

Aislamiento de un fragmento del ADNc ACC Oxidasa expresado durante la maduración del fruto de Guayaba Enana

Guillermín Aguero*¹, Edrey Rodríguez², Lisbet Díaz², Neyda Bacallao² y Elio Jiménez². *Autor para correspondencia.

¹ Centro de Análisis de Procesos. Facultad Química Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: chapin@qf.uclv.edu.cu

² 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 54 830.

RESUMEN

En este trabajo se describe el aislamiento y clonaje por TI-PCR (Transcripción inversa y Reacción en cadena de la polimerasa) de un fragmento de ADNc que codifica para la ACC oxidasa a partir de frutos maduros de guayaba. Este es un paso preliminar para aplicar la tecnología de ARN antisentido para el silenciamiento de genes con el propósito de controlar la maduración en frutos de guayaba a través de la transformación genética. Un fragmento de ADNc ACC oxidasa fue aislado usando el sistema Ready To Go™ RT-PCR Beads y fue clonado en el vector pGEM^R-TEasy. El análisis de la secuencia mostró un elevado porcentaje de homología (84-94%) con otras ADNc ACC oxidadas referenciadas en bases de datos.

Palabras clave: antisentido, etileno, *Psidium guajava*, Transcripción Inversa Reacción en Cadena de la Polimerasa (TI-RCP)

ABSTRACT

Isolation and cloning of a cDNA fragment encoding ACC oxidase from ripe guava fruits by RT-PCR is shown in this report. It is the early step to apply RNA antisense technology for gene silence in order to control guava fruit ripening through genetic transformation. ACC oxidase cDNA fragment was isolated using Ready To Go™ RT-PCR Beads system and cloned into pGEM^R- Teasy vector. Sequence analysis showed a high homology percent (84-94%) with other cDNA ACC oxidases reported in data base.

Key words: antisense, ethylene, *Psidium guajava*, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Abreviaturas: ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario), ACC oxidasa (1-aminociclopropano-1-carboxilo oxidasa), TI-RCP (transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa), RCP (reacción en cadena de la polimerasa), ARN (ácido ribonucleico).

INTRODUCCIÓN

La guayaba (*Psidium guajava* L., *Myrtaceae*) originada en América tropical es ampliamente cultivada en Cuba para el consumo nacional y con interés de mercado. La facilidad de su cultivo, su alto valor nutricional y la popularidad de sus productos procesados la convierten en un cultivo muy atractivo para el país. La guayaba es un fruto climatérico, en el cual el etileno controla la velocidad de maduración (Yueming, 2000). La rapidez con que se produce este proceso afecta la comercialización de la fruta fresca; por lo que el manejo poscosecha es importante para reducir las pérdidas por maduraciones tempranas (Mason y Botella, 1997). La dilucidación de la ruta biosintética del etileno ha brindado las bases para el análisis bioquímico y genético de la misma. La ACC oxidasa es una enzima clave en la biosíntesis de etileno siendo la última que interviene en la síntesis del mismo (Giovannoni, 2001). Por esta razón dicha enzima se selecciona para silenciar su actividad utilizando la tecnología del ARN antisentido unida a la transformación genética (Mason y Botella, 1997). El trabajo muestra por primera vez el aislamiento

y la secuenciación de un fragmento de ADNc ACC oxidasa a partir de frutos maduros de guayaba enana con la perspectiva de ser usado para el futuro control de la biosíntesis de etileno en frutos de este cultivo.

Material vegetal y extracción de ácidos nucleicos

Los frutos de Guayaba Enana fueron colectados y trasladados al laboratorio dejándolos madurar completamente. Los mesocarpios fueron cortados, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta que se necesitaran. El ARN total fue aislado a partir de los mesocarpios de los frutos, usando un protocolo descrito por López-Gómez y Gómez-Lim (1992). El ADN genómico fue aislado a partir de hojas siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983)

Diseño de los Oligonucleótidos y Reacción TI-RCP

Un par de oligonucleótidos degenerados fueron diseñados a partir de un alineamiento realizado a 13

secuencias ADNc ACC oxidasas pertenecientes a individuos de la subclase Rosidae en el programa Clustal X. La secuencia de los oligonucleótidos 5' y 3' fueron 5' AAYTGGGGHTTYTTTGAG 3' y 5' GCGNAGYTTTCATRTARTCYTC 3' respectivamente. La reacción de transcripción inversa fue llevada a cabo utilizando el sistema Ready To Go™ RT-PCR Beads (AmershamPharmaciaBiotech), 2µg de ARN total y 1.0mM de ambos oligonucleótidos en un volumen total de reacción de 50 µl. La reacción fue realizada en un solo paso en termociclador Perkin Elmer 2400 programado con los siguientes pasos: 30min 42°C; 5min 95°C; 1min 95°C, 1min 50°C, 1min 72°C (RCP) por 32 ciclos más una incubación final de 7min a 72°C.

Reacción RCP

Se realizó una reacción adicional de RCP usando como molde una pequeña porción de la reacción de TI-RCP. Los parámetros de la RCP fueron 2 min 95°C; 1 min 94°C, 1 min 52°C, 1min 72°C por 30 ciclos más una extensión final a 72°C por 7 min. En el caso de la RCP sobre el ADN de la planta los parámetros fueron 5 min 94°C; 1 min 94°C, 1 min 50°C, 1min 72°C por 32 ciclos.

Clonaje y Secuenciación

El producto de la RCP fue bien purificado sin contaminaciones de sales y otros productos usando el kit GEL Band Purification Kit (AmershamPharmaciaBiotech). La banda fue clonada en un vector pGEM^R-TEasy (Promega, USA) y la selección de los recombinantes fue según el criterio de colonias blancas y azules utilizando células competentes XL-1Blue en la transformación. La secuenciación se realizó sobre el mismo vector utilizando los oligonucleótidos del fago M13 por el servicio de secuenciación MWG (MWG-Biotech, Ebersberg, Germany).

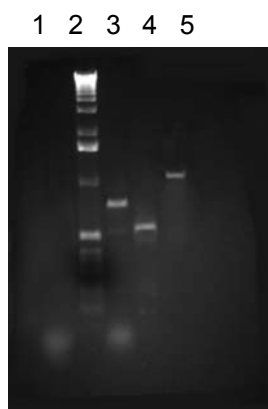
El método de extracción de ARN fue exitoso para el caso de los frutos de guayaba maduros, a pesar de que este protocolo nunca se había experimentado para este cultivo. Se obtuvo un ARN total de buena calidad y con altos rendimientos, por lo tanto se tomó para la reacción de transcripción inversa. La relación 260/280 estuvo por encima de 1.80 lo que indicó poca contaminación con proteínas. La integridad del ARN fue analizada por electroforesis en gel de agarosa desnaturante, visualizándose dos bandas correspondientes al ARN ribosomal 25 S y 18 S (Fig. 1).



Fig. 1 ARN total aislado a partir del mesocarpio de fruto maduro de guayaba.

Al separar los productos de la reacción de TI-RCP en un gel de agarosa 0.8% se observó una banda intensa de aproximadamente 750 bp además de otras amplificaciones no específicas ubicadas por encima y por debajo de dicha banda. Para aumentar la especificidad del producto, se tomó una pequeña porción de la reacción y fue reamplificada con un ligero incremento en la temperatura de apareamiento (52°C). Se obtuvo un solo producto y en la talla esperada

según el diseño de los oligonucleótidos. En el caso de la RCP sobre el ADN de la planta se obtuvo una banda ligeramente por encima 1Kb, que podría indicar la posible presencia de intrones al compararse con la banda obtenida con los mismos oligonucleótidos pero sobre el ARN total. La posibilidad de que esta banda pertenezca a una isoforma de la ACC oxidasa codificada en el ADN de la planta tampoco se descarta (Fig. 2) (Castellano y Vioque, 2002).



1. Control negativo
2. 1Kb ladder (Gibco BLR)
3. Reacción de IR-RCP con oligonucleótidos degenerados
4. Control positivo del kit Ready To Go™ RT-PCR Beads system.
5. Reacción de RCP con los oligonucleótidos degenerados a partir del ADN genómico extraído de hojas de la planta.

Fig. 2 Reacciones de IT-RCP y RCP sobre ARN total aislado de fruto maduro de guayaba y ADN genómico extraído de hojas de la planta respectivamente.

El fragmento amplificado a partir del ARN total resultó ser de una talla de 783 pb y su secuencia nucleotídica y aminoacídica está publicada en la base de datos GenBank con número de acceso "AY 123201". El análisis comparativo de secuencia realizado a través de un Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) mostró un alto porcentaje de homología (84-94%) con otras ADNc ACC oxidasas pertenecientes a diferentes cultivares.

Este es el primer informe de un gen homólogo ACC oxidasa expresado durante la maduración del fruto de la guayaba.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV.

REFERENCIAS

Castellano, JM y Vioque, B (2002) Characterisation of the ACC oxidase activity in transgenic auxin

overproducing tomato during ripening. *Plant Growth Regulation* 38(3): 203-208

Dellaporta, SL, Wood, J y Hicks, JB (1983) A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant Mol. Biol. Reporter* 1: 19-21

Giovannoni, J (2001) Molecular Biology and fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 725-749

López-Gómez, R y Gómez-Lim, MA (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience* 27(5): 440-442

Mason, MG y Botella, JR (1997) Identification and characterization of two 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) synthase cDNAs expressed during Papaya (*Carica papaya*) fruit ripening. *Journal Plant Physiology* 24: 239-244

Yueming, J (2000) Ethylene regulation of fruit ripening: Molecular aspects. *Plant Growth Regulation* 30(3): 193-200