

Construcción de bibliotecas de ADNc a partir de hojas de los cultivares de banano Calcutta 4 y Niyarma Yik inoculados con *Pseudocercospora fijiensis* Morelet

Milady F. Mendoza Rodríguez^{1*}, Elio Jiménez¹, Frank Maier², Whilhelm Schäfer², Idalmis Bermúdez¹, Yennys Padrón¹, Michel Leyva¹, Yelenys Alvarado¹, Mayra Acosta¹ y Orelvis Portal¹. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: mmendozar@ibp.co.cu

² University of Hamburg. Center of Applied Molecular Biology of Plants. Institute of General Botany and Botanical Garden. Germany.

RESUMEN

Los estudios moleculares de la interacción planta-patógeno, son de gran importancia para la identificación de genes relacionados tanto con el proceso patogénico, como con la defensa de la planta. Estos genes podrán ser utilizados en los programas de mejoramiento genético, para la obtención de plantas con resistencia a enfermedades. El objetivo de este trabajo fue la construcción de bibliotecas de ADN complementario (ADNc), a partir de dos cultivares de banano (uno resistente: Calcutta 4 y otro susceptible: Niyarma yik) a la enfermedad de la Sigatoka negra, infectados artificialmente con el aislado de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet CCIBP-Pf1. La síntesis de la primera cadena de ADNc, fue a partir de 1 µg de ARN total con el oligonucleótido dT y la calidad de la misma fue comprobada por la reacción en cadena de la polimerasa con los oligonucleótidos específicos para el gen del *citocromo b*. La síntesis de la segunda cadena de ADNc, fue realizada por marcaje homopolimérico con la combinación dCBamH I + dTNot I. Fueron obtenidas cuatro bibliotecas de ADNc a partir de plantas, en dos períodos de tiempo después de la infección con el patógeno. Fue realizada la secuenciación nucleotídica de 41 clones de una de las bibliotecas de Niyarma Yik y la información obtenida de las mismas se corresponde con genes relacionados con hongos.

Palabras clave: Interacción Banano-*Mycosphaerella fijiensis*, *Musa* spp., Sigatoka negra

ABSTRACT

Molecular studies of plant-pathogen interaction are very important for the identification of gene (s) related with the pathogenic process, as well as with the plant resistance. These gene (s) could be use for the genetic improvement programs in order to obtain resistant cultivars. The aim of this work was to construct complementary DNA (cDNA) libraries from infected leaves with *Pseudocercospora fijiensis* CCIBP-Pf1 isolated of two banana cultivars (a resistant one Calcutta4 and another one susceptible Niyarma Yik). First-strand cDNA synthesis, was made beginning with one microgram of total RNA by using oligo dT primer and cDNA quality was checked by Polimerase chain reaction (PCR) with *cytochrome b* specific primers. Second-strand cDNA synthesis was performed by using the homopolymeric tailing with dC-BamH I + dT-Not I primer combination. Four cDNA libraries of infected plants at different times of infection with the pathogen were obtained. Forty one clones of one of the libraries of Niyarma Yik were sequenced and the obtained sequences correspond with genes related to fungi.

Key words: Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interaction, Black Sigatoka, *Musa* spp.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de la raya negra de la hoja causada por el ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* (*Pseudocercospora fijiensis*, anamorfo) (Crous, 2003), es la enfermedad foliar más importante en bananos y plátanos a nivel mundial (Pasberg-Gaul *et al.*, 2000).

Desde la introducción de la enfermedad en Cuba en el año 1990, en varias instituciones del país se ha estado trabajando en la búsqueda de variedades resistentes a la Sigatoka negra, mediante la utilización de técnicas biotecnológicas sin lograrse resultado alguno (García *et al.*, 2000).

Debido a la limitante que presenta el uso del mejoramiento convencional en la mayoría de los bananos y plátanos cultivados, por su esterilidad y triploidía, el empleo de la Ingeniería Genética podría ser una solución alternativa para la introducción de resistencia a hongos en plantas. Varios experimentos de transformación genética han sido realizados en estos cultivos, tanto por pistola de genes (Becker *et al.*, 2000) como mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Ganapathi *et al.*, 2001); con el empleo de genes reporteros o que codifican para proteínas antifúngicas, con el objetivo de desarrollar las tecnologías para la obtención de plantas transgénicas con resistencia

a hongos. Los resultados obtenidos con la utilización de las mismas han sido muy satisfactorios.

Por otra parte, pocos han sido los estudios realizados a nivel molecular en este patosistema, por lo que existe un gran desconocimiento acerca de las interacciones específicas que ocurren durante el proceso infeccioso. El conocimiento de las mismas resultaría de gran interés, para un mejor entendimiento de la biología de esta relación y serviría para la creación, optimización y desarrollo de novedosas estrategias para la protección de los cultivos del ataque por hongos.

Con este trabajo se pretende realizar un estudio molecular de la interacción *Mycosphaerella fijiensis-Musa*, con el objetivo de encontrar genes relacionados con la virulencia del hongo y/o genes que confieran resistencia a las plantas. La obtención de los mismos aportará información muy valiosa acerca de la biología molecular de este sistema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente del hongo y de las plantas

Plantas de banano, de los cultivares Calcutta 4 y Niyarma yik, fueron obtenidas por propagación *in vitro* según Orellana (1994).

El aislado fúngico de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet utilizado fue el CCIBP-Pf1, perteneciente a la colección de cultivo del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Inoculación artificial

Las plantas de Calcutta 4 y Niyarma yik fueron inoculadas según lo descrito por Alvarado *et al.* (2003).

Aislamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de plantas

El ADN genómico fue extraído a partir de hojas de plantas infectadas, con el kit Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, MN USA). La calidad de la purificación fue comprobada en un gel de agarosa al 0.8 % teñido con Bromuro de Etidio (BrEt) 0.5 µg.ml⁻¹.

Aislamiento del ácido ribonucleico (ARN) total

Segmentos de hojas de plantas susceptibles y resistentes infectadas con el hongo, fueron tomadas a los 24 y 35 días después de la inoculación, para la extracción del ARN total. El protocolo de purificación incluyó la homogenización del tejido con el tampón de extracción (peqGold RNA pureTM), seguido de dos extracciones con cloroformo y la precipitación con isopropanol. La integridad del ARN fue comprobada en un gel de agarosa al 1 % teñido con BrEt 0.5 µg.ml⁻¹ y

la pureza del mismo fue medida en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 Uv/Vis Spectrophotometer).

Síntesis de la primera cadena de ADNc

La reacción de Transcripción reversa (RT-del inglés Reverse transcription), fue realizada en un volumen final de 20 µl, que contenía 1 µg de ARN total libre de ADN, 0.5 mM de oligonucleótido dT (Tabla 1), 0.5 mM de cada nucleósido trifosfato (dNTP), 0.01M de Dithiothreitol, 40 U de inhibidor de RNAsa, tampón de la primera cadena 1X (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) y 200 U de la enzima SuperScriptTMII RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen). La reacción se realizó a 42 °C durante 1h seguida de una incubación a 70 °C por 15 min.

Control de la calidad por PCR (del inglés: Polymerase chain reaction)

La calidad de las síntesis realizadas fue comprobada por PCR, con los oligonucleótidos específicos para el gen del *citocromo b* (internos y externos), diseñados a partir de la secuencia del aislado de *Mycosphaerella fijiensis* 184.97.1 referida en el GenBank (Tabla 1). Como control positivo fue utilizado ADN genómico de planta. Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen final de 20 µl, que contenía 2 µl de ADNc, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleótido, tampón PCR 1X y 1U Taq ADN polimerasa (Promega). Las condiciones del PCR fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C 1 min, 55 °C 1 min y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 10 min a 72 °C, seguida de un paso de enfriamiento a 4 °C.

Síntesis de la segunda cadena de ADNc

Se realizó por marcaje homopolimérico con la enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (MBI Fermentas). Varias combinaciones de oligonucleótidos, (dC-*Bam*H I + dT-*Not* I, dC-*Xho* I + dT-*Not* I, dC-*Bam*H I + dT-*Eco*R I) fueron empleadas para la amplificación por PCR (Tabla 1). Esta se desarrolló en un volumen final de 20 µl, que contenía 5 µl ADNc, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP y oligonucleótidos, tampón PCR 1X y 1U Taq ADN polimerasa (Promega). Las condiciones de amplificación fueron: 3 ciclos a 94 °C por 30 s, 49 °C por 2 min y 72 °C por 8 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 68 °C por 2 min y 72 °C por 8 min, con una extensión final a 72 °C por 10 min, seguida de un paso de enfriamiento a 4 °C.

PCR, clonación y análisis de los clones

Los ADNc obtenidos de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos dC-*Bam*H I + dT-*Not* I, fueron reamplificados en las mismas condiciones,

purificados con el kit Nucleospin[®] Extract (Macherey-Nagel) y posteriormente ligados al vector pGEM[®]-T easy (Promega). Cada ligazón fue transformada en la cepa de *Escherichia coli* XL-1 Blue, en medio de cultivo de selección con Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 0.1 mM, 5-bromo-4 cloro-3 indolyl- β -D galactoside (X Gal) 40 μ g.ml⁻¹ y como antibiótico de selección para el plásmido, Ampicillina 100 μ g.ml⁻¹. Los clones resultantes fueron comprobados por PCR de

colonias, en un volumen final de 20 μ l que contenía 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 10 pmol de los oligonucleótidos M13 (Tabla 1), tampón PCR 1X y 1U Taq ADN polimerasa (Promega). El PCR fue iniciado por desnaturalización a 94 °C por 10 min, seguido de 25 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 30 s, con una extensión final a 72 °C por 10 min y un paso de enfriamiento a 4 °C. Los clones recombinantes con inserto fueron purificados con el kit Nucleospin Extract (Macherey-Nagel) y secuenciados.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el PCR en las reacciones de transcripción reversa, marcaje homopolimérico, análisis de la calidad de la síntesis del ADNc y de los clones recombinantes.

<i>citocromo b</i>		5'-CCT TAT GGT CAA ATG TCT TTA TGA GC-3'
		5'-TTA CCT GAA CCT GCA CTA TCG TG-3'
<i>citocromo b</i> intrón		5'-TCT TAT TTT TCC GCT TGA TTA GTA GG-3'
		5'-GAG CAT TTG TGT TGG TAG TCG C-3'
dT		5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3'
De anclaje	dC- <i>Bam</i> H I	dT- 5'-AAC GGA TCC (CCC) ₃ -3'
	<i>Not</i> I	dC- <i>Xho</i> 5'-AAC GCG ATG CGG CCG (CCC) ₂ (TTT) ₅ -3'
	I	dT- <i>Eco</i> R I 5'-ATA CTC GAG CC (CCC) ₃ -3'
		5'-CCG GAA TTC CGC CCC (TTT) ₆ -3'
M13		5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
		5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fue lograda la infección de las plantas de Calcutta 4 y Niyarma Yik con el homogenizado micelial de *P. fijiensis*, en las condiciones de luz y humedad existentes en la casa de cultivo, con un adecuado desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Como ha sido descrito previamente por Alvarado *et al.* (2003), la inoculación artificial de las plantas utilizando la suspensión de micelio, resulta ser un método fácil, rápido y factible para obtener el desarrollo homogéneo y uniforme de los síntomas en las hojas inoculadas.

Fue realizada la síntesis de la primera cadena de ADNc para cuatro muestras (dos de cada cultivar en estudio), a partir de ARN total de gran pureza e integridad. Para la comprobación de la calidad de los ADNc sintetizados por PCR, fue utilizado ADN genómico de planta como patrón, para comparar las tallas de los fragmentos amplificados con y sin intrón (1267 y 224) pares de bases (bp) respectivamente, en la amplificación con los oligonucleótidos del *citocromo b* y (469 bp y no amplificación) con los internos del mismo gen (Figura 1 A y B). Como resultado de este ensayo se obtuvo, que los ADNc sintetizados no presentaban contaminación con ADN genómico. De forma general la realización de esta prueba con oligonucleótidos específicos, es de gran importancia en todo proceso de síntesis, ya que permite verificar la calidad e integridad de los ADNc sintetizados por la ausencia de intrones en las

mismas (Ruiz-Roldán *et al.*, 2001). Los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen del *citocromo b* fueron adecuados para este análisis.

Se realizó la síntesis de la segunda cadena de ADNc por marcaje homopolimérico para las cuatro muestras, con la combinación (dC-*Bam*H I + dT-*Not* I), (Figura 2 A). Con las otras combinaciones hubo poca amplificación o ninguna por PCR (Figura 2 B). A pesar de la complejidad que ofrece este método de síntesis descrito por Eschenfeldt *et al.* (1987), resultó ser adecuado y efectivo para la realización de las síntesis.

Fueron obtenidas cuatro bibliotecas de ADNc, dos para el cultivar resistente Calcutta 4 y dos para el susceptible Niyarma Yik. Del análisis por PCR de 42 clones de una de las librerías de Niyarma Yik, 41 presentaron inserto y las tallas de los mismos oscilaban entre 400 y 1 500 bp (Figura 3). Las secuencias obtenidas de los clones fueron comparadas con las bases de datos utilizando los algoritmos BLAST disponibles en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Como resultado de este análisis se obtuvo que todas las secuencias analizadas se correspondieron con genes relacionados con hongos (Tabla 2). Se considera que estos resultados están asociados con el nivel de infección que presentaban las plantas en el momento de la toma de muestras. No existe ninguna referencia

al respecto, pero la información obtenida de los fragmentos de genes secuenciados, está relacionada con proteínas involucradas en el metabolismo normal del crecimiento del hongo y no en su interacción con la planta.

Con el objetivo de obtener secuencias de los cultivares Niyarma yik y Calcutta 4 relacionadas con el proceso de interacción se deberá realizar la purificación de ARN total en estadios más tempranos de la infección entre (4-10 DPI).

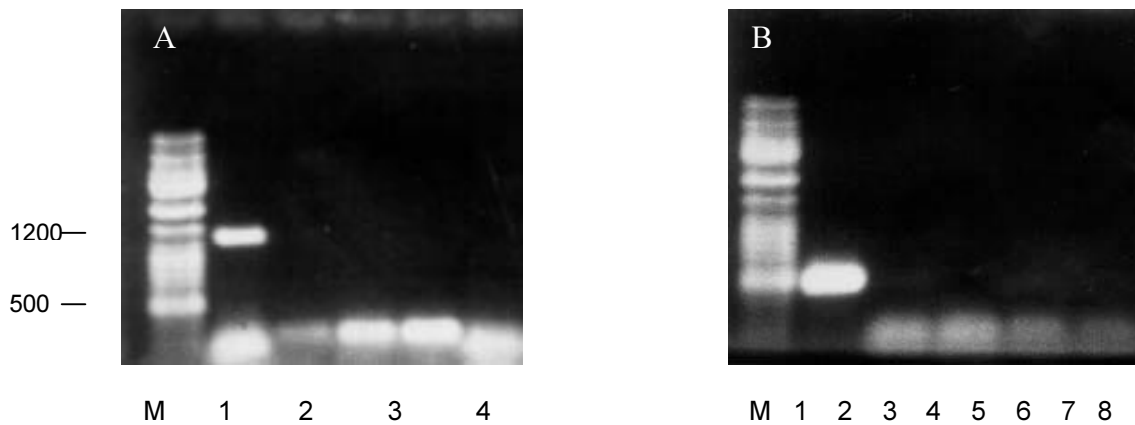


Figura 1. Amplificación específica por PCR de ADN genómico, con los oligonucleótidos del *citocromo b* resulta en un fragmento de 1 287 bp (C), comparado con el de 224 bp para los ADNc de Calcutta 4 y de Niyarma yik (1-4) (A) y con los oligonucleótidos del *citocromo b* intrón resulta en un fragmento de 469 bp (C), comparado con la no amplificación para los ADNc de Calcutta 4 y Niyarma yik (1-4). Gene ruler™ DNA ladder Mix (M). Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

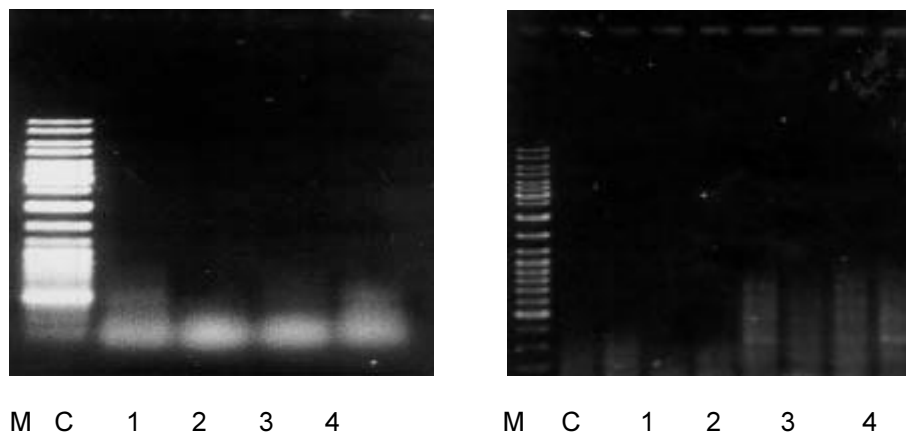


Figura 2. Continuación del proceso de síntesis para las cuatro muestras. Síntesis de la segunda cadena de ADNc por marcaje homopolimérico con los oligonucleótidos (dC-*Bam*H I + dT-*Not* I) (A) (1-4) y con los oligonucleótidos (dC-*Xho* I + dT-*Not* I) (B) (1-4). Reamplificación por PCR de los ADNc con los oligonucleótidos dC-*Bam*H I + dT-*Not* I) (5-8). Gene ruler™ DNA ladder Mix (M). Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.



Figura 3. PCR de colonias con los oligonucleótidos M13, de 42 clones recombinantes obtenidos al azar de la biblioteca de ADNc de Niyarma yik, (A-D). Gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

Tabla 2. Homología entre las secuencias obtenidas de la biblioteca de ADNc del cultivar Niyarma Yik y las secuencias referidas en las bases de datos

Clon.	Tamaño del Inserto (bp)	Registro correspondiente en las bases de datos	Valor-E (Blast X)
a01	395	Phosphoglycerate kinase	1e ⁻³¹
a03-01	872	Phosphoglycerate kinase	9e ⁻²⁵
b02	194	Hypothetical protein	3e ⁻¹⁸
b06	501	Unspecific monooxygenase	2e ⁻³⁰
d10	569	Unspecific monooxygenase	1e ⁻¹⁷
h03	361	Succinate dehydrogenase	6e ⁻⁰⁴

REFERENCIAS

- Alvarado, Y, Leiva M, Dita MA, Acosta M, Cruz M, Portal N, Gómez R, García L, Bermúdez I y Padrón J (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (Eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, pp. 169-175. INIBAT
- Becker, DK, Dugdale B, Smith MK, Harding RM y Dale JL (2000) Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa spp.* AAA group) cv Gran Nain via microprojectile bombardment. *Plant Cell reports* 19: 229-234
- Crous, PW, Groenewald JZ, Aptroot A, Braun U, Mourichon X y Carlier J (2003) Integrating morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on *Musa*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (Eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases in San José, Costa Rica, pp. 43-58 INIBAT
- Eschenfeldt, WH (1987) Homopolymeric tailing. *Method Enzymology* 152: 337-342
- Ganapathi, TR, Higgs NS, Balint-Kurty PJ, Arntzen CJ, May GD, Van Eck JM (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Reports* 20: 157-162
- García, L, Bermúdez I, Orellana P, Veitía N, García L, Clavero J y Romero C (2000) Inducción de mutaciones por radiaciones Gamma en el cultivo *in vitro* de brotes del cultivar Gran Enano (AAA). *Biotecnología Vegetal* 1: 45-50
- Orellana, P (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, IBP. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara
- Pasberg-Gauhl, C, Gauhl F y Jones D (2000) Fungal disease of foliage. Sigatoka leaf spots. Black leaf streak. Distribution and economic importance. En: Jones, D (ed) *Disease of banana, abaca and enset*. pp. 37-44. CABI, Publishing. London
- Ruiz-Roldán, MC, Maier FJ y Schafer W (2001) PTK1, a Mitogen-Activated-Protein Kinase Gene, is required for Conidiation, Appressorium formation, and Pathogenicity of *Pyrenophora teres* on Barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 116-125