

## Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp.

### Evaluation of different RNA extraction methods from the native fungus *Xylaria* sp.

Jhon Felipe Sandoval-Pineda\*, Francisco Manuel Ochoa-Corona\*\*, Esperanza Torres-Rojas\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57114

#### RESUMEN

La extracción de ARN de calidad constituye el primer paso para el análisis de la expresión génica. Sin embargo, su obtención no es sencilla debido a la susceptibilidad de esta molécula a la presencia de contaminantes como ARNasas, proteínas y polisacáridos. Adicionalmente, debido a la diversa composición de la pared celular de los hongos se requiere optimizar los procesos de extracción de ARN para organismos específicos. Este estudio evaluó el uso de diferentes metodologías de homogeneización de tejido (nitrógeno líquido y liofilización) y extracción de ARN (Trizol, CTAB y RNeasy mini kit) a partir del hongo nativo ascomiceto *Xylaria* sp. Se determinó la pureza, concentración e integridad del ARN obtenido por medio de espectrofotometría y electroforesis. Adicionalmente, se diseñaron cebadores de referencia para el gen  $\beta$ -*Tubulina* a partir del alineamiento de secuencias de este gen obtenidas de diferentes ascomicetes. Estos cebadores fueron utilizados para evaluar si el ARN extraído es amplificable mediante RT-PCR. Se determinó que la homogeneización de tejido por medio de liofilización generó mayores rendimientos de extracción independientemente del protocolo de extracción utilizado; sin embargo, éstos alteraron la integridad del ARN. Se obtuvo un ARN con mayor pureza con el protocolo CTAB y un mayor rendimiento con el RNeasy mini kit. Los resultados indican que el ARN extraído, independientemente de la metodología de homogeneización y extracción utilizada, es amplificable mediante RT-PCR. No obstante, se recomienda homogeneizar el tejido con nitrógeno líquido y extraer con RNeasy mini kit por la brevedad del protocolo de extracción y calidad obtenida.

**Palabras clave:** ascomicetes,  $\beta$ -*tubulina*, liofilización, nitrógeno líquido, RT-PCR.

\* Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, jfsandovalp@unal.edu.co.

\*\* PhD., Oklahoma State University. Stillwater, Estados Unidos, ochoaco@okstate.edu.

\*\*\* PhD., Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Facultad de Ciencias Agrarias. Colombia, Dirección de correspondencia: etorresr@unal.edu.co.

## ABSTRACT

Obtaining high quality RNA is the first step for gene expression analysis. However, the low stability of this molecule and high presence of contaminants such as RNases, proteins and polysaccharides may trouble extractions. Fungi cell wall composition is highly diverse; therefore optimizing RNA extraction procedures is necessary when studying specific organisms. In this study, different methods of tissue homogenization (liquid nitrogen and lyophilization) and RNA extraction (Trizol, CTAB and RNeasy mini kit) were assessed with a native ascomycete, *Xylaria* sp. RNA purity, concentration and integrity were determined by spectrophotometry and electrophoresis. In addition, a set of housekeeping gene primers was designed targeting the  $\beta$ -tubulin gene. The primers were used to determine if the RNA extracted allowed RT-PCR amplification. It was demonstrated that homogenization of tissue by lyophilization allowed higher yields of RNA regardless of the extraction protocol used, however, the RNA integrity was affected. The higher RNA purity was obtained using CTAB and the higher yields using the RNeasy mini kit. The extracted RNA is amplifiable by RT-PCR regardless of the homogenization and extraction methodology used. However, it is recommended to homogenize the tissue with liquid nitrogen and to extract RNA with the RNeasy mini kit due the shortness and efficiency of these protocols.

**Keywords:** ascomycete,  $\beta$ -tubulin, lyophilization, liquid nitrogen, RT-PCR.

**Recibido:** agosto 22 de 2016

**Aprobado:** mayo 25 de 2017

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de hongos capaces de modificar la pared celular con el fin de encontrar mejores sistemas de degradación de la materia orgánica (Dhouib *et al.*, 2005). La familia Xylariaceae pertenece a un grupo de hongos ascomicetes relacionados con la pudrición blanda y son un componente importante de la microbiota en bosques tropicales donde actúa principalmente como hongo descomponedor (Floudas *et al.*, 2012). Su habilidad está relacionada con la producción de enzimas extracelulares como las hidrolasas versátiles y lacasas que permiten degradar material orgánico (Castaño *et al.*, 2015). Por esta razón el estudio de la expresión de genes que codifican enzimas lignocelulolíticas ha generado un gran interés debido a su uso en diferentes aplicaciones biotecnológicas (Kunamneni *et al.*, 2007).

El análisis de expresión génica es piedra angular en la biología molecular moderna y contribuye a un mejor entendimiento de la genética y la regulación transcripcional (Liu *et al.*, 2012). Dentro de las metodologías para el análisis de expresión de genes se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), ambas técnicas permiten la detección de mARNs transcritos por genes específicos y son amplia-

mente utilizadas debido a su alta precisión, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Walker, 2002).

La obtención de ARN de calidad constituye la base para el desarrollo de diferentes técnicas moleculares, de lo contrario podría comprometer seriamente los resultados de procedimientos posteriores a la extracción, los cuales requieren intensa labor, tiempo adicional y altos costos. Extraer ARN no siempre es sencillo, esta molécula es menos estable que el ADN y la presencia de contaminantes como ARNsas, proteínas, polisacáridos y ADN genómico pueden desafiar su obtención (Zakaria *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha reportado que la presencia de estos contaminantes puede interferir con la amplificación de los ácidos nucleicos (Vermeulen *et al.*, 2011).

En el caso particular de hongos, la obtención de ARN de baja calidad es frecuente debido a la presencia de paredes celulares o estructuras como las hifas y conidias que no son degradables fácilmente (Melo *et al.*, 2006). Adicionalmente, la presencia de alto contenido de fenoles y polisacáridos genera la necesidad de modificar los protocolos de extracción (Vasanthaiyah *et al.*, 2008; Kumar, 2012). En la actualidad, existen diferentes metodologías de ruptura y homogeneización de tejidos a través del uso de nitrógeno líquido, arena, esferas o liofilización de micelio (Burden, 2008), sin

embargo, independientemente de la metodología usada, el riesgo de rehidratación de muestras y activación de ARNasas está siempre latente. A la fecha, se han reportado diferentes procesos de extracción de ARN entre las cuales se encuentran el uso de compuestos fenólicos, triazoles, sodio dodecil sulfato (SDS), cloruro de litio, detergentes como el Brumoro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y ahora con mayor frecuencia con paquetes o kits comerciales de extracción (Rojas *et al.*, 2011; Lever *et al.*, 2015). No obstante, la calidad y rendimiento del ARN extraído puede variar entre las metodologías mencionadas y la especie biológica de estudio (Fleige & Pfaffl, 2006).

Los genes que codifican proteínas esenciales para la vida o 'housekeeping genes' (HKG) son útiles como genes de referencia para estandarizar técnicas de expresión génica, ya que estos se transcriben de manera estable durante el ciclo de vida de la célula y en diferentes estados de desarrollo (Giménez, 2011). Por lo tanto, permiten corregir variaciones tales como diferentes cantidades de ARN inicial y eficiencias durante la transcripción reversa (Udvardi *et al.*, 2008). No obstante, es recomendable evaluar diferentes cebadores, para ampliar el rango de opciones y elegir el que más se ajuste a las condiciones experimentales (Hruz, 2011). Para la familia Xylariaceae se han diseñado cebadores para el gen *β-tubulina* y *actina* utilizados en estudios filogenéticos y de expresión génica, respectivamente (Chen *et al.*, 2013).

Se ha determinado que al usar metodologías con alta reproducibilidad y sensibilidad, como RNAseq, se pueden generar cambios en la expresión génica dependiendo de la metodología de extracción de ARN utilizada (Sultan *et al.*, 2014). Por lo tanto, esta investigación tuvo como objetivo evaluar diferentes metodologías de homogeneización (nitrógeno líquido y liofilización) y extracción de ARN (Trizol, CTAB y RNeasy mini kit) a partir de micelio del hongo ascomicete *Xylaria* sp. Esto con el fin de estandarizar una metodología que permita la obtención de ARN de alta calidad y rendimiento. Adicionalmente, como modelo de estudio y validación se realizó una RT-PCR, usando cebadores degenerados para amplificar un fragmento del gen de la *β-tubulina*. Estos fueron diseñados mediante análisis

múltiple de secuencias obtenidas de hongos ascomicetos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento fúngico y preservación.

Los aislamientos del hongo *Xylaria* sp. (Ascomicota: Xylariaceae) fueron obtenidos en el laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), sede Bogotá. Este hongo fue seleccionado previamente por su alta actividad lacasa y preservado en medio agar-salvado de trigo a 4°C según Castaño *et al.*, 2015. Para evaluar la especificidad de los cebadores de referencia diseñados, además del ADN extraído a partir del hongo *Xylaria* sp., se utilizó el ADN de otros hongos actinomicetos (*Sclerotinia* sp., *Fusarium solani*, *Penicillium* sp., *Fusarium oxysporum*) y basidiomicetos (*Hymenogloea* sp., *Pholliota* sp., *Agrocybe* sp.) obtenidos previamente en el laboratorio de Agrobiotecnología (Crespo *et al.*, 2014).

### Medios de cultivo.

Los hongos se sub-cultivaron en 30 ml de medio de cultivo líquido Mandels modificado de acuerdo a lo reportado por Moya & Torres (2012). En todos los casos, los medios de cultivo fueron inoculados con tres discos de 5 mm de diámetro tomados de la periferia del hongo e incubados a 26 °C y con agitación de 150 rpm durante 6 días de acuerdo a lo reportado por Castaño *et al.*, 2015.

### Extracción de ARN total a partir de micelio.

Para el proceso de extracción de ARN se partió de micelio homogenizado mediante maceración con nitrógeno líquido o liofilización (Christ Alpha 1-4LD) por 48 horas. Todas las soluciones y materiales se esterilizaron tres veces previamente a su utilización a 121°C por 20 min. Tubos eppendorf de 2 ml fueron alícuotados con aproximadamente 400 mg de tejido fúngico homogenizado. Se evaluaron tres metodologías de extracción de ARN: Trizol® reagent (Life Technologies), protocolo CTAB con precipitación con LiCl<sub>2</sub> (Chang *et al.*, 1993) y RNeasy Mini Kit® (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En cada caso, se realizaron tres repeticiones por muestra.

### **Análisis y cuantificación de ARN.**

Las soluciones de ARN obtenidas se cuantificaron con un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo scientific). Se determinó la pureza del ARN en cada muestra por medio de relaciones de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  y el rendimiento fue calculado como la cantidad de ARN obtenido (ng) sobre el peso de micelio utilizado para la extracción ( $\mu\text{g}$ ), las extracciones se realizaron por triplicado. Los resultados de pureza y rendimiento fueron analizados mediante ANOVA y pruebas de comparación de medias de Tukey ( $\alpha < 0.01$ ) siguiendo un diseño factorial completamente al azar, posterior a la revisión de supuestos de normalidad (Lilliefors:  $p > 0.05$ ) y homogeneidad de varianzas (Fligner-Killeen:  $p > 0.05$ ). Los datos obtenidos fueron procesados con el programa estadístico R 3.4.0. Además, se constató y documentó la integridad del ARN mediante visualización directa en gel de electroforesis (agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio, 100V por 15min) mediante un visualizador de imágenes ChemiDoc MP system (BioRad). Los procesos de extracción de RNA se llevaron a cabo en el laboratorio de Agrobiotecnología de la FCA de la UNAL, sede Bogotá y la visualización en el laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAL.

### **Diseño de cebadores de referencia para el gen de la $\beta$ -tubulina.**

Se diseñó un juego de cebadores a partir de un alineamiento múltiple de veintitrés secuencias de ADN del gen  $\beta$ -tubulina obtenidas de veintitrés especies de la familia Xylariaceae y diez secuencias adicionales de diversos ascomicetes almacenadas en la base de datos NCBI usando BLAST (accesiones: HM585018, GQ502718, GQ502698, GQ502712, GQ502703, GQ502710, GQ502697, GQ487702, GQ487701, GQ495955, GQ502685, GQ502707, GQ478209, GQ502706, GQ495945, AB625369, GQ502692, GQ478222, JX868543, EF025617, JX868550, GQ478226, EF025606, AY951665, AY951734, GQ478213, GQ470224, GQ470228, EF025607, GQ470220, EF025616, GQ478211, JQ691672. Última fecha de acceso: Marzo 2017). Las secuencias consenso se identificaron a partir de alineamientos múltiples para lo cual se utilizó los programas ClustalX2 y GeneDoc. También se utilizaron los programas Primer3,

OligoAnalyzer y mFold para el diseño de cebadores y análisis de las propiedades termodinámicas *in silico*. Los cebadores fueron diseñados teniendo como referencia los siguientes parámetros: temperatura de disociación ( $T_m$ : 55-65°C), contenido de Guaninas y Citosinas (GC%: 50-55%), energía óptima para ruptura de estructuras secundarias ( $\Delta G > -9\text{Kcal/mol}$ ), tendencia del primer a formar estructuras secundarias con si mismo (3' > Any number) y con su extremo 3' (3' > 3' number) (Dieffenbach *et al.*, 1993; Arif & Ochoa-Corona, 2013).

### **Evaluación del juego de cebadores.**

Se realizó la validación y optimización de condiciones para el funcionamiento de los cebadores diseñados según Ochoa-Corona *et al.* (2007), por medio de la evaluación de un gradiente de temperatura óptima de anillamiento (51-62°C), prueba de sensibilidad (diluciones seriadas a partir de 1ng-1pg de ADN de *Xylaria* sp.) y finalmente prueba de especificidad con ocho especies de hongos lignocelulolíticos. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en 50 $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción que contenía 500ng de ADN, 0.5U de Taq ADN polimerasa, 0.3mM dNTPs, 1X buffer Tris HCl 0.1M, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 $\mu\text{M}$  de primer BtubF (5'-TTCCARATYACMCACTCGCT-3') y BtubR (5'-GCCATCATGTTCTTRGGGTC-3'). La amplificación de ADN se realizó bajo las siguientes condiciones: 96 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, con una extensión final de 72 °C por 10 min en un termociclador (Thermal Cycler 170-9701, Bio Rad). Finalmente, 5 $\mu\text{l}$  de producto de PCR con 1 $\mu\text{l}$  de EZ-visión fue visualizado y fotografiado en un gel (agarosa 1.0%, buffer TBE 0.5X, 90V por 35 min) utilizando el visualizador de imágenes ChemiDoc MP system (Bio Rad). Estos procesos fueron llevados a cabo en el laboratorio de Agrobiotecnología de la FCA de la UNAL.

### **Condiciones de RT-PCR.**

La contaminación con ADN en la solución de ARN fue eliminada mediante tratamiento con kit de DNase I (Invitrogen, ThermoFisher scientific®) de acuerdo a las indicaciones del proveedor, seguido por síntesis y amplificación del cADN a partir de 1 $\mu\text{g}$  ARN total, usando el kit RT-PCR one step (Qiagen), de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Homogeneización de micelio y extracción de ARN.

Como consecuencia a la susceptibilidad del ARN a ser degradado durante el proceso de extracción, la estandarización de este tipo de procedimientos es fundamental para asegurar la reproducibilidad de protocolos. Generalmente, en los procesos de extracción de ácidos nucleicos se hace uso de maceración con nitrógeno líquido para la homogeneización de tejidos, no obstante, existe riesgo de rehidratación de muestras y con ello activación de ARNasas, lo cual puede ocurrir si el procedimiento no es continuo y rápido. (Wilfinger & Mackey, 2015). Otra forma de homogeneizar el tejido inicial es haciendo uso de la liofilización debido a su facilidad durante la manipulación de muestras, la disrupción uniforme del tejido y sus consistentes resultados en los rendimientos de extracción de ARN (Pearson *et al.*, 2006).

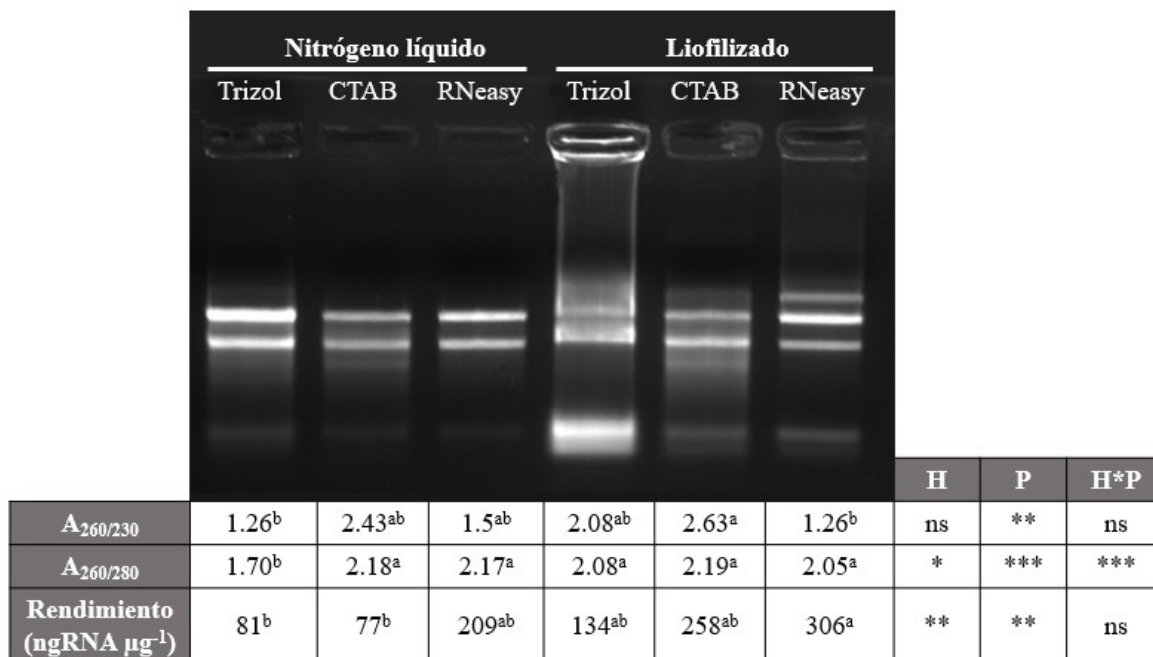
En el caso de *Xylaria* sp. se encontró que tanto el método de homogeneización como el protocolo utilizado, afectan el rendimiento de extracción de ARN (figura 1), encontrando los mayores rendimientos con el uso de liofilización y el protocolo RNeasy (306 ngRNA  $\mu\text{g}^{-1}$ ). Se detectó que con el uso de tejido liofilizado se obtuvieron rendimientos de extracción más altos (1.7, 3.4, 1.5 veces más) que cuando se realizó con micelio macerado con nitrógeno líquido, con las tres metodologías de extracción de ARN empleadas (Trizol, CTAB y RNeasy mini kit, respectivamente). Este resultado puede estar asociado a la diferencia en peso seco de las muestras como resultado de las diferentes metodologías de homogeneización empleadas. Kumar *et al.* (2007), reportan de manera similar aumentos en rendimiento de extracción de ARN en *Solanum tuberosum* (Solanaceae) cuando se utiliza tejido liofilizado (100% peso seco) en contraste con tejido macerado con nitrógeno líquido (tejido con 18% peso seco).

No obstante, a pesar de haber obtenido indicadores altos de calidad con la homogeneización mediante liofilización (figura 1.  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230} > 1.8$ : Manchester, 1996), al observar la integridad del ARN en el gel se constató una ligera degradación por el uso de esta metodología de homogeneización, lo cual sugiere que la evaluación de calidad y pureza por medio de espec-

trofotometría no corresponde completamente a lo reflejado por el gel de electroforesis. Kasajima *et al.* (2013), discuten que las estimaciones de calidad y pureza de ácidos nucleicos se hacen de manera más confiable con visualización directa en gel de electroforesis, que con el uso de relaciones  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ . Los resultados obtenidos concuerdan con Sukumar *et al.* (1997), donde la utilización de tejido liofilizado de *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae) generó una degradación total de ARN, este tipo de daños en la integridad del ARN pueden posteriormente limitar la eficiencia de reacciones de RT-PCR (Fleige & Pfaffl, 2006). Por otro lado, aunque la maceración con nitrógeno no fue la metodología que permitió los mayores rendimientos de extracción por peso de muestra usada en comparación al uso de liofilización, se logró extraer ARN no degradado, observándose con claridad las dos bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28 y 18S, respectivamente (figura 1).

Con respecto a las metodologías de extracción se encontró que las extracciones con Trizol y RNeasy mini kit® generaron ARN contaminado con polisacáridos ( $A_{260/230} < 1.8$ ; figura 1). Es frecuente encontrar extracciones de ARN de hongos con baja relación  $A_{260/230}$  debido a contaminación con melanina, la cual también absorbe luz en el espectro 200-400nm (Dorrie *et al.*, 2006). Adicionalmente, algunos autores han reportado baja calidad de ARN por presencia de contaminación con polisacáridos mediante el uso de Trizol en plantas y hongos (Ma & Yang, 2011; Schumann *et al.*, 2013); en forma similar, la contaminación por presencia de azúcares residuales al final de la extracción, puede ocurrir cuando se emplean kits de extracción ya que los carbohidratos de la muestra pueden establecer interacciones hidrofóbicas con la matriz la cual posee los grupos oligo dT necesarios para la captura de las secuencias terminales polyA+ del ARN, (Sánchez *et al.*, 2008).

El uso del protocolo CTAB en *Xylaria* sp. incrementó la pureza, disminuyendo la presencia de polisacáridos ( $A_{260/230}$ : 2.43 y 2.63 con nitrógeno y liofilización respectivamente). Se ha reportado que el uso de agentes como CTAB y  $\text{LiCl}_2$  son ideales para incrementar la pureza del ARN en organismos con alto contenido de contaminantes (Sánchez *et al.*, 2008; Vasanthaiah *et al.*, 2008), esto sucede debido a que el CTAB se une a los



**Figura 1.** ARN obtenido mediante diferentes metodologías de homogeneización y extracción, 1µg de RNA fue servido en cada pozo. Asteriscos indican los P-valores generados por el análisis de varianza (ns, no significativo; \*, <0.05; \*\*, <0.01; \*\*\*, <0.001) de los factores: método de homogenización (H), tipo de protocolo de extracción (P) y su interacción (H\*P). Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes según pruebas de Tukey (á=0.01; n=3).

polisacáridos cuando la concentración de sales es alta, removiéndolos de la solución (Clarke, 2009). Adicionalmente, el LiCl<sub>2</sub> facilita la precipitación específica del ARN, libre de ADN, proteínas o carbohidratos (Barlow *et al.*, 1963); no obstante, en este trabajo, se observó una ligera degradación del ARN con esta metodología de extracción (figura 1).

Con respecto a *Xylaria* sp. el uso de homogeneización del micelio con nitrógeno líquido combinado con el protocolo de extracción RNeasy mini kit permitió la extracción de ARN de mejor calidad, pureza y rendimiento ( $A_{260/280}$ : 2.18;  $A_{260/230}$ : 1.5; rendimiento: 209ngRNA µg<sup>-1</sup>), además este protocolo requiere de un periodo de procesamiento menor a 30 min en comparación con el uso de las otras metodologías de extracción en donde el proceso requiere de aproximadamente 30 horas, lo cual es recomendable cuando se requiere realizar la extracción de un amplio número de muestras.

### Diseño del cebadores de referencia para el gen $\beta$ -tubulina.

Con el fin de evaluar la efectividad de las metodologías de extracción de ARN se diseñó un par de cebadores de referencia para la detección del gen  $\beta$ -tubulina, este codifica una proteína crucial requerida en procesos celulares de eucariotes y está presente en la mayoría de los componentes del citoesqueleto y flagelos eucarióticos (Faguy & Doolittle 1998). El gen que codifica la proteína  $\beta$ -tubulina es un candidato ideal como gen de referencia debido a la alta similitud entre secuencias de toda la taxa eucariota (65-70%) (Einax & Voigt, 2003). El análisis realizado con ClustalX2 permitió la identificación de una región altamente conservada en uno de los exones por lo cual se diseñó un par de cebadores en esa posición (figura 2).

A pesar de los recientes desarrollos en herramientas bioinformáticas, el diseño de cebadores puede ser per-

**Tabla 1.** Evaluación de propiedades termodinámicas del juego de cebadores  $\beta$ -Tub.

| Especie              | Primer | Secuencia del Primer       | Producto (pb) | Longitud (pb) | Tm (°C) | GC (%) | $\Delta G^*$ | Any <sup>**</sup> | 3' <sup>***</sup> |
|----------------------|--------|----------------------------|---------------|---------------|---------|--------|--------------|-------------------|-------------------|
|                      |        | 5' - 3'                    |               |               |         |        |              |                   |                   |
| <i>X. polymorpha</i> | BtubF  | TTC CAR ATY ACM CAC TCG CT | 506           | 20            | 63.13   | 55     | 0.7          | 4                 | 1                 |
| <i>X. polymorpha</i> | BtubR  | GCC ATC ATG TTC TTR GGG TC |               | 20            | 62.63   | 55     | 1            | 5                 | 1                 |

\* Valor  $\Delta G$  calculado usando mfold

\*\* Tendencia del oligo a formar estructura secundarias calculado usando Primer 3

\*\*\* Tendencia del extremo terminal 3' del oligo a formar dímeros con sí mismo calculado usando Primer 3

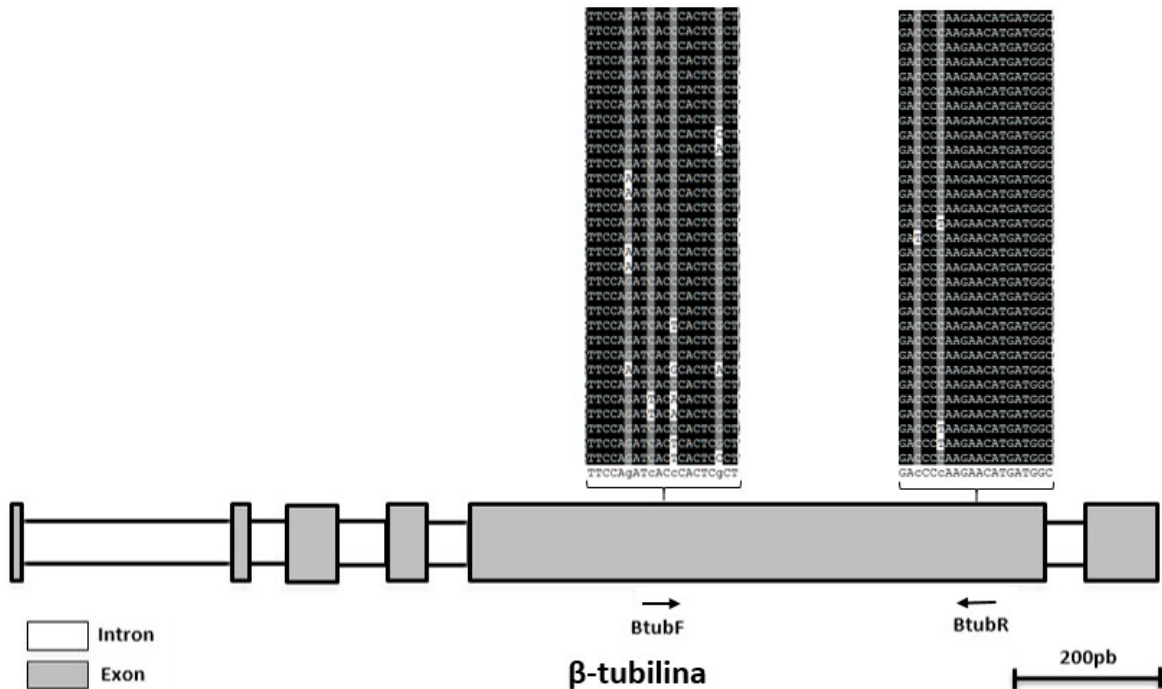
feccionado con base en el análisis termodinámico de las secuencias que permiten predecir la eficiencia del cebador incluso antes de su validación *in vitro* en reacciones de PCR (Arif & Ochoa-Corona, 2013). Por esta razón, mediante el programa mFold se determinó la tendencia de los cebadores a formar estructuras secundarias y se encontró que la energía óptima ( $\Delta G$ ) es de 1 y 0.7 kcal/mol para los cebadores sentido y antisentido, respectivamente (tabla 1). Este valor hace referencia a la cantidad de energía mínima requerida para romper dichas estructuras,  $\Delta G$  menores a -9 kcal/mol pueden generar problemas en reacciones de PCR (IDT, 2010), generalmente asociados a alto contenido de regiones GC que requerirían condiciones denaturantes más agresivas como temperaturas de disociación más altas, ocasionando un rápido deterioro de la polimerasa. Por lo tanto, se requiere que los cebadores diseñados tengan un rango mínimo de energía que no limite las condiciones de la reacción PCR.

El análisis realizado determinó que los cebadores poseen características termodinámicas ajustadas a un margen óptimo que favorece la amplificación de ADN en PCR (tabla 1). Los cebadores diseñados presentan baja probabilidad de formación de estructuras secundarias (ANY < 3; y 3' < 6), adicionalmente poseen otros parámetros óptimos como son: %GC (55%) y diferencia entre Tm de los cebadores (< 2°C). Los cebadores que no cumplen con estas características pueden experimentar dimerización, amplificaciones inespecíficas e incluso falsos positivos (Dieffenbach *et al.*, 1993). El análisis realizado permite predecir que los primer poseen características termodinámicas favorables para una eficaz reacción de PCR (Arif & Ochoa-Corona, 2013).

Los cebadores BtubF y BtubR fueron validados y optimizados por un gradiente de temperatura de anillamiento en donde la temperatura óptima correspondió a 57 °C (figura 3A); temperaturas menores a 53 °C favorecieron amplificaciones inespecíficas y temperaturas mayores a 61 °C inhibieron la hibridación de los cebadores. Mediante una prueba de sensibilidad se determinó que este par de cebadores poseen un límite de amplificación de hasta 1ng de ADN (figura 3B), otros autores han reportado sensibilidades de detección de 25 ng (Quellhorst & Rulli, 2006), cebadores altamente sensibles tienen la ventaja de permitir la detección el objetivo en muestras con poco ARN. Finalmente, mediante la prueba de especificidad se determinó que en ascomicetes se detecta una única banda, cuyo peso varía entre 500-650pb dependiendo de la especie (figura 3C); esto es ideal ya que múltiples bandas indican generalmente la presencia de inespecificidad (Quellhorst & Rulli, 2006). Los cebadores amplifican productos en diferentes organismos ascomicetes y algunos basidiomicetes, por lo que se concluye que se diseñaron cebadores en una región altamente conservada que permiten su uso en el estudio de genes de los diversos organismos evaluados.

#### RT-PCR.

La evaluación de la integridad y pureza del ARN es un factor crítico previo a la validación de datos de expresión génica (Fleige & Pfaffl, 2006; Vermeulen *et al.*, 2011). Con el ARN extraído mediante las diferentes metodologías descritas se evaluó con los cebadores de referencia diseñados y se pudo comprobar que a pesar de la contaminación con proteínas y polisacáridos detectada en varias de las metodologías utilizadas (figura



**Figura 2.** Localización aproximada de los cebadores BtubF y BtubR sobre la secuencia del gen  $\beta$ -Tubulina.

1), se logró la amplificación exitosa del primer de referencia en todos los tratamientos (figura 4).

Particularmente el ARN obtenido con el protocolo con CTAB generó una banda tenue en comparación con las obtenidas con ARN proveniente de otras metodologías de extracción. Estos resultados sugieren que el ARN obtenido mediante este protocolo posiblemente generó una disminución en la eficiencia de la reacción de RT-PCR. Sánchez *et al.* (2008), reporta que incluso después de centrifugación, considerables cantidades remanentes de buffer de lisis pueden permanecer atrapadas en los espacios internos del material amorfo precipitado y trazas de inhibidores de detergentes como el SDS podrían tener un efecto sobre la eficiencia de la reacción de PCR (Rossen *et al.*, 1992), generando finalmente bandas tenues en el gel de electroforesis.

## CONCLUSIONES

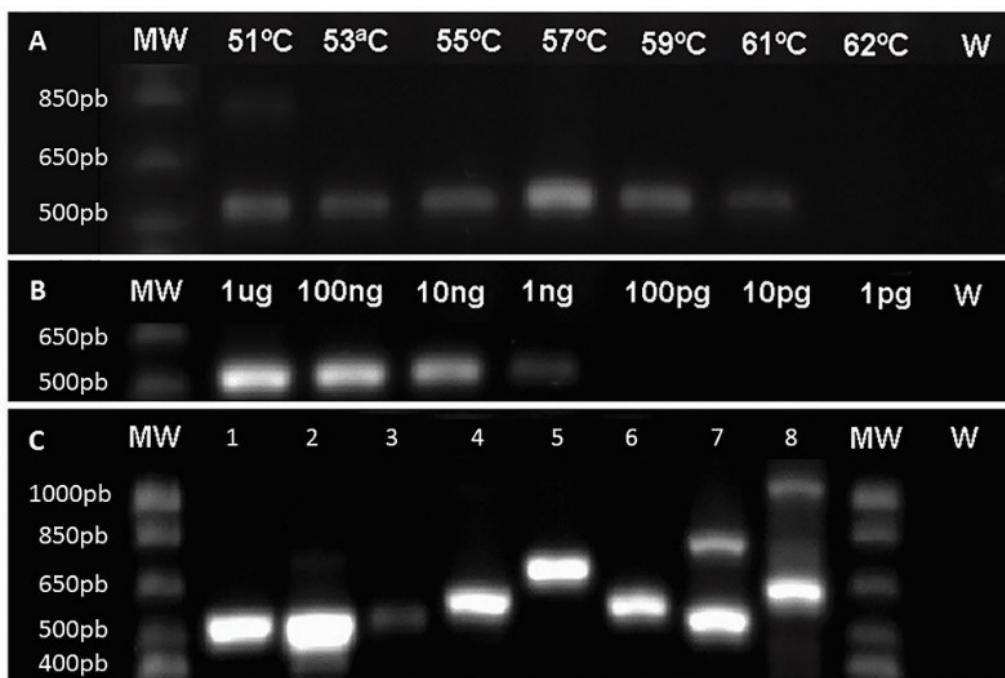
El uso de tejido liofilizado generó los mayores rendimientos de ARN durante el proceso de extracción por masa de micelio inicial, comparado con la maceración con nitrógeno líquido; sin embargo, el proceso de liofi-

lización también favorece la degradación del ARN. También se evidenció mayor pureza y rendimiento de ARN con el uso de Buffer CTAB y RNeasy mini kit. Por otro lado, los cebadores BtubF y BtubR amplificaron exitosamente regiones codificantes del gen de referencia  $\beta$ -tubulina útiles para llevar a cabo estudios de expresión génica en ascomicetes. Finalmente, se logró obtener ADN complementario (cADN) amplificable mediante RT-PCR independiente de la metodología de homogenización y extracción probada. No obstante, se recomienda la homogenización con nitrógeno líquido y extracción con RNeasy mini kit cuando se busca eficiencia en el manejo de tiempo y calidad del ARN en la evaluación de expresión génica mediante RT-PCR.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, al Centro de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos (GeBiX) y a Colciencias (contrato 632-2011) por financiar esta investigación y al Ministerio del Medio Ambiente Desarrollo y Vivienda Territorial por el permiso marco de colecta 0255. Agradecemos también a los ingenieros agrónomos Diana Zabala, Diego





**Figura 3.** Validación y optimización de los cebadores  $\beta$ -tub mediante: (A) evaluación de gradiente de temperatura de anillamiento, (B) evaluación de sensibilidad y (C) evaluación de especificidad en diferentes ascomicetes (1: *Xylaria* sp.; 2: *Sclerotinia* sp.; 3: *Fusarium solani*; 4: *Penicillium* sp.; 5: *Fusarium oxysporum*) y basidiomicetes (6: *Hymenogloea* sp.; 7: *Pholliota* sp.; 8: *Agrocybe* sp.). 1kb marcador  $\lambda$  (MW), Control negativo con agua (W).



**Figura 4.** Evaluación de la eficiencia de la reacción de RT-PCR a partir de ARN obtenido por diferentes metodologías de homogeneización y extracción. MW: 1kb marcador  $\lambda$ , W: control negativo con agua.

Vásquez, y al químico Jesús Castaño por su apoyo y contribuciones en el laboratorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arif, M., & Ochoa-Corona, F.M. (2013). Comparative assessment of 5' A/T-rich overhang sequences with optimal and sub-optimal primers to increase PCR yields and sensitivity. *Molecular Biotechnology*, 55(1), 17–26.

Barlow, J.J., Mathias A.P., & Williamson R. (1963). A simple method for the quantitative isolation of undergraded high

molecular weight ribonucleic acid. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 13(1), 61–66.

Burden, D.W. (2008). Guide to the Homogenization of Biological Samples. *Random Primers*, 7, 1–14.

Castaño, J.D., Cruz, C., & Torres, E. (2015). Optimization of the production, purification and characterization of a lac-case from the native fungus *Xylaria* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 710–716.

Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113–116.

- Chen, J., Zhang, L., Xing, Y., Wang, Y., Xing, X., Zhang, D., Liang, H., & Guo, S. (2013). Diversity and Taxonomy of *Endophytic Xylariaceous Fungi* from Medicinal Plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). *PLoS ONE*, 8(3), e58268.
- Clarke, J. (2009). Cetyltrimethyl Ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3, pdb.prot5177.
- Crespo, C. C., Aime, M., & Torres-Rojas, E. (2014). Exploration for fungi with novel lignocellulolytic enzymes in the High Andes Colombian Forest. *En: VIII Congreso Latinoamericano de Micología por Asociación Latinoamericana de Micología*, Medellín, Colombia.
- Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Martinez, M.J., & Sayadi, S. (2005). Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21(8), 1415–1423.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 3(3), S30–S37.
- Dörrie, J., Wellner, V., Kämpgen, E., Schuler, G., & Schaft, N. (2006). An improved method for RNA isolation and removal of melanin contamination from melanoma tissue: Implications for tumor antigen detection and amplification. *Journal of Immunological Methods*, 313(1), 119–128.
- Einax, E., & Voigt, K. (2003). Oligonucleotide primers for the universal amplification of  $\beta$ -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organism Diversity & Evolution*, 3(3), 185–194.
- Faguy, D. M., & Doolittle, W. F. (1998). Cytoskeletal proteins: the evolution of cell division. *Current Biology*, 8, R338–R341.
- Fleige, S. & Pfaffl, M.W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 126–139.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., & Blanchette, R.A. (2012). The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, 336(6089), 1715–1719.
- Giménez, M.J., Pistón, F., & Atienza, S.G. (2011). Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. *Planta*, 233(1), 163–173.
- Hruz, T., Wyss, M., Docquier, M., Pfaffl, M., Masanetz, S., Borghi, L., Verbrugghe, P., Kalaydjieva, L., Bleuler, S., Laule, O., Descombes, P., Gruissem, W., & Zimmermann, P. (2011). RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics*, 12, 156.
- IDT. (2010). Self-dimer and hetero-dimer results guide. ISY-318. 1, 1–2.
- Kasajima, I., Sasaki, K., Tanaka, Y., Terakawa, T., & Ohtsubo, N. (2013). Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of *Cyclamen persicum* Mill. and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpyrrolidone (PVPP). *Scientia Horticulturae*, 164, 65–72.
- Kumar, G.N., Iyer, S., & Knowles, N.R. (2007). Extraction of RNA from fresh, frozen, and lyophilized tuber and root tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1674–1678.
- Kumar, J. (2012). An RNA isolation protocol for recovery of high quality functional RNA from fungi and plants. *Current Science*, 102(9), 1257–1260.
- Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F.J., & Alcalde, M. (2007). Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1, 233–245.
- Lever, M.A., Torti, A., Eickenbusch, P., Michaud A.B., Santl-Temkiv, T., & Jorgensen B.B. (2015). A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Frontiers in Microbiology*, 6, 476.
- Liu, S., Caia, P., Houa, N., Piao, X., Wang, H., Hunga, T., & Chen, Q. (2012). Genome-wide identification and characterization of a panel of housekeeping genes in *Schistosoma japonicum*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 182(1), 75–82.
- Ma, X., & Yang, J. (2011). An optimized preparation method to obtain high-quality RNA from dry sunflower seeds. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 160–168.
- Manchester, K.L. (1996). Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques*, 20(6), 968–970.
- Melo, S., Pungartnik, C., Cascardo, J., & Brendel, M. (2006). Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the basidiomycete *Crinipellis perniciosa*. *Genetics and Molecular Research*, 5(4), 851–855.
- Moya, L.A., & Torres, E. (2012). Hydrolysis of cellulose and oil palm empty fruit bunches by using consortia of fungi isolated from the soil of Colombian high andean forest. *Agronomía Colombiana*, 30(3), 411–418.
- Ochoa-Corona, F.M., Tang, J., Lebas, B., & Alexander B. (2007). Validation of primer design for plant virus diagnosis

- tics using the web-interface pathway primer3-mFOLD-BLASTn. *Phytopathology*, 97(7), S86.
- Pearson, G., Lago-leston, A., Valente, M., Serrao, E. (2006). Simple and rapid RNA extraction from freeze-dried tissue of brown algae and seagrasses. *European Journal of Phycology*, 41(1), 97–104.
- Quellhorst, G., & Rulli, S. (2006). A Systematic Guideline for Developing the Best Real-Time PCR Cebadores. *Sabiosciences*, 1, 1–8.
- Rojas, L., Portal, O., & Jiménez, E., (2011). Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos. *Bioteología Vegetal*, 11(4), 213–222.
- Rossen, L. Norkov, P., Holmstromet, K., & Rasmussen, F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17 (1), 37–45.
- Sánchez, A., Portal, O., Rojas, L.E., Ocaña, B., Mendoza, M., Acosta, M., Jiménez, E., & Hofte, 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(3), 299–305.
- Schumann, U., Smith, N.A., & Wang, M.B. (2013). A fast and efficient method for preparation of high-quality RNA from fungal mycelia. *BMC Research notes*, 6, 71.
- Sukumar, S., Callahan, F.E., Dollar, D.A., & Creech, J.B. (1997). Effect of Lyophilization of cotton tissue on quality of extractable DNA, RNA, and protein. *The Journal of Cotton Science*, 1, 10–14.
- Sultan, M., Amstislavskiy, V., Risch, T., Schuette, M., Dökel, S., Ralser, M., Balzereit, D., Lehrach, H., & Yaspo, M. (2014). Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. *BMC Genomics*, 15, 675.
- Udvardi, M.K., Czechowski, T., & Scheible, W. (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, 20, 1736–1737.
- Vasanthaiyah, H., Katam, R., & Sheikh, M. (2008). Efficient protocol for isolation of functional RNA from different grape tissue rich in polyphenols and polysaccharides for gene expression studies. *Journal of Biotechnology*, 11(3), 1–8.
- Vermeulen, J., De preter, K., Lefever, S., Nuystens, J., De Vloed, F., Derveaux, S., Hellemans, J., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2011). Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 39(9), e63.
- Walker, N. (2002). A Technique Whose Time Has Come. *Science*, 296(5567), 557–559. Wilfinger, W. & Mackey, K. (2015). The most common factors that reduce the quality or quantity of isolated RNA. *Molecular Research Center Technical Bulletin*, 10, 1–2.
- Zakaria, Z., Umi, S. H., Mokhtar, S. S., Mokhtar, U., Zaiharina, M. Z., Aziz, A. T., Hoh, B. P. (2013). An alternate method for DNA and RNA extraction from clotted blood. *Genetics and Molecular Research*, 12(1), 302–311.