

Análisis de Expresión Génica Durante el Deterioro Fisiológico Poscosecha en Raíces de *Manihot esculenta* Utilizando Microarreglos de EST's



Diego F. Cortés³, Kim Reilly², John Beeching², Diana Bernal¹ Joe Tohme¹
 1. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali. Colombia.
 2. Universidad de Bath, UK
 3. Virginia Bioinformatics Institute, Virginia Tech University, Blacksburg VA 24060, USA

INTRODUCCION

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta que tiene la capacidad de crecer bajo condiciones climáticas adversas y en suelos poco fértiles. Sus raíces forman tubérculos con un alto contenido de carbohidratos, por lo que constituyen una importante fuente alimenticia para millones de personas en países en vía de desarrollo de América, África y Asia.

Los tubérculos de la yuca sufren un deterioro fisiológico poscosecha (DFP) que los hace no comestibles en 24-72 horas. Este proceso empieza con una coloración azul oscura del tejido vascular, y posteriormente una coloración marrón de todo el parénquima (Fig. 1). El DFP es el mayor impedimento para la comercialización de los tubérculos de yuca, por lo que ampliar su vida útil beneficiaría a los campesinos, procesadores y consumidores de los mismos.

El DFP es un proceso activo de los tubérculos, por lo tanto, debe estar controlado por la expresión de genes específicos. El objetivo de este proyecto es identificar los principales genes involucrados en el DFP, utilizando tecnologías de análisis masivo de expresión génica como los microarreglos de ADNc, y caracterizar a nivel genómico aquellos genes que tengan el potencial de ayudarnos a modularlo.

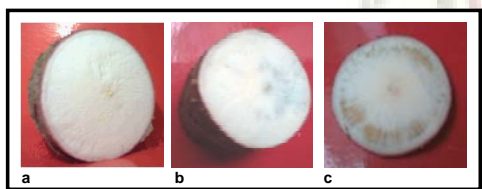


Fig. 1
 DFP en tubérculos de yuca. (a) Tubérculo recién cosechado, (b) después de 24 horas, (C) después de 72 horas.

METODOLOGIA

Se fabricaron microarreglos de ADNc con mas 11.000 clones de una librería construida a partir de ARNm de raíces de *Manihot esculenta* en diferentes etapas del DFP, los cuáles fueron hibridizados simultáneamente con muestras de ADNc marcadas diferencialmente, de raíces recién cosechadas y raíces cosechadas 12, 24, 48, 72 o 96 horas antes (Fig. 2). Los resultados de las hibridizaciones fueron analizados en la Universidad de Bath (Reino Unido), con el programa "Arrayvision". Los clones cuya expresión aumentó 2 veces o mas, o disminuyó 2.3 veces o mas durante el DFP fueron secuenciados, y se les asignó una función putativa según las homologías encontradas en bases de datos de ADN o de proteínas del "Gene Bank".

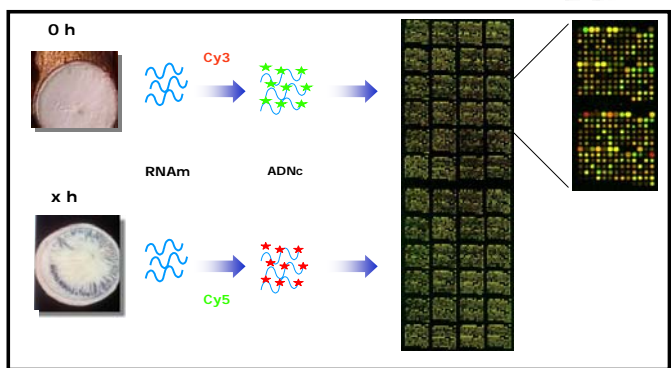


Fig. 2
 Esquema de hibridización sobre microarreglos de ADNc para identificar clones con expresión regulada durante el DFP. X=12, 24, 48, 72 o 96 horas después de la cosecha.

RESULTADOS Y DISCUSION

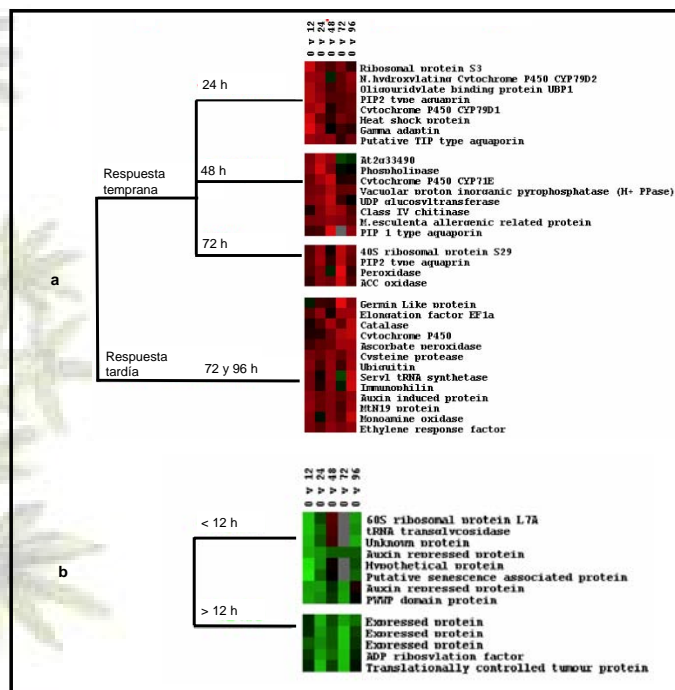


Fig. 3
 Agrupamiento de los clones regulados durante el DFP según el momento en que aumentó (a) o disminuyó (b) su nivel de expresión. La intensidad del color refleja la magnitud del cambio en el nivel de expresión.

Se identificaron 114 clones inducidos y 70 suprimidos en algún momento de las primeras 96 horas del DFP. Algunos de estos clones son redundantes entre sí y representan genes con roles en refuerzo de la pared celular; biosíntesis de glucosinolato; muerte celular programada; control de transcripción y traducción; estrés oxidativo; transducción de señales o percepción; transporte de iones, agua y metabolitos; y sin función conocida. En la Fig. 3 se muestra el patrón de expresión de algunos de los genes regulados durante el DFP. Los genes aparecen organizados según el momento del DFP en el que su nivel de expresión aumentó (Fig. 3a) o disminuyó (Fig. 3b). Entre los genes regulados se encontró un aumento en el nivel de expresión de cuatro enzimas que desactivan especies reactivas de oxígeno, como catalasas y peroxidases; también se encontró un aumento en el nivel de expresión de un factor de transcripción activado por el etileno y de la enzima ACC oxidasa (oxidasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), la cuál cataliza el último paso de la biosíntesis del etileno; por otro lado, se encontró disminución en la expresión de una proteína reprimida por auxina y aumento en la expresión de otra proteína inducida por auxina. Así, los resultados obtenidos hasta ahora, indican que factores como el estrés oxidativo, el etileno y la auxina posiblemente juegan un papel importante durante el DFP.

Finalmente se va a determinar el patrón de expresión de los clones del microarreglo en hojas sanas y heridas, y según las funciones putativas asignadas, se seleccionaran algunos clones para aislar y caracterizar la secuencia genómica correspondiente, incluyendo los promotores. Así esperamos adquirir suficiente conocimiento para entender como esta siendo regulado el deterioro fisiológico poscosecha, y tener genes candidatos para modular el DFP en plantas transgénicas.