

## Trabajo de revisión

### Genes ribosomales en plantas

T.D. DINKOVA, M. RAMOS-LEAL y R.H. MARIBONA

Departamento de Bioplantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,  
Apartado 6990, La Habana 6, Cuba

Recibido en diciembre de 1989

Aprobado en septiembre de 1990

### INTRODUCCION

El estudio de los ARN ribosomales de las plantas superiores, en los últimos años ha estado dirigido principalmente al análisis del desarrollo evolutivo y filogenético (Hamby y Zimmer, 1988; Zimmer *et al.*, 1989; Springer *et al.*, 1989). La naturaleza conservadora de los genes ribosomales (Appels y Dvorak, 1982), así como el alto grado de homogeneidad entre las unidades repetitivas y la abundancia del ARN ribosomal en tejidos en crecimiento activo, hacen de estos genes sondas que facilitan la estrategia de trabajo para el conocimiento de la estructura del genoma.

No menos atractivo para el mejoramiento genético resulta el polimorfismo del espacio intergénico ribosomal (EIG), capaz de detectar precozmente las variaciones genéticas -detección que consume largos años en los programas de mejora.

Un grupo de evidencias señalan un rol al ADN ribosomal en la adaptación al estrés. Aunque lejos aún de conocerse la función de estos genes en la regulación de la expresión génica, su relación directa con la síntesis de proteínas nos plantea

posibilidades acerca de la existencia de un mecanismo génico de adaptación al estrés.

### ORGANIZACION DE LOS GENES RIBOSOMALES

En procariotes, los genes ribosomales se encuentran dispuestos en forma de operones que codifican en conjunto para los ARN 16S, 23S, 5S y ARN de transferencia (Freifelder, 1983). En estos organismos, muchos estudios están relacionados con la organización de los genes ribosomales, habiéndose realizado el mapeo genético de los operones de diferentes géneros bacterianos (Johnson y Harich, 1983; Jarvis *et al.*, 1988). A diferencia de los procariotes, en las plantas superiores los genes ribosomales se hallan dispuestos en tándems de unidades altamente repetitivas.

Dentro de los tándems, los genes 18S, 5,8S y 26S están agrupados y se transcriben como una sola unidad (figura 1a), mientras que los genes 5S se localizan en el genoma separados del resto de los ADNs ribosomales y también dispuestos en unidades repetitivas, siendo muy abundantes (figura 1b) (Zimmer *et al.*, 1988).

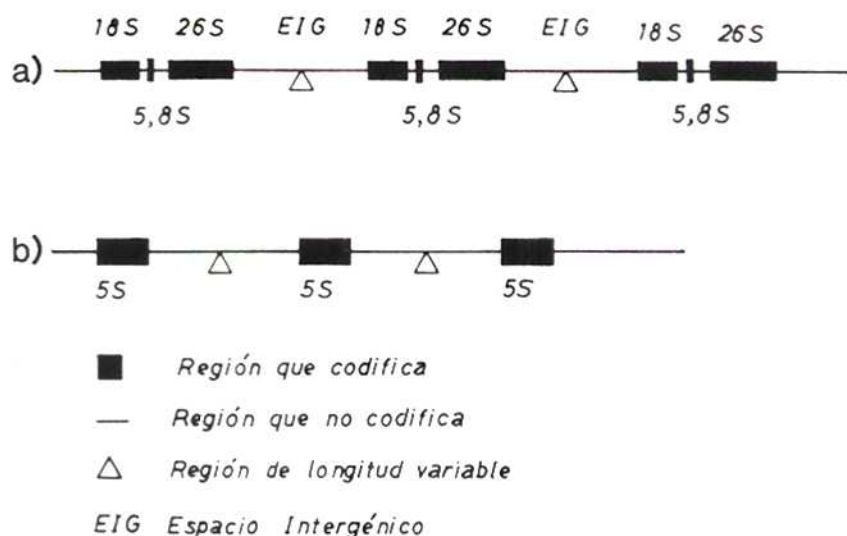


FIG. 1. Organización de los genes ribosomales en los organismos eucariotes: a) rADN 28S, 18S; b) rADN 5S.

Los genes ribosomales 18S - 26S se repiten en el genoma de las plantas más de 1 000 veces y están dispuestos en uno o varios organizadores nucleolares (tabla 1) (Ananiev y Chernichef, 1989).

Los diferentes organizadores nucleolares de un genoma contienen diferente cantidad de genes ribosomales, como por ejemplo, en el trigo (Appels *et al.*, 1980; Brettell *et al.*, 1986).

Tabla 1  
GENES RIBOSOMALES 18S - 26S DE PLANTAS

Planta estudiada	Tamaño del tándem	Número de copias	Localización cromosomal
<i>Triticum aestivum</i>	9,5	4 700	1B, 5D, 6B
<i>S. cereale</i>	9,0	3 000	1
<i>Hordeum vulgare</i>	9,5 y 10	3 600	6,7
<i>Cucurbita pepo</i>	10 y 11,5	3 400	
<i>Vicia faba</i>	7,2-13	2 000	cromosomas satélites
<i>Daucus carota</i>	11-11,5	1 600	
<i>Trillium sp.</i>	13,7 15,6 18,5	1 000 - 2 000	

Fuente: Tomado de "Organización del Genoma", Moscú, Ciencia, 1989, p. 222.

Los estudios realizados han permitido determinar la existencia entre el terminal 3' del gen 26S y el terminal 5' del gen 18S, de un espacio intergénico EIG altamente polimórfico (Rogers y Bendich, 1987b). Las posibles funciones de este EIG están aún por dilucidar.

En los ADN de los organismos superiores, además del mecanismo de amplificación, que es muy común para el genoma ribosomal de cloroplastos y mitocondrias (Bendich, 1987), se ha demostrado que existe una gran variabilidad en una serie de características: a) en el número de copias; b) en la longitud del EIG. Esto ocurre, tanto entre las diferentes especies, como dentro de una misma especie y de las variedades, pero en diferentes generaciones, incluso entre los diferentes tejidos de una planta (Rogers y Bendich, 1987b).

Las investigaciones demuestran que el cambio en el número de copias ocurre de forma rápida y que la mayoría de estas copias, aparentemente son innecesarias y superfluas, pudiendo ser funcionales o simplemente toleradas (Rogers y Bendich, 1987a).

La mayoría del ARN celular es ARN ribosomal. En el caso de organismos procariotes, la gran demanda de este material es proporcional a la velocidad de crecimiento y a la necesidad de síntesis proteica. Aunque en los organismos superiores este mecanismo no ha sido plenamente confirmado, lo más posible es que también ocurra. Ha sido demostrado que el alto número de copias para los genes ribosomales presente en las plantas, se debe a una alta velocidad de recombinación en la zona del ADN ribosomal (Rogers y Bendich, 1988). Sin embargo, la existencia de un mecanismo de amplificación, aún no explica la presencia de tan alto número de copias.

Actualmente es todavía difícil sacar una conclusión global sobre el genoma ribosomal, sin embargo, se ha hecho evidente a través de los estudios realizados que el EIG está asociado fuertemente a la variabilidad del mismo durante la evolución de las especies.

## VARIABILIDAD DEL GENOMA RIBOSOMAL DE LAS PLANTAS

Zimmer *et al.* (1988) comprobaron, mediante análisis en maíz con enzimas de restricción, que las regiones que codifican para ARN ribosomal son altamente conservadoras, mientras que la región del EIG es altamente variable. Esto último ocurre también con la región del ARN 5S. Ambos patrones de restricción enzimáticos han sido utilizados para la diferenciación de especies con un alto grado de confiabilidad.

Maggini y Tucci (1988), realizaron estudios semejantes en especies de la familia *Cynareae* y detectaron heterogeneidad en la longitud del EIG en los genes ribosomales. En dichos estudios se utilizaron sondas ribosomales provenientes de arroz, demostrando su utilidad en trabajos de carácter evolutivo.

Otra muestra del alto nivel de conservación del genoma ribosomal es el caso de algunos oligonucleótidos sintéticos, complementarios a secuencias de ARN 18S y 26S, que se han mantenido invariables a través de la evolución de los eucariotes, proporcionando la base de una técnica de secuenciación rápida (Hamby y Zimmer, 1988; Hamby *et al.*, 1988).

En diferentes trabajos se han estudiado otros aspectos de importancia que revelan la amplificación y variabilidad del genoma ribosomal. En lino y en otras especies, se demostró que condiciones desfavorables tales como estrés nutricional, inducen

cambios cuantitativos en secuencias de ADN repetidas (Cullis, 1981). Se observaron fundamentalmente amplificación y delección, en el ARN ribosomal, ARN 5S y otras secuencias altamente repetidas.

Los cambios en las secuencias de los genes ribosomales también ocurren a consecuencia del cultivo de tejido (Brettell *et al.*, 1986). Aunque actualmente es un tema muy controvertido, algunos trabajos relacionan la variabilidad del EIG con procesos como la variación somaclonal y la hibridación sexual en el mejoramiento genético de las plantas (Scowcroft y Larkin, 1988).

### ARN RIBOSOMAL 5S

Los ribosomas del citoplasma de células eucarióticas contienen dos especies de ARN de bajo peso molecular: 5S y 5,8S. Ambas especies son componentes de la subunidad grande y se encuentran en

cantidades equimolares al ARN 28S. El ARN ribosomal 5S es muy abundante en la célula y está presente, tanto en los organismos procariotes como en los eucariotes. A ello debe sumarse su mayor estabilidad, comparado con el resto de los ARNs (Kopylov, 1981).

Hasta el momento, esta especie de ARN es una de las más estudiadas, tanto en organismos procariotes (Nazar *et al.*, 1979), como eucariotes (Nazar *et al.*, 1983; Yeh *et al.*, 1988), en el estudio de las interacciones ARN-proteínas. Una utilidad novedosa para el ARN 5S es su empleo como sonda ribosomal, capaz de detectar diferencias en el genoma ribosomal con fines evolutivos y filogenéticos. Esta utilidad está dada por el hecho de que las sondas ribosomales, incluyendo las de ARN 5S, han sido ampliamente utilizadas para el apoyo a la clasificación morfológica clásica (figura 2) (Hamby y Zimmer, 1988), así como en el

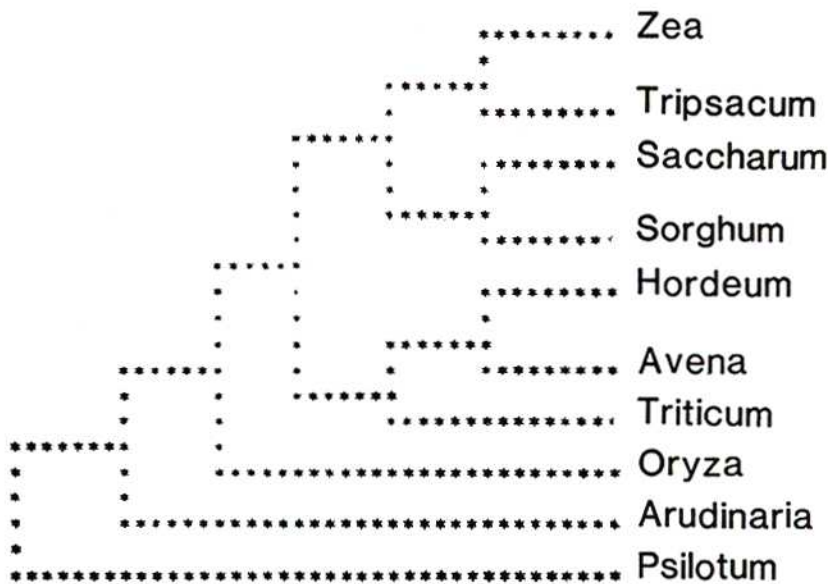


FIG. 2. Arbol evolutivo de la familia *Poaceae*, basado en la secuencia de genes ribosomales. Cortesía de la doctora Elizabeth Zimmer (Hamby y Zimmer, 1988).

establecimiento de árboles filogenéticos que permitan elucidar la evolución de las plantas (Zimmer *et al.*, 1989).

## MARCADORES GENETICOS: RFLP y OP

Desde hace varios años, el estudio de algunos marcadores fenotípicos bioquímicos como las isoenzimas, se viene abordando en el estudio de las plantas con diferentes fines (Ruiz y Maribona, 1983). Sin embargo, estos marcadores son influenciados por factores ambientales externos.

El desarrollo de marcadores genéticos moleculares que detectan variaciones a nivel de ADN está abriendo nuevas perspectivas en los análisis genéticos, tanto en la especie humana como en las plantas.

Una de las técnicas de avanzada más promisorias en la agricultura para detectar la variabilidad genética inducida, en los programas de mejoramiento, es el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Helentjaris *et al.*, 1985; Beckmann y Sollert, 1986). El uso de RFLP en las plantas es de gran importancia para el mejoramiento genético de las mismas y para la selección y variación somaclonal. Sin embargo, para su aplicación se hace necesario examinar una población grande, lo cual todavía resulta costoso.

El uso de sondas de oligonucleótidos (OP) es una técnica de relativa novedad introducida en el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas humanas (Geldermann, 1975). En la agricultura este método prevé un amplio uso, ya que permite seguir el polimorfismo en todo el genoma de las plantas y a la vez procesar un gran número de muestras, mediante el uso de la técnica de Dot Blot, lo cual

resultaría de menor costo. Sin embargo, este método requiere el montaje de una infraestructura de secuenciación y síntesis de oligonucleótidos, lo cual sí implica un costo elevado y constituye una limitación. El enorme número de cambios de posible detección, a nivel de oligonucleótidos, es muy superior al que es capaz de detectarse mediante el análisis de RFLP, por lo que resulta más ventajoso (Beckmann, 1988).

Una fuente prometedora de sondas oligonucleotídicas puede encontrarse entre los genes de ARN ribosomal, donde el polimorfismo es abundante y existe además un alto número de copias de estos genes, fundamentalmente en las plantas.

## IMPORTANCIA DE LAS SONDAS RIBOSOMALES PARA EL MEJORAMIENTO GENETICO DE LAS PLANTAS

La obtención de una sonda oligonucleotídica para el género *Saccharum* es importante, ya que prácticamente todas las variedades de caña modernas son interespecíficas. En estos casos, la mayoría de los cromosomas provienen de la especie *S. officinarum* (más de 80) y el resto fundamentalmente de *S. robustum* (Glazmann *et al.*, 1989). En virtud de esta complejidad, actualmente existen muy pocos marcadores que sean útiles en el estudio de la variabilidad genética. Se han hecho algunos estudios donde se utilizan los marcadores de ADN ribosomal y las isoenzimas para diferenciar variedades (Glazmann *et al.*, 1989).

El empleo de sondas ribosomales que permitan detectar con precocidad y certeza las variaciones genéticas producidas, debe constituir un paso importante en el aumento de la eficacia y velocidad de los programas de mejoramiento.

## OTRAS PERSPECTIVAS QUE OFRECEN LAS SONDAS RIBOSOMALES

Los trabajos que abordan estudios dependientes o relacionados con el genoma ribosomal, son relativamente escasos y recientes.

Las características de este genoma permiten su utilización en estudios filogenéticos y evolutivos de diversas plantas (Hamby y Zimmer, 1988; Zimmer et al., 1989; Maggini et al., 1988; Tucci y Maggini, 1986; Glazmann et al., 1989). Sin embargo, el uso del ADN ribosomal como sondas marcadoras de determinados caracteres en las plantas, promete mucho como punto de partida en el conocimiento de la estructura del genoma de las plantas.

Estudios realizados recientemente en caña de azúcar, comprobaron la presencia de ARN ribosomal 5S, 18S y 28S, no encontrándose evidencias para 5,8S (Ramos et al., en preparación). Nuestros trabajos han estado dirigidos hacia el aislamiento de rARN 5S y la obtención de una sonda ribosomal a partir de caña de azúcar, lo que ha sido de utilidad en procesos de hibridación con ADN de caña de azúcar y de otras gramíneas, para la realización de análisis filogenéticos.

Gracias al polimorfismo en la secuencia nucleotídica de los EIG ribosomales y la longitud de los tándems, los genes ribosomales sirven como marcadores de gran utilidad para los cromosomas que portan los organizadores nucleolares.

Algunos autores plantean que la amplificación de los genes ribosomales está asociada a condiciones de estrés (Cullis, 1981; Flavell et al., 1986), aunque es conocido que esta amplificación también existe en condiciones normales de crecimiento. Pensamos que esta hipótesis,

en el caso de la caña de azúcar, pudiera explicar la alta variabilidad en el número de cromosomas (desde 10 hasta más de 100), tomando en cuenta también la amplia gama de condiciones estresantes que es capaz de soportar dicha planta. En tal caso, la sonda ribosomal sería de utilidad para detectar en qué medida la amplificación de los genes ribosomales influye en los cambios en el número de cromosomas y si están o no relacionados con las condiciones de estrés.

## REFERENCIAS

- ANANIEV, E.B. y A. CHERNICHEV (1989). "Organización molecular del genoma de las plantas". En: *Organización del Genoma*. (Eds.) Bogdanov y Prozorov, Edit. Ciencia: 218-236.
- APPELS, R.; W.L. GERLACH y E.S. DENNIS (1980). Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma* 78: 293-298.
- APPELS, R. y J. DVORAK (1982). The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in populations and among species. *Theor. Appl. Genet.* 63: 337-348.
- BECKMANN, J.S. y M. SOLLER (1986). Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement. *Oxford Survey of Plant Molecular and Cell Biology* 3: 197-249.
- BECKMANN, J.S. (1988). Oligonucleotide polymorphisms: a new tool for genomic genetics. *Biotechnology* 6(9): 1061-1063.
- BENDICH, A.J. (1987). Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *Bioessays* 6(6): 279-282.
- BRETTELL, R.I.S.; M.A. PALLOTA; J.P. GUSTAFSON y R. APPELS (1986). Variation at the *Nor* loci in triticale derived from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.* 71: 637-643.
- CULLIS, C.A. (1981). Environmental induction of heritable changes in flax: Defined environments inducing changes in rDNA and peroxidase isozyme band pattern. *Heredity* 47: 87-94.
- FLAVELL, R.B.; M. O'DELL; P. SHARP; E. NEVO y A. BEILES (1986). Variation in the intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat *Triticum dicocoides*, in Israel. *Mol. Biol. Evol.* 3: 547-558.
- FREIFELDER, D. (1983). Molecular Biology, A Comprehensive Introduction to Prokariotes and Eukariotes. Edit.
- GELDERMANN, H. (1975). Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. *Theor. Appl. Genet.* 46: 319-330.

- GLAZMANN, J.C.; J.L. NOYER y C. LANAUD (1989). Use of molecular variation for sugarcane breeding. *Proc. XII Eucarpia Congress*.
- HAMBY, R.K. y E. ZIMMER (1988). Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family (*Poaceae*). *Plant. Syst. and Evol.* 160: 29-37.
- HAMBY, R.K.; L. SIMS; L. ISSEL y E. ZIMMER (1988). Direct rRNA sequencing: optimization of extraction and sequencing methods for work with Higher plants. *Plant Molec. Biol. Reporter* 6: 175-192.
- HELENTJARIS, T.; G. KING; M. SLOCUM; C.S. STRONG y S. WEGMAN (1985). Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.* 5: 109-118.
- JARVIS, E.D.; R.L. WIDOM; G. LA FAUCCI; Y. SETOGUCHI; I.R. RICHTER y R. RUNDER (1988) Chromosomal organization of rRNA operons in *Bacillus subtilis*. *Genetics* 120: 625-635.
- JOHNSON, J.L. y B. HARICH (1983). Comparisons of procedures for determining ribosomal ribonucleic acid similarities. *Current Microbiol.* 9: 111-120.
- KOPYLOV, A.M. (1981). Estructura y función de ARN ribosomal 5S y 5,8S. *Biol. Chem. (Ruso)* 15: 38-77.
- MAGGINI, F.; G.F. TUCCI y M.T. GELATI (1988). Ribosomal RNA genes in species of the *Cynareae* Tribe (*Compositae*).II. *Protoplasma* 144: 125-131.
- NAZAR, R.N.; G.E. WILICH y A.T. MATHESON (1979). The 5S RNA- protein complex from an extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. *J. Biol. Chem.* 254: 1506-1512.
- NAZAR, R.N. y A.G. WILDEMAN (1983). Three helical domains from a protein binding site in the 5S RNA-protein complex from eucariotic ribosomes. *Nucl. Acid Res.* 11(10): 3155-3168.
- ROGERS, S.O. y A.J. BENDICH (1987a). Heritability and variability in ribosomal RNA genes of *Vicia faba*. *Genetics* 117: 285-295.
- ROGERS, S.O. y A.J. BENDICH (1987b). Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9: 509-520.
- ROGERS, S.O. y A.J. BENDICH (1988). Recombination in *E. coli* between cloned ribosomal RNA intergenic spacers from *Vicia faba*: a model for the generation of ribosomal RNA gene heterogeneity in plants. *Plant Science* 55: 27-31.
- RUIZ, A. y R.H. MARIBONA (1983). Peroxidase isozyme analysis: a massive method for identification of sugarcane varieties. Proc. 18 ISSCT Congress, Plant Physiol., Cuba.
- SCOWCROFT, W.R. y P.J. LARKIN (1988). "Somaclonal variation". En: *Applications of Plant Cell and Tissue Culture*. Willey, Chichester (Ciba Foundation Symposium) 137: 21-35.
- SPRINGER, P.S.; E.A. ZIMMER y J.L. BENNETZEN (1989). Genomic organization of the ribosomal DNA of sorghum and its close relatives. *Theor. Applied Genet.* 77: 844-850.
- TUCCI, G.F. y F. MAGGINI (1986). Ribosomal RNA genes in species of *Cynareae* Tribe (*Compositae*).I. *Protoplasma* 132: 76-84.
- YEH, LEE CHUAN C.; P.M. HOROWITZ y J.C. LEE (1988). Studies of RNA-protein interactions in the yeast 5S ribonucleoprotein particles by fluorescence and tritium exchange. Implications for ribosomal assembly. *J. Biol. Chem.* 263: 17412-17417.
- ZIMMER, A.; E.R. JUPE y V. WALBOT (1988). Ribosomal gene structure, variation and inheritance in maize and its ancestors. *Genetics* 120: 1125-1136.
- ZIMMER, E.A.; R.K. HAMBY; M.L. ARNOLD; D.A. LEBLANC y E.C. THERIOT (1989). "Ribosomal RNA phylogenies and flowering plant evolution". En: *The hierarchy of life*. B. Ferholm, K. Bremer & H. Jornwall (eds.) cap. 15. Elsevier Sci, Publishers, Amsterdam.