

SECUENCIAS DE ADNc DE *Musa balbisiana* EMPLEANDO OLIGONUCLEÓTIDOS DERIVADOS DELGENE DREB2

Porfirio Raúl Galicia, Josué Otoniel Mena, Maribel Quezada, Luis Carlos Rodríguez, Bartolomé Chi.
Universidad Tecnológica de Tecámac. Km. 37.5 Carr. Fed. México-Pachuca Tecámac Méx. C.P. 55740.
Tel. 59388453, Fax 59388458; e-mail pgaliciag@uttecamac.edu.mx.

Palabras clave: *Musa*, DREB2, PCR.

Introducción. El Banano, pertenece al género *Musa*, el cual incluye especies como *M. acuminata* y *M. balbisiana* cultivadas en nuestro país. Las variedades híbridas de estas son AB como es el 'Ladyfinger' y AAB o ABB (plátanos macho). Durante su cultivo las plantas están sujetas a diversos factores de estrés abióticos, sin embargo, se han identificado algunos genes que confieren tolerancia a varios tipos de estrés en diferentes especies. Una estrategia para obtener plantas resistentes es introducir genes de tolerancia, como primer paso para lograrlo es el aislamiento de esos genes (1).

El objetivo fue identificar y aislar secuencias de genes involucrados en la respuesta a la resistencia de factores abióticos a partir de plantas de *M. balbisiana*, utilizando PCR de gradientes y empleando oligonucleótidos degenerados derivados del gene DREB2.

Metodología. Se utilizaron plantas de *Musa balbisiana* variedad Pisang Klutuk Wulung de 1 mes de edad, sometidas a bajas temperaturas, se extrajo su ARN, se realizó la retrotranscripción para obtener ADNc, Este ADN fue sometido a PCR con diferentes combinaciones de oligos degenerados, se recuperaron los productos amplificados y se insertaron en pGEM T-EASY, el cual se insertó en *E. coli* por choque térmico, se recuperaron las colonias transformadas para realizar PCR y seleccionar las bacterias recombinantes, se secuenció su ADN y se realizó el análisis bioinformático mediante Clustalw y Blast.

Resultados y discusión. La Figura 1 muestra la amplificación de productos de PCR por gradientes, correspondientes a la amplificación con la combinación de oligos F2 vs R1 y dT para el gen DREB2. El tamaño de los productos obtenidos fue de 0.25 Kb, 0.8Kb y 1 Kb, los fragmentos mayores a 0.5 Kb fueron secuenciados. La secuenciación de uno de ellos (K7) reveló un tamaño de 497 pb con el 89% de homología con la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa activasa. Este mensajero se ha reportado para avena (*Avena sativa*), especie donde se incrementa la expresión de este gen cuando las plantas se exponen a 4° C por 6, 12 y 24 horas (2). El fragmento fue clonado a pesar de poseer "huecos" en la traducción.

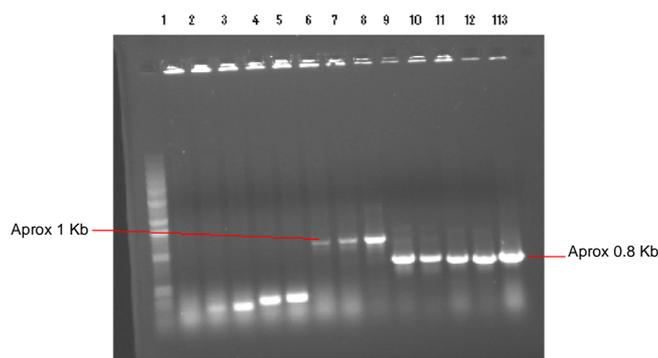


Fig. 1. Residuos de PCR en gradientes en gel de agarosa con oligos degenerados derivados del gen DREB2 de *M. balbisiana*.

El gen DREB2 tiene una gran variación en las secuencias para monocotiledóneas, en las cuales el mayor porcentaje de similitud es de 78 % entre las proteínas de *Schedonorus arundinaceus* y *Festuca arundinacea* (3). Además, el empleo de oligonucleótidos degenerados, diseñados a partir de regiones conservadas, fueron factores influyentes para que la metodología utilizada mostrara una alta probabilidad de clonar fragmentos diferentes al gen.

Conclusiones. Utilizando los oligonucleótidos DREB2 disponibles, solo 2 de ellos permitieron la amplificación de 12 secuencias de ADNc, de las cuales una correspondió a un fragmento de un mensajero cuya expresión se incrementa a bajas temperaturas como es la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa activasa.

Bibliografía.

1. Jones, D. R. (2000). Leaf speckle. In : *Disease of banana*. Abaca and Enset (ed). *CABI Publish*. pp. Wallingford, UK. 112-113.
2. Brautigam, M., Lindlof, A., Zakhrebekova, S., Gharti-Chhetri, G., Olsson, B. and Olsson O. (2005). Generation and analysis of 9792 EST sequences from cold acclimated oat, *Avena sativa*. *BMC Plant Biology* 5 (18) pp. 88-95.
3. Zhifei, Z., Liqun, R., Zhiyang, Z., Zouxian, X., Zhijian, Y. and Hua Y. (2007). Molecular cloning, bioinformatics, and expression profiling of a dehydration-responsive element-binding-2 (DREB2) homologue from *Festuca arundinacea*, *FapDREB2*, with high drought tolerance. *Hort. Science & Biotech.* 83(2) pp. 199-206.