

Un método eficiente para la extracción de ARN total de alta calidad de varios tejidos de *Myrciaria dubia* (camu camu)

An efficient extractive method of RNA of total high quality from various tissues of *Myrciaria dubia* (camu camu)

Ánderson E. Medina¹, Marianela Cobos^{1,2}, Jorge L. Marapara¹, Sixto A. Imán³ y Juan C. Castro⁴

Recibido: junio 2015

Aceptado: junio 2015

RESUMEN

Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh (camu camu) es un frutal nativo de la Amazonía que sobresale por el alto contenido de ácido L-ascórbico (vitamina C) en sus frutos. Pero, los estudios sobre expresión de genes en esta especie son escasos, debido a la falta de métodos de extracción de ARN total. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método eficiente para la extracción de ARN total de alta calidad de varios tejidos de *M. dubia*. Las muestras botánicas (brotes florales, inflorescencias, frutos verdes, pintones y maduros) fueron obtenidas de la Colección Nacional de Germoplasma de *M. dubia* del Instituto Nacional de Innovación Agraria. El ARN de los diferentes tejidos fue extraído con un método que combina la destrucción mecánica de la pared celulósica, la lisis celular con el detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio, la extracción y precipitación de los ácidos nucleicos con solventes orgánicos y sales. Los análisis espectrofotométricos ($A_{260}/A_{230} = 2,62 \pm 0,09$; $A_{260}/A_{280} = 1,82 \pm 0,03$) y electroforético (bandas de ARNr 28S y 18S sin evidencias de degradación) indican que el ARN total extraído es de alta calidad. Asimismo, el método desarrollado mostró altos rendimientos ($515,60 \pm 190,35 \mu\text{g}$ de ARN/g tejido). En conclusión, se ha desarrollado un método eficiente que nos permite la extracción de ARN total de alta calidad y cantidad apropiadas para realizar estudios de expresión genética en varios tejidos de *M. dubia*.

Palabras claves: ácidos nucleicos, expresión genética, frutal amazónico, purificación.

ABSTRACT

Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh (camu camu) is a native fruit of the Amazon overhanging by the high content of L-ascorbic acid (vitamin C) in fruits. However, studies on gene expression in this species are limited because of the lack of methods to extract total RNA. Therefore, the objective of this work was to develop an efficient method for extraction of high quality total RNA from various tissues of *M. dubia*. The botanical samples (buds, inflorescences, unripe, semi-ripe, and ripe fruits) were obtained from the National Germplasm Collection of *M. dubia* of the National Institute of Agro Innovation. RNA from various tissues were extracted using a method which combines the mechanical destruction of the cellulose wall, cell lysis with the detergent hexadecyltrimethylammonium bromide, extraction and precipitation of nucleic acids with organic solvents and salts. The spectrophotometric ($A_{260}/A_{230} = 2,62 \pm 0,09$; $A_{260}/A_{280} = 1,82 \pm 0,03$) and electrophoretic analysis (bands of 28S and 18S rRNA no evidence of degradation) indicate that the total RNA extracted is of high quality. Also, the method developed

¹Unidad Especializada de Biotecnología. Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

²Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética. Universidad Científica del Perú (UCP). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

³Área de Conservación de Recursos Fitogenéticos. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). San Juan Bautista, Loreto, Perú.

⁴Unidad Especializada de Biotecnología. Cirna. UNAP. Pasaje Los Paujiles s/n, Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Loreto, Perú. juanccgomez@yahoo.es

showed higher yields ($515,60 \pm 190,35 \mu\text{g RNA/g tissue}$). In conclusion, we have developed an efficient method for the extraction of high quality and quantity of total RNA suitable for gene expression studies in various tissues of *M. dubia*.

Key words: nucleic acids, gene expression, Amazonian fruit, purification.

INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia (camu camu), es un frutal silvestre de la Amazonía que crece en las riberas inundables de los ríos y cochas de aguas negras. Sus frutos presentan alto contenido de ácido L-ascórbico (vitamina C), que pueden llegar a 5,0 g por 100 g de pulpa (Rodrigues *et al.*, 2001) y en promedio 2,6 g por 100 g de pulpa fresca (Akter *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2002; Bradfield y Roca, 1964). Además, sus frutos contienen diversos compuestos fenólicos con actividad antioxidante (Akachi *et al.*, 2010; Akter *et al.*, 2011; Fracassetti *et al.*, 2013).

Sin embargo, a pesar de la importancia de esta especie amazónica, los estudios a nivel molecular son limitados. Específicamente, aún no hay reportes científicos sobre la expresión de los genes que controlan la producción de vitamina C. Esto se atribuye en parte, a la falta de métodos que sean eficientes para extraer ARN total de alta calidad. Porque, es precisamente la obtención de este tipo de ácidos nucleicos uno de los pasos fundamentales para los estudios de genómica funcional (Rubio y Zapata, 2011). Aunque, investigaciones previas han publicado diversos métodos para extraer ARN total de otras especies de plantas (Jaakola *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003; Vicent y Delseny, 1999) y de hojas de *M. dubia* (Castro *et al.*, 2013). Sin embargo, estos métodos no necesariamente serán de utilidad para extraer el ARN total de diversos tejidos de *M. dubia* tales como brotes florales, inflorescencias, semillas de frutos verdes, pintones y maduros, epicótilo e hipocótilo de plántulas.

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método eficiente para la extracción de ARN total de alta calidad de varios tejidos de *M. dubia*.

MATERIAL Y MÉTODO

Recolección de muestras botánicas

Todas las muestras de *M. dubia* (brotes florales, inflorescencias, frutos verdes, pintones y maduros) fueron obtenidas de la Colección Nacional de Germoplasma, Campo Experimental El Dorado, Estación Experimental Agraria San Roque - Loreto del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA); ubicado en el kilómetro 25,5 de la carretera Iquitos-Nauta ($3^{\circ}57'22,95''\text{S}$ y $73^{\circ}24'46,91''\text{O}$).

Para la obtención del epicótilo e hipocótilo de las plántulas, previamente se hicieron germinar las semillas de los frutos maduros según Medina *et al.* (2013). Brevemente, el procedimiento consistió en escarificar las semillas en la zona de brote del hipocótilo, luego fueron puestas entre cuatro capas de gasa embebidas con agua destilada y posteriormente transferidas a recipientes de plástico y cubiertas con una bolsa negra de polietileno.

Soluciones y materiales

Tampón de extracción modificado de Castro *et al.* (2013): tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 300 mM pH 8,2, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25 mM, cloruro de sodio (NaCl) 2 M, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 2%, polivinilpirrolidona 3% y espermidina 0,05%. Además, se añadió β -mercap-

toetanol (concentración final 2%) justo antes de usar.

Otras soluciones empleadas: cloroformo: alcohol-isoamílico (24: 1), cloruro de litio (LiCl) 10M, acetato de sodio 3M pH 5,2, etanol absoluto (100%), etanol al 70%, TURBO™ DNase (Ambion™, ThermoFisher Scientific, USA), agua libre de ribonucleasas.

Todos los materiales de plástico (microtubos, puntas, etc.), de vidrio, de porcelana (morteros y pilones) y las soluciones (excepto los que contenían Tris) fueron tratados con una solución acuosa de dietil pirocarbonato (40718, Sigma-Aldrich, USA) al 0,05% por 12 h y esterilizados en autoclave a 121 °C por 30 min.

Método de extracción del ARN total

Se utilizó el método modificado de Castro et al. (2013) que consistió en los siguientes pasos:

1. Poner 500 mg de la muestra botánica en un mortero que contiene 5 mL del tampón de extracción (atemperado a 70 °C por 20 min) y triturar la muestra hasta su completa homogenización (por ~5 min).
2. Transferir el homogenizado a microtubos de 2 mL e incubar en baño maría a 70 °C por 30 min, mezclando la solución cada 10 min en un vortex (Vortex-Genie® 2, Scientific Industries, USA).
3. Atemperar la muestra a 25 °C por 5 min, añadir 500 µL de cloroformo: alcohol-isoamílico (24:1) [CI] por cada mililitro de muestra, homogenizar la solución vigorosamente en el vortex por 30 seg y centrifugar a 23 000 x g por 10 min a 4 °C. Transferir el sobrenadante acuoso a un nuevo microtubo y repetir la extracción con CI.
4. Transferir el sobrenadante a un microtubo y añadir 0,25 volúmenes de LiCl 10 M

(concentración final 2,5 M), homogenizar e incubar en un congelador a -20 °C por 12 h.

5. Centrifugar a 23 000 x g por 20 min a 4 °C, eliminar el sobrenadante y lavar el ARN precipitado con 1 mL de etanol al 70% y repetir el proceso de centrifugación.
6. Secar el ARN precipitado en baño seco a 40 °C por 10 min, disolver el ARN con 89 µL de H₂O libre de ribonucleasas.
7. A la muestra disuelta agregar 10 µL del tampón 10x y 1 µL de la enzima TURBO™ DNase (2 U/L), homogenizar e incubar a 40 °C por 45 min.
8. Luego añadir 200 µL de CI, homogenizar en el vortex por 30 seg y centrifugar 23 000 x g por 10 min a 4 °C y transferir el sobrenadante acuoso a un nuevo microtubo.
9. Agregar 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 (concentración final 0,3 M), 3,0 volúmenes de etanol absoluto, homogenizar e incubar en una congeladora a -20 °C por 2 h.
10. Centrifugar la muestra a 23 000 x g por 10 min a 4 °C, lavar el ARN precipitado con etanol al 70% como previamente se indicó, secar y resuspender el ARN precipitado con 50 µL de agua libre de ribonucleasas y almacenarlo a -70 °C.

Análisis del ARN total extraído

La calidad y cantidad del ARN total fueron determinadas mediante análisis espectrofotométricos según Stephenson (2010). El nivel de contaminación por polifenoles/polisacáridos y proteínas se estimó con los ratios de absorbancia A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} , respectivamente. Además, la integridad del ARN total extraído se determinó mediante análisis electroforético de acuerdo con Sambrook et al. (1989).

Análisis estadísticos

Los datos de los ratios de calidad y rendimiento fueron analizados mediante estadís-

tica descriptiva (promedio y desviación estándar) empleando el programa IBM SPSS Statistics v 21,0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación se desarrolló un método eficiente para la extracción de ARN total de alta calidad de varios tejidos de *M. dubia*. Esto se evidencia con los resultados de los análisis espectrofotométricos (tabla 1). Por ejemplo, los promedios de los ratios de calidad $A_{260}/A_{230} = 2,62 \pm 0,09$ y $A_{260}/A_{280} = 1,82 \pm 0,03$ obtenidos con los análisis espectrofotométricos nos indican la ausencia de contaminantes (polifenoles/polisacáridos o proteínas, respectivamente) en el ARN total extraído de los siete tejidos de *M. dubia*. Estos resultados concuerdan con otros reportes de diferentes métodos de extracción de ARN total empleados en otras especies de plantas como *Arabidopsis thaliana* (Vicent y Delseny, 1999), *Cicer arietinum* (Venugopalan y Kapoor, 1997), *Vaccinium myrtillus* (Jaakola

et al., 2001), *Oryza sativa* (Suzuki et al., 2003) y *Glycine max* (Sharma et al., 2003).

Asimismo, es preciso mencionar que valores bajos en los ratios de calidad (p. ej., $A_{260}/A_{230} < 2,0$ y $A_{260}/A_{280} < 1,7$) indican contaminación con polifenoles/polisacáridos y proteínas, respectivamente (Porebski et al., 1997; Sambrook et al., 1989). Además, como los polifenoles y polisacáridos son compuestos abundantes en los tejidos vegetales y al no ser removidos de manera eficiente, estos pueden coprecipitar y contaminar los ácidos nucleicos durante la extracción, principalmente en la etapa de precipitación con isopropanol o etanol absoluto, afectando la calidad y el rendimiento (Kansal et al., 2008; Logemann et al., 1987). Pero, los problemas de contaminación mencionados no ocurrieron en las muestras de ARN total extraídas con el método descrito y esto se atribuye al uso de altas concentraciones de NaCl (2 M), que en conjunto con el detergente CTAB y el PVP

Tabla 1. Ratios de calidad y rendimiento de las muestras de ARN total extraídas de los diferentes tejidos de *M. dubia*.

| Tejido | Ratios de calidad | | Rendimiento (μg de ARN/g de tejido) |
|-------------------------|-------------------|-------------------|---|
| | A_{260}/A_{230} | A_{260}/A_{280} | |
| Brote floral | 2,62 | 1,83 | 882,4 |
| Inflorescencia | 2,63 | 1,83 | 603,2 |
| Semilla de fruto verde | 2,71 | 1,84 | 580,8 |
| Semilla de fruto pintón | 2,54 | 1,79 | 412,0 |
| Semilla de fruto maduro | 2,48 | 1,76 | 350,8 |
| Hipocótilo | 2,72 | 1,85 | 362,8 |
| Epicótilo | 2,67 | 1,84 | 417,2 |

remueven eficientemente los polisacáridos y polifenoles contaminantes (Jobes *et al.*, 1995; John, 1992).

También, los resultados del análisis electroforético muestran la alta calidad del ARN total purificado de los diversos tejidos de *M. dubia*. En la figura 1 se observa: a) que ninguna de las muestras está contaminada con ADN y/o polisacáridos, porque no hay bandas de alto peso molecular (ADN) o fluorescencia en los pocillos (polisacáridos), b) los ARN ribosomales 28 S muestran similar o mayor intensidad que los ARN ribosomales 18 S y c) no es evidente la degradación del ARN total. Por tanto, la concentración de la desoxirribonucleasa y el tiempo de hidrólisis del ADN contaminante fueron apropiados. Asimismo, el uso del CTAB y NaCl, a las concentraciones empleadas, han contribuido a remover los polisacáridos contaminantes. Finalmente, el uso del β -mercaptoetanol, un inhibidor de las ribonucleasas, ha garantizado la integridad del ARN total extraído.

Finalmente, las diferencias del rendimiento (μg de ARN/g de tejido) entre los diversos tejidos analizados (tabla 1) se pue-

den atribuir a diferencias en dos aspectos: 1) características intrínsecas de los tejidos y 2) la tasa de expresión genética que controla el metabolismo y división celular en cada tipo de tejido. Por ejemplo, al comparar los brotes florales con las inflorescencias, los primeros en principio están constituidos por células poco diferenciadas y por ende con paredes celulares más fáciles de romper; además, presentan una intensa actividad metabólica y con alta tasa de división celular. Consecuentemente, este tejido presenta más ARN total. De modo similar, el rendimiento disminuye gradualmente conforme las semillas van madurando, lo que puede deberse a una disminución de las tasas de expresión genética y por ende, al cese de las actividades metabólicas y de la división celular, porque las células se han diferenciado. También, las diferencias del rendimiento registradas del hipocótilo y el epicótilo se pueden deber a que en este último la mayoría de las células presentan en principio una alta actividad metabólica y una alta tasa de división celular; en contraste, en el hipocótilo esta característica se restringe principalmente a las células de los meristemas apicales. En general, nuestros

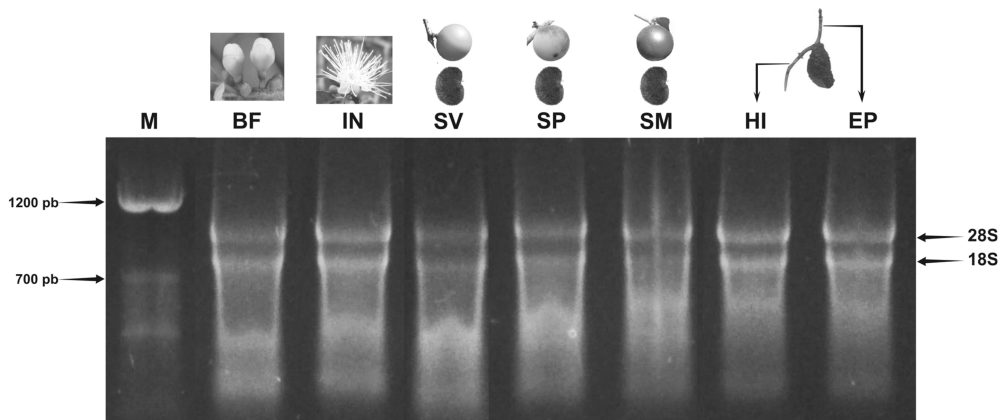


Figura 1. Análisis electroforético del ARN total extraído de diferentes tejidos de *M. dubia*. BF: brote floral, IN: inflorescencia, SV: semilla de fruto verde, SP: semilla de fruto pintón, SM: semilla de fruto maduro, HI: hipocótilo, EP: epicótilo, M: marcador de peso molecular.

hallazgos corroboran los resultados de Le Provost *et al.* (2007), quienes al trabajar con especies forestales muestran que el rendimiento está en función del tipo de tejido y de la etapa de desarrollo del mismo.

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método eficiente que nos permite la extracción de ARN total de alta calidad y cantidad apropiadas para realizar estudios de expresión genética en varios tejidos de *M. dubia*.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) y al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Concytec) por proporcionar los fondos para realizar esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akachi T, Shiina Y, Kawaguchi T, Kawagishi H, Morita T, Sugiyama K. 2010. 1-methylmalate from camu camu (*Myrciaria dubia*) suppressed D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(3): 573-578.

Akter MS, Oh S, Eun JB, Ahmed M. 2011. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. *Food Research International*, 44(7): 1728-1732.

Alves R, Filgueiras H, Moura C, Araujo N, Almeida A. 2002. Camu camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh): a Rich Natural Source of Vitamin C. *Proceeding of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*, 46: 11-13.

Bradfield RB, Roca A. 1964. Camu camu - a fruit high in ascorbic acid. *Journal of the American Dietetic Association*, 44: 28-30.

Castro JC, Egoavil AD, Torres J, Ramírez R, Imán SA. 2013. Isolation of high-quality total RNA from leaves of *Myrciaria dubia* (camu camu). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(6): 527-538.

Fracassetti D, Costa C, Moulay L, Tomás-Barberán FA. 2013. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 139(1-4): 578-588.

Jaakola L, Pirttilä AM, Halonen M, Hohtola A. 2001. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Molecular Biotechnology*, 19(2): 201-203.

Jobs DV, Hurley DL, Thien LB. 1995. Plant DNA Isolation: A Method to Efficiently Remove Polyphenolics, Polysaccharides, and RNA. *Taxon*, 44(3): 379-386.

John ME. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, 20(9): 2381.

Kansal R, Kuhar K, Verma I, Gupta RN, Gupta VK, Koundal KR. 2008. Improved and convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysaccharide rich plant tissues. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46(12): 842-845.

Le Provost G, Herrera R, Paiva JA, Chaumeil P, Salin F, Plomion C. 2007. A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biological Research*, 40(3): 291-297.

- Logemann J, Schell J, Willmitzer L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 163(1): 16-20.
- Medina A, Córdova E, Fasabi J, Rodríguez NH, Imán SA, Castro JC. 2013. Semillas y plántulas de *Myrciaria dubia* (camu camu): biometría, germinación, desarrollo y crecimiento inicial. *Scientia Agropecuria*. 5(2014): 85-92.
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1): 8-15.
- Rodrigues RB, De Menezes HC, Cabral LM, Dornier M, Reynes M. 2001. An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu camu (*Myrciaria dubia*). *Fruits*, 56(05): 345-354.
- Rubio JA, Zapata O. 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(5): 1-8.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sharma AD, Gill PK, Singh P. 2003. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 314(2): 319-321.
- Stephenson FH. 2010. Nucleic acid quantification. In F. H. Stephenson (Ed.), *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (Second Edition)* (pp. 99-122). Boston: Academic Press.
- Suzuki Y, Hibino T, Kawazu T, Wada T, Kihara T, Koyama H. 2003. Extraction of total RNA from leaves of *Eucalyptus* and other woody and herbaceous plants using sodium isoascorbate. *BioTechniques*, 34(5): 988-990.
- Venugopalan C, Kapoor HC. 1997. Single step isolation of plant RNA. *Phytochemistry*, 46(8): 1303-1305.
- Vicient CM, Delseny M. 1999. Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* Seeds. *Analytical Biochemistry*, 268(2): 412-413.