trigo sarraceno (*Buckwheat*) es producida o está relacionada directamente con la precipitación o inmovilización interna del aluminio causada por el fósforo. Este hecho sería el responsable de la alta acumulación de este en el tejido radicular.

Wenzl *et al.* (2002a), sugieren que la dramática disminución de los niveles de fósforo en las plantas sensibles al aluminio de *Brachiaria*, podría limitar severamente la disponibilidad de energía química importante para la división celular en el meristemo, el cual podría ser putativamente un mecanismo de resistencia en este género. Ellos hacen esta sugerencia apoyándose en el hecho que los mecanismos de resistencia al aluminio que operan en los ápices

radiculares, al parecer, consumen mucha energía en forma de ATP y al estar el fósforo en cantidades reducidas en *B. ruzizensis* estos mecanismos no podrían operar.

En este trabajo nosotros proponemos que *B. decumbens*, además de los mecanismos de fijación de aluminio por ácidos orgánicos dentro del tejido radicular (Wenzl *et al.* 2002b), también posee un mecanismo de fijación o inmovilización con fósforo donde podría estar involucrada la fosfoesterasa codificada por el gen *AlBdec10*. El mecanismo de inmovilización de aluminio por fósforo ya ha sido tratado por varios autores en diferentes cultivos (Marienfeld and Stelzer, 1993; Vázquez *et al.*, 1999; Gaume *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2005).

La intervención de iones de fósforo en la resistencia al estrés por aluminio encontrado por varios autores, está muy relacionado con los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Nosotros encontramos que la presencia de iones de aluminio puede ocasionar disminución en la expresión del gen *AlBdec10* (que al parecer corresponde a una fosfoesterasa) en Ruzi, de 0 a 3 horas (figura 12), mientras que en *B. decumbens* la expresión tiende a aumentar a las 48 horas. Además, la tasa de rotación interna de fósforo parece ser mayor en esta última especie por el bajo contenido de fósforo inorgánico y la alta actividad de fosfatasa ácida (Wenzl *et al.*, 2002a).

En términos generales, la resistencia al daño causado por aluminio tiene que ver con la habilidad de la planta de obtener y usar los nutrientes necesarios para mantener un buen desarrollo de sus tejidos, principalmente de la raíz (Liao *et al.* 2006). Interesantemente, en las plantas que han mostrado diferencia en la resistencia al estrés por aluminio con acumulación de fósforo en sus raíces, se ha detectado que la mayoría de iones de este metal, en los materiales más resistentes, se encuentran en la pared celular de las raíces (Zheng *et al.*, 2005; Wenzl *et al.*, 2002a).

En soya por ejemplo, Al igual que sucede con las especies de *Brachiaria*, los genotipos eficientes en el uso del fósforo (que es la capacidad de tolerar estrés por deficiencia de fósforo) presentan los más altos niveles de resistencia al daño causado por cationes de aluminio. Liao *et al.* (2006), hallaron que el crecimiento de la raíz principal de soya de dos genotipos fósforo-eficientes fue menos afectado por la toxicidad por aluminio que los que presentan una tendencia de ineficiencia en el uso del fósforo. Esto se explica probablemente, por que a pesar de que el aluminio reduce la disponibilidad de fósforo (Macklon *et al.*, 1994), estas especies pueden funcionar fisiológicamente con menos cantidad que las que son deficientes en el uso de este elemento.

La mayor disponibilidad de iones de fósforo desde fosfatos orgánicos fijados por plantas o microorganismo, para el uso de las plantas para sus funciones biológicas se da con la intervención de las enzimas mono y diesterasas que hidrolizan los

enlaces ester de fosfatos. Estas enzimas principalmente componen una familia de enzimas que se conoce como fosfatasas ácidas (E.C. 3.1.3.2) y alcalinas (EC 3. 1. 3.1) que en su mayoría son secretadas en células epidérmicas de las raíces y muchas veces liberadas en la rizosfera.

Las fosfatasas ácidas actúan en los lisosomas de las células, mientras que las fosfatasas alcalinas son enzimas intrínsecas de la membrana plasmática. Estas enzimas están involucradas en una gran variedad de actividades metabólicas tales como permeabilidad, crecimiento y diferenciación celular, la síntesis de proteínas, la absorción y transporte de nutrientes (Blasco *et al.*, 1993).

Según Watanabe *et al.* (2006), las fosfohidrolasas pueden funcionar como un mecanismo reciclador de fósforo en las plantas para la formación de fosfolípidos, ácidos nucleicos, coenzimas y ester de fosfatos bajo condiciones de deficiencia de fósforo. Huttová *et al.* (2002), revela que la exposición de las raíces de plantas de cebada a concentraciones fitotóxicas de aluminio, incrementa la actividad de fosfatasas ácidas. Esto coincide con nuestro resultado, donde hallamos que la presencia de aluminio aumentó la expresión del gen *AIBdec10* el cual está relacionado con una actividad fosfoesterasa, aunque hasta el momento nosotros no podríamos asegurar el papel específico que esta fosfoesterasa cumple dentro de la resistencia al estrés por aluminio.

La relación entre iones de aluminio y el fósforo ha sido objeto de estudio por varios grupos de investigadores. Según Sivaguru *et al.* (2003), muchos de los genes inducidos por la presencia de iones de aluminio en el medio de crecimiento de las plantas, son también inducidos por otros estreses entre los cuales está la deficiencia de fósforo. La toxicidad por aluminio y la deficiencia de fósforo coexisten y son los limitantes más severos de los suelos ácidos. Wang *et al.* (2006), señalan que la aluminio toxicidad causa un conjunto de desordenes nutricionales que pueden ser manifestados como una deficiencia de elementos esenciales, una toxicidad por manganeso o por baja disponibilidad de Fósforo.

De hecho algunos autores relacionan algunos síntomas del efecto de aluminio con deficiencia de fósforo (Lee and pritchard, 1984; Foy, 1992). Según Cuming and Ecbert (1986), la presencia de aluminio en el suelo, concentra la cantidad de fósforo en las raíces y lo disminuye en la parte aérea, ocasionando los síntomas característicos de deficiencia.

La deficiencia de fósforo induce alta actividad de fosfohidrolasas (Nanamori *et al.* 2004) y ocasiona cambios interesante en la membrana plasmática en plantas de avena (Andersson *et al.* 2003). El crecimiento de plantas de avena bajo condiciones de deficiencia de fósforo induce un cambio drástico en la composición de glicerolípidos de las membranas plasmática de las raíces (Andersson *et al.* 2003; Andersson *et al.* 2005).

En el caso de las membranas de las células vegetales, además de un pequeño porcentaje de esfingolípidos, tres tipos de glicerolípidos forman esta bicapa: los glicerofosfolípidos o fosfolípidos, los glucoglicerolípidos o glucolípidos y los sulfolípidos (Karp, 1987). Los fosfolípidos son una buena fuente de fósforo para algunas plantas en casos de escasez por lo tanto la hidrólisis de fosfolípidos representa una estrategia fundamental para el reciclado de fósforo en circunstancias de estrés.

Bajo condiciones de deficiencia de fósforo, una gran parte de los glicerofosfolípidos de estas membranas son remplazados por lípidos carentes de fósforo como son el digalactosyldiacylglycerol, las glucosylceramidas y las esterolglycosidas (Andersson *et al.* 2005). Stival da Silva *et al.* (2006), proponen que algunos cambios específicos en la composición lipídica de la membrana plasmática, podría contribuir a mantener el crecimiento radicular bajo condiciones de estrés por aluminio. Esto a razón que el aluminio no tendría donde pegarse al cambiar las cargas negativas de los grupos fosfatos de los fosfolípidos de las membranas plasmáticas.

Sería interesante, igualmente, ver si en las plantas de *Brachiaria* sometidas a estrés por aluminio ocurre un fenómeno igual o parecido a este. El hallazgo de la fosfoesterasa codificada por el gen *AIBdec10* es un primer paso por que esta podría estar involucrada en la resistencia a iones de aluminio por diferentes maneras. Una de ellas podría ser que la fosfoesterasa aumentara la disponibilidad de iones de fósforo o grupos de fosfatos, directamente desde moléculas orgánicas, otra podría ser que esta fosfoesterasa esté interviniendo en el cambio de fosfolípidos a glicerolípidos en la membrana celular.

Llamativamente en el trabajo de Andersson *et al.* (2005) de modificación en la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática, también se encontró un polipéptido que alineó con una proteína fosfoesterasa, aislada desde plantas de arroz. La secuencia de esta proteína también fue asociada, mediante análisis BLAST a seis genes ortólogos en el genoma de *A. thaliana* y en otras plantas superiores, al igual que en algunas bacterias.

Con nuestros resultados se podría inferir, una vez más, que la resistencia al estrés por aluminio en *Brachiaria* es una característica bastante compleja y que está dada por diferentes mecanismos. El hecho de haber encontrado siete genes diferentes que estarían involucrados con la resistencia diferencial a aluminio entre la especie *B. decumbens* y *B. ruzizensis*, además de los otros genes ya publicados en otras especies, pone de manifiesto esta característica.

Bajo la luz del resultado del gen *AIBdec10*, que codifica putativamente una fosfoesterasa, se podría decir que el aluminio activa mecanismos para mayor disponibilidad y/o transporte de fósforo en las puntas de raíces de *B. decumbens*

que en las de *B. ruzizensis*, lo cual le daría mayor resistencia al daño causado por la presencia de iones de aluminio, por las razones arribas expuestas.

Nuestro trabajo permite acercarnos un poco más a la manera como estas especies de *Brachiaria* resisten al daño causado por el estrés con aluminio, pero se necesitan elaborar otros experimentos para definir de manera contundente la intervención de estos genes en el mecanismo de resistencia.

8. CONCLUSIONES

Los niveles de inhibición en el crecimiento de las raíces de cada una de las especies usadas en este estudio confirman, una vez más, que existe diferencia en la resistencia al estrés por aluminio en las especies de *Brachiaria*, siendo el genotipo de *B. decumbens* más resistente que el de *B. ruziziensis*.

El uso de herramientas moleculares como el PCR en tiempo real y la librería sustractiva por supresión, permitió el aislamiento de siete secuencias génicas que podrían estar involucradas en la resistencia al estrés por aluminio en *B. decumbens*. Ninguna de estas siete secuencias ha sido reportada previamente en ningún trabajo con plantas resistentes al daño causado por aluminio.

Los análisis de secuencias de los siete fragmentos de ADN expresados diferencialmente permiten postular que en *B. decumbens* existen varios mecanismos de resistencia al daño causado por aluminio, tal como ha sido reseñado por otros autores. Uno de estos mecanismos involucraría la actividad de una fosfoesterasa-metal dependiente que pertenece a una familia de proteínas muy poco caracterizada en plantas, la cual se conoce con el nombre de DHH.

Así mismo, se identificaron en *B. decumbens* genes homólogos de *ALTM1*, *HvAACT1* y *STOP1*, los cuales han sido reportados como responsables de la resistencia o tolerancia a aluminio en plantas. Este es el primer reporte de la presencia de estos genes en el género *Brachiaria* a nivel de ARNm.

9. PERSPECTIVAS

Para confirmar la función de los siete genes expresados diferencialmente en el alto grado de resistencia que presenta la especie *B. decumbens*, en especial el gen *AIBdec10*, se necesita diseñar experimentos para probar y dilucidar su función específica (*Proof of concept*).

Una de las estrategias podría ser usar líneas de arroz ó de *A. thaliana* que tengan estos genes interrumpidos o dañados, en experimentos con aluminio y comparar los resultados con la línea normal. En estas dos especies modelos ya existen líneas con genes mutados e identificados que podrían ser de mucha ayuda. Para el gen *AIBdec10* nosotros identificamos en la Web algunas líneas que tienen este gen interrumpido, lo cual va a permitir llevar a cabo un análisis como el anteriormente planteado.

Otra estrategia, es tratar de mutar cada uno de los siete genes en *B. decumbens* y hacer los mismos análisis de aluminio resistencia entre el material mutado y uno normal. Este análisis tendría la ventaja que se haría en plantas que ya se conoce su comportamiento frente al estrés por aluminio, pero tendría unos costos más elevados que hacer el análisis en plantas modelos que ya tienen la mutación.

10. BIBLIOGRAFIA

Akopian, A. N. and Wood, J. N. 2000. Construction and screening of a subtractive cDNA library. In: Hunt, S. and Livesey, F. (eds). *Functional Genomics: A Practical Approach*. Oxford university press, Inc. New York. p. 9-31.

Andersson, M. X.; Stridh, M. H.; Larsson, K. E.; Liljenberg, C. and Sandelius, A. S. 2003. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Letters*, 537: 128-132.

Andersson, M. X.; Larsson, K. E.; Tjellström, H.; Liljenberg, C. and Sandelius, A. S. 2005. Phosphate-limited Oat. The plasma membrane and tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *The Journal of Biological chemistry*, 280 (30): 27578-27586.

Arango, A. 2004. Identificación de secuencias reguladoras de genes candidatos que confieren resistencia a la toxicidad por Aluminio en *Brachiaria decumbens* Sttappf cv. Basiilliisk. Tesis de Maestría. Universidad nacional de Colombia facultad de agronomía. Escuela de postgrado. Bogotá. p. 109.

Aravind, L. and Koonin, E. V. 1998. A novel family of predicted phosphoesterases includes *Drosophila* prune protein and bacterial RecJ exonuclease. *Trends Biochem. Sci.*

23: 17–19.

Basu, U.; McDonald-Stephens, J. L.; Arhamhaultt, D. J.; Good, A. G.; Briggs, K. G.; Aung, T. and Taylor, G. T. 1997. Genetic and physiological analysis of double-haploid, aluminum-resistant lines of wheat provide evidence for the involvement of a 23 kD, root exudates polypeptide in mediating resistance. *Plant Soil*, 196: 283-288.

Basu, U.; Good, A. G.; Taylor, G. J. 2001. Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminum-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminum. *Plant Cell Environ.* 24:1269–1278.

Begun, H. H.; Osaki, M.; Nanamori, M.; Watanabe, T.; Shinano, T. and Rao, I. M. 2006. Role of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in the adaptation of a tropical forage grass to low-phosphorus acid soils. *J. of Plant Nutrition*, 29: 35-57.

Blasco, J.; Puppo, J. and Sarasquete, M. C. 1993. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Biology*, 115: 113-118

Brady, D. J.; Edwards, D. G.; Asher, C. J. and Blamey, P. C. 1993. Calcium amelioration of aluminium toxicity effects on root hair development in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *New Phytol.* 127: 531-538.

Buitrago, M. E. 2003. Evaluación de los componentes fisiológicos de la adaptación a suelos ácidos en una población de híbridos de *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens*. Tesis Pregrado. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Cali. p. 184.

Cobbet, C.S. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825-832.

Copeland, L. and DeLima, M. L. 1992. The effect of aluminium on enzyme activities in wheat roots. *J. Plant Physiol.* 140. p. 641-645.

Cuming, J. R. and Ecbert, R. T. 1986. Effect of Al on P uptake and translocation by red spruce seedling. *Can. J. Bot.* 16: 864-867.

Chen, L. S. 2006. Physiological responses and tolerance of plant shoot to aluminum. *Journal of plant physiology and molecular biology*, 32 (2): 143-155.

Cho, Y.-J. and Liang, P. 2000. Differential display analysis of alteration in gene expression. In: Hunt, S. and Livesey, F. (eds). *Functional Genomics: A Practical Approach*. Oxford university press, Inc. New York. p. 33-43.

Delhaize, E.; Craig, S.; Beaton, C. D.; Bennet, R. J.; Jagadish, V. C. and Randall, P. J. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol.* 103: 685-693.

Delhaize, E.; Gruber, B. D. and Ryan, P. R. 2007. The roles of organic anion permeases in aluminum resistance and mineral nutrition. *FEBS Letters*, doi:10.1016/j.febslet.2007.03.057. Article in press.

Desai, S.; Hill, J.; Trelogan, S.; Diatchenko, L. and Siebert, P. D. 2000. Identification of differentially expressed genes by suppression subtractive hybridization. In: Hunt, S. and Livesey, F. (Eds). *Functional Genomics: A Practical Approach*. Oxford university press, Inc. New York. p. 81-112.

Do Valle, C. B. y Savidan, H. 1998. Requerimientos Nutricionales y adaptación a los Suelos Ácidos de Especies de *Brachiaria*. En: Miles, J.W.; Maass, B.L. and do Valle, C.B. (Eds). *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. CIAT, Cali, Colombia and Embrapa/CNPGC, Campo Grande, MS, Brazil. p. 312.

Driscoll, C. T.; Schecher, W. D. 1988. Aluminium in the environment. In: *Metal Ions in Biological system. Aluminium and its Role in Biology*; H. Siegel & A. Siegel (eds). Marcel Deckker, Inc. New York. vol. 24. p. 59-122.

- Drummond, R. D.; Guimaraes, C. T.; Felix, J.; Ninamango-Cardenas, F. E.; Carneiro, N. P.; Paiva, E. and Menossi, M. 2001. Prospecting sugarcane genes involved in aluminum tolerance. *Genet. Mol. Biol.* 24:221–30.
- Espinosa, J. 1994. Acidez y encalado de los suelos. En: Fertilidad de Suelos: Diagnóstico y control. Sociedad Colombiana de Suelos. Francisco Mojica (ed.). Santa Fé de Bogotá. p. 113-128.
- Ezaki, B.; Yamamoto, Y. and Matsumoto, H. 1995. Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminum treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. *Physiologia Plantarum*, 93:11-18.
- Ezaki, B.; Tsugita, S. and Matsumoto, H. 1996. Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. *Physiologia Plantarum*, 96: 21-28.
- Ezaki, B.; Gardner, R. C.; Ezaki, Y.; Matsumoto, H. 2000. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* 122:657–65.
- Ezaki, B.; Kiyohara, H.; Matsumoto, H. and Nakashima, S. 2007. Overexpression of a fan auxilin-like gene (F9E10.5) can suppress Al uptake in roots of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 58 (3): 497-506.
- Fassbender, H. 1994. Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. 2ª ed. Rev. San José, C. R.: IICA (Colección de libros y Materiales Educativos/ IICA; 81). ISBN 92-9039-124 3.
- Foy, C.D. 1988. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Communications in Soil Sci. Plant Analysis*, 19: 959-987.
- Foy, C. D. 1992. Soil chemical factors limiting plant root growth, in: Hatfield J.L., Stewart B.A. (Eds.), *Advances in Soil Sciences: Limitations to Plant Root Growth*, Vol. 19, Springer Verlag, New York, pp. 97-149.
- Furukawa, J.; Yamaji, N.; Wang, H.; Mitani, N.; Murata, Y.; Sato, K.; Katsuhara, M.; Takeda, K. and Ma, J. F. 2007. An Aluminum-Activated Citrate Transporter in Barley. *Plant Cell Physiol.* 48 (8): 1081–1091
- Gessa, C. E.; Mimmo, T.; Deiana, S.; and Marzadori, C. 2005. Effect of aluminium and pH on the mobility of phosphate through a soil-root interface model. *Plant and soil*, 272: 301-311.
- Garzón, T. 2003. Estudio de la compartimentación celular en plantas modelo sometidas a estrés por aluminio. Tesis presentada para optar el grado de Doctor

en Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias. Laboratorio de Fisiología Vegetal. p. 95.

Gaume, A.; Mächler, F. and Frossard, E. 2001. Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L.: root exudation of organic acids and influence of phosphorous nutrition. *Plant Soil*, 234: 73-81.

Gibson, U. E.; Heid, C. A. and Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6: 995-1001.

González García, S. y Gutiérrez, J. N. 1985. Química Bioinorgánica: Una Introducción. Versión en español de Bioinorganic Chemistry an Introduction publicada por Allyn and Bacon, Inc., Boston. Editorial Reverté, S. A. 1985. Capítulo 17. pp. 463-487.

Grundy, S. P.; Jones, D. L. and Godbold, D. L. 2001. Organic acid root-tip tissue-concentration in *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria ruziziensis*. En: Horst, W. J.; Schenk, M. K.; Bürket, A.; Claassen, N.; Flessa, H.; Frommer, W. B.; Golbach, H.; Olf, H. –W.; Römheld, V.; Sattelmacher, B.; Schmidhalter, U.; Schubert, S.; von Wirén, N. and Wittenmayer, L. (eds). Plant nutrition food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research. Series: Developments in Plant and Soil Sciences, vol. 92. Hardcover. p. 506-507.

Guo, P.; Bai, G.; Carver, B.; Li, R.; Bernardo, A. and Baum, M. 2007. Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. *Mol Genet Genomics*, 277 (1): 1-12.

Gutiérrez, J. L. 1991. Física y Química. Áreas Consultor Didáctico. *Editorial Planeta*. Colombia. 353 p. ISBN: 958-614-336-8.

Hamilton, C. A.; Good, A. G. and Taylor, G. J. 2001. Induction of vacuolar ATPase and Mitochondrial ATP Synthase by Aluminium in an Aluminum-resistant cultivar of Wheat. *Plant physiology*, 125: 2068-2077.

Hasler, P.; Brot, N.; Weissbach, H. Parnassa, A. P.; and Elkon, K. B. 1991. Ribosomal Proteins PO, P1, and P2 Are Phosphorylated by Casein Kinase II at Their Conserved Carboxyl Termini. *The journal of biological chemistry*, 266 (21): 13815-13820.

Haug, A. R. 1984. Molecular aspects of aluminium toxicity, *CRC Critical Rev. Plant Sci.* 1: 345–373.

Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J. and Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986–994.

- Husaini, Y. and Rai, L. C. 1992. pH-dependent aluminium toxicity to *Nostoc linckia*: studies on phosphate uptake, alkaline and acid phosphatase activity, ATP content, photosynthesis and carbon fixation. *J. Plant Physiol.* 139: 703–707.
- Huttová, J.; Tamás, L.; and Mistrík, I. 2002. Aluminium induced acid phosphatase activity in roots of Al-sensitive and Al-tolerant barley varieties. *Rostlinná Výroba*, 48 (12): 556–559.
- Iuchi, S., Koyama, H., Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., Ikka, T., Hirayama, T., Shinozaki, K. & Kobayashi, M. 2007. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**: 9900-9905.
- Martin, J.; Abaidoo, R. C.; Nolte, C. and Horst, W. J. 2007. Aluminum resistance of cowpea as affected by phosphorus-deficiency stress. *Journal of Plant Physiology*, 164: 442- 451
- Jones, D. L.; Gilroy, S.; Larsen, P. B.; Howell, S. H.; Kochian, L. V. 1998. Effect of aluminum on cytoplasmic Ca²⁺ homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Planta*, 206: 378-387
- Judd, S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F. and Donoghue, M. J. 1999. Plant systematics a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 563p.
- Karp, G. 1987. Biología Celular. Traducida por Longi, G. y revisada por Laguna, G. McGraw-Hill. 1ª edición en español. Capítulo 5. p. 147-231.
- Kozak, M. 1987. An analysis of 5' noncoding sequences upstream from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15: 8125-8148.
- Kochian, L.V. 1995. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Annul Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 237–260.
- Kochian, L. V.; Hoekenga, O. A. and Piñeros, M. A. 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annu Rev. Plant Biol.* 55:459-493.
- Kochian, L. V.; Piñeros, M. A. and Hoekenga, O. A. 2005. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil*, 274 (1-2): 175-195.

- Kumari, M.; Taylor, G. J. and Deyholos, M. K. 2008. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*, 279: 339–357.
- Lapointe, S. L. y Miles, J. W. 1992. Germoplasm case study: *Brachiaria* species. En: Pastures for the tropical lowlands: CIAT's contribution. CIAT, Cali, Colombia. p. 43-55.
- Larsen, P. B.; Tai, C-Y.; Kochian, L. V. and Howell, S. H. 1996. Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol.* 110: 743-751.
- Lee, J. and Pritchard, M. 1984. Aluminium toxicity expression on nutrient uptake, growth and root morphology of *Trifolium repens* L. *Plant soil*, 82 (1): 101-116.
- Liang, P. and Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-971.
- Liao, H.; Wan, H.; Shaff, J.; Wang, X.; Yan, X. and Kochian L. V. 2006. Phosphorus and Aluminum Interactions in Soybean in Relation to Aluminum Tolerance. Exudation of Specific Organic Acids from Different Regions of the Intact Root System. *Plant Physiology*, 141: 674–684.
- Livesey, F. and Hunt, S. (eds). 2000. Functional Genomics: Approaches and methodologies. In: Functional Genomics: A Practical Approach. Oxford university press, Inc. New York. p. 1-7.
- Lora, R. 1994. Factores que afectan la disponibilidad de nutrientes para las plantas. En: Fertilidad de Suelos: Diagnóstico y control. Sociedad Colombiana de Suelos. Francisco Mojica (ed.). Santa Fé de Bogotá. p. 29-55.
- Lütcke, H. A.; Chow, K. C., Mickel, F. S.; Moss, K. A.; Kern, H. F. and Scheele, G. A. 1987. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *The EMBO Journal*, 6 (1): 43-48.
- Ma, J. F.; Nagao, S.; Sato, K.; Ito, H.; Furukawa, J. and Tekeda, K. 2004. Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. *J. Exp. Bot.*, 55 (401):1335-1341.
- Ma, J. F; Ryan, P. R. and Delhaize, E. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6 (6): 273-278.
- Ma, J. F.; Zheng, S. J. and Matsumoto, H. 1997 Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology*, 38: 1019–1025.

- Macklon, A.; Lumsdon, D. and Sim, A. 1994. Phosphate uptake and transport in *Agrostis capillaris* L.: effects of non-toxic levels of aluminum and the significance of P and Al speciation. *J. Exp. Bot.* 45: 887–94.
- Marienfeld, S. and Stelzer, R. 1993. X-ray microanalyses in roots of Al-treated *Avena sativa* plants. *J. Plant Physiol.* 141: 569–573.
- Mao, C.; Yi, K.; Yang, L.; Zheng, B.; Wu, Y.; Liu, F. and Wu, P. 2004. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in Rice (*Oriza sativa* L.): aluminum-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *Journal of experimental Botany*, 55 (394): 137-143.
- Marschner H. 1991. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil*, 134: 1-20.
- Matos, M.; Camacho, M. V.; Pérez-Flores, V; Pernaute-Carnide, O. and Benito, C. 2005. A new aluminum tolerance gene located on Rye chromosome arm 7RS. *Theoretical Appl. Genet.* 111: 360-369.
- Matsumoto, H. 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Rev. Cytol.* 200: 1–46
- McBratney, S. and Sarnow, P. 1996. Evidence for Involvement of *trans*-Acting factors in selection of the AUG star codon during eukaryotic translational initiation. *Molecular and Cellular Biology*, 16 (7): 3523-3534.
- iddehaufe, S.; Garzia, L.; Ohndorf, U.; Kachholz, B.; Zollo, M. and Steegborn, C. 2007. Domain mapping on the human metastasis regulator protein h-Prune reveals a C-terminal dimerization domain. *Biochem. J.* 407: 199–205.
- Miles, J.W.; Maass, B.L. and do Valle, C.B. (eds). 1996. *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*. Joint publication by CIAT, Cali, Colombia and Embrapa/CNPGC, Campo Grande, MS, Brazil. p. 312.
- Mossor-Pietraszewska, T. 2001. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica polonica*, 48 (3): 673-686.
- Muller, P.; Janovajak, H.; Miserey, A. and Dobbie, Z. 2002. Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time PCR. *Biotechniques*, 32: 1-7.
- Nanamori, M.; Shinano, T.; Wasaki, J.; Yamamura, T.; Rao, I. M. and Osaki, M. 2004. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in the tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar Mulato compared with Rice. *Plant cell Physiol.* 45 (3): 460–469.

- Nguyen, V. T.; Burow, M. D.; Nguyen, H. T.; Le, B. T.; Le, T. D. and Paterson, A. H. 2001. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102:1002-1010.
- Pandey, S.; Ceballos, H.; Magnavaca, R.; Bahía-Filho, A.F.C.; Duque-Vargas, J. and Vinasco, L.E. 1994. Genetics of tolerance to soil acidity in tropical maize. *Crop Sci.* 34: 1511–1514.
- Peixoto, P. H. P.; Cambraia, J.; Sant’Anna, R.; Mosquim, P. R.; and Moreira, M. A. 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11 (3):137-143.
- Pellet, D. M.; Papernik, L. A. and Kochian, L. V. 1996. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. *Plant Physiol.* 112: 591–597.
- Peters, M., Franco, L.H., Schmidt, A. and Hincapié, B. 2003. Especies forrajeras multipropósito: Opciones para productores de Centroamérica. *Publicación CIAT No. 333*. CIAT, Cali, Colombia.
- Pfaffl, M. W. 2004. Chapter 3: Quantification strategies in real-time PCR. A-Z of quantitative PCR (editor: S. A. Bustis). International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA. p 63-82.
- Piñeros, M. A.; Shaff, J. E.; Manslank, H. S.; Carvalho, V. M. and Kochian, L. V. 2005. Aluminium resistance in Maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. *Plant physiology*, 137: 231-241.
- Raman, H.; Zhang, K.; Cakir, M.; Appels, R.; Garvin, D. F.; Maron, L. G.; Kochian, L. V.; Moroni, J. S.; Raman, R.; Imtiaz, M.; Drake-Brockman, F.; Waters, I.; Martin, P.; Sasaki, T.; Yamamoto, Y.; Matsumoto, H.; Hebb, D. M.; Delhaize, E. and Ryan, P. R. 2005. Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 48: 781-791.
- Raman, H.; Raman, R.; Wood, R. and Martin, P. 2006. Repetitive indel markers within the ALMT1 gene conditioning aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*, 18: 171-183.
- Rao, I. M.; Kerridge, P. C.; y Macedo, M. C. M. 1998. Requerimientos Nutricionales y adaptación a los Suelos Ácidos de Especies de *Brachiaria*. En: Miles, J.W.; Maass, B.L. and do Valle, C.B. (eds). *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. CIAT, Cali, Colombia and Embrapa/CNPQC, Campo Grande, MS, Brazil. p. 58-78.
- Rengel, Z. 1992. Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.* 121: 499-513.

- Rengel, Z. and Zhang, W. H. 2003. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytol.* 159: 295-314.
- Richards, K. D.; Snowden, K. C. and Gardner, R. C. 1994. *Wali6 and wali7*. Genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 105:1455–56.
- Riede, C. R. and Anderson, J. A. 1996. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci.* 36: 905-909.
- Ririe, K.; Rasmussen, R. and Wittwer, C. T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA *melting* curves during the polymerase Chain reaction. *Anal Biochem.* 245: 154-160.
- Rivas, L. and Holmann, F. 2004. Impacto económico potencial de nuevos híbridos de *Brachiaria* resistentes a salivazo en los Llanos orientales y Costa norte de Colombia. *Publicación CIAT No. 199*. CIAT, Cali, Colombia
- Rosero Ortégón, L. C. 2005. Mapeo de QTL (*quantitative trait loci*) asociados a resistencia a aluminio en *Brachiaria* sp. Tesis (Bióloga). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Biología, Santafé de Bogotá, DC, CO. p.80.
- Rout, G. R.; Samantara, Y. B. and Dasb, P. 2001. Aluminium toxicity in plants: A review. *Agronomie*, 21: 3–21.
- Salcedo, A.F.; Recio, M.E.; Chavez, A. L.; Thome J. and Ishitani, M. 2005. Isolation and characterization of candidate genes for Al tolerance in *Brachiaria*. Annual Report Biotechnology Research Unit, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), AA 6713, Cali, Colombia.
- Salisbury, F. B. and Ross, C. W. 1992. Fisiología Vegetal. Traducido a español por González, V. Grupo editorial Iberoamerica. Mexico. p. 759.
- Sasaki, T.; Ryan, P.; Delhaize, E.; Hebb, D. M.; Ogihara, Y.; Kawaura, K.; Noda, K.; Kojima, T.; Toyoda, A.; Matsumoto, H. and Yamamoto, Y. 2006. Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene and its relationship to aluminum resistance. *Plant cell physiol.* 47: 1343-1354.
- Sasaki, T.; Yamamoto, Y.; Ezaki, E.; Katsuhara, M.; Ahn, S. J.; Ryan, P.; Delhaize, E. and Matsumoto, H. 2004. A wheat gene encoding an aluminium-activated malate transporter segregates with aluminium tolerance in wheat. *Plant Journal*, 37: 645-653.

- Sibov, S. T.; Gaspar, M.; Silva, M. J.; Ottoboni, L. M. M.; Arruda, P. and Souza, A. P. 1999. Two genes control aluminum tolerance in maize: Genetic and molecular mapping analyses. *Genome* 42:475–82.
- Simonovicova, M.; Tamás, L.; Huttová, J. and Mistrík, I. 2004. Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. *Biología Plantarum*. 48 (2): 261–266.
- Schmohl, N. and Horst, W. 2002. Effect of aluminium on activity of apoplastic acid phosphatase and the exudation of macromolecules by roots and suspension-culture cells of *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiol.* 159: 1213–1218.
- Sivaguru, M.; Pike, S.; Gassmann, W. and Baskin, T. I. 2003. Aluminum rapidly depolymerises cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiol.* 44: 667–675.
- Slaski, J. J. 1990. Response of calmodulin-dependent and calmodulin-independent NAD kinase to aluminium in root tips from various cultivated plants, *J. Plant Physiol.* 136: 40–44.
- Slaski, J.J.; Zhang, G.; Basu, U.; Stephens, J.L. and Taylor, G.J. 1996. Aluminum resistance in wheat (*Triticum aestivum*) is associated with rapid Al-induced changes in activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in root apices. *Physiol. Plant*, 98: 477-484.
- Snowden, K. C. and Gardner, R. C. 1993. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 103: 855–61.
- Sokolov, B. and Prockop, D. J. 1994. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNA from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*, 22 (19): 4009-4015.
- Stival da Silva, A. L.; Sperling, P.; Horsta, W.; Franke, S.; Ott, C.; Becker, D.; Staba, A.; Lörz, H. and Heinz, E. 2006. A possible role of sphingolipids in the aluminium resistance of yeast and maize. *Journal of Plant Physiology*, 163: 26-38.
- Tamás, L.; Huttová, J.; Mistrík, I.; Simonovicova, M. and Siroká, B. 2005. Aluminium induced esterase activity and isozyme pattern in barley root tip. *Plant Soil Environ.* 51 (5): 220–225.
- Tang, Y.; Sorrells, M. E.; Kochian, L. V. and Garvin, D. F. 2000. Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene *Alp*. *Crop Sci.* 40: 778-782.

- Taylor, G. J. 1991. Current views of the aluminum stress response: The physiological basis of tolerance. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 10: 57-93.
- Taylor, G. J. 1995. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. *Plant Soil*, 171 (1): 89-103.
- Tchórzewski, M. 2002. The acidic ribosomal P proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34 (8): 911-915.
- Thomas, D. and Grof, B. 1986. Some pasture species for the tropical savannas of South America. III. *Andropogon gayanus*, *Brachiaria* species and *Panicum maximum*. *Herbage Abstracts*, 56: 557-565.
- Tolrá, R. P.; Poschenrieder, C.; Luppi, B. and Barceló J. 2005. Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L. *Environmental and Experimental Botany*, 54: 231-238.
- Uchiumi, T.; Traut, R. R. and Kominami, R. 1990. Monoclonal antibodies against acidic phosphoproteins P0, P1, and P2 of eukaryotic ribosomes as functional probes. *The Journal of biological chemistry*, 265 (1): 89-95.
- Vázquez, M.; Poschenrieder, C.; Corrales, I. and Barceló, J. 1999. Changes in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of tolerant maize variety. *Plant Physiol.* 119: 435-444.
- Vedoy, C. G.; Bengison, M. H. and Sogayar, M. C. 1999. Hunting for differentially expressed genes. *Brazilian Journal of Medical Research*, 32: 877-884.
- Vitarello, V. A.; Capaldi, F. R. and Stefanuto, V. A. 2005. Recent advances in aluminium toxicity and resistance in higher plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (1): 129-143.
- Wang, J.-P.; Raman, H.; Zhang, G-P.; Mendham, N. and Zhou, M-X. 2006. Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): Physiological mechanism, genetics and screening methods. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7 (10): 769-787.
- Watanabe, T.; Osaki, M.; Yano, H. and Rao, I. M. 2006. Internal mechanism of plant adaptation to aluminium toxicity and phosphorus starvation in three tropical forages. *J. of Plant nutrition*, 29:1243-1255.
- Watt, D. A. 2003. Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 54 (385): 1163-1174.

- Wenzl, P.; Arango, A. Chávez, A. L.; Buitrago, M. E.; Patiño, G. M.; Miles, J. and Rao I. M. 2006. A Greenhouse Method to screen Brachiariagrass genotypes for aluminum resistance and root vigor. *Crop Sci.* 46: 968–973.
- Wenzl, P.; Mayer J. E. and Rao I. M. 2002a. Aluminum stress inhibits accumulation of phosphorus in root apices of aluminum-sensitive but not aluminum-resistant *Brachiaria* cultivar. *J. of Plant nutrition*, 25:1821-1828.
- Wenzl, P.; Chávez, A. L.; Patiño, G. M.; Mayer J. E. and Rao I. M. 2002b. Aluminum stress stimulates the accumulation of organic acids in root apices of *Brachiaria* species. *J. of Plant nutrition Soil Cie.* 165:582-588.
- Wenzl, P.; Patiño, G. M.; Chávez, A. L.; Mayer J. E. and Rao I. M. 2001. The high level of Aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. *Plant Physiol.* 125:1473-1484.
- Wu, W.; Welsh, M. J.; Kaufman, P.B. and Zhang H. H. 1997. *Methods in Gene Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 406.
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H. 2002. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 128: 63–72.
- Yang, G. P.; Ross, D. T.; Kuang, W. W.; Brown, P. O. and Weigel, R. J. 1999. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed gene. *Nucleic Acids Research*, 27 (6): 1517-1523.
- Yang, J. L.; Zhang¹, L.; Li, Y. Y.; You, J. F.; Wu, P. and Zheng, S. J. 2006. Citrate Transporters Play a Critical Role in Aluminium-stimulated Citrate Efflux in Rice Bean (*Vigna umbellata*) Roots. *Annals of Botany*, 97: 579–584
- Yang, Z. M.; Nian, H.; Sivaguru, M.; Tanakamaru, S. and Matsumoto, H. 2000 Characterization of aluminium-induced citrate secretion in aluminium-induced citrate secretion in aluminium-tolerant soybean (*Glycine max*) plants. *Physiol. Plant*, 113: 64–71.
- Yuan, J. S.; Reed, A. Chen, F. and Stewart, C. N. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7: 85. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/85>).
- Zhang, Y. and Mian R. 2003. Functional genomics in forage and turf-present status and future prospects. *Minireview. African Journal of Biotechnology*, 2 (12): 521-527

Zheng, S. J; Yang, J. L; He, Y. F. and Yu, X. H. 2005. Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiol.* 138: 297-303.

11. ANEXOS

Anexo A: Extracción de DNA genómico

Dellaporta *et al.* 1983, modificado:

1. Macerar 100mg de tejido vegetal en un mortero utilizando N2 líquido.
2. Añadir 1ml de tampón de extracción y homogenizar.
3. Centrifugar por 10 minutos a 11000 r.p.m., añadir un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1) y mezclar. No utilizar el vórtex.
4. Centrifugar a 11000 r.p.m. durante 10 min.
6. Transferir el sobrenadante y añadir 0,8 volúmenes de isopropanol, mezclar y dejar la muestra 20 min.
7. Centrifugar a 11000 r.p.m. durante 10 min.
8. Lavar el pellet con 0.5 ml de etanol 70%
9. Resuspender en 50µl de agua.

Tampón de extracción:

0,3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 20mM EDTA, 1% sarcosil.

Anexo B: Protocolo del Trizol para la obtención de ARN total

1. Macerar el tejido vegetal en morteros de cerámica, usando Nitrógeno líquido. Luego agregar 1 ml de reactivo de TRIZOL por 50 a 100 mg de tejido.

Nota: El volumen de muestra no debe superar el 10% del volumen de TRIZOL usado.

2. Incubar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3. Centrifugar y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

4. Añadir 0,2 ml de cloroformo por cada 1 ml de reactivo de TRIZOL.

5. Agitar vigorosamente las muestras durante 15 segundos e incubar a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos.

6. Centrifugar las muestras a 12000 r.p.m durante 10 min., y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, sin perturbar la interfase.

7. Agregar a la fase acuosa 0,5 ml de etanol por cada 1 ml de TRIZOL utilizado.

8. Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugar a 12000 r.p.m por 10 min. Eliminar el sobrenadante por completo. Lavar el *pellet* de ARN, con etanol al 75% y secar al aire durante 5-10 minutos. (ojo: es importante no sobre secar la muestra de ARN)

9. Disolver en 30 µl agua-DEPC. En este momento, el ARN está listo para ver su calidad, cantidad y pureza.

Nota: Siempre usar guantes y protección para los ojos. Evitar el contacto con la piel o la ropa. Usar en cámara de extracción para evitar la inhalación del vapor.

Anexo C: Protocolo de síntesis de cDNA SuperScript III reverse transcriptase

Síntesis de la primera cadena de cDNA para PCR en Tiempo Real.

1. Añadir los siguientes componentes a un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas:

1 μ l de oligo (dT)₂₀ (50 μ M), o de 200-500 ng oligo (dT)₁₂₋₁₈; o 2 pmol de cebadores de genes específicos

10 pg-5 μ g de ARN total o 10 pg-500 ng de mRNA

1 μ l de 10 mM dNTP Mix (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro)

Agua destilada-estéril, hasta 13 μ l

2. Calentar la mezcla a 65 °C durante 5 minutos e incubar en hielo, por lo menos, 1 minuto.

3. Recoger el contenido del tubo con un pulso de centrifugación y añadir:

4 μ l de 5X First-Strand Buffer

1 μ l de 0,1 M DTT

1 μ l de RNaseOUT™ recombinante RNase Inhibitor (40 u./ μ l)

1 μ l de SuperScript™ III RT (200 unidades/ μ l)

4. Mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo. Si se usa *primers* al azar, se debe incubar el tubo a 25 °C durante 5 minutos.

5. Incubar a 50 °C durante 30-60 minutos. Aumentar la temperatura de reacción a 55 °C cuando se usen *primers* específicos.

6. Inactivar la reacción de calentando a 70 °C durante 15 minutos.

El cDNA Ahora se puede utilizar como una plantilla para la amplificación por PCR.

Anexo D: Protocolo de extracción y purificación de ácidos nucleicos desde geles de agarosa con NucleoTrap® Gel

1. Correr las muestras de ADN en geles de agarosa con bromuro de etidio. Se recomienda usar ya sea un gel TAE (40 mM Tris-acetato [pH 8], 1 mM EDTA) o un gel de TBE (45 mM Tris-borato [pH 8], 1 mM EDTA).
2. Localizar el o los fragmentos en el transiluminador de luz ultravioleta. Cortar con bisturí el gel con los fragmentos de ADN de interés. Se recomienda cortar cerca del fragmento, para reducir al mínimo los alrededores de agarosa.
3. Medir el peso de la rebanada de gel y transferirlo a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml. Por cada 100 mg de agarosa, añadir 300 µl de Buffer NT1. Para geles que contienen agarosa >2%, añadir 600 µl de NT1 por cada 100 mg de agarosa.
4. Dar vortex (agitar) a la Suspensión NucleoTrap hasta que los precipitados estén totalmente resuspendido
5. Por cada 1 µg de ADN que se quiera purificar, añadir 4 µl de NucleoTrap Suspensión.

Nota: Mínimo 10 µl de la suspensión NucleoTrap es necesario usar en cada reacción, para garantizar una alta eficiencia en el bandeo.

6. Incubar la muestra a 50 °C durante 5-15 min. Agitar brevemente cada 2-3 min. durante el período de incubación.

Nota: Para fragmentos de ADN de 400 pb y 5 kb, la muestra se incuba a 50 °C durante 6 min. Vortex brevemente cada 2 min.

7. Centrifugar la muestra a 10000 r.p.m durante 30 segundos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante.
8. Añadir 500 µl de tampón de NT2 al *pellet*. Agitar brevemente.
9. Centrifugar a 10000 r.p.m durante 30 segundos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante completamente.
10. Añadir 500 µl de Buffer NT3 a la muestra. Agitar brevemente.
11. Centrifugar la muestra a 10000 r.p.m durante 30 segundos a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante completamente.
12. Repita los pasos 10-11.

13. Centrifugar el *pellet* de nuevo a 10000 r.p.m durante 30 segundos a temperatura ambiente. Secar el precipitado por 10-15 min.

Notas: No utilizar *Speed Vac* para secar el *pellet*. El *Speed Vac* tienden a sobresecar las muestras, y esto conduce a la disminución de las tasas de recuperación.

14. Añadir 20-50 μ l de Buffer NE u otro buffer de bajo contenido de sal a el *pellet*. Resuspender el *pellet* por agitación.

Notas: las tasas de recuperación previstos van desde 60% (elución en 20 μ l) a 80% (elución en 50 μ l).

15. Eluir el ADN incubando la muestra a temperatura ambiente por 10-15 min. Agitar la mezcla de 2-3 veces durante la etapa de incubación.

Notas: Incubar la muestra a 55 ° C durante 10 min., si el fragmento de ADN que se eluye es \geq 5 kb.

16. Centrifugar la muestra a 10000 r.p.m durante 30 segundos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante, que contiene el fragmento de ADN, a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio.

Notas: Repetir los pasos 14-16 pueden aumentar los rendimientos en aproximadamente 10%. Para fragmentos de ADN de 400 pb y 5 kb, repitiendo los pasos 14-16 puede aumentar el rendimiento hasta un 15%.

Anexo E: Preparación de células competentes de *E. coli* (DH5 α)

Inocular 10 ml de SOB con una colonia de DH5 α . Crecer toda la noche a 37 °C con agitación (200 rpm).

Inocular 500 ml de SOB con 2.5 ml del cultivo anterior.

Crecer a 37° con agitación constante hasta una concentración de OD₅₅₀=0.5-0.7 (aproximadamente 5 horas).

Enfriar el cultivo en agua-hielo 15 min.

Centrifugar a 5000 rpm en una centrífuga Beckman durante 10 min a 4 °C.

Lavar el *pellet* dos veces con 500 ml de WB estéril frío. Centrifugar la suspensión celular a 5,000 rpm durante 15 min.

Resuspender el *pellet* de células en volúmenes de 1-2 ml.

Tomar alícuotas de 50 μ l en tubos de microcentrífuga y congelarlas en nitrógeno líquido

Guardar a -80 °C hasta su uso.

Medios usados:

S.O.B.	Cantidad
Trytopne	20,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
NaCl	0,584 g
KCl	0.186 g
Agua desionizada	hasta 1 L

Mezclar componentes con un agitador, ajust a pH 7,0 con NaOH, y autoclavar.

WB

10% Glicerol

90% agua destilada (v / v)

Anexo F: Protocolo kit BD SMART™ RACE cDNA Amplification (Cat. No. 634914)

Nota: Para resultados óptimos, usar 1µg de ARN poli-A o 1µg de de ARN total.

Síntesis de la primera cadena para 5' RACE

1. Combinar lo siguiente en 2 tubos de microcentrífuga distintos:

Para 3'-RACE'
1-3 µl de ARN
1µl 3'-CDs *primer A*

Para 5'-RACE
1-3 µl de ARN
1 µl 5'-CDS *primer A*
1 µl SMART II A oligo

2. Añadir H₂O estéril a un volumen de final de 5 µl para cada reacción.
3. Mezcle contenido y haga girar los tubos brevemente en un microcentrifuge.
4. Poner los tubos a 70 °C durante 2 minutos.
5. Enfriar los tubos sobre hielo durante 2 minutos.
6. Haga girar los tubos brevemente para coleccionar los contenidos en la parte inferior.
7. Añadir lo siguiente a cada tubo de reacción (ya contienen 5 µl):

2 µl 5X First-Strand Buffer
1 µl DTT (20 mM)
1 µl dNTP Mix (10 mM)
1 µl BD PowerScript Reverse Transcriptase _____
10 µl Total volume

8. Mezclar los contenidos de los tubos pipetting suavemente.
9. Centrifugar los tubos brevemente para coleccionar el contenido en la parte inferior.
10. Poner los tubos en 42 °C durante 1.5 horas en un termociclador o una incubadora de aire.

Nota: usar un termociclador es recomendado, por que la incubación puede reducir el volumen de la mezcla de reacción (debido a la evaporación), y por lo tanto reducir la eficiencia de la síntesis de cDNA.

11. Diluir el producto de reacción con Tricine - EDTA:

- Añada 20 µl si se empieza con < 200 ng de ARN total.
 - Añada 100 µl si se empieza con > 200 ng de ARN total.
 - Añada 250 µl si se empieza con ARN poly A.
12. Calentar los tubos a 72 °C durante 7 minutos.
13. Las muestras pueden ser guardado a 20 ° C hasta tres meses.

Amplificación Rápida de los Extremos de cDNA (RACE)

Nota: todas las reacciones de PCR -3' y 5' con este kit, han sido optimizadas para usar *BD Advantage 2 Polymerase Mix* como enzima.

El siguiente protocolo se usa indistintamente para 3' y 5' RACE

Preparar un Master Mix, agregando los siguientes reactivos aun tubo de 1.5 ml:

34.5 µl de agua grado PCR
 5.0 µl 10X BD Ventaja 2 PCR Buffer
 1.0 µl dNTP Mix (10 mM)
 1.0 µl 50x *BD Advantage 2 Polymerase Mix*
 Volumen total 41.5 µl

Mezclar por agitación (sin introducir burbujas) y luego, centrifugar brevemente

Para 3' RACE, preparar lo siguiente en un tubo para PCR:

Componente	Cantidad
cDNA 3'-RACE	2.5 µl
UPM (10X)	5.0 µl
<i>Primer</i> fw (10 µM)	1.0 µl
Agregar el Master Mix	41.5 µl
Volumen final	50 µl

Nota: Para el 5' RACE se hace lo mismo, pero se cambia el cDNA3'-RACE por el cDNA5'-RACE y el *Primer*.

Amplificar el fragmento de interés mediante PCR, usando una de estas dos estrategias:

Estrategia 1 (es recomendada para *Primers* con $T_m > 70^\circ\text{C}$)

94°C 30 seg	}	5 ciclos
72°C 3 min*		
94°C 30 seg	}	5 ciclos
70°C 30 seg		
72°C 3 min*		
94°C 30 seg	}	25 ciclos
68°C 30 seg		
72°C 3 min*		

Estrategia 2 (es recomendada para *Primers* con $T_m = 60-70^\circ\text{C}$)

94°C 30 seg	}	30 ciclos
68°C 30 seg		
72°C 3 min*		

* Si el o los fragmentos esperados son >3 kb, aumentar 1 min por cada kb adicional

Seleccionar el o los fragmentos de interés y caracterizarlos.

Anexo G: Protocolo 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA End

Síntesis de la primera cadena para 5' RACE Version 2.0

1. Añadir lo siguiente a un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml o a un tubo de PCR:

GSP1 (primer específico)	2.5 pmoles (~10 a 25 ng)
RNA	1-5 µg
Agua-DEPC hasta un volumen final de 15.5 µl	

2. Incubar la mezcla 10 minutos a 70 °C. Enfriar por 1 min en hielo. Recoger el contenido del tubo de centrifugación breve y añadir lo siguiente en el orden se indica:

Componente	Volumen (µl)
10X PCR buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
10 mM dNTP mix	1.0
0.1 M TDT	2.5
Volumen final	8.5

El volumen final de la etapa 1 y 2 es de 24 µl.

3. Mezclar suavemente, y recoger la reacción por un pulso de centrifuga. Incubar durante 1 min a 42 °C.

4. Añadir 1 µl de *SuperScript™ III RT* (200 U/µl). Mezclar suavemente e incubar durante 50 min a 42 °C.

5. Incubar a 70 °C durante 15 min. para parar la reacción.

6. Centrifugar 10 a 20 seg. y poner la reacción a 37 °C.

7. Añadir 1 µl de RNasas, mezclar poco a poco pero a fondo, e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

8. Recoger por centrifugación y poner en hielo. El procedimiento puede detenerse en este punto y las reacciones ser almacenadas a -20 °C.

Purificación de cDNA con Columnas S.N.A.P.

1. Equilibrar la *binding solution* a temperatura ambiente.

2. Para cada una de las muestras a ser purificada, equilibrar ~ 100 µl de agua estéril, destilada a 65 °C para su uso en el paso 9.

3. Añadir 120 µl de *binding solution* (6 M de yoduro de sodio) a la reacción de síntesis de cDNA.
4. Transferir la mezcla de cDNA/*binding solution* a una columna S.N.A.P. y centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 20 seg.
5. Extraer el cartucho de la columna y guardar la solución hasta que la recuperación del cDNA sea confirma.
6. Poner el cartucho en un nuevo tubo y añadir 0,4 ml de 1X *wash buffer* frío (4 °C). Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 20 seg. y desechar el líquido. Repetir este paso de lavado tres veces más.
7. Lavar el cartucho dos veces con 400 µl de etanol al 70% frío (4 °C) como se describe en el paso 6.
8. Después de eliminar el etanol al 70%, centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 min.
9. Transferir el cartucho a un tubo nuevo y agregar 50 µl de agua estéril, destilada, (a una temperatura de 65 °C). Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 20 seg. para la elución del cDNA.

Obtención de cDNA con cola poli T

1. Añadir los siguientes componentes para cada tubo y mezclar suavemente:

Componente	Volumen (µl)
Agua-DEPC	6.5
5X tailing buffer	5.0
2 mM dCTP	2.5
cDNA purificado con S.N.A.P.	10.0
Volumen final	24.0

2. Incubar durante 2 a 3 min a 94 °C. Poner 1 min en hielo. Centrifugar unos seg. y dejar en hielo.
3. Añadir 1 µl TdT, mezclar suavemente e incubar durante 10 min a 37 °C.
4. Inactivar la TdT por calentamiento a 65 °C durante 10 min. Centrifugar por pocos seg. y poner en hielo.

PCR del cDNA con cola dC

El cDNA obtenido en el anterior protocolo puede ser directamente amplificado por PCR.

1. Equilibrar el termociclador a 94 °C para mejorar la especificidad de la reacción. Esto es clave cuando no se trabaja con PCR "hot start" o "Arranque en caliente".

2. Añadir los siguientes reactivos a un tubo de PCR ubicado en el hielo:

Componente	Volumen (µl)
Agua destilada estéril	31.5
10X PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]	5.0
25 mM MgCl ₂	3.0
10 mM dNTP mix	1.0
Cebador anidado GSP2 (preparado como 10 µM solución)	2.0
Abridged Anchor Primer (10 µM)	2.0
cDNA con cola dC	5.0
Volumen final	49.5

3. Añadir 0.5 µl de Taq-DNA polimerasa (5 unidades/µl) inmediatamente antes de la mezcla.

4. Mezclar el contenido del tubo

Composición final de la reacción:

20 mM de Tris-HCl (pH 8.4)

50 mM de KCl

1,5 mM de MgCl₂

400 nm de GSP2

400 nm de *Abridged Anchor Primer*

200 µm de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (cada uno)

cDNA X ng

2.5 unidades de Taq-DNA polimerasa

5. Transferir los tubos del hielo al termociclador preequilibrado a 94 °C.

6. Realizar de 30 a 35 ciclos de PCR. Un ciclo típico para amplificar cDNA de ≈1 kb es el siguiente:

Desnaturalización inicial de 94 °C durante 1-2 min

Desnaturalización: 94 °C durante 0.5-1 min

Annealing: 55 °C durante 0.5-1 min

Extensión: 72 °C durante 1-2 min

Seguido de:

Extensión final a 72 °C, 5-7 min

} 30-35 ciclos

7. Analizar 5-20 µl de los productos 5'RACE por electroforesis en gel de agarosa.