

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL GENOMA CLOROPLÁSTICO (cpADN) DEL CAFÉ *Coffea arabica* L. cv. Caturra¹

Nelma M. Sánchez-Krieger*, Jorge E. Mayer**, Eugenio Andrade***, Néstor M. Riaño-H.****

RESUMEN

SANCHEZ K., N.M.; MAYER J.E.; ANDRADE E.; RIAÑO H, N.M. Aislamiento y caracterización del genoma cloroplástico (cpADN) del café *Coffea arabica* L. cv. Caturra. *Cenicafé* 51(3):177-184. 2000.

Se desarrolló una metodología para la extracción del ADN cloroplástico (cpADN) de café *Coffea arabica* L. c.v. Caturra utilizando altas concentraciones de antioxidantes (β -mercaptoetanol y PVP-40) en el buffer de extracción para evitar la producción de polifenoles en la muestra. La purificación de los cloroplastos se realizó en un gradiente discontinuo de sacarosa 30%-50% y la purificación del cpADN mediante el método de Sambrook *et al.*, (1982), con un rendimiento de 60ng de cpADN g⁻¹(pf). El análisis de restricción luego de la digestión del cpADN con *Sal I*, *Xho I* y *Pst I* permite estimar un tamaño del cpADN de *C. arabica* L. c.v. Caturra de ~131Kb. La comparación del patrón de restricción del cpADN de *C. arabica* L. c.v. Caturra con el de dos poblaciones de *C. arabica* L. silvestres de Etiopía exhibe una variación en la longitud de los fragmentos de restricción que puede ser útil en estudios filogenéticos. La hibridación de los fragmentos de restricción obtenidos por digestión del cpADN de la variedad Caturra con *Pst I* permitió establecer la presencia del gene *rbcL* en un fragmento de ~2,4Kb. Se construyó una librería de cpADN de la variedad Caturra clonando los fragmentos de restricción en *E. coli* JM105.

Palabras claves: ADN cloroplástico, café, *Coffea arabica* L., análisis de restricción, librería genómica.

ABSTRACT

A methodology for chloroplastic DNA (cpDNA) extraction from coffee *Coffea arabica* L. cv. Caturra was developed using high concentrations of antioxidants (β -mercaptoethanol and PVP-40) in the extraction buffer to avoid production of polyphenol in samples. Purification of chloroplasts was achieved in a discontinuous 30-50% sucrose gradient, and cpDNA was purified according to Sambrook *et al.* (1982), producing [60 ng(cpDNA)g⁻¹(fw)]. Restriction analysis after digestion of cpDNA with *Sal I*, *Xho I* and *Pst I* allowed estimating the size of *C. arabica* L. cv. Caturra cpDNA to be X131 Kb. Comparison of the restriction pattern of *C. arabica* cv. Caturra cpDNA with that of two wild populations of *C. arabica* L. from Ethiopia showed a variation in the length of the restriction fragments that could be useful for phylogenetic studies. Hybridization of the restriction fragments obtained by digestion of cpDNA from cv. Caturra with *Pst I* allowed establishing the presence of gene *rbcL* in a X2.4 Kb fragment. A cpDNA library of *C. arabica* cv. Caturra was built by cloning restriction fragments in *E. coli* JM105.

Keywords: Chloroplastic DNA, coffee, *Coffea arabica* L., restriction analysis, genomic library.

1 Fragmento de tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencias, Bioquímica, de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

* Microbióloga, M.Sc en Bioquímica.

** Senior Staff, laboratorio de bioquímica molecular, CAMBIA, Canberra, Australia.

*** Profesor asociado, Facultad de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

**** Asistente de Investigación. Fisiología Vegetal. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

Los cloroplastos son organelos de la célula vegetal donde se realiza el proceso fotosintético. Estos poseen su propio ADN el cual es diferente del ADN nuclear en varios aspectos (3) y conjuntamente con el ADN mitocondrial (*mtADN*), son responsables de la herencia citoplásmica o maternal. El *cpADN* es una molécula circular de doble cadena con un tamaño entre 120 y 160Kb. A pesar de las diferencias en tamaño, su contenido genético y organización general son muy similares aún entre especies filogenéticamente muy distantes (8), que pueden exhibir una homología mayor del 30% en sus secuencias de nucleótidos, lo cual indica un alto grado de conservación (8, 9). La comparación del *cpADN* de nueve genotipos de café (*C. arabica*, *C. eugenioides*, *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica*, *C. excelsa*, *C. arabusta*, *Paracoffea ebracteolata* y "*nana*" taxon) por medio de marcadores moleculares (RFLP) ha permitido establecer información acerca de la filogenia del café, según Berthou *et al.*, (1). El objetivo del presente estudio fue el de contribuir a la caracterización del genoma cloroplástico (*cpADN*) del café *Coffea arabica* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de los cloroplastos. Se utilizaron hojas jóvenes etioladas de plantas de café *Coffea arabica* L. cv. Caturra, de seis meses de edad que se colocaron en oscuridad durante 5 días. Se homogeneizaron 100g de tejido foliar en una licuadora Osterizer modificada, reemplazando las aspas convencionales con hojas de bisturí No. 10, en presencia de un buffer de extracción que contenía Tris-HCl 0,05M, pH=8,0; 0,35M sorbitol; 0,0005MEDTA; 0,1% BSA (p/v); 1,25M a 2 40 2 5 β -mercaptoetanol (v/v) (2, 5), los dos últimos reactivos adicionados justo antes de ser utilizado el buffer. El tejido foliar homogeneizado se filtró en cuatro capas de gasa y dos de muselina y se centrifugó a 2.000 x g durante 10min a 4°C. Se hizo enton-

ces una resuspensión del precipitado lentamente, en buffer de lavado Tris-HCl 0,05M, de pH=8,0; 0,35M sorbitol; 0,02M EDTA y se centrifugó a 2000 x g a 4°C durante 10min.

El proceso se repitió tres veces, luego de lo cual el precipitado se resuspendió en 10ml del buffer de lavado y se sometió a un gradiente de sacarosa 30%-50% preparado en Tris-HCl 0,05M, pH=8,0; 0,025M EDTA, a 120000 x g a 4°C durante 60min en una ultracentrífuga Beckman LB-70M. La interfase con los cloroplastos fué extraída con una pipeta Pasteur sin punta y luego los cloroplastos se resuspendieron en 4 volúmenes de buffer de lavado y se centrifugó a 8000 x g por 15min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 6ml de buffer TE pH=8,0.

Extracción del *cpADN*. A la suspensión de cloroplastos se le agregó un 25% (v/v) de sarkosyl del 10% y un volumen de fenol equilibrado con Tris-HCl 0,05M pH=8,0. Se agitó suavemente durante 1 hora, a la temperatura ambiente y se centrifugó a 3400 x g durante 10min. A la fase acuosa se le agregó 1 volumen de fenol: cloroformo 1:1 (fenol/Tris-HCl 0,05M; pH=8,0), se agitó suavemente durante 30min a temperatura ambiente y se centrifugó a 3400 x g durante 10min. Luego se agregó un 10% (v/v) de acetato de sodio 3 M; pH=5,5 y 2,5 volúmenes de etanol y se incubó durante toda una noche a -20°C. La suspensión se centrifugó a 10000 x g durante 20min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 60 μ l TE, pH=8,0, al cual se agregaron 5 μ l de RNasa A (10 mg mL⁻¹) y se incubó durante 2 horas a 37°C. La pureza del *cpADN* extraído se determinó espectrofotométricamente a 230-320nm, y la integridad se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa del 0,6-0,8% en buffer TBE.

Mapeo de restricción Se hizo la digestión del *cpADN* obtenido con *Bam HI*, *Eco RI*, *Kpn I*, *Pst I*, *Pvu II*, *Sal I*, *Sst I*, *Xho I*, *Hae III* y *Hinf I* y los fragmentos se separaron electroforé-

ticamente en geles de agarosa del 0,6% a 2,5 Volt cm^{-1} durante 16 horas. Los fragmentos producidos por la digestión con *Sma I* y *Xba I* se separaron en geles del 0,8% a 6 Volt cm^{-1} durante 2 horas. Los tamaños de los fragmentos se obtuvieron por comparación con los tamaños de los marcadores λ -*Hind III*, 1-*Eco RI*, 1Kb Ladder (Gibco-BRL) y HMW (Gibco-BRL). Para construir el mapa físico de restricción se realizaron digestiones dobles con *Pst I*, *Sal I* y *Xho I* y se compararon con los resultados de las digestiones simples.

Construcción de la librería genómica de cpADN Los fragmentos de restricción se insertaron en el vector pBluescript II KS +/- de Stratagene digerido con *Eco RI*, defosforilados con fosfatasa alcalina de Promega y clonados en *E. coli* JM105 mediante choque osmótico con CaCl_2 . Se sembraron 50 μl de las células competentes en medio LB sólido con 40 μg ampicilina ml^{-1} y se incubaron a 37°C durante 18 horas, para obtener crecimiento bacteriano. La selección de transformantes se realizó utilizando IPTG y X-gal en medio sólido y 30 de las colonias transformadas seleccionadas al azar se utilizaron para realizar minipreparaciones de los fragmentos insertados (7). La identificación del ácido nucleico extraído como cpADN se logró hibridando una sonda heteróloga *rbcL* (subunidad grande de RuBPCO) de *Nicotiana tabacum* (suministrada por el Dr. A. Gaitán, proyecto Cenicafé - U. de Cornell) con los fragmentos de

restricción obtenidos por digestión del cpADN de café con *Pst I*, *Sal I* y *Xho I*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron en promedio 6 μg de cpADN por cada 100g de tejido foliar [60ng (cpADN). g^{-1} (pf)], lo cual es menor que la cantidad obtenida por Palmer (6), [0,2 a 10 μg (cpADN). g^{-1} (pf)] en más de 100 especies de angiospermas, gimnospermas y pteridofitas utilizando un doble gradiente de CsCl_2 -bromuro de etidio. Las bajas cantidades de cpADN obtenidas pueden explicarse por la pérdida de cloroplastos durante el proceso de homogeneización, y porque durante la lisis de los organelos utilizando solventes orgánicos se afecta el cpADN asociado estrechamente a las membranas cloroplásticas. Además, se liberan nucleasas endógenas que degradan los ácidos nucleicos (8). La relación A_{260}/A_{280} obtenida en promedio de 14 extracciones fue de 1,74. La Figura 1 muestra el espectro del cpADN obtenido en el rango 220-320nm, en el que se evidencia el buen grado de pureza logrado mediante el protocolo descrito anteriormente. Una prueba más concluyente sobre la pureza e integridad del cpADN aislado se obtuvo con las electroforesis del cpADN digerido con *Sma I* en donde la ausencia de barridos indica que no hay contaminación con ADN nuclear degradado (Figura 2).

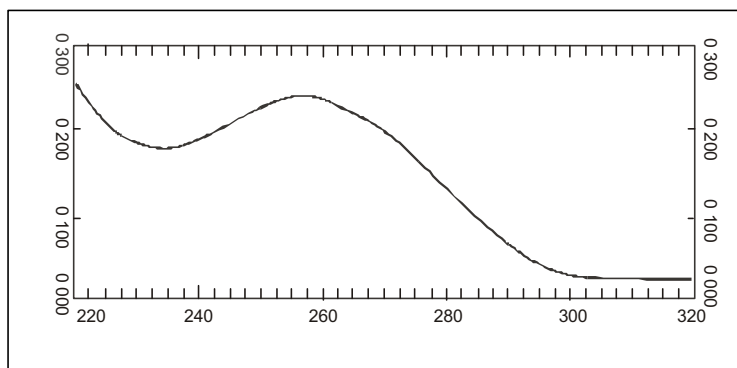


Figura 1. Espectro de absorción del cpADN de *Coffea arabica* L. cv. Caturra (220 - 320nm)

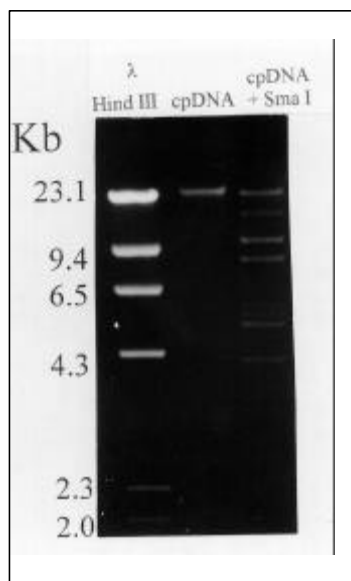


Figura 2. Electroforesis del cpADN de *Coffea arabica* L. cv. Caturra completo y digerido con *Sma I*. De izquierda a derecha: carril 1: λ -*Hind III*; carril 2: cpADN; 3: cpADN digerido con *Sma I*.

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa del cpADN obtenido, muestran consistentemente una banda de alto peso molecular con muy escasa degradación. La escasa resolución a altos pesos moleculares en esta electroforesis, permite sugerir que la banda próxima a la banda mayor de λ -*Hind III* (23,1Kb) corresponde a cpADN de *C. arabica* L. cv. Caturra (Figura 2). En la misma Figura, se presenta el patrón de restricción obtenido mediante digestión con *Sma I*. En la Tabla 1 se presentan los datos sobre el número de fragmentos obtenidos de la digestión del cpADN con diferentes enzimas de restricción y en los cuales se evidencia que el menor número de sitios de restricción del cpADN de *C. arabica* L. cv. Caturra se

obtiene por digestión con *Pst I*, *Sal I* y *Xho I*, lo cual permite escoger estas enzimas para el mapeo de restricción (Figura 3). La comparación de los patrones de restricción del cpADN de la variedad Caturra con los del cpADN de las poblaciones P8 y P36₂ de *Coffea arabica* L., aislados por Berthou *et al.* (1), (Figura 4), muestra alteración en los sitios de restricción del cpADN digerido con *Kpn I* y *Xho I*. Esta variación ha sido utilizada para estudios filogenéticos, a pesar de que en la mayoría de estudios con especies vegetales se observa una baja tasa de variación intraespecífica (4). La determinación de las longitudes de los fragmentos de restricción obtenidos con la digestión simple con *Pst I*, *Sal I* y *Xho I* permite estimar una longitud total promedia del cpADN de *C. arabica* L. cv. Caturra de 130,99Kb (Tabla 2).

Los resultados de la hibridación de la sonda heteróloga *rbcL* de tabaco con los fragmentos de restricción producidos por la digestión simple del cpADN con *Pst I*, *Sal I* y *Xho I* y la digestión doble con *Sal I*-*Xho I* muestran una señal nítida en las bandas de 16,6Kb de *Sal I* y de 26,5Kb de *Xho I* y en la banda de 16,6Kb en *Sal I*-*Xho I* que confirman la obtención de cpADN sin contaminación con ADN nuclear (Figura 5). La hibridación de los fragmentos de la digestión del cpADN con *Pst I* (señales en las bandas de 2,35 y 1,0Kb) con la sonda *rbcL*, permiten sugerir que hay un sitio de corte dentro del gene *rbcL* en el cpADN de *C. arabica* L. cv. Caturra (Figura 6).

Librería genómica de cpADN de *Coffea arabica* L. cv. Caturra. La eficiencia de trans-

TABLA 1. Número de fragmentos de cpDNA de *Coffea arabica* L. cv. Caturra cortados con endonucleasas de restricción.

Número de fragmentos	Endonucleasa de restricción
Más de 30	<i>Bam HI, Eco RI, Hae III, Hinf I</i>
14	<i>Sst I</i>
11	<i>Pst I, Pvu II, Xho I</i>
10	<i>Sma I</i>
7	<i>Kpn I</i>
5	<i>Sal I</i>

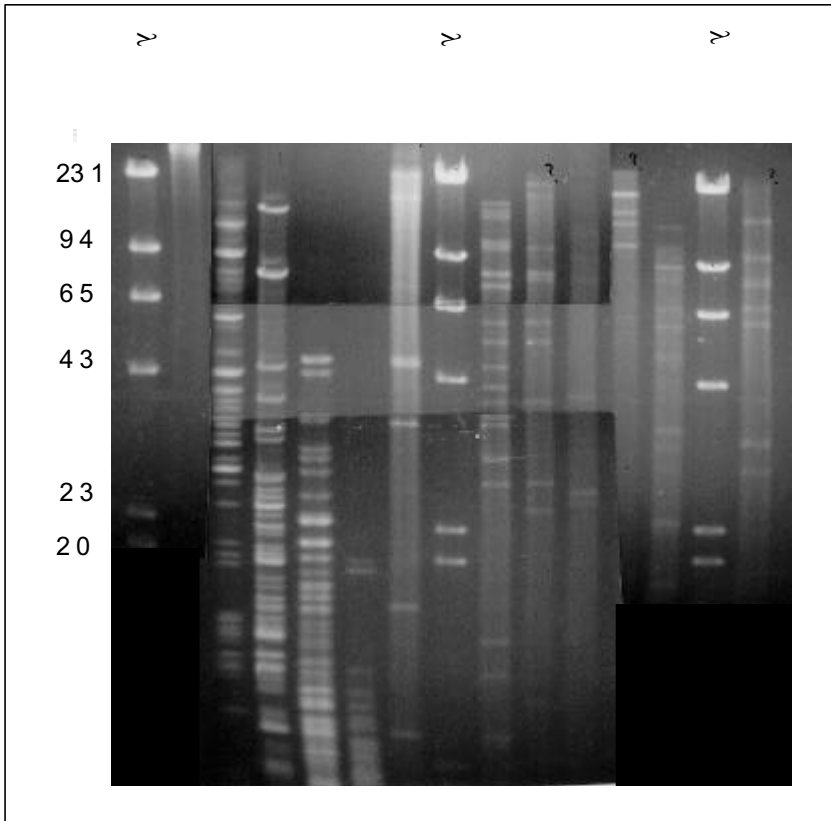


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (0,6%; 2,5Volts cm^{-1} , 16h) donde se visualiza el cpADN de *Coffea arabica* L. cv. Caturra digerido con varias enzimas de restricción. De izquierda a derecha : *l - Hind III*; cpADN de caturra; *Bam HI*; *Eco RI*; *Hae III*; *Hinf I*; *Kpn I*; *l - Hind III*; *KpnI / Pst I*; *Pst I*; *Pvu II*; *Sal I*; *Sst I*; *l - Hind III*; *Xho I*.

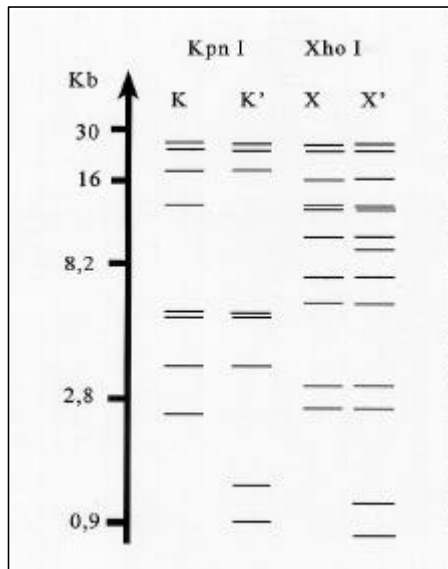


Figura 4. Esquema de las digestiones de cpADN con *Kpn I* y *Xho I*. K y X: cpADN de poblaciones de *C. arabica*, P8 y P36, (Berthou *et al.* (1); K' y X': cpADN de *C. arabica* L. cv. Caturra.

TABLA 2. Fragmentos obtenidos en digestiones simples de *cpDNA* de *Coffea arabica* L., cv. Caturra con las endonucleasas *Pst* I, *Sal* I y *Xho* I.

Numeración de los fragmentos	<i>Pst</i> I (Kb)	<i>Sal</i> I (Kb)	<i>Xho</i> I (Kb)
1	25,8	16,6(x2)	28,6
2	20,9(x2)	15,6(x2)	26,5
3	17,0	13,6(x2)	13,7(x2)
4	10,0	11,1(x2)	10,0(x2)
5	7,80(x2)	1,4	8,4(x2)
6	7,50		7,1
7	6,18		6,5
8	5,30		3,3
9	4,10		3,0
10	2,80	2,50	
TOTAL (Kb)	138,58	115,00	139,4
PROMEDIO (Kb)		130,99	

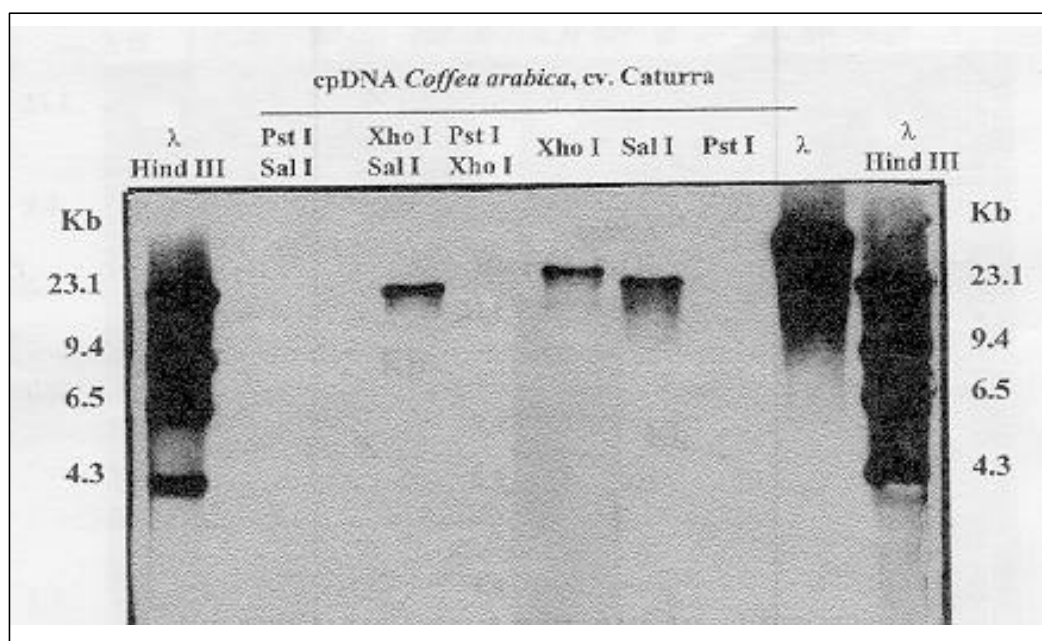


Figura 5. Resultado de la digestión sencilla y doble del *cpADN* de café *Coffea arabica* L. cv. Caturra, con las enzimas de restricción *Pst* I, *Sal* I, *Xho* I; e hibridado con *rbcL* de tabaco *Nicotiana tabacum*.

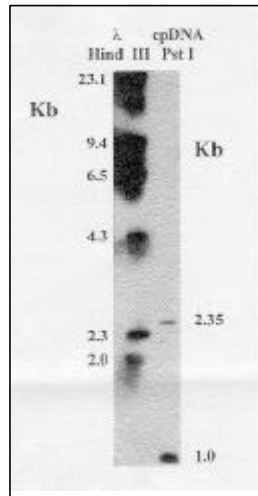


Figura 6 Resultado de la digestión del cpADN de café *Coffea arabica* L. cv. Caturra, con *Pst I* e hibridado con *rbcL* de tabaco *Nicotiana tabacum*. 1 - *Hind III* marcador de peso molecular.

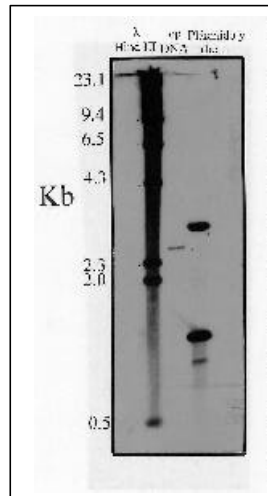


Figura 7 Resultado de la digestión de cpADN de café *Coffea arabica* L. cv. Caturra, con *EcoRI* e hibridado con *rbcL* de tabaco *Nicotiana tabacum*.

formación utilizando el plásmido pBluescript II KS +/- como vector fue de $[5,3 \times 10^6 \text{ (UFC)} \mu\text{g}^{-1} \text{ (ADN)}]$. Se considera que los valores mayores de $[1 \times 10^6 \text{ (UFC)} \mu\text{g}^{-1} \text{ (ADN)}]$ son eficientes. Los controles negativos en medio LB con $40 \mu\text{g}$ ampicilina ml^{-1} no mostraron crecimiento, lo cual puede interpretarse como ausencia de transformación. La disminución en la eficiencia de transformación $[3 \times 10^3 \text{ (UFC)} \mu\text{g}^{-1} \text{ (ADN)}]$ obtenida cuando se transformó *E. coli JM105* con $\sim 100\text{ng}$ de pBluescript II KS +/- cortado con *EcoRI*, defosforilado, autoligado y purificado con una columna Wizard de Promega, es un indicativo de una buena actividad de la fosfatasa. La mayoría de los fragmentos del cpADN obtenidos por digestión con *EcoRI* exhiben tamaños adecuados ($< 5\text{Kb}$) para la inserción en el vector, con excepción de dos fragmentos de 13,34 y 7,5Kb. La hibridación de los fragmentos con la sonda heteróloga *rbcL* de tabaco muestra que el gene de la subunidad grande de RuBPCO se halla localizado en un fragmento de $\sim 2,4\text{Kb}$ (Figura 7). Las minipreparaciones del plásmido de las 30 colonias seleccionadas aleatoriamente digeridas con *EcoRI* muestran que el 90% de las colonias portan insertos con un tamaño promedio de 900pb. La multiplicación de las bacterias transformadas utilizando $50 \mu\text{l}$ de inóculo arroja

1000 colonias de las cuales el 40% son transformadas, de estas el 90% exhiben insertos (360 colonias recombinantes). Si el tamaño del inserto es de 900pb se obtiene un total de 324Kb de cpADN clonadas. Con un tamaño estimado del cpADN de 130,1Kb, en $50 \mu\text{l}$ de la suspensión bacteriana se ha clonado 2,5 veces el genoma del cloroplasto y en $700 \mu\text{l}$ de suspensión bacteriana ~ 35 veces el cpADN de *Coffea arabica* L. cv. Caturra.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue llevada a cabo en el marco del proyecto 2251-07-002-93 patrocinado por COLCIENCIAS y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Los autores agradecen al Dr. Jeff Palmer de la Universidad de Indiana y al Dr. Alvaro Gaitán por el suministro de la sonda *rbcL*, Al Doctor Jaime E. Muñoz, Profesor Asociado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional, seccional Palmira, y al Dr. Yamel López F. por las correcciones, sugerencias y revisión final del artículo.

LITERATURA CITADA

1. BERTHOU, F.; MATHIEU, C.; VEDEL, F. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic in the genus *Coffea* L. *Theoretical and Applied Genetics* 65: 77-84. 1983.
2. BOOKJANS, G.; STUMMANN, B.M.; HENNINGSSEN, K.W. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids in a medium of high ionic strength. *Analytical Biochemistry* 141: 244-247. 1984.
3. GRIERSON, D.; COVEY, S.N. Plant molecular biology. 3th level Biology. 2 ed. London, Blackie and Son, 1988. 233p.
4. PALMER, J.D. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplasts DNA variation. *The American Naturalist* 130: 6-29. 1987.
5. PALMER, J.D. Isolation and structural analysis of chloroplasts DNA. *In*: WEISSBACK, A.; WEISSBACK, H. (Eds). *Methods in enzymology*. Vol. 118 Plant molecular biology. Orlando, Academic Press, 1986. p. 167-186.
6. PALMER, J.D. Physical and gene mapping of chloroplasts DNA from *Atriplex triangularis* and *Cucumis sativa*. *Nucleic Acids Research* 10: 1593-1605. 1982
7. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. p. 64 – 82.
8. SCHULER, M.A.; ZIELINSKY, R.E. *Methods in plant molecular biology*. Orlando, Academic Press, 1989. p. 71-87.
9. WHITFELD, P.R.; BOTTOMLEY, W. Organization and structure of chloroplasts genes. *Annual Review of Plant Physiology* 34: 279-310. 1983.