

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA AMPLIFICAR UN FRAGMENTO DE ADN DE CAÑA DE AZUCAR CON POSIBLE RELACION CON LA RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD MANCHA DE OJO

M. Ramos Leal, T.D. Dinkova, E. Canales y A. Veitia.

Dpto. Bioplantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 29 de marzo de 1996.

RESUMEN. Se amplificó un fragmento de ADN de 540 pares de bases (pb) mediante la reacción en cadena de la polimerasa, usando como cebadores la secuencia aminoacídica de la proteína de enlace con la toxina responsable del desencadenamiento del proceso patogénico. El fragmento amplificado se clonó y se empleó como sonda de alta homología frente a un grupo de ADN genómicos provenientes de variedades de caña de azúcar. Los resultados de la hibridación mostraron la presencia de varias bandas, al emplear dos enzimas de restricción, pero que no permiten establecer ninguna correlación. Se sugiere aumentar el número de enzimas y variedades a emplear para descartar si este fragmento juega ó no algún papel en la expresión de la resistencia a esta enfermedad.

INTRODUCCION

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹ se ha convertido en una de las tecnologías de mayor uso en la Biología experimental contemporánea. La popularidad de la PCR es primariamente motivada por su aparente simplicidad y alta probabilidad de éxito.

La capacidad de sintetizar grandes cantidades de un fragmento específico de ADN (en magnitud de orden exponencial), a partir de una ínfima cantidad de ADN de molde, ha facilitado significativamente los subsecuentes análisis.¹ Reducido a los términos más básicos, la PCR incorpora la combinación de una muestra de ADN como molde o patrón, con los oligonucleótidos como cebadores (iniciadores de la reacción), desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) y la enzima Taq ADN polimerasa en un *tampón* adecuado, para luego reiteradamente calentar y enfriar la mezcla por varias horas hasta obtener la cantidad deseada de ADN amplificado.² Uno de los factores que ha permitido la amplia utilización de esta técnica es la sustitución de la enzima ADN polimerasa proveniente de *E.coli* por otra termoestable aislada de *Thermus aquaticus*,³ lo que permite hacer en un ciclo completo la separación de las cadenas de ADN ($\approx 94^{\circ}\text{C}$), el anillamiento ($\approx 54^{\circ}\text{C}$) y la extensión ($\approx 72^{\circ}\text{C}$), reiterando dicho ciclo varias veces.

La enfermedad mancha de ojo causada por el hongo *Drechslera sacchari* libera una toxina (DS) que es el determinante del proceso patogénico.⁴ Esta toxina se enlaza específicamente con una proteína (MJ-1), cuya secuencia aminoacídica primaria ha sido descrita.⁵

ABSTRACT. A 540-bp DNA-fragment was amplified by PCR, using the aminoacidic sequence of the binding protein responsible of the pathogenesis to eyespot disease in sugarcane as primers. The DNA fragment was cloned and used as a high homology probe with restricted genomic DNA from a group of sugarcane commercial varieties. Although hybridization analysis showed several bands, no correlation with disease resistance could be established. These results suggest to increase the different enzymes and sugarcane varieties, trying to determine the possible role of this fragment in the resistance expression.

En este trabajo, se describe la amplificación de secuencias de ADN, cuyo producto, la proteína de enlace con la toxina DS, juega un papel importante en el mecanismo de la resistencia a dicha enfermedad.

MATERIALES y METODOS

Material vegetal

Se utilizaron hojas primordiales de plantas de 3 a 5 meses de edad, correspondientes a un grupo de variedades de caña de azúcar de comportamiento conocido frente a la enfermedad, tres variedades obtenidas por cultivo de tejido *in vitro*⁶ CC 4-83 y CC 1-83 altamente resistentes (AR), CC 2-83 (resistente (R)yC8 7-51 altamente susceptible(AS) y que fue la variedad donante para el proceso de cultivo de tejidos.

Preparación de ADN genómico

Los ADN genómicos, tanto el molde para la reacción, como los empleados para el análisis molecular, se aislaron según el procedimiento de Dellaporta y col.,⁷ ap artird el as variedades antes descritas.

Cebadores

Los cebadores se diseñaron y sintetizaron a partir de la secuencia aminoacídica conocida de la proteína de enlace con la toxina que provoca la enfermedad.⁵ Los oligonucleótidos se obtuvieron en un sintetizador Gene Assembler Plus-DNA (Pharmacia-LKB), añadiéndose a cada cebador el sitio de reconocimiento para las enzimas EcoR I y Hind III, respectivamente, para facilitar la clonación del fragmento de ADN amplificado. La secuencia de los cebadores utilizados fue:

EcoR I
Cebador I : 5'-GC~~G~~**GAATT** CGACATT GTCCAT TTCAGTT GG-3'
(29 mers)

siendo el primero el original a partir de la secuencia conocida y el segundo, complementario y en sentido inverso al original

PCR

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 40 μ L que contenía 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.6; 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.001 % gelatina, 0.1 mmol/L de cada desoxinucleótido, 400 ng del ADN molde y 1 UI Taq polimerasa. La amplificación se realizó en un termostato programable Gene ATAQ (Pharmacia-LKB), programado para 40 ciclos de 1 min a 92 °C, 2 min a 50 °C y 3 min a 72 °C. El ADN genómico de la variedad resistente CC 4-83 se usó como molde de la reacción. Se empleó además, una muestra libre de ADN como control de calidad del proceso. El análisis de los productos de la PCR, se realizó sobre un gel 1.5 % agarosa Nu-Sieve, que permitió la purificación posterior de los fragmentos.

Análisis del ADN genómico, la transferencia y la hibridación

Los ADN genómicos aislados fueron digeridos⁸ empleando las enzimas de restricción EcoRI y Hind III y luego transferidos sobre una membrana de *nylon* (Amersham), de acuerdo con los productores.

El fragmento amplificado se clonó en un plásmido M-13, según lo recomendado por los productores (Stratagene). Los clones positivos se identificaron por el crecimiento de colonias blancas. La sonda se marcó por el método de *nick translation*⁸ con [³²P]-dATP. Después de la hibridación, las membranas se lavaron dos veces a 65 °C por 20 min y luego, se expusieron con placas de rayos X a -70 °C.

RESULTADOS y DISCUSION

La amplificación desarrollada a partir del ADN genómico de la variedad CC 4-83, altamente resistente a la enfermedad, dió como resultado la síntesis de un fragmento único de 540 pares de bases (bp) (Fig. 1). La amplificación de la muestra control no mostró presencia de ADN, lo que descartó la posibilidad de falsos positivos por artefacto.² Se observó igualmente la presencia, al final de la corrida, de una banda que se correspondió con un exceso de cebadores en la mezcla de reacción.



Fig. 1 Productos de PCR teñidos con bromuro de etidio, luego de la amplificación del ADN de CC 4-83 variedad AR (carril 1), control negativo sin ADN (carril 2). El patrón de pesos moleculares corresponde al plásmido pBR 322 digerido con Alu I (carril 3). Se aprecia la presencia de una banda intensa de aproximadamente 540 bp. La banda inferior indica el exceso de cebadores en la mezcla de reacción.

El fragmento amplificado luego de su clonación fue empleado como sonda. La hibridación con ADN genómico de diferentes variedades y el donante, mostró una alta homología (Fig. 2).

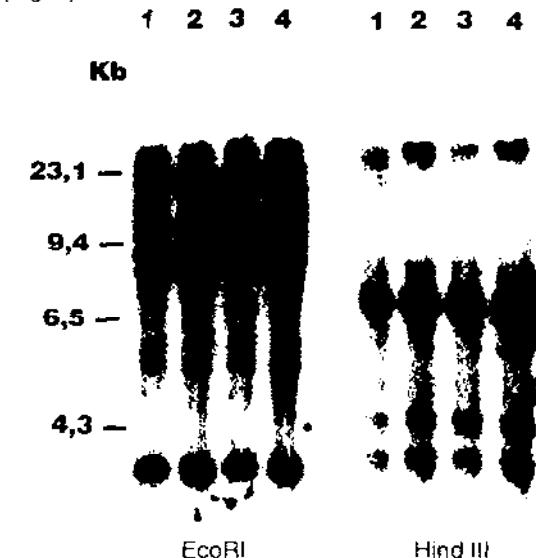


Fig. 2. Autoradiografía de ADN genómicos hibridados con la sonda correspondiente al fragmento amplificado. Las variedades empleadas fueron digeridas con EcoRI (a) y Hind III (b). C 87-51 AS (carril 1) ; CC 1-83 AR (carril 2) ; CC 2-83 R (carril 3) . CC 4-83 AR (carril 4).

Tanto para la digestión con la enzima EcoRI como con la Hind III, se observaron varias bandas entre 3.2 y 9.8 kb. Resulta interesante señalar que hasta el momento, no se ha obtenido hibridación entre la sonda obtenida y el ADN mitocondrial. Estos resultados pudieran sugerir que el fragmento aislado corresponde a secuencias repetidas dentro del genoma nuclear de la caña.

A pesar de que la proteína MJ-1 es comúnmente aislada de la fracción mitocondrial, dicha proteína debe ser codificada probablemente a nivel de genoma nuclear, sintetizada en el citoplasma y posteriormente importada, como ocurre con un gran conjunto de proteínas tanto de mitocondrias,⁹ como de cloroplastos.¹⁰

La utilización de PCR en este trabajo permitió además de la identificación de una secuencia específica, una rápida clonación de los fragmentos amplificados.

El hecho de estar presente la proteína MJ-1 tanto en variedades susceptibles como resistentes a la enfermedad,¹¹ implica la necesidad de un estudio más profundo a nivel genético, de las diferencias detectadas en la secuencia de aminoácidos. El empleo de este fragmento como sonda molecular, combinado con otras enzimas de restricción, pudiera permitir la determinación de su posible papel en el proceso de resistencia a la enfermedad.

La detección de secuencias específicas dentro del genoma de las plantas en muchas ocasiones ha sido difícil, cuando se trata de secuencias únicas. Mediante el uso de la PCR es posible amplificar una secuencia deseada, a partir de una cantidad mínima de material de partida, facilitando de esa forma el estudio posterior del fragmento amplificado. En el caso de genes relacionados con la resistencia a enfermedades, la aplicación de la PCR permite una caracterización más rápida de ellos, facilitando su uso en los sistemas de selección y programas de mejoramiento.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS) Ref. C/1447-2 a nombre de M.R.L. por el financiamiento de una parte de este trabajo.

Al Dr. L. Maestre del laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", por sugerencias en el desarrollo de los análisis de PCR.

BIBLIOGRAFIA

1. Mullis K.B. and Faloona F.A. **Meth. Enzymol.**, **155**, 335, 1987.
 2. Saiki R.K. The design and optimization of the PCR. In PCR Technology Principles and Applications for DNA amplification. Erlich H.A. (ed.) Stockton Press, N.Y. Chapter 1, 7, 1990.
 3. Gelfand D.H. Taq DNA polymerase In PCR Technology: Principles and Applications for DNA amplification. Erlich H.A. (ed.) Stockton Press, N.Y. Chapter 2, 17, 1990.
 4. Ramos Leal M., Maribona R.H., Ruiz A. and Sandoval I. **Plant Breed.**, **102**, 45, 1989.
 5. Ruiz A. and Rodríguez M. In Advances in Modern Biotechnol. 1:14.14, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 1992.
 6. Ramos Leal M., Maribona R., Ruiz A., Korneva S., Canales E., Dinkova T.D., Coto O., Izquierdo F. and Rizo D. **Plant Breed.**, **115**, 37, 1996.
 7. Dellaporta S.L., Wood J. and Hicks J.B. **Plant Mol. Biol.**, **1**, 19, 1983.
 8. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Lab., N.Y., 1989.
 9. Eckenrode V.K. and Levin C.S. Maize mitochondrial genes and cytoplasmic male sterility. In Tailoring genes for crop improvement. Bruening and Harada (ed.). Plenum Pub. Corp., N.Y., 69, 1987.
 10. Weil J.H. **Plant Science**, **49**, 149, 1987.
 11. Ruiz A., Ramos Leal M., Rodríguez M. and Maribona R.H. **Eur. J. Plant Path.**, 1996 (enviado).
-