

Librería sustractiva obtenida de un mutante de la variedad B 4362 con resistencia a la roya de la caña de azúcar

María I. Oloriz^{1*}, Luis Rojas¹, Víctor Gil², Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54830.

² Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54830.

RESUMEN

La respuesta hipersensible es uno de los mecanismos más poderosos por el cual las plantas resisten el ataque de patógenos. Mutaciones realizadas, previamente, sobre la variedad B4362, de caña de azúcar, originaron cinco mutantes que expresan este mecanismo frente al ataque de la roya (*Puccinia melanocephala* Syd.). Mediante una hibridación sustractiva entre el cADN obtenido a partir del clon resistente inoculado con roya y un pool de cADN de la variedad susceptible (B4362) inoculado y del clon resistente no inoculado, se logró reducir el número de genes expresados durante la infección con el hongo. Se realizó una librería sustractiva donde se espera se encuentren la mayoría de los genes involucrados en la respuesta de hipersensibilidad que presentan estos mutantes frente a la infección del patógeno.

Palabras clave: hibridación sustractiva, *Puccinia melanocephala* Syd, respuesta hipersensible

ABSTRACT

The hypersensitive response is one of the most powerful mechanisms for which the plants resist pathogen attack. Mutations carried out previously on the variety B4362, of sugarcane, originated five mutants that express this mechanism towards the attack of rust (*Puccinia melanocephala* Syd.). By means of a subtractive hybridization among the cDNA obtained starting from the resistant clone inoculated with rust and a pool of cDNA of the susceptible variety (B4362) inoculated and of the resistant clone not inoculated, it was possible to reduce the number of genes expressed during the infection with the fungus. A subtractive library was carried out where we hope that most of the genes are involved in the hypersensitive response that present these mutants towards the infection of the pathogen.

Key words: Subtractive hybridization, hypersensitive response, *Puccinia melanocephala* Syd.

INTRODUCCIÓN

La obtención de nuevas variedades de caña de azúcar con resistencia a la roya (*Puccinia melanocephala* Syd) ha sido una tarea difícil para los mejoradores. Mediante la variación somaclonal y la mutagénesis *in vitro* Gil *et al.* (1987) refirieron mutantes de la variedad B4362 con resistencia a la roya, pero a su vez perdieron la resistencia al carbón (*Ustilago scitaminea* Syd.).

En trabajos posteriores con dichos somaclones, fue registrada un tipo de peroxidasa que coincide con la encontrada en variedades resistentes a la enfermedad, la cual no existe en el donante susceptible B4362 (Oloriz y Gil, 1994; 1999).

La hibridación sustractiva es una eficiente herramienta para identificar y aislar cADN de genes diferencialmente expresados entre dos poblaciones de interés. Una variante de esta técnica basada en el PCR (polymerase chain reaction) fue propuesta por Diatchenco *et al.* (1996) a la que nombraron Hibridación Sustractiva por Supresión, (SSH del inglés

supresión subtractive hybridization). La misma es empleada para seleccionar fragmentos de cADN blancos (expresados diferencialmente) y simultáneamente suprimir la amplificación de otras secuencias.

Este trabajo se propuso la tarea de encontrar los genes de resistencia a la roya de la caña de azúcar. Un mutante resistente a través de una respuesta hipersensible y la variedad original B 4362 fueron empleados en una hibridación sustractiva. Se obtuvo una notable reducción de los genes expresados con los que se elaboró una librería sustractiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inoculación con roya

Los genotipos empleados fueron la variedad B 4362 susceptible a la roya y su mutante IBP 8518 resistente vía respuesta hipersensible. Las plantas obtenidas a partir de estacas fueron crecidas durante dos meses en condiciones de luz solar,

alta humedad relativa, temperatura entre 25 y 27 °C y en un ambiente libre de roya.

El inóculo del hongo se preparó a partir de pústulas de hojas de la variedad B4362 colectadas en el campo. Se aplicó una mezcla de estas mediante un pincel en el envés de la hoja. Se tomaron muestras del tejido foliar por espacio de siete días, tiempo en el que estaban establecidos los puntos de infección en las hojas. Del mismo modo se procedió con plantas controles (sanas).

Purificación del ARN

Las hojas colectadas fueron pulverizadas en nitrógeno líquido se adicionó el buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 9, 200mM NaCl, 15 mM EDTA, 0,5 % Sarcosyl, 100mM mercaptoetanol), a razón de 2 ml por gramo de tejido y una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamil (25:24:1). Se dió vortex fuerte y se adicionó acetato de sodio 3 M pH 5.2, dejándose en hielo por 20 min. Se centrifugó y se le repitió otro paso de fenol: cloroformo. Se precipitó con isopropanol y luego con cloruro de litio. El ARN resultante fue chequeado por espectrofotometría (DO 230, 260, 280) y empleado para la purificación del mARN mediante el kit PolyATract mRNA Isolation System IV (Promega Z 5310).

Hibridación sustractiva

La hibridación sustractiva se realizó con los cADN obtenidos a partir de 2 µg de mARN del mutante IBP 8518 inducido y una mezcla de 2 µg del mARN de la variedad B4362 inducida e IBP 8518 no inducida. Se

siguieron las instrucciones del kit PCR-Select cDNA Subtraction Kit CLONTECH (K1804-1) fundamentalmente, con la salvedad de que para las reacciones de PCR primario y secundario se adicionaron 5 U de Taq Polimerasa (Promega) y se empleó 65 °C en la unión del primer y 35 ciclos de amplificación para el caso del PCR primario, y para el secundario 68 °C con 21 ciclos.

Los productos de la sustracción fueron separados en los sistemas de geles de agarosa (2 % agarosa / Buffer TAE 1X, EtBr) y acrilamida (7 % acrilamida / TBE 1X, con tinción de plata).

Librería sustractiva

La librería sustractiva se confeccionó por el clonaje del producto de la sustracción en el vector pGEM-T Easy vector (Promega A 1360). Los clones positivos fueron seleccionados mediante análisis de restricción con Eco RI y PCR empleando los oligos M13:

FW 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
Rev 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones en que se mantuvieron las plantas y el modo de inoculación empleado permitieron un buen desarrollo de la infección por roya. Los primeros puntos cloróticos aparecieron a los cinco días de inoculadas las plantas y el desarrollo de la pústula madura sobre B4362 aproximadamente a los 11 días de inoculadas. Las muestras tomadas resultaron un material de partida ideal para el trabajo, de donde se extrajeron los ARN con purezas (DO 260/280) superiores a dos y de buena calidad (Figura 1).

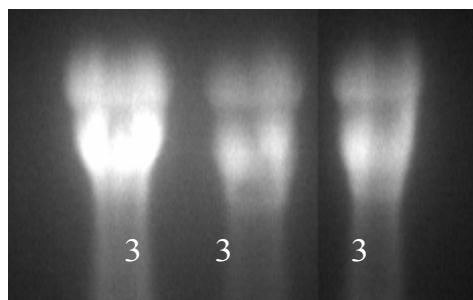


Figura. 1 Electroforesis, en gel de agarosa de los ARN total purificados. 1) Somaclon IBP 8518 inoculado con roya, 2) Variedad B4362 inoculada, 3) Somaclon IBP 8518 no inoculado.

Los cADN obtenidos (Figura 2) estuvieron dentro del rango de talla esperado, lo que permitió la sustracción eficiente de estos. Puede observarse en la figura 3 que el rango de los productos de la sustracción varió desde los 600 a los 1800 pb aproximadamente, además de una significativa disminución en cuanto al número de genes amplificados. Al chequear el producto de la sustracción sobre el gel de acrilamida aun aparecieron, un considerable número de bandas, lo cual es un índice de la diversidad de genes que

son expresados durante la respuesta de defensa del mutante IBP 8518.

La librería sustractiva obtenida contiene un total de 207 clones, en la figura 4 se muestra el análisis de estos por restricción con la enzima EcoR I. De los resultados de su secuenciación se espera encontrar los genes claves del mecanismo de respuesta hipersensible que anula el ataque de la roya en caña de azúcar.

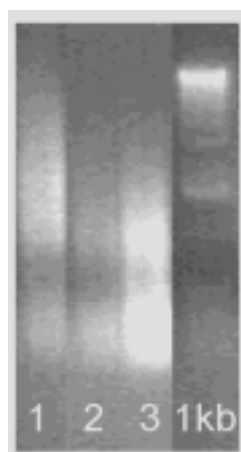


Figura. 2 Electroforesis, en gel de agarosa/TAE al 2%, del cADN sintetizado para la hibridación sustractiva. 1) Somaclon IBP 8518 inducida, Somaclon IBP 8518 inducido, 2) mezcla de la variedad B4362 inducida y el somaclon IBP 8518 no inducido, 3) control de la reacción. Marcador de peso molecular 1Kb (Gibco).

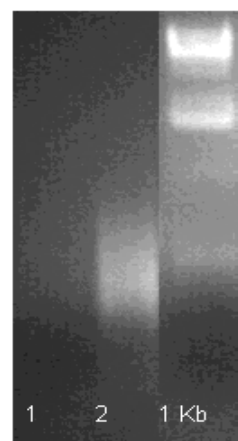


Figura. 3 Electroforesis, en gel de agarosa/TAE al 2%, del producto del PCR secundario IBP 8518 sustraída (1) y sin sustraer (2). Marcador de peso molecular 1Kb (Gibco).

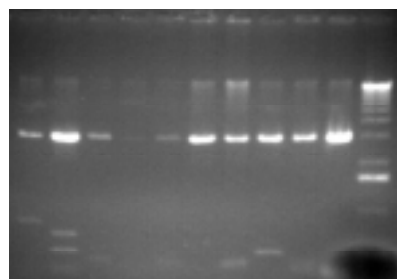
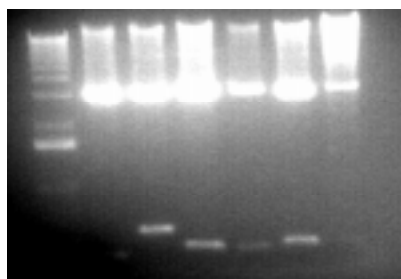


Fig. 4 Electroforesis en gel de agarosa /TBE al 1.2% de clones pertenecientes a la librería sustractiva digeridos con la enzima *EcoR* I. Marcador de peso molecular 1Kb (Gibco).

REFERENCIAS

Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchick A, Moqadam F, Huang B, Lukynov S, Lukynov K, Gurskaya N, Sverdlov D, Siebert P (1996) Supresión sustractiva hibridization: A method for generating differetially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 6025-6030

Gil V, Pérez JN, Orellana P, Mollineda P, Gonzáles A, Velázco O (1987) Mejoramiento de la variedad B 4362 ante la enfermedad

de la roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala* Syd.) mediante el cultivo *in vitro*. VIII Congreso Latinoamericano de Genética. La Habana. Libro de reportes cortos: 30

Oloriz MI y Gil V (1994) Caracterización de somaclones de caña de azúcar var. B 4362 por isoenzimas peroxidasas. Centro Agrícola 2: 90-91

Oloriz MI y Gil V (1999) Marcadores moleculares en clones de caña de azúcar con resistencia a la roya. Centro Agrícola Año 26, No 4: 55-60