

# Identificación de genes análogos de resistencia en una biblioteca genómica BIBAC de *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia

Maribel Colmenares Esqueda\*<sup>1</sup>, Miguel Gómez Lim<sup>2</sup> y Carlos Giménez Alvarado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal (BioVeLUZ), Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Genética, Cinvestav-Unidad Irapuato, Apartado 629, Guanajuato, México.

Recibido: 03-09-07 Aceptado: 08-09-08

## Resumen

La mayoría de los plátanos y bananos comerciales se caracterizan por su poca diversidad genética y su susceptibilidad a enfermedades. *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia muestra una alta resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* y a algunas razas de *Fusarium spp*, lo que representa una fuente de genes de resistencia a la sigatoka negra y al mal de Panamá. En este trabajo se realizó el escrutinio de 13.824 clones de una biblioteca genómica BIBAC de *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia, usando como sonda un marcador MSAP análogo a NBS, asociado con la tolerancia a las toxinas de *Mycosphaerella fijiensis*. Las condiciones de hibridación y lavados fueron de alta astringencia y se utilizaron procedimientos estándares para sondas con marcaje radiactivo [ $\alpha$ -32P] dCTP. Se identificaron 12 clones BIBAC, reconfirmados mediante *dot blots*, a los cuales se les purificó el ADN plasmídico para ensayar diferentes endonucleasas de restricción, y se seleccionaron 3 clones para un análisis RFLP. Los 12 clones BIBAC positivos representan 12 locus diferentes del genoma donde se ubican familias homólogas NBS. De los RFLP aplicados a 3 clones, se concluye que existen al menos 9 genes tipo RGA-NBS agrupados en familias con al menos dos genes por cada 100 kb.

**Palabras claves:** BIBAC, cultivar Tuu Gia, genes análogos de resistencia, *Musa*, RFLP.

## Identification of resistance genes analog in a genomic BIBAC library of *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia

### Abstract

Most of the commercial cultivars of bananas and plantains are characterized by their sterility and disease susceptibility. *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia shows high resistance to *Mycosphaerella fijiensis* and some strains of *Fusarium spp* which represents a source of resistance genes to black sigatoka and Panama disease. In this research a screening of a BIBAC genomic library from *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia was performed, using a MSAP marker as a probe. This probe is an NBS gene analog associated with the tolerance to *Mycosphaerella fijiensis* toxins. The genomic library with 13,824 clones was hybridized using standard procedure for radio labeled probes [ $\alpha$ -32P] dCTP and the hybridization and washing procedures were performed at high stringency. Twelve positive BIBAC clones were identified and reconfirmed by dot blots. Plasmid purification was done to perform restriction analyses, and select three clones for RFLP studies. The results show twelve positive

\* Autor para la correspondencia. Telf.: 58-261-7597757. E-mail: mcolmenares@luz.edu.ve.

BIBAC clones, reconfirmed by dot blots. The restriction analyses demonstrated that the twelve positive BIBACs represent different genomics loci which content different RGA-NBS gene families. From the RFLPs applied to the three BIBAC could be concluded that exist nine different NBS genes clustered in families of at least two genes each 100 kb.

**Key words:** BIBAC, cultivar Tuu Gia, *Musa*, resistance genes analog, RFLP.

## Introducción

En el género *Musa* se han planteado tres posibles estrategias para superar los problemas en la producción agrícola ocasionados por diferentes fitopatologías y características agronómicas inferiores, a saber: a) la selección e introducción de cultivares resistentes (1); b) el desarrollo de nuevos cultivares a partir de programas de mejoramiento convencional (2); y c) la introducción de plantas genéticamente modificadas (3).

En la actualidad, el gran desarrollo alcanzado en los métodos de genética molecular y transgénesis en plantas está recibiendo mayor atención como estrategia de mejoramiento. Una de estas técnicas permite introducir fragmentos de ADN de gran tamaño (~150 kb) dentro de las células vegetales utilizando vectores de tipo cromosoma bacteriano artificial binario (BIBAC: Binary Bacterial Artificial Chromosome) (4,5). La ventaja de estos vectores es que pueden clonar genes en un solo inserto de ADN de aproximadamente 150 kb y además pueden ser transferidos directamente a la planta a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Las bibliotecas genómicas o genotecas han servido como una herramienta en el aislamiento y caracterización de regiones importantes del genoma. Los vectores de las genotecas BIBAC contienen el factor F para *E. coli*, con control estricto del número de copias y replicación de ADN unidireccional. Ambas características promueven el mantenimiento y la estabilidad del ADN de interés, clonado en el plásmido (4).

La necesidad de generar genotecas compuestas de insertos de gran tamaño ha incrementado el uso de los vectores BIBAC.

Estos vectores se pueden multiplicar tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*, el cual contiene copias adicionales de los genes *vir G* y *vir E*, cuyos productos ayudan en la transferencia eficiente del ADN desde *Agrobacterium* hacia la planta.

Choi *et ál.* (6) lograron transformar plantas de tabaco con un fragmento de ADN humano de 150 kb clonado en una genoteca BIBAC. Este fragmento se heredó de manera estable durante varias generaciones sexuales, venciendo así la barrera que representaba el tamaño del ADN para ser transferido a la planta, con lo cual ahora se pueden alterar las características de calidad y rendimiento que son controlados por genes múltiples. Varias características agronómicamente importantes, tales como el peso de la semilla en el caso de la soya o la dormancia del tubérculo en el caso de la papa, son fenotipos multigénicos cuantitativos (QTL). Adicionalmente se ha reportado que los genes de resistencia a enfermedades se distribuyen agrupados en familias alélicas en un mismo cromosoma (7,8). Los vectores BIBAC pueden, por primera vez, facilitar el manejo de tales características complejas en las plantas. Michelmore *et ál.* (9) sugieren que la aplicación más significativa de las genotecas de clones BIBAC será en la clonación basada en el mapeo genético y en un mejor entendimiento de la organización del genoma en plantas.

Estudios en la variabilidad de las secuencias de genes análogos de resistencia, en combinación con la revisión de bibliotecas genómicas BIBAC de variedades o cultivares resistentes a la sigatoka negra, mal de Panamá u otras fitopatologías, nos permitirían identificar genes de resistencia. Estos genes de resistencia pueden ser transferidos hacia plantas comerciales susceptibles a

transformación genética mediada por *A. tumefaciens* para realizar los estudios de expresión genética correspondientes y así finalmente desarrollar cultivares resistentes a los hongos *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium spp* u otro patógeno, sin cambiar las propiedades agronómicamente deseables.

Este trabajo de investigación presenta la identificación de clones BIBAC que contienen genes análogos de resistencia identificados mediante hibridación y un análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism analysis) como base para su futura secuenciación y manipulación por transgénesis.

## Materiales y métodos

### Preparación y características de la sonda

El gen análogo de resistencia usado como sonda fue aislado inicialmente como un marcador MSAP (methylation sensitive amplified polymorphism) asociado con la tolerancia a las toxinas del hongo *Mycosphaerella fijiensis* (10) (GenBank DQ264397). El inserto clonado de 249 pb fue amplificado por PCR, usando cebadores universales SP6 y T7 que flanquean el sitio de clonaje del vector pCR®II-TOPO® (Invitrogene), y purificado con kit QIAGEN para productos de PCR.

Giménez et ál. (10) reportan el análisis de la secuencia del marcador MSAP5 asociado con la tolerancia a las toxinas de *M. fijiensis*, con una homología del 45% en los aminoácidos (a.a.) idénticos y 62% en los a.a. positivos (diferentes, pero con las mismas propiedades bioquímicas), y con proteínas responsables de mecanismos de resistencia a patógenos en *Musa acuminata* y otras especies monocotiledóneas relacionadas, como *Oryza sativa* L. (arroz), *Zea mays* L. (maíz) y *Hordeum vulgare* L. (cebada).

Análisis con el software InterproScan muestran que el dominio NB-ARC (PRODOM, PD001752, Q8S121\_EEEEE

\_Q8S121, 6e-05[47-79]T) se localiza entre los aminoácidos 47-79. Este dominio es un motivo de señalización que regula la muerte celular programada y que es capaz de enlazar nucleótidos de adenosina o guanina (10). Esta secuencia se encuentra tanto en eucariotas como en bacterias y es característica de genes relacionados con la resistencia a patógenos en plantas (15). Sobre la base de estas características, la sonda se denominó RGA-NBS (por sus siglas en inglés: Resistance Gene Analogs - Nucleotide Binding Site).

### Hibridación

Se utilizó una biblioteca genómica de *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia digerida con Hind III, clonada en el vector pCLD04541 (figura 1) y transformada en *E. coli* DH10B. Este cultivar presenta una alta resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* y a algunas razas de *Fusarium spp* (11). Se realizó el escrutinio de tres membranas, cada una de las cuales contenía 4.608 clones BIBAC, por lo que fueron revisados 13.824 clones.

La sonda se preparó siguiendo las instrucciones del sistema Rediprime II Random (Amersham Biosciences), utilizando  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (Amersham). Se añadió en un tubo de hibridación (Pyrex) 0,1 ml x cm<sup>2</sup> de solución de hibridación (solución de fosfato de sodio 0,25 M pH 7,2; 7% SDS; 1% BSA, 2,5 mM EDTA pH 8) y se precalentó a 65 °C por 30 min. Luego se prehibridó la membrana a la temperatura de hibridación de 65 °C por al menos 30 min.

Después de la prehibridación, se agregó la sonda marcada al amortiguador de hibridación (0,5 ng/ $\mu$ l) a 65 °C durante 14 h. Para el lavado de las membranas se realizó: un primer lavado en 2X SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente por 30 min; un segundo lavado en 1X SSC, 0,1% SDS a 65 °C por 25 min, y un tercer lavado en 0,1X SSC, 0,1% SDS a 65 °C por 25 min. La localización de las moléculas hibridadas fue revelada por autoradiografía (12).

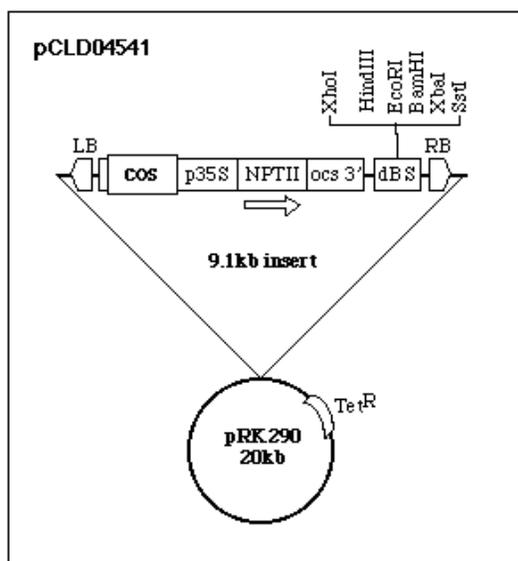


Figura 1. Mapa del plásmido BIBAC utilizado en la construcción de la biblioteca genómica de *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia.

### Verificación de los clones BIBAC positivos

Los clones BIBAC identificados en las membranas como positivos para los genes de resistencia tipo RGA-NBS fueron seleccionados de la biblioteca y crecidos. Para la extracción del ADN plasmídico de estos clones de la genoteca BIBAC, se aplicó la metodología reportada por Birboim y Dolly (13) y Ish-Horowicz y Burke (14). Este ADN se dispuso en un arreglo de puntos en una membrana (tipo *dot blot*) para su verificación, usando la sonda RGA-NBS marcada según el protocolo descrito en la sección anterior.

### Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El DNA plasmídico de los doce clones verificados por *dot blot* fue digerido separadamente con varias enzimas de restricción de corte poco frecuentes en eucariota: EcoRI, HindIII, NotI, XhoI, BamHI y PstI, a 37 °C con el amortiguador correspondiente.

Posteriormente, los productos de la digestión fueron resueltos por Electroforesis en Campo Pulsado (CHEF) en geles de agarosa al 1,2% en TAE 1,5X y pulsado con un ángulo de 120°, 5 V/cm, pulsos inicial 5 s y final 15 s, a 14 °C, durante 15 h. Luego, las bandas resueltas fueron teñidas con bromuro de etidio (4 µg/mL) y visualizadas en un transiluminador con luz ultravioleta a 302 nm. Los patrones de restricción obtenidos fueron seleccionados sobre la base del patrón que generó mayor número de bandas discretas y tamaños mayores a 3.000 pb.

Se seleccionaron tres de los doce clones positivos del escrutinio para un análisis RFLP. Los plásmidos BIBAC de estos clones fueron cortados con EcoRI y luego separados en geles de agarosa al 1,2%, mediante CHEF, y transferidos a una membrana de nylon según el procedimiento de transferencia por capilaridad (12). Para la hibridación de la membrana con la sonda RGA-NBS, se siguió el mismo procedimiento ya descrito para el escrutinio de la biblioteca genómica.

## Resultados y discusión

### Escrutinio de la biblioteca genómica

Considerando que el genoma haploide de *Musa acuminata* está estimado entre 559 a 613 Mpb (17), el ensayo de hibridación de 13.824 clones BIBAC de la biblioteca de *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia, con un tamaño promedio del inserto de 100 kb y con la sonda RGA-NBS marcada con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, representó el análisis de al menos 2,2 veces el genoma haploide de este cultivar. Esto permitiría identificar, por lo menos, un clon BIBAC con el gen buscado, si este existe en el genoma estudiado con una secuencia de al menos 70% de homología con la sonda utilizada.

La revisión mediante la hibridación con la sonda RGA-NBS en los 13.824 clones permitió identificar 12 clones BIBAC (figura 2), posteriormente verificados mediante un *dot blot*.

### Análisis de los patrones de restricción de los clones BIBAC

La restricción del ADN plasmídico de los 12 clones con diferentes endonucleasas (EcoRI, HindIII, NotI, XhoI, BamHI y PstI) generó entre 5 y 30 bandas, mostrando diferentes patrones de digestión (figura 3), lo que indica que los BIBAC estudiados representan diferentes regiones del genoma.

Los patrones de restricción obtenidos fueron analizados según el tamaño, número y resolución de las bandas discretas. Patrones de restricción con más de 15 bandas presentan poca separación de los fragmentos entre sí. Sin embargo, lo importante es que el patrón de restricción presente bandas bien definidas y aisladas en el rango del tamaño de interés (3 a 10 kb), considerando que 3 kb es el tamaño promedio de un gen completo. Se estima que el tamaño promedio de un gen de arroz y arábido es de 2.200 pb (15). Por otra parte, se requiere un fragmento con un tamaño mayor a 2.200 pb que permita subclonar el gen completo, incluyendo posibles regiones regulatorias, para secuenciar y completar su caracterización.

En consecuencia, se seleccionó la endonucleasa EcoRI, enzima de corte poco frecuente en eucariota y que además corta en el sitio de clonaje múltiple del plásmido pCLD04541 (figura 1), para el análisis *southern blots* de los 3 clones que mostraron patrones de restricción con los tamaños adecuados ( $\geq 3.000$  pb) y mejor resolución.

El análisis de los patrones de restricción indica que los 12 clones BIBAC identificados contienen secuencias homólogas a NBS y que estas están ubicadas en diferentes regiones del genoma, ya que los patrones de corte son totalmente diferentes (figura 3). Esto significa que en el genoma del cv. Tuu Gia se localizan doce locus homólogos a RGA-NBS y que cada locus puede tener un tamaño de al menos 100 kb. Estas secuencias homólogas pueden estar agrupadas en un mismo locus de 100 kb en familias de genes conformadas por grupos de secuencias

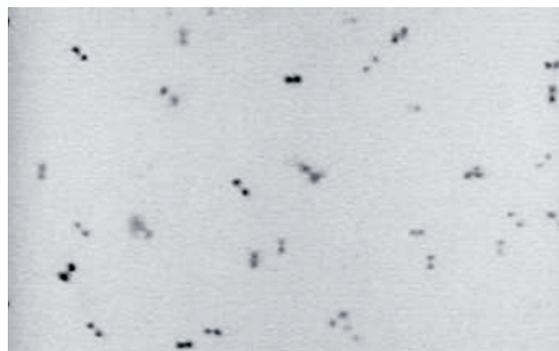


Figura 2. Autorradiografía de clones positivos de la biblioteca genómica BIBAC con la sonda RGA-NBS. Macro arreglo en membrana de nylon. Las parejas de señales corresponden a duplicados de cada clon.

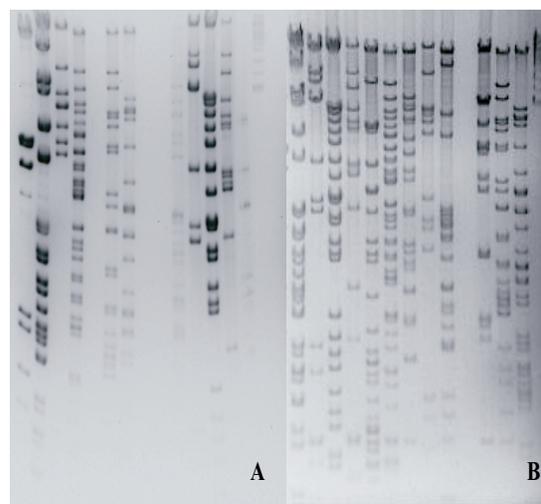


Figura 3. Análisis de 12 clones BIBAC identificados en la biblioteca genómica. Los clones fueron crecidos por 20 h, se les realizó maxiprep y se digirieron con A) EcoRI y B) HindIII, y fueron separados por electroforesis de campo pulsante como se describe en materiales y métodos.

que comparten una alta homología. Mago *et al.* (18) reportan, en *Oriza sativa*, el mapeo de un grupo de 6 genes tipo NBS-LRR (repeticiones ricas en leucina) que presentan pa-

trones RFLP muy similares entre sí y que se ubican en un mismo locus en el mapa genético. Para *Musa acuminata* var. Calcuta VI, se estima, según el análisis de secuencias de los extremos de los clones BAC, que cada 6,4 kb se localiza un gen. En otros clones esta densidad es menor: se encuentra un gen cada 10 kb. En este caso se cree que esta baja densidad está relacionada con la presencia de secuencias microsatélites y transposones (19). Sobre la base de estos datos podemos inferir que para un clon BIBAC de 100 kb, pueden existir aproximadamente unos 15 genes, de los cuales encontramos que de 2 a 4 corresponden a genes tipo NBS.

#### Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El análisis RFLP de los tres clones BIBAC digeridos con la enzima EcoRI indica una organización genómica en familias de genes análogos de resistencia tipo NBS.

En el clon BIBAC-3 digerido con EcoRI, la sonda hibridó con 2 fragmentos diferentes de 10,5 y 7,8 kb (figura 4.B, carril 3), mientras que en otros clones (Figura 4.B, carril 1 y 2) hibridan 3 a 4 bandas. Esto indica que existen al menos 2 genes agrupados en aproximadamente 100 kb.

Esto se debe a que el dominio altamente conservado de NBS Quinasa 2 (19, 20) está presente en muchos de los genes que codifican enzimas quinasa dependientes de ATP/GTP, por lo que estos patrones de bandas y los polimorfismos en la longitud de restricción encontrados indican la presencia de familias de genes tipo NBS con altos niveles de homología (> 60 %) y que se agrupan en un promedio de 2 a 3 genes (figura 4). Haciendo inferencia sobre la base de los datos descritos para el RFLP (figura 4) y los clones analizados mediante enzimas de restricción y la técnica CHEF (figura 3), se estimaría un promedio de 30 genes RGA tipo NBS distribuidos en el genoma. Sin embargo, este número de genes podría ser menor debido a que es común encontrar estos genes repetidos en diferentes regiones genómicas.

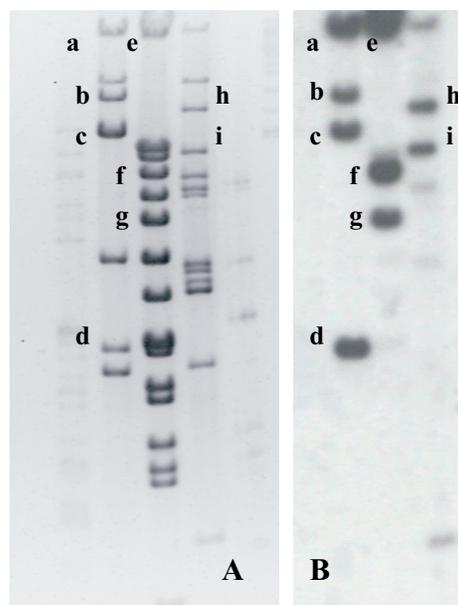


Figura 4. Análisis RFLP de tres clones positivos con la sonda RGA-NBS. A: productos de la digestión con EcoRI separados en gel de agarosa 1,2 %. B: *southern blots* de los patrones de restricción de A. Fragmentos: a) 34 kb, b) 11 kb, c) 9 kb, d) 3 kb, e) 34 kb, f) 6,5 kb, g) 4,5 kb, h) 10,5 kb, i) 7,8 kb.

Pan *et ál.* (19) estiman que para *Arabidopsis thaliana* existen aproximadamente 300 genes RGA tipo NBS y en *Lycopersicon esculentum* se habían mapeado solo 75 genes tipo NBS-LRR, por lo que aún estaban lejos de saturar el mapa con este tipo de genes. Foo y Town (20) analizaron una genoteca BAC de *Musa acuminata* (AA) var. Calcuta IV mediante secuenciación de los extremos BAC, reportando que más del 5% de los genes en esta variedad está representado por proteínas quinasa dependientes de ATP/GTP.

En *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu Gia, Ortiz *et ál.* (11) reportan la revisión de la misma biblioteca genómica BIBAC con otro RGA (NBS-LRR), obteniendo 48 clones positivos, de los cuales solo el 50% lograron ser confirmados mediante *southern blots*, lo que nos

indica la presencia de un máximo de 24 familias de RGA (NBS-LRR). Sin embargo, en este trabajo no se muestran análisis RFLP que permitan inferir el posible número de genes agrupados en estas familias.

En conclusión, se localizaron doce clones BIBAC positivos, todos reconfirmados por *dot blots* que representan diferentes locus del genoma. Los análisis RFLP de 3 clones BIBAC permitieron identificar nueve genes tipo NBS agrupados en familias de al menos dos genes por cada 100 kb.

### Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (Proyecto Condes CC-0451-06), por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

### Referencias bibliográficas

1. VUYLSTEKE D., ORTIZ R., FERRIS S. *African Crop Science Journal* 1: 1-8, 1993.
2. ROWE P., ROSALES F. "Current approach and future opportunities for improving major *Musa* (ABB) types present in the Asian/Pacific region: Saba, Pisang Awak, Bluggoe". In: Frison E., Horry J., De Waele D. (Eds.). *New frontiers in resistance breeding for nematode, Fusarium and Sigatoka*. INIBAP, Montpellier (Francia), pp. 129-141, 1996.
3. CROUCH J., VUYLSTEKE D., ORTIZ R. *Electronic Journal of Biotechnology* 1: 11-22, 1998. Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue1/full/2/bip/index.html>.
4. HAMILTON C. *Gene* 200: 107-116, 1997.
5. HAMILTON C., FRARY A., LEWIS C., TANKSLEY S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 9975-9979, 1996.
6. CHOI S., CREELMAN R., MULLET J., WING R. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 124-128, 1995.
7. MEYERS B., KOZIK A., GRIEGO A., KUANG H., MICHELMORE R. *Plant Cell* 15: 809-834, 2003.
8. MEYERS B., SHAIL K., RAJA S. *Current Opinion in Plant Biology* 8:129-134, 2005.
9. MICHELMORE, R.W. *Nature Biotechnology* 14:1653-1654, 1996.
10. GIMÉNEZ C., PALACIOS G., Colmenares M. *Plant Mol. Biol. Rep.* 24: 33-43, 2006.
11. ORTIZ-VÁZQUEZ E., KAEMMER D., ZHANG H., MUTH J., RODRÍGUEZ-MENDIOLA M., ARIAS-CASTRO C., JAMES A. *Theor. Appl. Genet.* 110: 706-13, 2005.
12. SAMBROOCK J., RUSSELL D. *A laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> edition. Cold Springs Harbor Press, New York (USA), 2002.
13. BIRNBOIM H., DOLY J. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-23, 1979.
14. ISH-HOROWICZ D., BURKE J.F. *Nucl. Acids Res.* 9: 2989-2898, 1981.
15. CLUTTER M., JEN J. *National Genome Initiative Progress Report*. pp. 1-23. December 2001. Disponible en: <http://www.Ostp.gov/NSTC/html/mpgi2001/npgi2001.pdf>.
16. VAN DER BIEZEN E., JONES J. *Biol. Curr.* 8: 226-7, 1998.
17. LYSÁK M., DOLEZELOVÁ M., HORRY J., SWENNEN R., DOLEZEL J. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1344-1350, 1999.
18. MAGO R., FAIR S., MOHAN M. *Theor. Appl. Genet.* 99: 50-57, 1999.
19. FOO CH., TOWN CH. *BMC Plant Biology* 7: 29, 2007. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/7/29>.
20. PAN Q., LIU Y., BUDAI-HADRIAN O., SELA M., CARMEL-GOREN L., ZAMIR D., FLUHR R. *Genetics* 155: 309-322, 2000.