

Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos

Luis Rojas*, Orelvis Portal, Elio Jiménez *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: luis@ibp.co.cu

RESUMEN

La alta calidad de ARN total requerida como material de partida es un elemento común en la mayoría de las técnicas utilizadas en estudios moleculares tanto en plantas como en hongos fitopatógenos. En este manuscrito se profundiza en las características de cada uno de estos tejidos y la conveniencia del uso de determinados protocolos, los cuales van a estar, esencialmente, diferenciados por la aplicación de diferentes tipos de detergentes. También, se afrontan las posibles soluciones que se pueden dar para eliminar los altos contenidos de polisacáridos que dificultan la extracción de ARN total. Además, se hace referencia a protocolos de extracción de ARN efectivos para obtener buenos rendimientos en la interacción planta-hongo filamentosos. Como elemento común, tanto para plantas como para hongos filamentosos, se hace una descripción detallada de los pasos a seguir en la obtención de ARN total y se explica el porqué de cada uno de ellos, así como las diferentes variantes cuando se encuentran problemas relacionados con la estructura de los tejidos sujetos a investigación.

Palabras clave: detergentes, fenoles, polisacáridos

ABSTRACT

RNA of high quality is a common element required as starting material in the majority of the techniques used in molecular studies either in plants or in phytopathogenic fungi. In this manuscript we emphasized in the characteristics of each of these tissues and the convenience to use certain protocols, which are going to be differentiated by the application of different detergents. We also dealt with possible solutions to eliminate the high contents of polysaccharides that difficult the total extraction of ARN. In addition, some RNA extraction protocols to obtain good yields during the interaction plant-filamentous fungi are mentioned. As common element, either for plants or filamentous fungi, a detailed description of the steps to be followed to obtain total ARN is done. Besides, the different variants when we face problems related to the tissues structure of this investigation were also studied.

Keywords: detergents, phenols, polysaccharides

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

ETAPAS ESENCIALES EN LA PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL

Ruptura del tejido y extracción de componentes subcelulares

Precipitación diferencial de ARN total

Tratamiento final de la preparación

Cuantificación del ARN mediante espectrofotometría

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL A PARTIR DE TEJIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS

EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL PARA ESTUDIOS DE INTERACCIÓN PLANTA-HONGO FILAMENTOSO

CONCLUSIONES

INTRODUCCIÓN

La obtención de ácido ribonucleico (ARN) total de alta calidad y en cantidades adecuadas en plantas, hongos filamentosos y en los estudios de interacción hospedante- patógeno constituye un paso crítico en experimentos

como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polimerase Chain Reaction*), amplificación de transcritos mediante reacción de reverso transcripción (RT-PCR, del inglés: *Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*) (Yang *et al.*, 2008), construcción de bibliotecas sustractivas y

genómicas de cadena completa, estudios de polimorfismos para la longitud de los fragmentos amplificados basado en las huellas de ARNm (cDNA-AFLP, del inglés: *Complementary Desoxyribonucleic Acid-Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Soanes *et al.*, 2002) y más recientemente análisis de PCR cuantitativo y estudios de expresión en el contexto genómico (microarreglos) (Zahiri *et al.*, 2005). En el caso del estudio de la interacción entre dos entidades biológicas, complejiza mucho más el escenario molecular. No solo es necesario contar con ARN total de las especies por separado sino, y aún más importante, aquel que resulta de su interacción.

Debido a las características particulares de los tejidos celulares en hongos filamentosos y en plantas se ha hecho difícil establecer un protocolo efectivo para ambas especies (Logan *et al.*, 1998; Jelle *et al.*, 2006). Se ha concluido que el uso de detergentes catiónicos como el cetil trimetil de bromuro de amonio (CTAB, del inglés: *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) son altamente eficaces en tejidos vegetales pero inútiles cuando se aplican a tejidos de origen fúngico (Somma, 2008, Rodríguez-García *et al.*, 2006). Por otra parte el detergente aniónico dodecil sulfato de amonio (SDS, del inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate*) proporcionan buenos resultados cuando se aplican a hongos filamentosos y son medianamente eficientes sobre tejidos vegetales. Teniendo en cuenta esta característica del detergente SDS se establece un protocolo con resultados positivos para ambas especies y también para estudios de la interacción hongo-planta (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2008)

ETAPAS ESENCIALES EN LA PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL

Ruptura del tejido y extracción de componentes subcelulares

Una vez preparadas las condiciones experimentales, la ruptura celular es el primer paso en la extracción y uno de los más críticos para obtener un ARN total con buen rendimiento y calidad.

Uno de los problemas al trabajar con plantas y hongos filamentosos es la composición de su pared celular, lo cual dificulta el acceso al interior de la célula para la extracción de todo

el contenido intracelular. Dicha pared se debe romper por acción mecánica, pulverizando el tejido con hielo seco o con nitrógeno líquido (Rogers y Bendish, 1988). De forma inmediata, se deben destruir las membranas celulares de manera que los ácidos nucleicos, acompañados de otros compuestos (proteínas, enzimas, carbohidratos), queden disponibles para su posterior procesamiento (Velazco, 2005). Para conseguir esto se utilizan fuertes soluciones de sales caotrópicas. Estas soluciones de lisis, de baja o alta fuerza iónica y de altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) destruyen rápidamente las membranas celulares e inactivan las RNAsas. En esta primera etapa se emplean los agentes quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para proteger los ácidos nucleicos de la acción de enzimas nucleasas. Los agentes quelantes capturan los iones y no permiten que actúen como cofactores de estas enzimas. Las altas concentraciones de NaCl se utilizan para prevenir la contaminación de las muestras con polisacáridos que afectan la pureza de los ácidos nucleicos.

La base para la separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos, es su solubilidad diferencial en presencia de las altas concentraciones de NaCl, de esta forma, los polisacáridos precipitan bajo la acción de fuerzas centrifugas; también, se pueden utilizar polímeros como monolaurato de polioxietileno sorbitan (Tween 20), dimetil sulfóxido (DMSO) o polietilenglicol (PEG) (Adams *et al.*, 1996). A la mezcla anterior se agrega un detergente aniónico como el dodecil sulfato de sodio (SDS, del inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate*), que solubiliza proteínas, tejidos y membranas, evitando que una cantidad significativa de ácidos nucleicos quede atrapada en los desechos o restos celulares.

Cuando los polifenoles son liberados durante la lisis celular disminuye la calidad y rendimiento debido a que, mediante la polifenoloxidasas con su actividad catecolasa, los polifenoles se oxidan a quinonas y se acoplan covalentemente con los ácidos nucleicos degradándolos o provocando que precipiten con ellos (Loomis, 1974; Salzman *et al.*, 1999). Esta contaminación se hace evidente pues el ácido nucleico presenta una coloración gris o parda. Para neutralizar este

efecto, se pueden utilizar en el tampón de extracción los detergentes polivinil pirrolidona (PVP) o polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Manning, 1994) que se unen a los polifenoles y a continuación se eliminan por precipitación con etanol. Sin embargo, estos métodos son altos consumidores de tiempo y engorrosos para su manipulación, por lo que generalmente se usa un agente reductor fuerte como el β -mercaptoetanol (β ME) para eliminar la oxidación de los compuestos fenólicos (Lakhvir *et al.*, 2001). Las altas concentraciones de β ME ayudan a preservar el ARN total, esto evita la formación de quinonas a partir de la oxidación de los compuestos fenólicos (Venkatachalam *et al.*, 1999). Además, el β ME puede inactivar las enzimas nucleasas debido a la ruptura de los puentes disulfuros (Dawson *et al.*, 1986).

La presencia de proteínas es otro de los contaminantes más comunes en las extracciones de ácidos nucleicos y una de las vías para su eliminación es la realización de varias extracciones con fenol y fenol:cloroformo a un pH específico. Ambos solventes provocan desnaturalización en las proteínas que migran a la fase orgánica o interfase mientras que los ácidos nucleicos se mantienen en la fase acuosa. Una vez recuperada la fase acuosa, se realiza una segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico. Esta combinación de extracciones reduce las pérdidas de ARN total debido a la formación de complejos insolubles de ARN total:proteína en la interfase. El cloroformo se mezcla con el fenol para reducir las pérdidas de ARN total en la interfase y de esta forma aumenta la eficiencia en el proceso de extracción. El cloroformo desnaturaliza las proteínas, elimina los lípidos y solubiliza el fenol. Esto favorece la separación de los ácidos nucleicos que se mantienen en la fase acuosa. El alcohol isoamílico se agrega como antiespumante en el proceso de mezclado de las fases (Ambion, 2008).

Precipitación diferencial de ARN total

Para la precipitación diferencial del ARN total en solución han sido utilizadas diferentes vías como son el empleo de cationes monovalentes como el sodio (Na^+) y el amonio (NH_4^+). No obstante, el cloruro de litio (LiCl) es el más difundido por sus ventajas ya que a determinadas concentraciones es muy

eficiente para precipitar el ARN total e ineficiente para precipitar otras moléculas como el ADN, proteínas y carbohidratos (Barlow *et al.*, 1963).

Tratamiento final de la preparación

Para eliminar el ADN que queda como contaminante en la muestra después de la precipitación se realiza una digestión con la enzima desoxirribonucleasa la cual rompe los enlaces fosfodiéster del ADN. Esta es eliminada posteriormente con un volumen de fenol:cloroformo y 1/10 de acetato de sodio, la enzima pasa a la fase orgánica por centrifugación quedando el ARN total en la fase acuosa. Otro método usado es la extracción con fenol:cloroformo (pH 4.7); en este caso el ADN pasa a la fase orgánica, el ARN que se mantiene en la fase acuosa es recuperado por precipitación. También se puede usar el cloruro de litio (LiCl), el cual precipita selectivamente el ARN, no así el ADN. No obstante, con frecuencia se puede apreciar que estos dos últimos métodos no son suficientes para eliminar toda la contaminación con ADN. Esto se puede apreciar en reacciones de RT-PCR donde se amplifican fragmentos de ADN no detectados en tinciones con bromuro de etidio (Ambion, 2008).

Cuantificación del ARN mediante espectrofotometría

El ARN total puede cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir, a través de la lectura de absorbancia A (o densidad óptica, DO) de la luz ultravioleta. La concentración de ácidos nucleicos se determina a 260 nm comparada contra un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un cociente. Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza del ARN total. Un ARN total puro presenta una relación aproximada a 2.0. Otro indicador de la pureza es la lectura a 230 nm, un máximo de absorción a esta longitud de onda significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. El cociente A_{260}/A_{230} de un ARN puro puro es de 2.2 aproximadamente.

También puede emplearse el método de la placa de agarosa con bromuro de etidio. Permite

calcular la cantidad de ácidos nucleicos a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio irradiado con luz UV, comparándola con patrones de concentración (Somma, 2008).

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL A PARTIR DE TEJIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS

La purificación de ARN total de hongos filamentosos se dificulta debido a sus complejas paredes celulares, a la presencia de RNAsas intracelulares (Logan *et al.*, 1998) y a los altos niveles de carbohidratos excretados durante su crecimiento en medio líquido (Sokolovsky *et al.*, 1990). Es por esto que han aparecido toda una variedad de protocolos de extracción y purificación de ARN total en estos organismos.

Chambers *et al.* (1987) combinaron las ventajas de la extracción con fenol y la precipitación con LiCl en un protocolo usado para *Chlamydomonas*. Basados en lo anterior, Sokolovsky *et al.* (1990) modificaron este método y obtuvieron resultados satisfactorios para el hongo filamentosos *N. crassa* crecidos en diferentes condiciones de cultivo. El tampón de lisis estuvo constituido por 0.6 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, SDS 4%. Por otra parte Logan *et al.* (1998) obtienen ARN total íntegro y de alta pureza donde utilizaron como tampón de lisis 100 mM LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA y SDS 1%.

Rodríguez-García *et al.* (2006) propusieron para el hongo filamentosos *Mycosphaerella fijiensis* un protocolo de extracción de ARN total de alta calidad y libre de melanina para poder ser usado en reacciones de RT-PCR. La melanina es un compuesto fenólico y es considerado un pigmento asociado con la patogenicidad de los hongos (Kwon-Chung y Rhodes, 1986). Como todo compuesto fenólico la melanina se asocia a los ácidos nucleicos en el proceso de homogenización y coprecipita con el ADN y el ARN total. También interfiere en las lecturas espectrofotométricas debido a que absorben en un amplio espectro de longitudes de onda dando como resultado falsas interpretaciones en la cuantificación de los ácidos nucleicos (Satyamoorthy *et al.*, 2002). Además, su presencia influye en las reacciones de RT-PCR pues se asocian a las polimerasas e inhiben su actividad enzimática

(Giamberti *et al.*, 1998). Rodríguez-García *et al.* (2006) probaron que con el uso del detergente catiónico cetil trimetil de bromuro de amonio (CTAB) no se detectaba ARN total o las concentraciones obtenidas eran insuficientes para poder realizar una reacción de RT-PCR. Finalmente, proponen un protocolo híbrido tomando como base los sistemas comerciales de purificación TRIZOL (Invitrogen) y *RNeasy® Plant Mini Kit* (QIAGEN), los que por separado tienen sus desventajas al ser empleados para esta especie. El método del TRIZOL produce en apariencia un ARN total con buen rendimiento pero contaminado con melaninas, que al ser utilizado en la reacción de RT-PCR produce bajos rendimientos en los productos amplificados. Con el sistema *RNeasy® Plant Mini Kit* (QIAGEN) se obtuvieron bajos rendimientos de ARN total pero libre de melaninas, esto es una clara ventaja del método, pero debido a la pobre concentración del ácido nucleico no puede ser aplicado en los estudios de *Northern blot*. Con el empleo del protocolo híbrido se obtiene suficiente ARN total libre de melanina para ser usado en síntesis de ADNc, análisis de *Northern blot*, reacciones de RT-PCR, y en la construcción de bibliotecas genómicas, aunque tiene el inconveniente de utilizar dos sistemas comerciales de purificación sumamente costosos.

EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL

La purificación de ARN total en tejidos de plantas, al igual que en los tejidos fúngicos, se dificulta por la presencia de paredes celulares rígidas, cantidades apreciables de taninos, pigmentos, polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios (Claros y Canovas 1998; Kim y Hamada, 2005). Estos componentes con frecuencia coprecipitan con el ARN total afectando el rendimiento y la calidad del ácido nucleico.

Un número apreciable de métodos de extracción de ARN total de tejido de plantas han sido publicados teniendo en cuenta la problemática de la obtención de un ARN total libre de contaminantes. Generalmente, en tejidos de plantas se logra un ARN total de alta calidad cuando la actividad de las ribonucleasas ha sido inhibida totalmente

(Portillo *et al.*, 2006; Manickavelu *et al.*, 2007). Varios reactivos han sido utilizados para inhibir la actividad de las ribonucleasas, entre ellos se encuentra el tiocianato de guanidinio (Chomczynski, 1993). Posteriormente, se comenzó a utilizar el sistema comercial TRIZOL (Invitrogen), que está compuesto por una mezcla de isotiocianato de guanidinio, fenol, acetato de sodio, laurel sarcosil de sodio (LSS) y otros desnaturalizantes fuertes (Liu *et al.*, 1998). Actualmente existen varios sistemas de purificación de ARN total para trabajos de rutina con tejidos vegetales (Yamashita *et al.*, 2005; Jelle *et al.*, 2006), los cuales se basan en la ruptura de células y tejidos en presencia de sales caotrópicas. El ARN total solubilizado es adsorbido por una membrana de sílice bajo condiciones que optimizan la unión del ARN total y no la de los contaminantes. Seguidamente, se realizan varios lavados para eliminar los contaminantes que puedan quedar. El ARN total es eluido y dispuesto para el uso en una gran variedad de aplicaciones (Need, 2008). Frecuentemente estos sistemas de purificación tienen que ser modificados cuando se trabaja con diferentes especies de plantas e incluso en diferentes tejidos de la misma especie vegetal (Malnoy *et al.*, 2001). Se puede plantear que los sistemas de purificación no han demostrado ser eficientes para la obtención de ARN de alta calidad o de altos rendimientos en los tejidos de aquellas plantas denominadas recalcitrantes por sus altos contenidos de polisacáridos o metabolitos secundarios (Kim y Hamada, 2005) y se procede a las modificaciones según sea el caso pues no existe un manual para tales cambios, provocando que los sistemas de purificación no estén completos y de esta forma encareciendo las reacciones. Solo la pericia y experiencia de los investigadores en el mundo de las extracciones de ácidos nucleicos pueden mejorar los resultados ideando nuevos métodos, más allá de los sistemas de purificación para tales fines, aunque no es ocioso plantear que poder crear un sistema de purificación altamente eficiente y universal es una tarea pendiente en este campo.

Moriguchi *et al.* (2002) publicaron un artículo donde propusieron un protocolo simple para la extracción de ARN de frutas, las cuales contienen altos niveles de polisacáridos y compuestos fenólicos. Utilizaron un tampón de lavado para la eliminación de los polisacáridos,

conformado por 0.1 M Tris-HCl, 0.35 M sorbitol, 10% (p/v) PEG 6 000 y 2% (v/v) β -ME, el cual quedó como una variante para posibles eliminaciones de polisacáridos en otros cultivos. Para la eliminación de proteínas y polifenoles utilizaron PVP y acetato de potasio. El tampón de extracción estuvo compuesto por 2% (p/v) CTAB, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl y 20 mM EDTA pH 8.0.

Recientemente se propuso un protocolo para un amplio espectro de especies de plantas recalcitrantes, En un inicio trabajaron con lichi (*Litchi chinensis*), árbol frutal de zonas tropicales y subtropicales. Combinaron y modificaron diferentes métodos según los problemas que se presentaban, de esta forma lograron obtener una metodología para la extracción eficiente de ARN total en 15 especies de plantas recalcitrantes (Wang *et al.*, 2008). Este método difiere de los ya existente principalmente en la composición del tampón de extracción, ya que se incluyó NaCl con una concentración de 2 M para crear un ambiente molecular de alta fuerza iónica, lo cual favorece la eliminación de compuestos contaminantes en los tejidos vegetales (Chang *et al.*, 1993; Meisel *et al.*, 2005). Además, se añadió el detergente LSS y EDTA como inhibidores de la actividad ribonucleasa (John 1992; Kiefer *et al.*, 2000) y el detergente iónico desnaturalizante CTAB a una concentración final del 2% (p/v). El tapón de extracción estuvo formado por: (2 M NaCl, 25 mM EDTA, 200 mM Tris pH 8.0, 20 mM de borato de sodio, 2% PVPP (p/v), 2% CTAB (p/v), 1% LSS (p/v) y 2% (v/v) β -ME). Se puede plantear que este protocolo es relativamente simple y permite la extracción de ARN total de alta calidad en un breve periodo de tiempo.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL PARA ESTUDIOS DE INTERACCIÓN PLANTA-HONGO FILAMENTOSO

Varios estudios moleculares de interacciones entre planta-hongos filamentosos aparecen ampliamente difundidos en la literatura científica hasta el presente. Entre los patosistemas más estudiados se encuentran *Solanum lycopersicum-Passalora fulva* (hongo miembro de la familia *Mycosphaerellaceae*) (Van den Burg *et al.*, 2003), *Zea mays-Ustilago maydis* (Zahiri *et al.*, 2005), *Oriza sativa-Magnaporthe grisea* (Yang *et al.*, 2008) y *Genus triticum-*

Mycosphaerella graminicola (Stergiopoulos *et al.*, 2003).

La interacción molecular entre las especies *Solanum lycopersicum*-*Passalora fulva* (*syn. Cladosporium fulvum*) está gobernada por una relación del tipo gen-a-gen. Un total de ocho genes de las clases *Avr* (factores de avirulencia del patógeno) y *Ecp* (proteínas extracelulares extraídas de fluidos apoplásticos en plantas infectadas) han sido clonados y caracterizados. Para cuatro de estos últimos los pares que interactúan (genes *Cf*) en *P. fulva* también son conocidos. Sin embargo, contar con evidencias conclusivas de la verificación de una relación gen-a-gen para todos los factores genéticos involucrados ha sido complicado. Ello se debe a la poca disponibilidad de herramientas moleculares para el estudio de esta y otras interacciones del tipo planta-*Mycosphaerellaceae*. A pesar de ello esta interacción constituye un modelo adecuado para estudios en la familia *Mycosphaerellaceae*.

Los estudios en el patógeno *M. grisea* y los factores involucrados en la infección y desarrollo de la enfermedad en arroz han sido estudiados a múltiples escalas. El primero incluyó la identificación de genes individuales asociados a estos procesos, tal es el caso del gen *MgNIP04* que codifica para una proteína de secreción. También se ha utilizado la tecnología de PCR en tiempo real donde se demostró que este gen está sobre regulado en etapas tardías del desarrollo de la enfermedad. Su expresión está asociada con la aparición de puntos necróticos en el hospedante. Más recientemente se han llevado a cabo experimentos de mutagénesis insercional a escala genómica con 21 070 mutantes de *M. grisea*. Los ensayos biológicos de infección artificial en condiciones controladas con estos mutantes permitieron identificar 305 genes asociados con la patogenicidad provocando fenotipos de avirulencia o virulencia reducida (Jeon *et al.*, 2007).

Stergiopoulos *et al.* (2003) analizan el papel de la familia génica de los transportadores de trifosfato de adenosina (ATP, del inglés: *Adenosine Tri-Phosphate*), en la virulencia en *M. graminicola*. Entre ellos, el gen *MgAtr4* constituye el primer factor de la virulencia clonado de este patógeno. Los estudios

concluyeron que este gen está involucrado en la protección contra sustancias fungicidas generadas en plantas de trigo tras ser infectadas por *M. graminicola*.

La extensión de estas metodologías a otros patosistemas se ha visto limitada por la imposibilidad de obtener ARN total de gran calidad de tejidos infectados. En todos los casos anteriormente mencionados, han sido empleados el sistema comercial TRIZOL (Invitrogen). Es por ello que la búsqueda de nuevas metodologías de extracción de ARN total de alta eficiencia y calidad es un campo en amplio desarrollo.

Varios intentos han sido encaminados al aislamiento de ARN total de alta calidad en hongos filamentosos y en especies vegetales (Logan *et al.*, 1998; Jelle *et al.*, 2006). Las características físico-químicas de estos tejidos celulares hacen fallar el intento de extender el uso de un mismo protocolo para ambos casos. Es conocido, por ejemplo, que aquellas metodologías basadas en el uso del detergente CTAB son altamente eficaces en tejidos vegetales pero totalmente inútiles cuando se aplican a tejidos de origen fúngico (Somma, 2008; Rodríguez-García *et al.*, 2006).

Alternativamente, los métodos basados en el detergente aniónico SDS proporcionan buenos resultados cuando se aplican a hongos filamentosos y son medianamente eficientes sobre tejidos vegetales. La revisión de estas metodologías hace posible afirmar que la extracción de ácidos nucleicos resulta más compleja en hongos filamentosos que en plantas. Varias características condicionan lo anterior, entre las que se pueden mencionar: rigidez de la pared celular, presencia de ribonucleasas intracelulares y la alta concentración de polisacáridos secretados cuando se cultivan estos organismos en medio líquido. Esta última característica pudiera crear un paralelismo entre el trabajo con estos tejidos y los realizados en frutos que presentan altos contenidos de polisacáridos y polifenoles, aunque para este caso en particular existen metodologías de extracción de ARN total eficientes (Moriguchi *et al.*, 2002).

En ocasiones, cuando no existe un sistema comercial de purificación de ARN total efectivo, en estos estudios de interacción se utilizan dos

protocolos en dependencia de las características de cada una de las partes involucradas. Por ejemplo, Mendoza-Rodríguez *et al.* (2006) en el patosistema 'Calcuta 4' - *M. fijiensis* utilizaron protocolos diferentes para cada especie, se obtuvo finalmente una biblioteca sustractiva referida a la interacción planta-patógeno. En este trabajo se empleó el protocolo de Liao *et al.* (2004) para la extracción de ARN total en planta, para hongo liofilizado emplearon el protocolo de Sánchez-Rodríguez *et al.* (2008). Ambos protocolos tienen características específicas que responden a las particularidades de cada tejido. En el caso de Liao *et al.* (2004) usan el detergente CTAB, altamente eficiente en muestras de plantas y la técnica empleada por Sánchez-Rodríguez *et al.* (2008) incluyó el detergente SDS efectivo en hongos pero no tanto en plantas.

Es aquí donde se puede establecer la diferencia fundamental entre ambos protocolos pues es conocido que el CTAB es un detergente catiónico que tiene la propiedad de precipitar ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos en soluciones de baja concentración iónica. Bajo estas condiciones las proteínas y los polisacáridos neutros permanecen en solución. En soluciones de alta concentración iónica, el CTAB forma complejos con las proteínas y polisacáridos pero no precipita ácidos nucleicos. Por esta razón es especialmente útil para precipitar ácidos nucleicos de organismos que producen grandes cantidades de polisacáridos como las plantas y algunas bacterias Gram negativas (incluyendo algunas cepas de *Escherichia coli*).

El fenómeno va más allá de una simple interacción efectiva con polisacáridos y proteínas. Carmona-Ribeiro *et al.* (2006) demostraron que los detergentes catiónicos como el CTAB no provocan lisis celular en hongos, solo cambios en la carga de la superficie de las células. Esta pudiera ser una causa de la ineffectividad de este tipo de detergente catiónico a la hora exponer los compuestos subcelulares en el proceso de extracción. En el caso del detergente aniónico SDS sí existe un efecto de lisis en la célula por lo que es efectivo, esto es fundamental en estos procesos pues es medular contar con un proceso de lisis seguro. Por lo tanto, para tener un protocolo que sea eficiente en plantas

y hongos es recomendable usar un detergente aniónico que pudiera ser el SDS, que aunque, como se ha planteado anteriormente, no es tan efectivo en plantas si rinde resultados positivos. Sobre esta base, Sánchez-Rodríguez *et al.* (2008) establecieron un protocolo para micelio de hongos filamentosos combinando metodologías aplicadas a frutos con alto contenido de polisacáridos y métodos de extracción basados en SDS. Estos autores, al utilizar el tampón de lavado propuesto por Moriguchi *et al.* (2002) eliminaron en el paso inicial los altos contenidos de polisacáridos secretados al medio de cultivo por *M. fijiensis*. De esta forma el escenario molecular quedó listo para la acción del tampón de lisis sobre las células del hongo y como resultado se obtuvieron altas concentraciones de un ARN de buena calidad. Esto fue posible, además, porque se incluye un paso final de limpieza del ARN extrapolado del protocolo propuesto por Liao *et al.* (2004).

Sánchez-Rodríguez *et al.* (2008) consideraron que el SDS también podría tener resultados positivos en plantas. El protocolo diseñado resultó efectivo tanto en hongos filamentosos como en plantas con altos contenidos de polisacáridos. Esta efectividad fue abalada por técnicas de PCR, RT-PCR y *Southern blot* en cada uno de los tejidos. También el protocolo fue efectivo para la extracción de ARN total de *M. fijiensis* a partir de muestras de la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*, al amplificarse con el empleo de cebadores específicos el gen del *citocromo b* de este hongo en tejido foliar del cultivar susceptible 'Grande naine' en estadio tardío del desarrollo de la enfermedad. De esta forma, Sánchez-Rodríguez *et al.* (2008) brindaron una variante más para los estudios de interacción planta-patógeno. El protocolo propuesto se describe brevemente:

Se pesó 1 g de micelio liofilizado o tejido fresco de planta y se maceró con nitrógeno líquido. El polvo fue trasvasado a un tubo de polipropileno de 50 ml. Se adicionaron 20 ml del tampón de limpieza y se aplicó vórtex por 30 s. Seguidamente se centrifugó 10 min a 8 000 g a 4 °C. El sobrenadante con los residuos celulares flotantes fue decantado. Al precipitado obtenido se le añadieron 10 ml del tampón de extracción, que previamente fue calentado a 65 °C y fue incubado durante 10 min a 65 °C y

ocasionalmente se mezcló suavemente el contenido. La muestra se enfrió a temperatura ambiente. Seguidamente se agregaron en su orden y agitando después de cada adición, 1 ml de acetato de potasio 5 M, 3 ml de etanol absoluto frío, 10 ml de fenol y 2 ml de cloroformo. Se agitó vigorosamente hasta formar una emulsión y se incubó durante 30 min en hielo, posteriormente se centrifugó 30 min a 12 000 *g* a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se realizó una extracción con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v) agitando suavemente durante 10 min en un balancín. Se centrifugó 10 min a 12 000 *g* a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se realizó otra extracción con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v). La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo que contenía ¼ del volumen total de LiCl 10 M, se mezclaron los componentes y se dejó precipitando toda la noche a 4 °C. Se precipitó el ARN en la centrífuga a 12 000 *g* por 30 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió suavemente en 500 µl de SDS 0.5%. El ARN total fue extraído con un volumen de cloroformo- alcohol isoamílico alcohol (24:1 v/v) y fue centrifugado 10 min a 12 000 *g* a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló suavemente. El ARN total se dejó precipitar durante 2 h a -80 °C, posteriormente se centrifugó 30 min a 12 000 *g* a 4 °C. El precipitado se lavó dos veces con etanol 75%. Se secó durante 10 min y se resuspendió en 100 µl de agua libre de ribonucleasas.

Tampón de lavado: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.35 M sorbitol, 10% (p/v) PEG 6 000 y al volumen total se le añadió el 4% de βME al momento de su uso.

Tampón de extracción: 0.6 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 4% SDS y al volumen total se le añadió el 4% de βME al momento de su uso.

CONCLUSIONES

Existen varios métodos efectivos para la extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos pero en los estudios de interacción las variantes se reducen a unos pocos protocolos referidos a especies específicas y esto se debe fundamentalmente

a las particularidades de cada uno de los tejidos en estudio, conjugar estas características de modo que se pueda obtener una metodología única de extracción es primordial para obtener resultados satisfactorios en los estudios de interacción. El uso de detergentes aniónicos como el SDS ha demostrado que es posible realizar estudios de interacción entre especies diferentes, aunque es recomendable continuar las investigaciones para obtener protocolos que engloben mayor número de especies interactuantes.

REFERENCIAS

- Adams, RP, Pandey RN, Flournoy LE (1996) Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molecular Biology* 14: 17-22
- Ambion (2008) The basics: RNA isolation. En: <http://www.ambion.com/techlib/basics/rnaisol/index.html#1> (consulta: abril 2008).
- Barlow, JJ, Mathias AP, Williamson R, Gammack DB (1963) A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochemical Biophysical Research Communications* 13: 61-66
- Carmona-Ribeiro, AM, Viera DB (2006) Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 760-767
- Chang, SJ, Puryear, Caimey J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116
- Chomczynski, P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532-537
- Claros, MG y Canovas FM (1998) Rapid high quality RNA preparation from pine seedlings. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 9-18
- Dawson, RM, Elliott CDC, Elliott WH, Jones KM (1986) Vitamins and coenzymes. En: Dawson RMC, Elliot DC y Jones KM (Eds) *Data for Biochemical Research*. Oxford Clarendon Press, UK.
- Giambernardi, TA, Ulrich R, Klebe RJ (1998) Bovine serum albumin reverses inhibition of RT-PCR by melanin. *Biotechniques* 25: 564-566
- Jelle, DK, Isabel RR, Erik VB, Arne H, Denis DK (2006) Efficient extraction of high-quality total RNA from various hop tissues. *Biochemistry and Biotechnology* 36: 355-362

- Jeon, J, Park SY, Chi MH, Choi J, Park J, Rho HS, Kim S, Goh J, Yoo S, Choi J, Park JY, Yi M, Yang S, Kwon MJ, Han SS, Kim BR, Khang CH, Park B, Lim SE, Jung K, Kong S, Karunakaran M, Oh HS, Kim H, Kim S, Park J, Kang S, Choi WB, Kang S, Lee YH (2007) Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature Genetics* 39: 561-565
- John, ME (1992) An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research* 20: 2381
- Kiefer, Werener EH, Dieter E (2000) A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 33-39
- Kim, SH, Hamada T (2005) Rapid and reliable method of extracting DNA and RNA from sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L). *Lam. Biotechnology Letter* 27: 1841-1847
- Kwon-Chung, KJ, Rhodes JC (1986) Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunology* 51: 218-223
- Lakhvir, L, Rashmita S, Rajesh K G, Priti S, Sanjay K (2001) RNA Isolation from high-phenolic tea leaves and apical buds. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 181a-181f
- Liao, Z, Chen M, Guo L, Gong Y, Tang F, Sun X, Tang K (2004) Rapid Isolation of high quality total RNA from taxus and ginkgo. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 34: 209-214
- Liu, JJ, Goh CJ, Loh CS, Liu P, Pua EC (1998) A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 1-6
- Logan, DA, Mukhtar M, Parveenc Z (1998) Isolation of RNA from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *Journal of Microbiological Methods* 33: 115-118
- Loomis, WD (1974) Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology* 31: 528-545
- Malnoy, M, Reynoird JP, Mourgues F, Cheverau E, Simoneau P (2001) A method for isolation total RNA from pear. *Molecular Biology Reporter* 19: 69-74
- Manickavelu, A, Kambara K, Mishina K, Koba T (2007) An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils. *Colloids Surf B Biointerfaces* 54: 254-258
- Meisel, L, Fonseca B, Gonzalez S, Baezayates R, Cambiazo V, Campos R, Gonzalez M, Orelana A, Retamales J, Silva H (2005) A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biological Research* 38: 83-88
- Mendoza-Rodríguez, M, Sánchez-Rodríguez A, Acosta-Suárez M, Roque B, Portal O, Jiménez E (2006) Construcción y secuenciación parcial de una biblioteca sustractiva en 'Calcutta 4' (*Musa AA*) en estadio temprano de infección con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal* 6: 213-117
- Moriguchi, T, Hu CG, Honda C, Kita M, Tsuda T (2002) A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 69a-69g
- NEED (2008) New European Interprice in Distribution. En: <http://www.need.es/list.aspx?c=122&hc=&md=2> (consulta: mayo 2009)
- Portillo, M, Fenoll C, Escobar C (2006) Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue. *Physiologia Plantarum* 128: 1-7
- Rodríguez-García, CM, Islas-Flores I, Peraza-Echeverría L y Canto-Canché B (2006) Extraction of high-quality, melanin-free RNA from *M. fijiensis* for cDNA preparation. *Molecular Biotechnology* 34: 45-50
- Rogers, SO y Bendish AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissues. En: Gelvin, SB y Schilperoort RA (Eds) *Plant molecular biology manual*, pp. 1-10. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Salzman, RA, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa PM y Bressan RA (1999) An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 11-17
- Sánchez-Rodríguez, A, Portal O, Rojas LE, Ocaña B, Mendoza M, Acosta M, Jiménez E y Höfte M (2008) An efficient method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis* – *Musa* spp. interaction. *Molecular Biotechnology* 40: 299-305
- Satyamoorthy, K, Van Belle LG, Elder PA y Herlyn M (2002) A versatile method for the removal of melanin from ribonucleic acids in melanocytic cells. *Melanoma Research* 12: 449-452

- Soanes, DM, Skinner W, Keon J, Hargreaves J y Talbot NJ (2002) Genomics of phytopathogenic fungi and the development of bioinformatic resources. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(5): 421-427.
- Sokolovsky, V, Kaldenhoff R, Ricci M y Russo VEA (1990) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. En: www.fgsc.net/fgn37/sokol.html (consulta: febrero 2008).
- Somma, M (2008) DNA extraction and purification, session 4th. En: *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms*, pp. 1-18. Joint Research Centre, European Commission
- Stergiopoulos, I, Lute-Harm Z y De Waard MA (2003) The ABC transporter MgAtr4 is a virulence factor of *Mycosphaerella graminicola* that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves. *Molecular Plant Microbe Interactions* 16: 689-698
- Van den Burg, HA, Westerink N, Francoijs KJ, Roth R y Woestenenk E (2003) Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *Journal of Biological Chemistry* 278: 27340-46
- Velazco, R (2005) Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 3: 14-18
- Venkatachalam, P, Thanseem I y Thulaseedharan A (1999) A rapid and efficient method for isolation of RNA from bark tissues of *Hevea brasiliensis*. *Current Science* 77: 635-637
- Wang, X, Tian W y Li Y (2008) Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. *Molecular Biotechnology* 38: 57-64
- Yamashita, Y, Sakurai T, Kuno N, Uchida K y Yokobayashi T (2005) RNA extraction reagent, and method for analyzing biological materials. Dickstein Shapiro Llp, Ac12q168fi. Washington DC, USA
- Yang, J, Li CY, Li H, Liu L, Su Y, Li JB, Chang Q, Qu LJ, Wang YY y Zhu YY (2008) A Novel Gene Involved in Lesion Formation in *Magnaporthe grisea*. *Journal of Phytopathology* 156: 99-103
- Zahiri, AR, Babu MR y Saville BJ (2005) Differential gene expression during teliospore germination in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics* 273: 394-403