

Evaluación de protocolos de extracción de RNA total de *Aloe vera* sometido a estrés salino y déficit hídrico

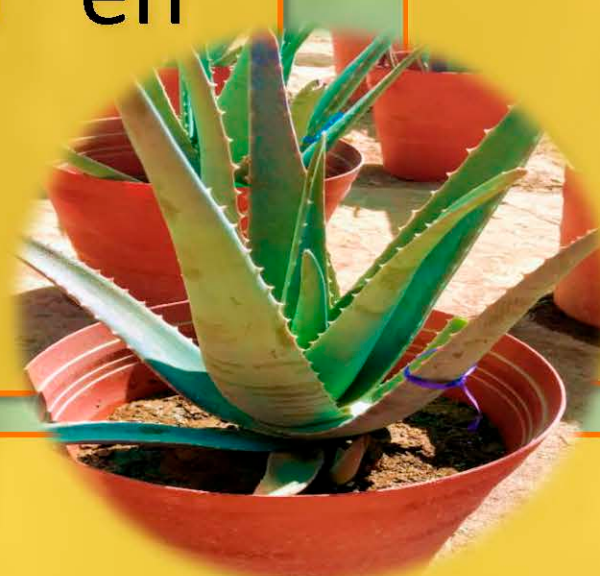
María S. Mota-Ituarte ¹, Mayela Rodríguez González ¹, Aurelio Pedroza-Sandoval ^{1*},
José Rafael Minjares-Fuentes ², J. Josafath Quezada-Rivera ³

¹ Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Km. 40 Carr. Gómez Palacio -Chihuahua, Bermejillo, Durango, México. C.P. 35230. ² Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Av. Artículo 123 s/n. Gómez Palacio, Durango, México. C.P. 35010. ³ Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad s/n Fracc. Filadelfia CP. 35010 Gómez Palacio, Durango, México. Gómez Palacio, Durango, México. C.P. 35010.

apedroza@chapingo.uruza.edu.mx *

INTRODUCCIÓN

El ácido ribonucleico (RNA) es una macromolécula esencial en varios procesos biológicos, su importancia radica en su función como plantilla para la síntesis de proteínas y catalizar reacciones biológicas. Importantly, el ARN aislado es ampliamente utilizado en una serie de ensayos de biología molecular, incluido el análisis de expresión génica a través de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción reversa (RT-qPCR) (Toni et al., 2018). Sin embargo, los datos de expresión génica precisos y fiables se basan en la extracción adecuada de ARN de alta calidad. Obtener RNA limpio e intacto a partir de tejidos vegetales se complica por los altos niveles de polifenoles y polisacáridos que se unen y/o precipitan con él (Gehrig, Winter, Cushman, Borland, & Taybi, 2000). En este sentido, el *Aloe vera* es una planta medicinal valiosa. Sin embargo, el estrés abiótico y puede afectar negativamente las características morfológicas de la planta, así como la calidad y cantidad de sus compuestos fitoquímicos (Asghari & Ahmadvand, 2018). Las plantas de *A. vera* pueden haber adquirido genes específicos esenciales para la tolerancia al estrés durante el curso de su evolución. Encontrar tales genes puede influir enormemente en la productividad agrícola en el futuro. El objetivo del presente fue comparar métodos simples y efectivos para aislar RNA de alta calidad de las hojas de *A. vera* en un ambiente de laboratorio, y obtener suficiente para usar en experimentos posteriores.



MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las plantas de *A. vera* fueron obtenidas de la Unidad Regional de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma de Chapingo (Durango, México) (25°52'28" LN y 103°37'07" LO. Éstas estuvieron en condiciones de malla sombra y estrés abiótico (salinidad inducida con NaCl 20 y 80 mM, déficit hídrico con humedad alta (HA) 16-21% y baja (HB)10-15% de la humedad edáfica), durante enero a marzo 2020. Las muestras se lavaron, seccionaron y congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C, hasta que se extrajo el RNA de la penca.



Figura 1. Procedimiento general de los protocolos de extracción de ARN. Previo a la extracción, los tejidos se molieron hasta obtener un polvo fino verde opaco usando un mortero y nitrógeno líquido. Para cada protocolo se evaluaron 4 muestras.

RESULTADOS

Con metodologías descritas anteriormente no se encontraron diferencias estadísticas en la concentración (ng/μl) del aislado entre los tres protocolos, sin embargo, el protocolo C logró una extracción con concentración ligeramente mayor. De acuerdo a la relación A260/280 hay diferencia estadística entre protocolos, dicha relación es un indicador directo del nivel de pureza. Particularmente, las extracciones con protocolo A generaron RNA contaminado con compuestos aromáticos (A260/280<1.7; Tabla 1). En el protocolo B y C se obtuvo RNA de pureza óptima (A260/280 2.0– 2.2.7; Tabla 1), sin embargo por las concentraciones bajas, no se logra visualizar con claridad en la electroforesis (Fig. 2). La relación A260/230 (Tabla 1), para los tres protocolos probados en éste estudio, da como resultado RNA altamente contaminado con polisacáridos, sales y fenoles, sin diferencia estadística entre protocolos. Características fisiológicas y metabólicas de *A. vera*, como lo son, un alto contenido de polisacáridos (Femenia *et al.*, 1999), la elevada producción de compuestos fenólicos (Jaafar *et al.*, 2012) y la acumulación de iones tóxicos de Na⁺ en las vacuolas (de Freitas *et al.*, 2018), como mecanismo defensivo, activados por el estrés hídrico y salino de las plantas usadas como muestras hacen que la extracción de RNA de alta calidad sea una tarea difícil. Con esto, los resultados obtenidos no son los esperados en calidad y cantidad de RNA aislado.

Tabla 1. Cuantificación espectrofotométrica del RNA total extraído de corteza de plantas de *A. vera*.

Protocolo de aislamiento de RNA	Concentración de RNA (ng/μl)	260/280	260/230
A	22.43 ± 12.6 a	1.08 ± 0.15 a	0.25 ± 0.06 a
B	20.95 ± 14.8 a	2.28 ± 0.52 b	0.35 ± 0.13 a
C	31.80 ± 17.3 a	2.05 ± 0.21 b	0.39 ± 0.20 a

Concentración y pureza en valor promedio seguidos de desviación estándar, n=4.). Diferencias entre medias encontradas mediante Tukey (p≤ 0.05). Valores con la misma letra, dentro de una misma columna, son estadísticamente

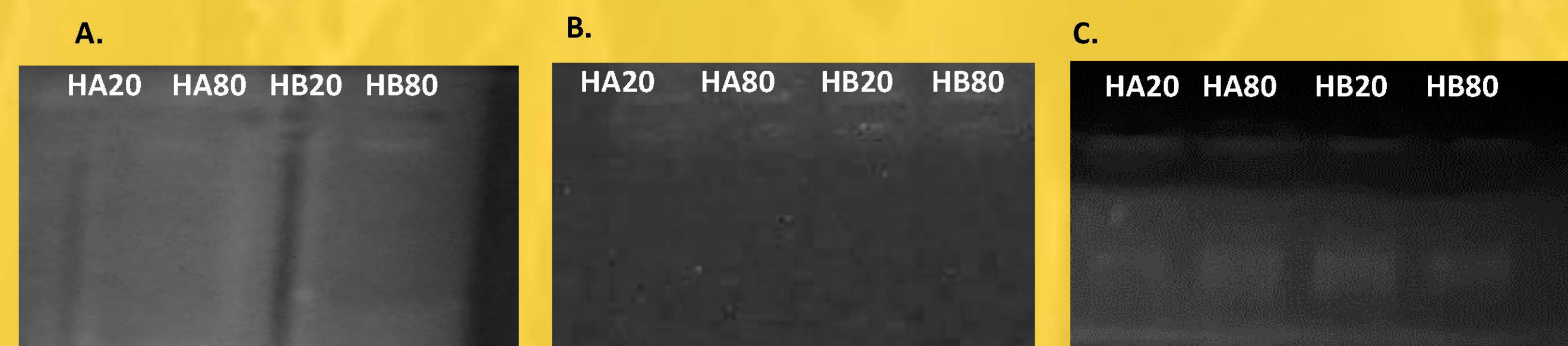


Figura 2. Patrón de bandeo de las muestras de RNA total de corteza de *A. vera* extraídas con tres métodos diferentes. A: Kit RNeasy®, B: Mattison et al. (2017) y C: Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011). Muestras bajo estrés salino (NaCl 20 y 80 mM) y déficit hídrico (HA y HB, 16-21 y 10-15% de la humedad edáfica, respectivamente).

CONCLUSIÓN

En este estudio presentamos una comparación entre 3 métodos diferentes para el aislamiento de RNA total de *A. vera*. Los métodos fueron evaluados con especial énfasis en la calidad del RNA y el rendimiento. Todos los métodos probados extraen RNA con rendimiento bajo y calidad similar. Por lo que se recomiendan modificaciones o adaptaciones para mejores resultados. Dado que los diferentes métodos de extracción se mostraron constantes en el

rendimiento, es de gran importancia elegir el método ideal, o en su defecto estandarizar dichos protocolos para garantizar RNA de alta calidad para posteriores análisis down stream. Desarrollar métodos simples y efectivos para aislar RNA de alta calidad es tan determinante como el obtener suficiente para usar en experimentos posteriores. La contaminación del RNA con reactivos usados durante la extracción y componentes propios del material vegetal de estudio, tienen un impacto negativo sobre el mismo.