

CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA DE cDNA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) PARA MAPEO GENETICO

Hernando Ramírez*; Jorge E. Mayer**; William M. Roca**; Joseph Tohme**; Yamel López F.***

COMPENDIO

Se construyó una pequeña librería de cDNA de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de alrededor de 1500 clones, con el fin de incrementar la saturación del mapa de ligamiento de frijol con marcadores de RFLPs. Para la generación de la librería se utilizó la técnica de amplificación por PCR (Jepson *et al.*, 1991). En ella se utilizan como iniciadores para la reacción los mismos adaptadores empleados para generar los terminales cohesivos del cDNA. Se obtuvieron insertos con un promedio de 500 pares de bases. Se aislaron 93 clones, los cuales mostraron un porcentaje de repetición del 61%. De los clones con patrón único, el 80% fueron de copia única y el 20% fueron de bajo número de copias. Se evaluó el polimorfismo de tres pares de parentales de frijol, escogidos por sus características agronómicas. El polimorfismo total más alto se halló con la enzima de restricción EcoRV (77%), luego le siguieron DraI (73%), EcoRI (63%) y HindIII (60%). El par más polimórfico fue DOR60 con APN18, con 71% para EcoRV y 57% para EcoRI respectivamente. Se analizaron por hibridización dos clones de los grupos con más repeticiones en "slot blot" contra los demás clones y DNA que codifica para γ RNA, con el fin de aclarar el origen de las repeticiones. Sólo uno de ellos parece ser de origen ribosomal, como lo sugiere el patrón de hibridización con DNA genómico de frijol digerido con HaeIII, lo cual puede indicar que el grupo al cual pertenece es probablemente de origen ribosomal. Esto se puede explicar probablemente por la combinación en la metodología de amplificación por PCR con la utilización de iniciadores múltiples para la síntesis de la primera cadena de cDNA.

ABSTRACT

A small cDNA library from beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of about 1500 clones was constructed, to further saturate the bean RFLP linkage map. The primarily synthesized cDNAs were amplified by PCR using the adaptors as primers for amplification (Jepson *et al.*, 1991). Inserts in the range of 500 bp were obtained. 93 clones were singled for further analysis. They showed a degree of repeatability of around 61%. Around 80% of the unique clones were single copy, and 20% were low copy sequences as expected from a cDNA library. Three pairs of parental bean lines were chosen for their agronomical traits, and evaluated for polymorphism, which was highest as revealed by digestion with EcoRV (77%), followed by DraI (73%), EcoRI (63%) and HindIII (60%). The highest polymorphism was observed between the pair DOR60 and APN18, 71% for EcoRV and 57% for EcoRI, respectively. Two clones of the two groups with the most repeated clones were analyzed by slot blot hybridization against the other clones and ribosomal DNA, to understand the origin of the repetitions. Only one clone seemed to be of ribosomal origin, as confirmed by the patterns obtained by hybridization to bean genomic DNA digested with HaeIII, implying that the whole group to which it belonged was of ribosomal origin. It can be explained by the combined utilization of the PCR amplification methodology and the multipleprimers for the synthesis of the first cDNA strand.

INTRODUCCION

Entre las leguminosas alimenticias de grano, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la especie más importante para consumo humano, especialmente entre los países de América Latina y África, donde constituye una fuente importante de proteína y calorías de bajo costo (Voyssest, 1983; Pachico, 1989; Laing *et al.*, 1984).

Los promedios de rendimiento en América Latina y África (600 Kg ha⁻¹) son bajos si se comparan con los de Estados Unidos (1500 Kg ha⁻¹) lo cual puede ser atribuido al efecto de factores tales como (a) Bióticos (plagas, enfermedades y malezas); (b) edáficos (deficiencias o excesos de nutrientes, textura, estructura y PH

* Estudiante del Postgrado Producción Vegetal. Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. A.A. 237.

** Unidad de Investigación en Biotecnología, CIAT.

*** Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. A.A. 237.

inadecuados y (c) climáticos (sequía, alta precipitación, temperaturas bajas o muy elevadas (Pastor-Corrales, 1985; Pachico, 1989).

Se han obtenido algunos éxitos en el desarrollo de variedades de fríjol con caracteres de importancia agronómica, como resistencia a algunas enfermedades (Beebe y Pastor-Corrales, 1991) y plagas (Kornegay y Cardona, 1991), variedades con capacidad mejorada de fijación simbiótica de nitrógeno (Bliss, 1984; CIAT, 1990), variedades con la arquitectura de la planta modificada para un mayor rendimiento (Kelly y Adams, 1987); sin embargo ha sido limitado el mejoramiento para caracteres más complejos como rendimiento, tolerancia a suelos ácidos, adaptación a la sequía, aumento en la calidad y contenido de proteína del grano, probablemente debido a la poca variabilidad genética (Sprecher, 1988; Gepts y Debouck, 1991; Debouck y Tohme, 1988) y la incompatibilidad entre los acervos genéticos de *P. vulgaris* (Smartt, 1970; Singh y Gutiérrez, 1984; Debouck y Tohme, 1988) y entre *P. vulgaris* y otras especies cultivadas como *P. acutifolius*, *P. lunatus*, *P. coccineus* y *P. polyantus* (Muñoz et al., 1990; Mok et al., 1978).

El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, del DNA recombinante y las técnicas de transformación genética de plantas, ha abierto nuevas alternativas para el mejoramiento vegetal, ya que además de proporcionar nuevos métodos para la evaluación de la variabilidad genética a nivel genómico también, permiten la identificación, aislamiento, modificación y transferencia de genes, contribuyendo así al aumento de la variabilidad genética de una especie (Roca, 1990; Roca y Mroginski, 1991).

Una de las herramientas claves para el mejoramiento vegetal es el conocimiento del genoma de la especie a mejorar lo cual se logra a través de un mapa genético. Los mapas genéticos basados en caracteres morfofisiológicos son dispendiosos y lentos de realizar, siendo además limitados en su utilidad por el bajo número de marcadores que poseen.

En la actualidad el proceso de generación de

mapas genéticos ha sido acelerado significativamente a través del uso de marcadores moleculares, como los RFLPs (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción). Los RFLPs permiten comparar regiones homólogas en los genomas de diferentes materiales, las cuales pueden haber sufrido cambios en la secuencia de sus nucleótidos en el transcurso de la evolución debido a mutaciones puntuales, inserciones, translocaciones, etc. Por esta razón, al digerir estas regiones con una misma enzima de restricción (endonucleasa que reconoce y corta en una secuencia específica dentro de la cadena de DNA) los fragmentos originados pueden variar en tamaño, los que al ser separados electroforéticamente en geles de agarosa presentan patrones de migración diferentes.

Mediante la técnica de RFLP se ha logrado en un tiempo relativamente corto, construir mapas genéticos bastante saturados de tomate (800 marcadores) (Bernatzky y Tanksley, 1986) maíz (Helentjaris et al., 1987) lechuga (Landry et al., 1987) arroz ((McCouch et al., 1988) y fríjol (224 marcadores) (Vallejos et al., 1992 y Nodari et al., 1990). La distancia entre marcadores en estos mapas es de pocos centi-Morgan (1 cM = 1% de recombinación), facilitando de este modo el marcaje de genes de interés agronómico.

Para la construcción de estos mapas genéticos con marcadores moleculares es importante tener una fuente de sondas con un nivel de polimorfismo alto (con un mínimo de enzimas de restricción) y que sean de secuencias de copia única o bajo número de copias para facilitar la evaluación de la población segregante.

Las principales fuentes de estas sondas son librerías genómicas, de cDNA o sondas heterólogas. Las sondas provenientes de una librería de cDNA, que se derivan de genes transcritos, han demostrado gran utilidad para el mapeo genético, primero porque presentan alto porcentaje de secuencias de copia única o de bajo número de copias, y segundo porque el nivel de polimorfismo de estas sondas es más alto que el de las provenientes de una librería genómica. En tomate por ejemplo, el 60% de los clones de cDNA presentaron secuencias de copia única

(Tanksley *et al.*, 1989), mientras que en lenteja el 88% presentaron secuencias de bajo número de copias (Havey y Muehlbauer, 1989); en lechuga las sondas provenientes de clones de cDNA fueron 2.5 veces más polimórficas que las de los clones de la librería genómica (Landry *et al.*, 1987), mientras que en lenteja los clones de cDNA fueron dos veces más polimórficos que los genómicos (Havey y Muehlbauer, 1989).

El mapa de ligamiento de fríjol, basado principalmente en marcadores de RFLP, está en proceso de desarrollo. En la actualidad este mapa cuenta con un marcador de color de flor y semilla, 9 proteínas de semilla, 9 isoenzimas y 224 marcadores de RFLP arreglados en 11 grupos de ligamiento para un cubrimiento genómico de 960 cM (Vallejos, 1992). Las sondas que se están utilizando para la construcción de este mapa provienen de una librería genómica pequeña (aproximadamente 2.000 clones), compuesta por insertos generados con la enzima de restricción PstI (Chase y Vallejos, 1991).

El principal objetivo de este trabajo fue la construcción de una librería de cDNA como fuente complementaria de sondas para continuar saturando el mapa de fríjol con marcadores moleculares, y la caracterización de una muestra representativa, con respecto a su grado de polimorfismo en relación con tres pares de parentales seleccionados por sus características agronómicas.

MATERIALES Y METODOS

EXTRACCION DEL RNA TOTAL

Se pulverizó con nitrógeno líquido tejido fresco congelado de plántulas etioladas de 8 días a -80°C en un mortero de porcelana. La extracción del RNA total se hizo siguiendo la metodología descrita por Chomczynski y Sacchi (1987). El RNA obtenido se analizó espectrofotométricamente (Sambrook *et al.*, 1989) y por electroforesis (Rosen y Villa-kamaroff, 1990) para determinar su pureza y cantidad.

AISLAMIENTO DEL mRNA

El método más común para el aislamiento del mRNA (RNA mensajero) es el de cromatografía de afinidad por oligo (dT) celulosa. En vez de utilizar una columna de vidrio termostatazada, los pasos de adsorción y elución se realizaron en un tubo de centrifuga haciendo lavados de la matriz con las soluciones de adsorción (Tris-HCl 20 mM pH 7.6; NaCl 0.5M; EDTA 1 mM) y elución (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM) y separando los lavados por centrifugaciones a bajas revoluciones (Sambrook *et al.*, 1989). Las fracciones recolectadas se precipitaron con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol al 100% y se dejaron a -20°C por toda la noche. El mRNA se eluyó con tampón TE a 65°C recuperándose luego por centrifugación a 12000 g por 20 minutos a 4°C después de añadir 0.1 v de NaAc 3M pH 5.2 y 2.5 v de etanol al 100%. Los precipitados de cada fracción se resuspendieron en 50 μl de agua desionizada estéril (libre de RNasas) y se analizaron por electroforesis.

SINTESIS DEL cDNA

La síntesis del cDNA de doble cadena se realizó según Gubler y Hoffman (1983) usando el kit "cDNA Synthesis System Plus" de Amersham.

En la síntesis de la segunda cadena se utilizaron 5 μl de ^{32}P (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 Ci/mmol) para el marcaje del cDNA. El cDNA marcado se purificó haciendo una extracción con un volumen de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25: 24:1), seguida de una extracción con cloroformo. Antes de precipitar el cDNA, se tomó 1/10 del volumen final de la solución de cDNA para evaluar la síntesis de cDNA por electroforesis y autorradiografía. El resto de la solución de cDNA se precipitó con un volumen de acetato de amonio 4 M y dos volúmenes de etanol al 96%. La mezcla se agitó y se colocó a -20°C por 15 minutos, luego se centrifugó a 12000 g por 10 minutos. El sobrenadante se eliminó con mucho cuidado y el precipitado se lavó con 200 μl de etanol al 70%, se centrifugó a 12000 g por dos minutos, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío.

Clonaje del cDNA

El cDNA obtenido presenta extremos romos. Para facilitar el ligamiento de los cDNAs al vector (pUC19) linearizado con la endonucleasa EcoRI, fue necesario anexarles un adaptador comercial de New England Bio-Labs el cual consta de dos oligonucleótidos complementarios de 16 (adaptador EcoRI-XmnI) y 12 bases (adaptador XmnI) respectivamente. El exceso de adaptadores libres y dimerizados se hizo a través de una columna de Sephacryl S-400 siguiendo el proceso descrito en Sambrook *et al.*, (1989).

Amplificación del cDNA por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método *in vitro* para la amplificación de determinado segmento de DNA. Partiendo de poca cantidad, en el rango de pg y fg, se pueden producir μg del fragmento amplificado, lo que equivale a un factor de amplificación de 10^6 - 10^8 (Mullis and Faloona, 1987).

La amplificación de los cDNAs utilizando el sistema de PCR (Figura 1) se hizo siguiendo la metodología de Jepson *et al.*, (1991). La temperatura de alineación del iniciador (primer), se adaptó a la longitud de los adaptadores (40°C para un oligonucleótido de 16 residuos).

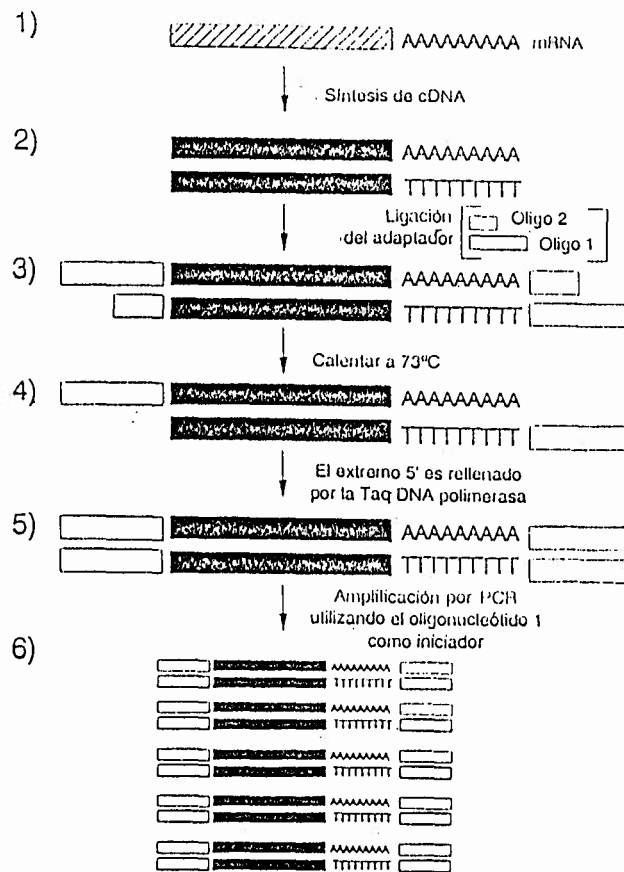


FIGURA 1. Esquema del proceso de amplificación del cDNA por PCR.

Fuente: Jepson *et al.*, 1991

En un termociclador de PCR (Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycle 480) se efectuaron 30 ciclos de amplificación, bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización	94°C	0.8 minutos
Alineación	40°C	1.1 minutos
Síntesis	72°C	3.0 minutos

El cDNA amplificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, luego se purificó con fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1) y cloroformo. Luego se precipitó con 0.1 vol de NaAc 3 M pH 5.2 y 2.5 vol de etanol al 95%. El cDNA purificado fue digerido con EcoRI para la recuperación de los extremos cohesivos.

Preparación del plásmido vector

El vector utilizado para ligar el cDNA fue el plásmido pUC19 (Vieira y Messing, 1982). Este plásmido presenta dos marcadores: un gen que codifica para la enzima β -lactamasa, que degrada el antibiótico ampicilina y que permite seleccionar las bacterias que contienen el plásmido. El otro marcador es el fragmento N-terminal del gene lac z que permite la selección por α -complementación (Vieira y Messing, 1982).

El plásmido se amplificó y purificó siguiendo la metodología de Sambrook *et al.*, (1989). Luego se linearizó con EcoRI y finalmente se defosforiló con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP), se purificó, se precipitó y el precipitado se resuspendió con agua destilada estéril hasta obtener una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Ligación del cDNA al vector

Para garantizar eficiencia en el ligamiento del cDNA al vector se recomienda una relación de plásmido a inserto de 5:1. Esta reacción se hizo de acuerdo con Sambrook *et al.*, (1989). Una vez ligado el cDNA al vector, los plásmidos recombinantes se introdujeron por transformación en células competentes *E. coli* (DH5 α) preparadas por el método de Hanahan (1985).

Las colonias con plásmidos recombinantes se

seleccionaron en placas con X-gal/IPTG (el sustrato cromogénico de la β -galactosidasa, X-gal, libera el colorante azul índigo cuando la enzima es activa, o sea, cuando el gen lac z no ha sido interrumpido por un inserto). Se aislaron colonias blancas individuales y se hicieron minipreparaciones de plásmidos siguiendo el método de lisis alcalina. El tamaño de los insertos se determinó en base al marcador de tamaños moleculares Lambda-HindIII a través de electroforesis en geles de agarosa al 1%.

MANIPULACION DEL DNA GENOMICO Y TECNICAS DE HIBRIDIZACION

Para la evaluación del número de copias y el nivel de polimorfismo de los clones de cDNA, se extrajo el DNA de tres parejas de parentales por el método de Vallejos *et al.* (1992) y se digirió con las enzimas de restricción: EcoRI, EcoRV, HindIII y DraI. La electroforesis del DNA digerido (5 μg de DNA por carril) se hizo en geles de agarosa al 0.8% a 1.1 voltio/cm por 16 horas. La transferencia capilar a filtros de nylon se hizo de acuerdo con Southern (1975).

La marcación de la sonda y la hibridización de los filtros se hizo de acuerdo con el manual del Kit de Amersham "Multiprime DNA labelling System".

La autoradiografía de los filtros se hizo exponiéndolos sobre una película de rayos X (Kodak XAR-5) usando un casete de exposición con pantallas intensificadoras. El casete se colocó a -80°C por 12 a 36 horas dependiendo de la intensidad de la señal radiactiva.

RESULTADOS Y DISCUSION

EXTRACCION DEL RNA TOTAL

De los métodos ensayados para la extracción de RNA total (Kirby, 1968; Chirgwin *et al.*, 1979 y Chomczynski y Sacchi, 1987), se seleccionó el de Chomczynski y Sacchi debido a la sencillez y rapidez (sólo 4 horas para extracción de RNA de buena calidad).

El rendimiento promedio del RNA total (evalua-

do espectrofotométricamente), fue de 350 $\mu\text{g/g}$ de tejido, con una relación promedio de A_{260}/A_{280} de 1.75 que indica una contaminación proteica, lo cual sugiere que el rendimiento obtenido es menor. Este rendimiento es aceptable si se compara con los obtenidos para varios tejidos de papa (tubérculos 171, hoja 317, tallo 74, y raíz 63 $\mu\text{g/g}$ de tejido, respectivamente) (Logemann *et al.*, 1987); aunque otros autores reportan rendimientos más altos, como en el caso del trébol blanco (*Trifolium repens* L.) con 780 $\mu\text{g/g}$ de tejido (Hughes *et al.*, 1990).

AISLAMIENTO DEL mRNA

Aunque el método más común es el de Aviv y Leder (1972), en el presente trabajo se utilizó un sistema de lavados de la matriz con soluciones de adsorción (Tris-HCl 20 mM pH 7.6; NaCl

0.5 M; EDTA 1 mM) y elución (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8.0) caliente (65°C), recuperando los lavados por centrifugaciones a 1500 g por 4 minutos (Sambrook *et al.*, 1989).

El rendimiento promedio de mRNA fue de 2.9 $\mu\text{g/g}$ de tejido lo que equivale a un 0.8% del promedio del RNA total aislado, valor que está dentro del rango encontrado en muchos otros cultivos.

El mRNA no mostró degradación en la electroforesis donde se pudo apreciar un barrido bastante amplio (100-10000 bases), lo que sugiere una amplia población de mRNAs (Figura 2). También se observó alguna contaminación de rRNA irrelevante para la síntesis del cDNA, si se usa oligo(dT) como iniciador en la síntesis de la primera cadena del cDNA.

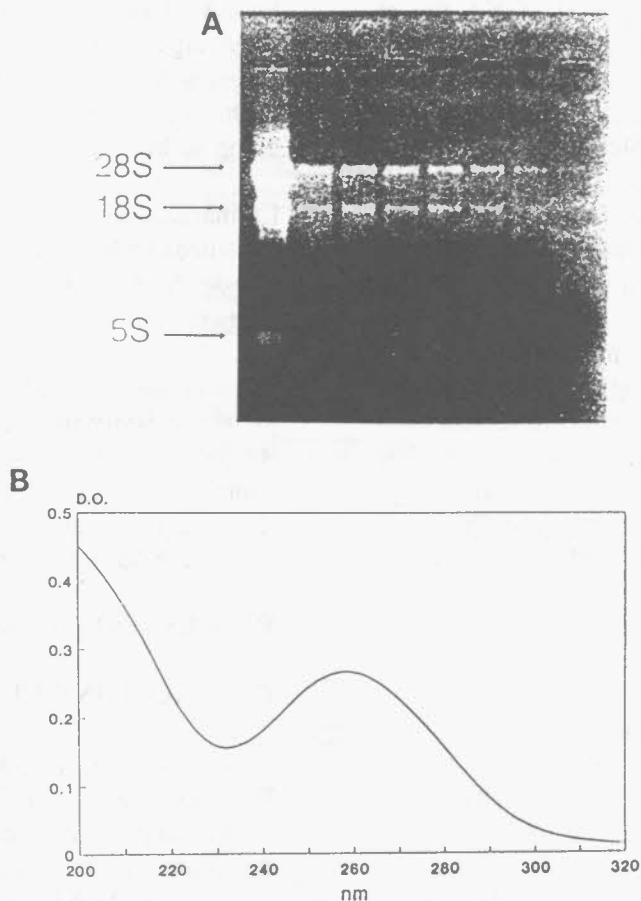


FIGURA 2. (A) Electroforegrama del perfil de elución de fracciones de mRNA en un gel de agarosa denaturalizante al 1.5% teñido con bromuro de etidio. 1. RNA total; (2-8) fracciones. (B) Análisis espectrofotométrico del mRNA.

SINTESIS DEL cDNA

La síntesis de la primera y segunda cadena del cDNA se efectuó mediante el kit "cDNA Synthesis System Plus" de Amersham, que sigue la metodología de Gubler y Hoffman (1983). Este kit utiliza la transcriptasa reversa del virus de Mieloblastosis de ave (AMV) para la síntesis de la primera cadena del cDNA que en presencia de 1 μ g de mRNA debiera dar un rendimiento de 2 μ g de cDNA, el cual es suficiente si se considera que para la construcción de una buena genoteca solo se necesitan 100 ng de cDNA.

Durante la síntesis de la segunda cadena se incorporó fósforo 32, para estimar la cantidad de cDNA producido, y para hacer un seguimiento del cDNA en las etapas posteriores de preparación para el clonaje. El cDNA obtenido tuvo un promedio de 1500 pares de bases (Figura 3A). El exceso de adaptadores luego del ligamiento fue eliminado por cromatografía de exclusión con Sephacryl S-400.

Amplificación del cDNA por PCR

La metodología de Jepson *et al.* (1991) para la amplificación del cDNA por PCR permite amplificar las diferentes secuencias de una población de cDNAs utilizando como iniciadores para la Taq polimerasa los mismos adaptadores que se usaron para generar los terminales cohesivos de los cDNAs. La Figura 3B muestra la amplificación del cDNA de cada una de las 11 fracciones recolectadas. Las fracciones de 3 a 7 presentan cDNAs entre 400-1500 pares de bases, las cuales se mezclaron, se purificaron y se precipitaron. El precipitado se secó al vacío quedando listo para su clonaje. La cantidad de cDNA obtenido en este precipitado juzgado por la intensidad del barrido después de la electroforesis fue de aproximadamente, 4 μ g.

Ligamiento del cDNA al vector y transformación

Los cDNAs amplificados por PCR fueron digeridos con EcoRI para la recuperación de los extremos cohesivos y se ligaron al vector (pUC19) linearizado con EcoRI y defosforilado.

También resultan cortadas las secuencias internas reconocidas por EcoRI lo cual es irrelevante ya que para marcadores de RFLP no se necesitan cDNAs completos. En esta reacción se usó una relación de vector a inserto de 5 a 1, con la cual se esperaba una buena eficiencia de ligamiento (Sambrook *et al.*, 1989). Después de incubar a 16°C por dos días se usaron 1, 3 y 5 μ l del ligamiento para la transformación, utilizando células competentes (*E. coli* DH5 α), y con una eficiencia de 8x10⁶ UFC por microgramo de DNA del plásmido. Después de incubar las células transformadas en medio SOC y sembrar alícuotas de 25, 50 y 100 μ l en cajas LB agar-ampicilina/X-Gal-IPTG e incubar a 37°C por 16 horas se hizo el conteo de colonias blancas y azules en cada caja. El promedio de colonias blancas (células con plásmidos recombinantes) fue de 20%. Esta baja eficiencia de colonias blancas pudo deberse a trazas del vector no linearizado ó no defosforilado no detectables por electroforesis.

Con esta eficiencia de plásmidos recombinantes sería posible obtener una librería de cDNA de 1.520 clones a partir de los 10 μ l de reacción de ligación, lo cual no es tan bajo si estos clones van a ser usados para mapeo. Sin embargo, para aislar genes de interés usando sondas heterólogas o sondas construídas a partir del producto génico se requieren librerías de cDNA de alrededor de 5x10⁵ clones para tener mayor probabilidad de que el gen de interés esté presente.

Caracterización de los clones de cDNA

De 220 colonias blancas evaluadas solamente 93 (42%) presentaron inserto. Una de las causas podría haber sido la presencia de una pequeña fracción de dímeros de adaptadores no completamente eliminados durante el fraccionamiento por Sephacryl S-400, los cuales se ligaron al vector más eficientemente que los cDNAs. Otra posible explicación es la pérdida de α -complementación de vectores religados por daños en el gene lac z. Los 93 clones útiles de cDNA presentaron insertos entre 400-600 pares de bases (Figura 3C). La obtención de estos insertos relativamente pequeños se puede explicar por la

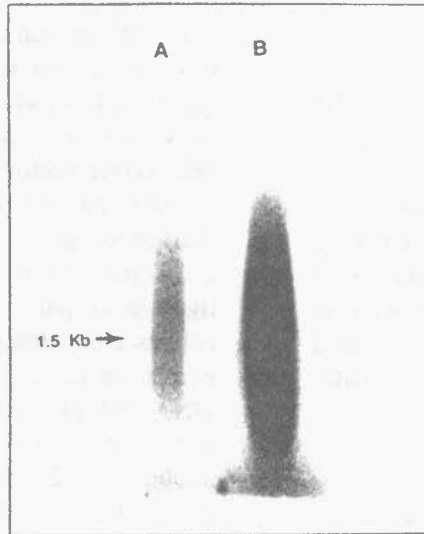


Figura 3A. Autorradiografía del cDNA marcado con ^{32}P durante la síntesis de la segunda cadena mostrando un tamaño promedio de 1.5 kb (A) 1 μl de la síntesis. (B) 3 μl de la síntesis.

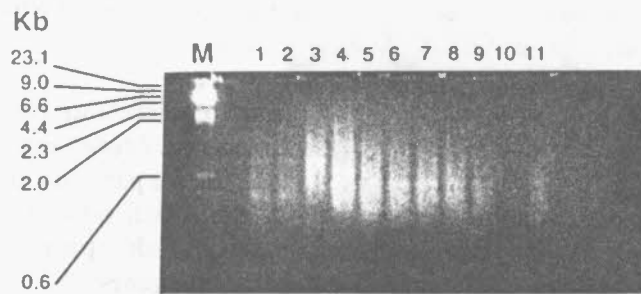


Figura 3B. Electroforegrama del cDNA amplificado por PCR en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. M= marcador de tamaños moleculares. 1-11, fracciones de cDNA provenientes de la columna se Sephacryl S-400 después de la amplificación.

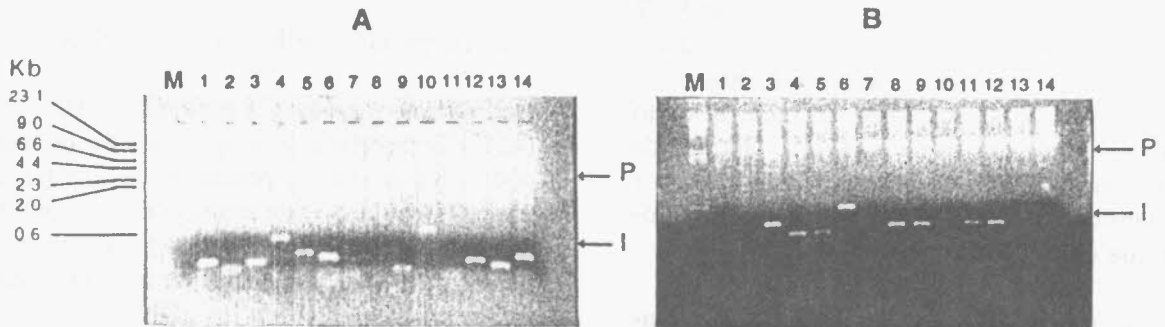


Figura 3C. Electroforegramas de diferentes clones de cDNA en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. M= marcador de tamaños moleculares. P= vector linealizado. I= insertos de diferentes tamaños. (A-B), 1-14 clones de cDNA tomados al azar de la librería.

amplificación de los cDNAs por PCR, ya que por la cinética de este proceso, los fragmentos pequeños se amplifican con mayor eficiencia que los grandes.

GRADO DE REPETICION Y POLIMORFISMO DE LOS CLONES

De los 93 clones útiles, 64 fueron usados como

sondas para hibridizar filtros de DNA genómico de seis variedades de fríjol digerido con las siguientes enzimas de restricción: EcoRI, EcoRV, HindIII y DraI, seleccionadas por Vallejos *et al.*, (1992). Los 64 clones se clasificaron en 25 grupos de patrones de hibridización (Cuadro 1). Los grupos 3 y 4 presentaron el mayor número de clones con el mismo patrón de hibridización (11 y 8, respectivamente).

CUADRO 1. Clasificación de 64 clones de cDNA en 25 grupos con base en la semejanza de los patrones de hibridización.

Grupo	Clones dentro de cada grupo	Número de clones	%
1	75*,97/101*/137*,148	5	7.8
2	38,52,152,167,186*/149*	6	9.4
3	54,62,66,82,84,197,214,216*/10*,91/190*	11	17.2
4	14,22,23.26,59,60,67,210*	8	12.5
5	18	1	1.6
6	15,21*/17*	3	4.7
7	25	1	1.6
8	150	1	1.6
9	1,73*/6*	3	4.7
10	3*,5	2	3.1
11	179	1	1.6
12	122	1	1.6
13	4	1	1.6
14	90*,121/170*	3	4.7
15	120*/172*	2	3.1
16	143*,165	2	3.1
17	19,85,94*	3	4.7
18	154,156*	2	3.1
19	162	1	1.6
20	80*/13*	2	3.1
21	175	1	1.6
22	163	1	1.6
23	173	1	1.6
24	135	1	1.6
25	158	1	1.6

* Clon(es) representativos dentro de cada grupo.

De los 25 clones con patrones únicos, 20 (80%) fueron de secuencias única y 5 (20%) de secuencias de bajo número de copias (Figura 4) (Cuadro 2), resultados que concuerdan con los datos

de Tanksley *et al.*, (1988) para tomate (60% de clones de copia única) y de Havey y Muehlbauer, (1989) para lenteja (88% de clones de cDNA de bajo número de copias).

CUADRO 2. Evaluación del número de copias de los 25 clones con patrones únicos de hibridización.

Grupo	Clon representativo	Tipo de secuencia			
		Mayor número de bandas en cualquiera de las enzimas	Menor número de bandas en cualquiera de las enzimas	Copia única (1-2 bandas)	Bajo número de copias (3-10 bandas)
1	75	7	3		X
2	186	6	1	X	
3	216	7	1	X	
4	210	6	1	X	
5	18	2	1	X	
6	21	2	1	X	
7	25	5	1	X	
8	150	7	1	X	
9	73	6	3		X
10	3	6	2	X	
11	179	12	1	X	
12	122	5	4		X
13	4	5	3		X
14	170	4	1	X	
15	172	3	2	X	
16	143	4	2	X	
17	94	1	1	X	
18	156	2	1	X	
19	162	5	3		X
20	80	2	1	X	
21	175	1	1	X	
22	163	6	2	X	
23	173	2	1	X	
24	135	1	1	X	
25	158	5	2	X	

Resúmen:

Tipo de secuencia	Cantidad	Porcentaje
Copia única	20/25	80
Bajo número de copias	5/25	20

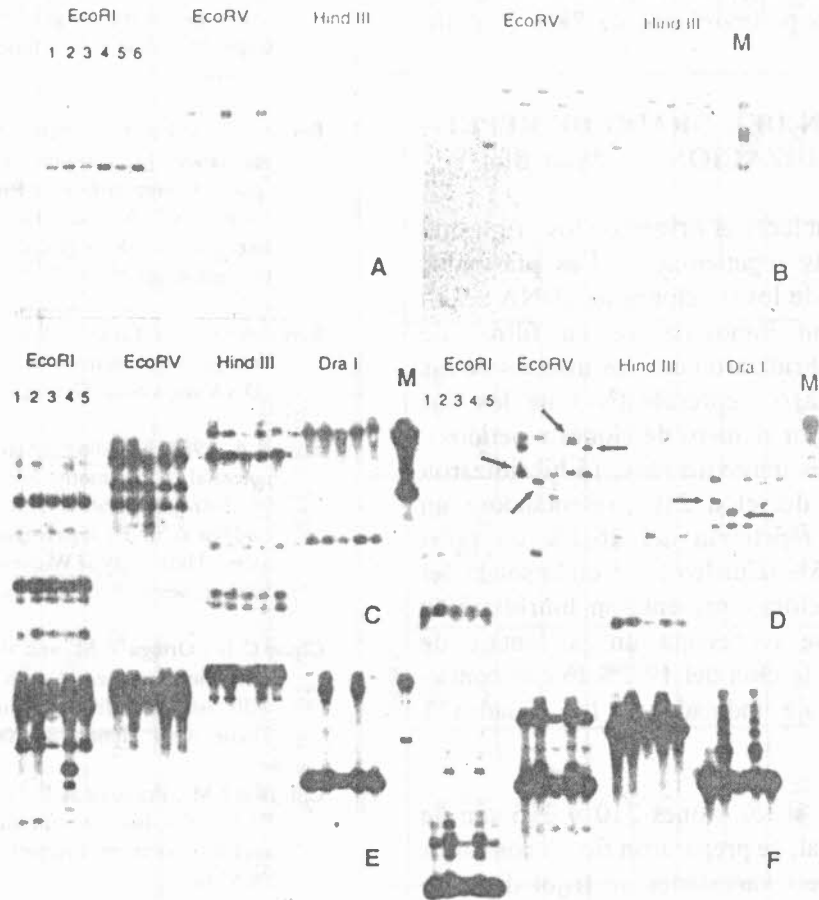


Figura 4. Autorradiografías de filtros con DNA genómico de los parentales analizados e hibridizados con distintos clones de cDNA. 1 = Calima, 2 = XR-235-1-1, 3 = DOR60, 4 = APN18, 5 = Ica Pijao 6 = G12952. M = Marcador de tamaños moleculares. (A,B) clones de copia única. No polimórfico en (A) y polimórfico en (B). (C a F) clones de copias medianamente repetitivas. Poco polimórfico en (C) y altamente polimórficos con algunas enzimas de restricción en (D, E y F).

Los clones presentaron mayor polimorfismo en digestiones con EcoRV, (77%), seguida de DraI (74%), EcoRI (63%) y HindIII (60%) (Cuadro 3). La pareja de parentales que presentó mayor polimorfismo con las endonucleasas EcoRI y EcoRV fue DOR60 y APN 18 con 57% y 71% respectivamente, mientras que con HindIII la pareja más polimórfica fue Calima y XR-235-1-1 con 40% y con DraI fue la pareja Ica Pijao y G12952 con un polimorfismo de 78% (Cuadro 4).

EVALUACION DEL GRADO DE REPETICION (HIBRIDIZACION EN "Slot Blot")

Se trató de establecer el origen de los grupos de clones con más repeticiones. Los plásmidos recombinantes de los 93 clones de cDNA seleccionados fueron inmovilizados en filtros de nylon que se hibridizaron con los insertos de los clones 210 y 216 (representativos de los dos grupos con mayor número de clones repetidos). De los 93 clones inmovilizados, 15 hibridizaron con el inserto del clon 210 presentándose un porcentaje de repetición del 16.1% un poco superior al 12.5% (Cuadro 1). Con la sonda del clon 216, 16 clones presentaron hibridización positiva lo que representa un porcentaje de repetición de este clon del 17.2% lo que confirma el porcentaje indicado en la Cuadro 1 (Figura 5).

Para investigar si los clones 210 y 216 son de origen ribosomal, se prepararon filtros con DNA genómico de seis variedades de fríjol digerido con la endonucleasa HaeIII (Rogstad *et al.*, 1988; Jeffreys *et al.*, 1988). Los filtros se hibridizaron con los clones 210, 216 y el clon ribosomal de soya pGmr1 que contiene una unidad repetitiva de DNA ribosomal (rDNA) con un tamaño de mas de 8 kilobases (Zimmer *et al.*, 1988).

La Figura 6 muestra los resultados de la hibridización de estos tres clones y se observa la similitud de los patrones de hibridización de los clones 210 y pGmr1 en las regiones a, b y c, mientras que el patrón de hibridización del clon 216 es diferente. Para confirmar el origen ribosomal del inserto del clon 210, este puede

ser secuenciando y comparar su secuencia con las secuencias de DNAs que codifican para γ RNA disponibles en bases de datos accesibles a través de programas de computador especializados.

BIBLIOGRAFIA

- Aviv H. and Leder P. 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo-thymidilic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:1408.
- Beebe S.E. y Pastor-Corrales, M.A. 1991. Breeding for resistance. In: Schoonhoven, A. van and Voyses, O. (eds.). *Common Beans: Research for crop Improvement*. C.A.B. International, Wallingford, U.K.; Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia. pp.561-617.
- Bernatzky R. and Tanksley S.D. 1986. Toward a saturated linkage map in tomato based in isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112:887-898.
- Bliss F.A. 1984. Breeding for enhanced dinitrogen fixation potential of commomn bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Nitrogen fixation and CO₂ metabolism. P.W. Ludden and J.E. Burris (eds.) *Proc. 14th. Steenbock Symp. University of Winsconsin, Madison, June 17-22 1984*. Elsevier Sci. Publ. New York. pp.303-310.
- Chase C.D., Ortega V.M. and Vallejos C.E. 1991. DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 81:806-811.
- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J. and Rutter W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18:5294
- Chomczynsky P. and Sacchi N. 1987. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162: 150-159.
- CIAT. 1991. *Bean Program, Annual Report 1990*. Cali, Colombia. pp.185-206
- Debouck D.G. and Tohme J. 1988. Implicaciones que tienen los estudios sobre los órganos del fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para los mejoradores de fríjol. En: *Temas actuales en mejoramiento genético del fríjol común*. Beebe, s. (ed.). *Memorias del Taller Internacional de Mejoramiento Genético de Fríjol*. 7-12 Noviembre, 1988. CIAT, Cali, Colombia. Documento de trabajo No. 47. pp.3-44.

CUADRO 3. Resumen de la evaluación de los patrones de hibridación de los 35 clones representativos de los 25 grupos y 10 subgrupos presentados en la Tabla 1, entre los 6 parentales seleccionados utilizando las enzimas de restricción EcoRI, EcoRV, HindIII y DraI.

	EcoRI		EcoRV		HindIII		DraI	
++	9/35	25.7%	6/35	17.1%	1/35	2.8%	2/19	10.5%
+	7/35	20.0%	16/35	45.7%	4/35	11.4%	6/19	31.5%
±	6/35	17.1%	5/35	14.2%	16/35	45.7%	6/19	31.5%
-	13/35	37.1%	8/35	22.8%	14/35	40.0%	5/19	26.3%
Polim.	22/35	63.0%	27/35	77.0%	21/35	60.0%	14/19	73.0%

CUADRO 4. Resumen de la evaluación del polimorfismo de los 35 clones representativos de los 25 grupos y 10 subgrupos presentados en la Tabla 1, entre los 3 pares de parentales seleccionados.

	EcoRI			EcoRV			HindIII			DraI		
	Calima XR-235-1-1	Ica Pijao G12952	Calima XR-235-1-1	DOR60 X APN18	Ica Pijao G12952	Calima XR-235-1-1	Calima XR-235-1-1	DOR60 X APN18	Ica Pijao G12952	Calima XR-235-1-1	DOR60 X APN18	Ica Pijao G12952
++	10	0	9	8	4	3	3	0	0	5	2	0
+	4	2	7	9	5	4	4	4	3	6	6	5
±	1	6	3	8	3	7	7	8	5	2	3	2
-	17	16	15	9	12	21	21	23	17	6	8	2
o	3	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
NR	0	9	0	0	10	0	0	0	10	16	16	26
NR	15/35	8/26	19/35	25/35	12/25	14/35	14/35	12/35	8/25	13/19	11/19	7/9
Polim.	42.8%	30.8%	54.3%	71.4%	48%	40.0%	40.0%	34.3%	32.0%	68.4%	57.9%	77.7%

++ Polimorfismo de patrones fuertes
 + Polimorfismo de patrones moderados
 ± Polimorfismo de patrones débiles
 - Ausencia de polimorfismo
 NR No realizado
 o Ausencia de bandas



Figura 5A. Autorradiografías de "Slot blots" de 93 clones de cDNA hibridizados con los insertos de: (A) clon 210 y (B) clon 216.

	1	2	3	4	5	6
A	1	3	4	5	6	10
B	12	13	14	15	17	18
C	19	20	21	22	23	25
D	26	28	38	46	48	49
E	52	53	54	55	56	59
F	60	62	64	66	67	71
G	73	75	80	81	82	84
H	85	86	88	90	91	94

	1	2	3	4	5	6
A	95	97	101	120	121	122
B	135	137	143	148	149	150
C	152	154	156	158	162	163
D	165	167	170	172	173	175
E	179	186	188	190	191	192
F	193	194	196	197	199	202
G	203	204	205	207	209	210
H	212	214	216		pGmr1	

Figura 5B. Posición de los clones de la prueba del "Slot Blot" mostrado en la figura 5A.

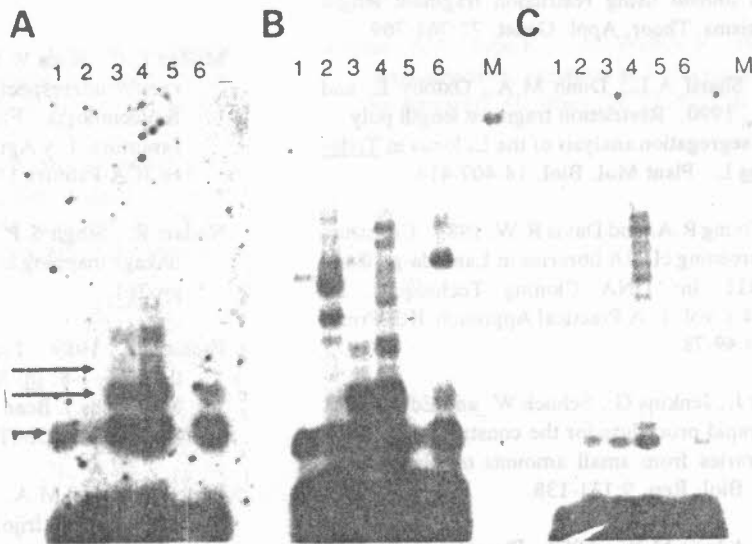


Figura 6. Autorradiografía de DNA genómico de 6 materiales de fríjol digeridos con *Hae*III e hibridizados con: (A) el clon 210, (B) el clon ribosomal de soya pGmr1 y (C) el clon 216. 1 = Calima, 2 = XR-235-1-1, 3 = DOR60, 4 = APN18, 5 = Ica Pijao, 6 = G12952 M = Marcador de tamaños moleculares.

- Gepts P. and Debouck D. 1991. Origin, Domestication, and Evolution of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Common Beans: Research for Crop Improvement. van Schoonhoven, A. and Voysest, O. (eds.). C.A.B. International, Wallingford, U. K.; Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali, Colombia. pp.7-53.
- Gubler U. and Hoffman B.J. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:26
- Hanahan D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning, a practical approach. Glover, D.M. (ed.). vol. 1. IRL Press, Oxford, pp.109-135.
- Havey M.J. and Muehlbauer F.J. 1989. Linkages between restriction fragment length, isozyme, and morphological markers in lentil. *Theor. Appl. Genet.* 77:395-401.
- Helentjaris T., Slocum M., Wright S., Schaffer A. and Nienhuis J. 1987. Construction of linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72:761-769.
- Hughes M.A., Sharif A.L., Dunn M.A., Oxtoby E. and Pancoro A. 1990. Restriction fragment length polymorphism segregation analysis of the Li locus in *Trifolium repens* L. *Plant Mol. Biol.* 14:407-414.
- Huynh T.V., Young R.A. and Davis R.W. 1984. Constructing and screening cDNA libraries in Lambda-gt10 and Lambda-gt11. In: DNA Cloning Techniques. D. Glover, (ed.). vol. 1: A Practical Approach. IRL Press, Oxford. pp.49-78.
- Jepson I., Bray J., Jenkins G., Schuch W. and Edwards K. 1991. A rapid procedure for the construction of PCR cDNA libraries from small amounts of plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:131-138.
- Kelly J.D. and Adams M.W. 1987. Phenotypic recurrent selection in ideotype of pinto beans. *Euphytica* 36:69-80.
- Kirby K.S. 1968. Isolation of nucleic acids with phenolic solvents. *Meth. Enzymol.* 12B:87.
- Kornegay J. and Cardona C. 1991. Breeding for Resistance in Beans. In: Common Beans: Research for Improvement. Van Schoonhoven, A. and Voysest, O. (eds.). C.A.B. International, Wallingford, K.; Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali, Colombia. pp. 619-648.
- Laing D.R., Jones P.R. and Davis J.C. 1984. Common Bean. In: The Physiology of Tropical Field Crops. Goldsworthy, P.R. and Fisher, N.M. (eds.). Wiley, New York. pp.305-351.
- Landry B.S., Kessely R.V., Farrara B., Michelmore R.W. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116:331-337.
- Logemann J., Schell J. and Willmitzer L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163:16-20.
- McCouch S.R., Kochert G., Yu Z.H., Wang Z.Y., Khush G.S., Coffman W.R. and Tanksley S.D. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815-829.
- Mok D. W. and Rabakoarihanta L.A. 1978. Interspecific hybridization of *P. vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius*. *Theor. Appl. Genet.* 52:209-215.
- Mullis K.B. and Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymology* 155:335-350.
- Muñoz L.C., Roca W.M. and Marquet A. 1990. Hibridación interespecífica en *Phaseolus*. En: La nueva Biotecnología, Fundamentos, Usos y Perspectivas. Jaramillo, J. y Agudelo, O. (eds.). Seminario realizado en ICA-Palmira 15-26 de Mayo, 1989. pp.101-106.
- Nodari R., Singh S.P. and Gepts P. 1990. RFLPs and linkage mapping in common bean. *Agronomy abstracts* pp.201.
- Pachico D. 1989. Trends in world common bean production. pp. 1-8. In: Schwartz, H.F. and Pastor-Corrales, M.A. (eds.). Bean Production Problems in the Tropics. 2nd Edition. CIAT, Cali, Colombia.
- Pastor-Corrales M.A. 1985. Conceptos básicos sobre patología de fríjol. 145-155. En: Lopez, M.; Fernández, F. y van Schoonhoven, A. (eds.). Fríjol: Investigación y Producción. PNUD/CIAT, Cali, Colombia.
- Roca W.M. 1990. La nueva biotecnología: Aplicaciones en la agricultura de los países en desarrollo. En: Jaramillo J. y Agudelo O. (eds.). La nueva Biotecnología, Fundamentos, Usos y Perspectivas. Seminario realizado en ICA-Palmira,, 15-26 de Mayo, 1989. pp. 1-11.
- Roca W.M. y Mroginski L.A. (eds.). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. 969p.

- Rogstad S.H., Patton II J.C. and Schaal B.A. 1988. M13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:9176-9178.
- Rosen M.K. and Villa-Komaroff L. 1990. An alternative method for the visualization of RNA in formaldehyde agarose gels. *Focus* 12:23-24.
- Sambrook J. Frisch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Singh S.P. and Gutiérrez A. 1984. Geographical distribution of the DL₁ and DL₂ genes causing hybrid dwarfism in *Phaseolus vulgaris* L. Their association with seed size, and their significance to breeding. *Euphytica* 33:337-345.
- Smartt J. 1970. Interspecific hybridization between cultivated American species of the genus *Phaseolus*. *Euphytica*. 19(4):480-489.
- Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98(23):503-517.
- Sprecher S.L. 1988. Allozyme differentiation between gene pools in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with special reference to Malawian germplasm. Ph.D. Dissertation, Michigan State University, East Lansing, MI. 207p.
- Tanksley S.D., Miller J.C., Paterson A.H. and Bernatzky R. 1988. Molecular mapping of plant chromosomes, In: *Proceedings of the 18th. statler genetics symposium*, (J.P. Gustafson, ed.). Plenum Press, New York. pp.157-173.
- Vallejos C.E., Sakiyama N.S. and Chase C.D. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics*, 131:733-740.
- Vieira J. and Messing J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259.
- Voysest O. 1983. *Varietades de fríjol en América Latina y su origen*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Cali, Colombia. 87p.
- Winnacker E.L. 1987. *From genes to clones: Introduction to gene technology*. VCH Publishers, New York. pp.32-53.
- Zimmer E.A., Jupe E.R. and Walbot V. 1988. Ribosomal gene structure, variation and inheritance in maize and its ancestors. *Genetics* 120:1125-1136.