

CARACTERIZACION DEL ADN MITOCONDRIAL DE LA CAÑA DE AZUCAR

E. Canales, M. Ramos Leal y R.H. Marlbona

Grupo de Bioplasmas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN. Las mitocondrias de una variedad de caña de azúcar fueron obtenidas a partir del verticilo apical mediante centrifugación diferencial y purificadas por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. El ADN fue extraído por el método de fenol-clorofórmico o por ultracentrifugación en gradiente de CsCl. El ADN mt fue caracterizado por su densidad de flotación, el contenido de guanina-citosina, su peso molecular y el patrón electroforético de los fragmentos de restricción.

ABSTRACT. Mitochondrial fraction was isolated from sugar cane spindles by differential centrifugation and purified by ultracentrifugation on a sucrose discontinuous gradient. DNA was isolated by phenol-chloroform method or by gradient ultracentrifugation on CsCl. DNA was characterized by buoyant density, guanine-cytosine content, molecular weight and electrophoretic restriction fragment pattern.

INTRODUCCION

El genoma mitocondrial de las plantas comparado con el resto de los organismos eucariotes presenta un tamaño muy superior. Ha sido demostrado que el ADN mitocondrial (ADN mt) codifica diferentes características y funciones, incluyendo la expresión de resistencia a diversos estrés y enfermedades como son la esterilidad citoplasmática masculina y la susceptibilidad al *Helminthosporium maydis* en el maíz.^{1,2}

El estudio del genoma mitocondrial es de gran utilidad para la detección precoz de la variabilidad inducida, bien por la hibridación sexual o por otras técnicas como el cultivo de tejidos, mutagénesis, fusión de protoplastos, etcétera.^{3,4} En el caso de la caña de azúcar, es aún más importante, ya que esta planta presenta un genoma nuclear extremadamente complejo de analizar debido al mosaicismo y poliploidía que lo caracteriza.

Para la estimación del tamaño del genoma mitocondrial usualmente han sido empleados tres métodos: microscopía electrónica, estudios de cinética de renaturalización y la sumatoria de los pesos moleculares de los fragmentos de restricción. Ninguno de estos métodos es completamente satisfactorio, debido a la complejidad y gran tamaño de los genomas mitocondriales de las plantas.⁵

En particular, los perfiles de endonucleasas de restricción de los ADN mt de plantas son muy complejos. Para la estimación del peso molecular del genoma mitocondrial, hay que tener en cuenta la estequiometría de las bandas de restricción individuales; dependiendo de qué banda es tomada para representar una secuencia de simple copia, se pueden obtener valores muy diferentes para el tamaño del genoma. Los pesos moleculares del ADN mt pueden resultar diferentes cuando son determinados por métodos distintos. Tal es el caso del ADN mt de algodón, para el cual se han determinado valores de 695, 697 y 712 kb según la sumatoria de los fragmentos de restricción obtenidos con tres enzimas diferentes y un valor de 2 070 kb por análisis de reasociación cinética.⁶

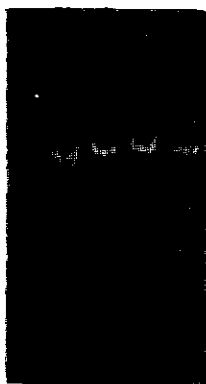


Fig.1. Electroforesis en gel de agarosa 0,4 % del ADN mt y ADN del fago λ .

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el ADN mitocondrial de la caña de azúcar por su isodensidad, el contenido de guaninacitosina, su peso molecular y el patrón electroforético de sus fragmentos de restricción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las mitocondrias fueron obtenidas a partir de los primordios foliares del verticilo apical (spindles) de plantas de caña de azúcar de 4 a 6 meses de edad, de la variedad C8751, según la metodología descrita por Forde y col.⁷ con algunas modificaciones.

Cien gramos de tejido (aproximadamente veinte spindles) se homogenizaron en un mortero con 200 mL de solución de homogenización (manitol 400 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, BSA 0,1 % y cisteína 8 mmol/L, pH 8,8) y se filtró por 4 capas de gasa. El filtrado se centrifugó a 1 250 xg durante 15 min y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 5 000 xg durante 20 min. El precipitado se resuspendió en 50 a 60 mL de solución de lavado (manitol 400 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, EDTA 1 mmol/L y BSA 0,1 %, pH 7,8) y posteriormente, se centrifugó a 12 000 xg durante 15 min. El precipitado se resuspendió en 6 mL de solución de lavado y se sometió a una ultracentrifugación en gradiente discontinuo, compuesto de 3 mL de sacarosa 1,45 mol/L y 5 mL de sacarosa 0,6 mol/L en una solución compuesta por EDTA 1 mmol/L, BSA 0,1 % y tricina 10 mmol/L,

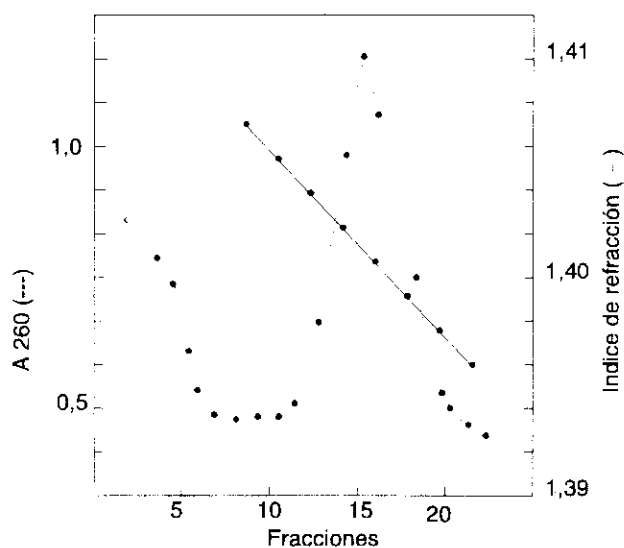


Fig.2. Perfil de absorbancia del ADN mt de caña de azúcar, fraccionado mediante centrifugación en gradiente de CsCl.

pH 7,2 y 1 mL de la suspensión de mitocondrias, centrifugándose a 30 000 x g durante 30 min. La suspensión de mitocondrias purificadas, colectadas en la interfase, se diluyó en 3 volúmenes de manitol 0,2 mol/L, EDTA 1 mmol/L y tricina 10 mmol/L, pH 7,2 centrifugándose nuevamente a 12 000 xg durante 15 min. Todo el proceso se realizó a 4 °C.

El ADN se extrajo mediante ultracentrifugación en gradiente de CsCl, según Rawson y col.⁸ o por el método de fenol.⁹ La isodensidad del ADN se determinó según van Ee y col.¹⁰ mediante ultracentrifugación en gradiente continuo de CsCl sin bromuro de etidio (EtBr), en una ultracentrifuga preparativa a una velocidad de 228^317 xg, durante 48 h a 10°C. Posteriormente, el gradiente se dividió en 30 fracciones de 100 L, a cada una de las cuales se les determinó el índice de refracción y la absorbancia a 260 nm. La isodensidad de la fracción correspondiente al máximo de absorbancia a 260 nm, calculada a partir de la medida del índice de refracción, fue considerada la isodensidad del ADN mt.

El ADN de *Saccharomyces cerevisiae*, de densidad de 1,697 2 g/cm³ fue empleado como control. El contenido de guanina-citosina (G-C) fue calculado según Mandel y col.,¹¹ mediante la fórmula:

$$G-C = \frac{P - 1.660}{0.098} \cdot 100 (\%)$$

donde: r es la densidad de flotación del ADN en CsCl.

Se realizó una electroforesis del ADN mt sin digerir en agarosa 0,4 %, para estimar la integridad del ADN, así como el rango de peso molecular, empleando como control un ADN de alto peso molecular (fago I, cuyo PM es 50 kb).

Para la obtención del patrón electroforético de los restringidos de ADN, este se digirió con la enzima EcoR V (suministrada por HEBER BIOTEC) bajo las condiciones especificadas por el proveedor. El ADN se fraccionó en un gel de agarosa 0,7 % en una solución Tris-acetato 0,04 mol/L y EDTA 2 mmol/L en presencia de 0,5 g/mL de EtBr. La electroforesis se realizó a 1 V/cm, durante 16 h.

El peso molecular del ADN fue estimado mediante la sumatoria de los pesos moleculares de los fragmentos de restricción.

Se realizaron cinco repeticiones para cada determinación, a partir de cinco aislamientos diferentes de ADN.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los ADN mt obtenidos por gradiente de CsCl y por el método del fenol, después de ser sometidos a electroforesis en gel de agarosa 0,4 %, se observaron como una simple banda, lo que sugiere que no hay degradación del ADN y además que no está contaminado con ARN (Fig.1). La distancia recorrida en el gel resultó similar a la del

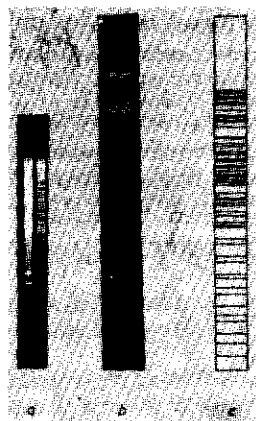


Fig. 3. Electroresis en gel de agarosa 0,7% del ADN mt digerido con la enzima el ADN EcoR V. Se empleó el ADN del fago <f128P14M><108><F255> digerido con Hind III como marcador molecular., b) detalle ampliado de los restringidos del ADN mt, c) electrofograma del patrón de registro.

ADN del fago I, lo cual permite estimar que el ADN mt purificado es de alto peso molecular.

El máximo de absorbancia del fraccionamiento del gradiente de densidad de CsCl (Fig.2) corresponde a un índice de refracción aproximado de 1,399⁶, el cual equivale a una densidad de 1,706 g/cm³ de CsCl, siendo esta la densidad de flotación del ADN mt de la caña de azúcar. El contenido de G-C, calculado a partir de este valor, fue de un 44,9 %. Estos valores resultan similares a los determinados a un gran número de plantas superiores, tales como soya, lechuga, maíz, petunia, papa, tabaco, trigo, etcétera.⁵ Estos resultados confirman lo planteado por otros autores en relación con la constancia en la composición de base del ADN mt de las plantas.

La Figura 3 muestra al ADN mt digerido con la enzima EcoR V. Se puede apreciar una distribución discreta de bandas, las cuales están representadas mediante un electrofograma. En este caso, la determinación del peso molecular se realizó solamente mediante el método de sumatoria de los pesos moleculares de los fragmentos de restricción.

Como se puede observar, el patrón electroforético de los fragmentos de restricción del ADN mt de la caña de azúcar es muy complejo, lo que dificulta la determinación de la estequiometría de las bandas, fundamentalmente las de menor peso molecular.

La Tabla I muestra los pesos moleculares aproximados de cada banda, tomando como control los pesos moleculares del fago I digerido con Hind III. El peso molecular determinado a partir de la sumatoria de los pesos individuales de cada banda fue de 367,33 kb. Este valor está dentro del rango establecido para los ADN mt de las plantas, el cual comprende desde aproximadamente 220 kb para las especies de Brassica¹² hasta 2 500 kb para el melón (*Cucumis melo*).¹³

Tabla I

Pesos moleculares de los fragmentos de restricción del ADN mt digerido con EcoR V

Banda	Peso molecular (kb)
1	22,0
2	20,7
3*	18,5
4	16,6
6	16,0
7	14,5
8	12,5
9*	12,0
10	10,8
11*	9,6
12	8,2
13	7,7
14	7,4
15	7,1
16	7,0
17*	6,6
18*	6,5
19	6,2
20	6,0
21	5,8
22	5,7
23	5,6
24	5,4
25	5,3
26*	4,9
27	4,7
28	4,6

bandas duplicadas

El valor del peso molecular determinado (367,33 kb), sitúa al ADN mt de la caña de azúcar en una posición intermedia con respecto a los pesos correspondientes a otras especies tales como son⁵

Brassica hirta (208), *B. campestris* (218), *B. oleracea* (219), *B. napus* (221), *B. nigra* (231), rábano (242), espinaca (327), remolacha (386), trigo (440) y maíz (570).

Es de destacar que el trigo y el maíz, pertenecientes también a las gramíneas como la caña de azúcar, tienen valores superiores a esta. Este valor no es lo suficientemente pequeño como los de las especies de *Brassica* y los ADN de cloroplastos, los cuales resultan relativamente sencillos de analizar, ni tiene la extraordinaria complejidad de otras especies como el del maíz.

Este estudio podría servir de base para profundizar en la comprensión de la estructura y organización del genoma mitocondrial de la caña de azúcar.

CONCLUSIONES

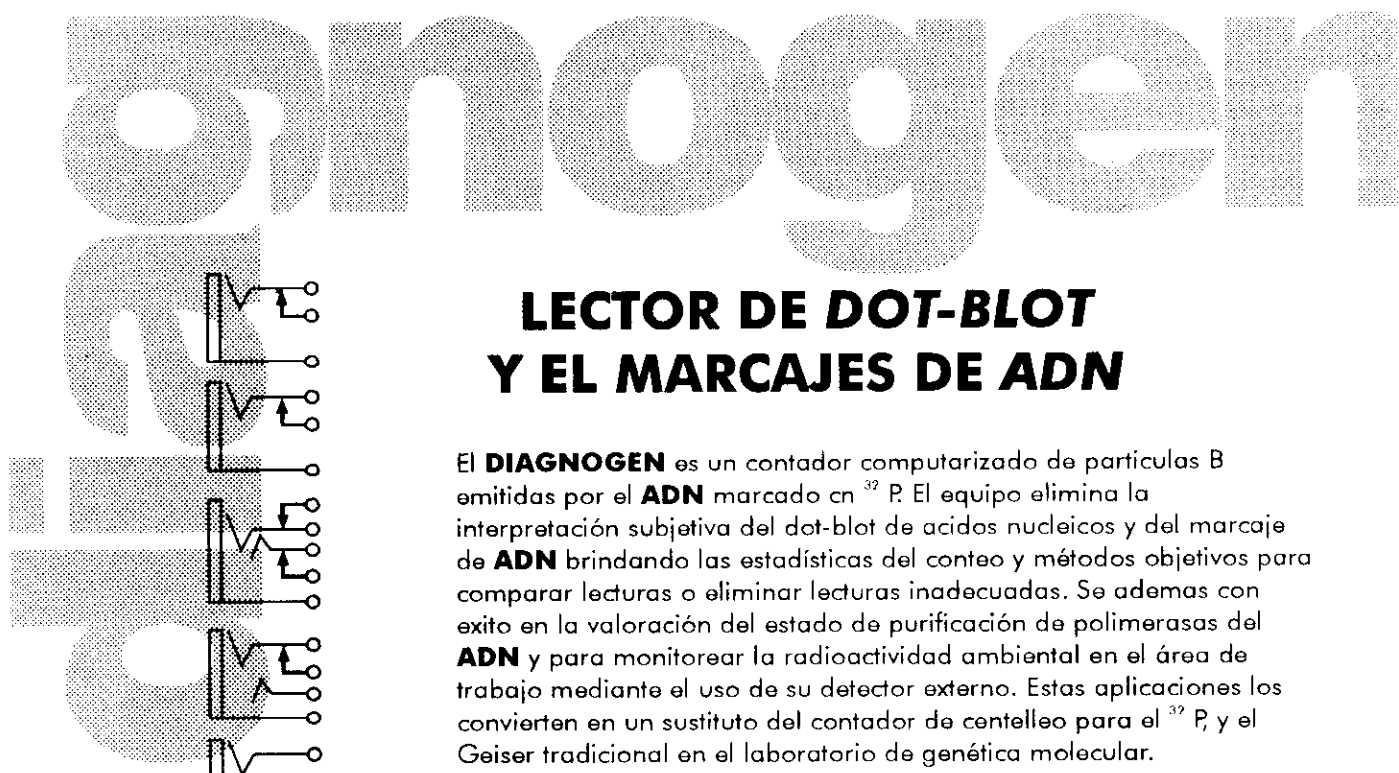
Se aisló el ADN mt de la caña de azúcar con un alto peso molecular y sin degradación. El ADN mt presentó una densidad de flotación de 1,706 g/cm³ y un contenido de G-C de 44,9 %, lo cual coincide con lo reportado para las plantas superiores.

El peso molecular determinado a partir de la sumatoria de los fragmentos producidos por la digestión con EcoR V fue de 367,33 kb.

BIBLIOGRAFIA

1. Breittell R.I.S. and Thomas E. *Theor. Appl. Genet.* 58, 55, 1980.

2. Wise R.P., Pring D.R. and Gengenbach B.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2858, 1987.
3. Asahi K., Kumashiro T. and Kubo T. *Plant Cell Physiol.* 29, 43, 1988.
4. Brears T., Curtis G.B. and Lonsdale D.M. *Theor. Appl. Genet.* 77, 260, 1989.
5. Lonsdale D.M. In: *The Biochemistry of Plants*, vol. 15, 229-295 (A. Marcus, ed.), Academic Press, Inc., 1989.
6. Hsu C.L. and Mullin B.C. *Plant Mol. Biol.* 13, 467, 1989.
7. Forde B.G., Oliver R.J. and Leaver C.J. *Plant Physiol.* 63, 67, 1979.
8. Rawson J.R.Y., Thomas K. and Clegg M.T. *Biochem. Genetic* 20, 209, 1982.
9. Synenky R.M., Leavitt III C.S. and Shah D.M. *Plant Physiol.* 61, 460, 1978.
10. van Ee J.H., Man in't Veld W.A. and Planta R.S. *Plant Physiol.* 66, 572, 1980.
11. Mandel M., Schildkraut C.L. and Marmu J. *Methods Enzymol.* 12B, 184, 1968.
12. Vedel F., Mathieu C., Pelletier G. and Primard C. *Plant Physiol. Biochem.* 25, 249, 1987.
13. Ward B.L., Anderson R.S. and Bendich A.J. *Cell* 25, 793, 1981.



diagnogen

LECTOR DE DOT-BLOT Y EL MARCAJES DE ADN

El **DIAGNOGEN** es un contador computarizado de partículas B emitidas por el **ADN** marcado en ³²P. El equipo elimina la interpretación subjetiva del dot-blot de ácidos nucleicos y del marcaje de **ADN** brindando las estadísticas del conteo y métodos objetivos para comparar lecturas o eliminar lecturas inadecuadas. Se además con éxito en la valoración del estado de purificación de polimerasas del **ADN** y para monitorear la radioactividad ambiental en el área de trabajo mediante el uso de su detector externo. Estas aplicaciones los convierten en un sustituto del contador de centelleo para el ³²P, y el Geiger tradicional en el laboratorio de genética molecular.