

Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja

Comparison of RNA isolation methods for Potato yellow vein virus (PYVV) detection by RT-PCR in different organs of *Solanum tuberosum* Group Phureja

*Hernández Guzmán Anngie Katherine**, *Guzmán-Barney Mónica***

Resumen

Potato yellow vein virus (PYVV, *Crinivirus/Closteroviridae*), contiene genoma tripartita de ssRNA(+), se limita al floema y causa pérdidas en la producción. Es un virus re-emergente y cuarentenario en Europa y Estados Unidos. La detección se ha basado en RT-PCR, NASH y RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) en muestras de foliolo y tubérculo. Se desconoce como es la distribución del virus en plantas infectadas lo que hace necesario establecer un método de extracción de RNA, que sea eficiente en la obtención de material a partir de diferentes órganos. El objetivo de este trabajo fue comparar tres métodos de extracción de RNA: uno basado en Tioisocianato de guanidina (Trizol® (Invitrogen)), uno que utiliza bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB) y el método fenol/cloroformo seguido por purificación con columnas de Sephadex; para detectar el virus por RT-PCR en: foliolo, peciolo, pedúnculo floral, pétalos, tallo aéreo y subterráneo, antera y brotes de tubérculo; de plantas infectadas. Los métodos de extracción fueron evaluados en términos de la integridad (relación de la intensidad de las bandas de las subunidades ribosomales 28S/18S), calidad (relación de las lecturas espectrofométricas 260/280nm) y rendimiento de los extractos. PYVV se detectó por RT-PCR en todos los órganos analizados por los tres métodos de extracción. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres métodos de extracción; sin embargo, Trizol® (Invitrogen) presentó mayor rendimiento, calidad e integridad; además, permitió la detección del virus por RT-PCR en todos los órganos evaluados.

Palabras claves: *crinivirus*, PYVV, extracción, Trizol®, CTAB, Sephadex.

Abstract

Potato yellow vein virus (PYVV, *Crinivirus/Closteroviridae*), contains a tripartite genome with ssRNA(+), is phloem limited and can affect yield reduction. PYVV is a re-emergent virus and is a quarantine pathogen in Europe and United States. The detection has been based in RT-PCR, NASH and real time RT-PCR (RT-qPCR) in leaflets and tuber shoots samples. It is not known how is the distribution of PYVV within infected plants, for that is necessary to establish an efficient RNA isolation method for obtaining material from different organs. The objective of the present work was to evaluate three RNA isolation methods: a Trizol® (Invitrogen) based method, a method using hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) and the phenol - chloroform method followed by Sephadex columns purification; for virus detection using RT-PCR in: leaflets, petiole, peduncle, petals, stem, aerial and subterranean roots, anther and shoot tuber; of infected plants. The isolation methods were tested in terms of integrity (ratio of band intensity of 28S and 18S ribosomal subunits), quality (absorbance 260/280 ratio) and total yield. PYVV was detected by RT-PCR in all organs analyzed by the three isolation methods. There were no

* M.Sc. Bioquímica. Bióloga. Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia.

** Ph.D. Virología, M.Sc. Microbiología. Bióloga. Coordinadora del Laboratorio de Virus Vegetales del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia. mmguzmanb@unal.edu.co

significant differences found among the three isolation methods, although, Trizol[®] (Invitrogen) presented high yield, quality and integrity, furthermore Trizol[®] (Invitrogen) allowed the virus detection using RT-PCR in all analyzed organs.

Key words: *Crinivirus*, PYVD, Trizol[®], CTAB, Sephadex.

Recibido: octubre 10 de 2012

Aprobado: junio 15 de 2013

Introducción

Potato yellow vein virus (PYVV) es un virus re-emergente, limitado al floema, miembro de la familia *Closteroviridae*, del género *Crinivirus* (Salazar *et al.*, 2000; Martelli *et al.*, 2011); sus partículas son filamentosas (Salazar *et al.*, 2000) y su genoma es tripartita ssRNA(+) (Livieratos *et al.*, 2004). Potato yellow vein disease (PYVD) fue observada por primera vez por Alba (1950) en Antioquia (Colombia) y debido al incremento en las poblaciones del vector (*Trialeurodes vaporariorum*, Westwood; Buriticá, 1971) y al transporte de tubérculos-semilla, el virus se ha dispersado en Colombia y países vecinos (Venezuela, Perú y Ecuador) (Salazar *et al.*, 2000). Los síntomas de PYVD son un amarillamiento intervenal que comienza en el ápice y se va extendiendo al resto de la lámina foliar además reduce la producción (Salazar *et al.*, 2000; Guzmán *et al.*, 2011). Por esta razón, es considerado un patógeno cuarentenario por agencias fitosanitarias como OEPP-Eppo (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) y USDA - APHIS (*United States Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service*) (OEPP/Eppo, 1979; USDA - APHIS, 2000).

En la actualidad no existen métodos serológicos para la detección de este virus, debido a que no hay un anticuerpo comercial anti-PYVV, en este momento el laboratorio de virus vegetales del IBUN, trabaja en la obtención de un anticuerpo para la detección de este virus. PYVV se ha detectado cualitativamente a partir de muestras de foliolo, por medio de técnicas moleculares como NASH (Salazar *et al.*, 2000), RT-PCR (Offei *et al.*, 2004; Guzmán *et al.*, 2006; 2010; Wei *et al.*, 2009) y cuantitativamente por qRT-PCR (López *et al.*, 2006);

Para que las técnicas basadas en amplificación de genes sean exitosas y se disminuya al máximo la posibilidad de detectar falsos negativos, es necesario contar con extractos de RNA de buena calidad y cantidad, en particular cuando se van a utilizar técnicas cuantitativas. Hay que tener en cuenta que algunos órganos de plantas de papa presentan una alta oxidación, tienen paredes celulares, pigmentos, polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios que coprecipitan con el RNA afectando el rendimiento y calidad de

los mismos (Claros y Canovas, 1998; Kim y Hamada, 2005).

La selección de un método de extracción de RNA en diferentes órganos, posibilita la detección del PYVV tanto a nivel cualitativo; como a nivel cuantitativo; permitiendo analizar algunos aspectos de la biología de PYVV como su distribución y dispersión en diferentes órganos de plantas, así como la contribución de diferentes órganos en la transmisión de este virus; como por ejemplo la transmisión sexual la cual no se ha podido demostrar para este virus, la detección de PYVV en órganos reproductores como antera podrían ayudar a dilucidar algunas características relacionadas con este tipo de transmisión. Adicionalmente, esta información resulta útil en programas de fitomejoramiento, de certificación de semillas e indexación de material vegetal.

Para la extracción de RNA a partir de muestras de plantas infectadas se puede utilizar diferentes métodos, dentro de los que se encuentran kits comerciales (ej. Qiagen, MoBio, Sigma, Promega, entre otros) que son rápidos pero costosos cuando se requiere hacer el diagnóstico en un alto número de muestras; otros métodos podrían ser más económicos y eficientes para diagnosticar virus, como por ejemplo el método comercial basado en Tioisocianato de guanidina (Trizol[®], Invitrogen) (Chomczynski, 1993); el método basado en CTAB (Chang *et al.*, 1993; López *et al.*, 2006), y el método fenol/cloroformo (Schneiderbauer *et al.*, 1991), razón por la cual fueron seleccionados en este estudio.

PYVV se limita al floema, pero no se ha reportado su detección en diferentes órganos de plantas infectadas. El objetivo de este trabajo fue evaluar tres métodos de extracción, para obtener RNA a partir de diferentes órganos (tallo, foliolo, peciolo, raíz, pedúnculo floral, pétalos y anteras) de plantas de *S. tuberosum* Grupo Phureja infectadas con PYVV; con el propósito de determinar cuál método es el más apropiado para la detección del virus por RT-PCR, a partir de diferentes órganos de plantas infectadas. En el trabajo se compararon tres métodos de extracción: uno que utiliza CTAB (López *et al.*, 2006), uno basado en Tioisocianato de guanidina (Trizol[®], Invitrogen) (Chomczynski, 1993),

y el método de fenol/cloroformo seguido de una purificación con columnas de Sephadex G-50 (Guzmán *et al.*, 2006); en términos de integridad, rendimiento, calidad y amplificación del gen CP-PYVV.

Materiales y Métodos

Material vegetal y aislados virales

Se recolectaron tres plantas completas de papa criolla que expresaban síntomas para PYVD, en el municipio de Chipaque (Cundinamarca), con una edad aproximada de dos meses. Estas fueron sembradas en matera, utilizando como sustrato una mezcla de tierra:cascarilla de arroz (3:1) y se mantuvieron durante dos meses a temperatura ambiente en el Instituto de Biotecnología (IBUN). Se regaron con agua dos veces por semana y se fertilizaron con 15:15:15 (Nitrógeno: Fósforo: Potasio), el día de la siembra en matera y un mes después. Se hizo control para hongos aplicando una vez a la semana Benlate 0.1% y para el control de mosca blanca, dos aplicaciones semanales de Karate® 1.5cc/L.

De cada planta se tomaron muestras de tallo subterráneo y aéreo, brotes de tubérculo, foliolo, pétalo, antera y pedúnculo floral de *S. tuberosum* Grupo Phureja. Se evaluaron 84 muestras por cada método de extracción (10 por cada órganos, excepto para antera, sólo se analizaron cuatro muestras debido a que la abundancia es baja dentro de las plantas).

Métodos de extracción de RNA

Las muestras recolectadas fueron pulverizadas con nitrógeno líquido y posteriormente se hizo extracción de RNA utilizando los tres métodos de extracción que han sido reportados en estudios de PYVV: uno que utiliza CTAB (López *et al.*, 2006), uno basado en Tioisocianato de guanidina (Trizol®, Invitrogen) (Chomczynski, 1993), y el método de fenol/cloroformo seguido de una purificación con columnas de Sephadex G-50 (Guzmán *et al.*, 2006) (En la tabla 1 se muestran algunas características de los tres métodos de extracción). Para Trizol® (Invitrogen) el procesamiento se hizo teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante; en el método basado en CTAB de acuerdo al protocolo propuesto por López *et al.*, (2006); y en el método fenol/cloroformo seguido por purificación con columnas de SephadexG-50 considerando el protocolo sugerido por Guzmán *et al.*, (2006). Todos los extractos de RNA fueron resuspendidos en 30µl de agua tratada con DEPC y almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

Evaluación de los tres métodos de extracción

Los extractos de RNA fueron evaluados en términos del rendimiento (ng de RNA /mg de material), relación de absorbancias 260/280nm (calidad), relación de la intensidad de las bandas de las subunidades ribosomales 28S/18S (integridad) y detección de PYVV por RT-PCR.

El rendimiento se estimó a partir de la concentración de los extractos de RNA, que se determinó por fluorimetría con el kit Quant-iT™ RiboGreen Assay (Invitrogen), teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante.

La calidad fue una medida indirecta de la presencia de contaminantes proteicos que se estableció por espectrofotometría; se diluyó 10µl del extracto de RNA con 990µl de agua tratada con DEPC y utilizando una celda de cuarzo de 1ml se hicieron lecturas a 260 y 280nm en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus (BIO-RAD), se calculó la relación 260nm/280nm, la cual debe tener un valor superior a 1.8, asumiendo que cuando el valor es igual a 2 el extracto es puro (Sambrook *et al.*, 1989; Staub *et al.*, 1995).

La integridad se determinó a partir de geles denaturantes de agarosa 1% con formaldehído, posteriormente se estimó la intensidad de las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S utilizando el software ImageJ 1.37 (Rasband, 1997). Finalmente se calculó el radio de las intensidades 28S/18S. Se considera que un RNA que se encuentra casi intacto debe presentar una relación 28S/18S igual o superior a dos (Conde *et al.*, 2012).

RT-PCR

Los extractos obtenidos por las tres metodologías de extracción fueron evaluados por RT-PCR utilizando una pareja de *primers* para la detección del gen CP-PYVV (*Primer forward* F2: 5' AAG CTT CTA CTC AAT AGA TCC TGC TA 3', *Primer reverse* 3': 5' CTC GAG GAT CCT CAT GGA AAT CCG AT 3') (Rodríguez *et al.*, 2009). La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un volumen final de 10µl adicionando una mezcla de 1X *buffer* de reacción (Epicentre), 1mM de dNTPs (Bioline), 10mM de DTT (Epicentre), 0.4µM de *primer reverse* 3', 1.6U de *RNAse inhibitor* (Fermentas), 8U de MMLV HP (Epicentre) y 100ng de RNA. Se incubó durante una hora a 42°C seguida de una denaturación a 70°C por 10min.

Las reacciones de amplificación contenían 1.6µl de cDNA, 1X de *buffer* NH₄ (Bioline), 2.5mM de MgCl₂ (Bioline), 0.4µM de dNTPs (Bioline), 0.4µM de cada *primer* (F2 y 3') y 1U de Biolasa (Bioline) en un volumen final de 10µl. El programa de amplificación

Tabla 1. Características de los tres métodos de extracción.

	Trizol® (Invitrogen)	CTAB	Fenol:cloroformo Sephadex
Referencia	Chomczynski (1993)	López <i>et al.</i> , (1993)	Guzmán <i>et al.</i> , (2006)
Cantidad de material vegetal procesado	100mg	150mg	100mg
Rompimiento de las células	Sarkosyl Tioisocianato de Guanidina	CTAB Cloroformo: Isoamilalcohol	SDS
Denaturación de proteínas e inhibición de RNasas	Sarkosyl Cloroformo Fenol Tioisocianato de Guanidina	CTAB Cloroformo: isoamil-alcohol EDTA	Fenol Cloroformo EDTA
Eliminación de carbohidratos	Fenol Cloroformo	Cloroformo	Fenol Cloroformo
Eliminación de Polifenoles	Cloroformo	Cloroformo: isoamil-alcohol PVP-40 Na ₂ SO ₃	Fenol Cloroformo
Precipitación de RNA	Isopropanol	LiCl	Purificación con columnas de Sephadex
Material extraído	RNA total	RNA total	RNA de doble cadena
Tiempo	1h 30min	2h	45min
Precio*	\$5.500	\$3.000	\$4.000

* Valor aproximado por reacción en pesos colombianos

consistió de una denaturación inicial a 94°C durante 3min, 35 ciclos de denaturación a 94°C durante 1min, alineamiento a 55°C durante 1min y extensión a 72°C durante 1min, y una extensión final a 72°C durante 10min. En las reacciones se incluyeron los controles descritos en la tabla 2.

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa 1% preparados en TAE 1X (0.04M Tris-Acetato, 0.001M EDTA) y teñidos con SYBR®Safe (Invitro-

gen), corridos a 70V constantes durante una hora y visualizados en digitalizador Gel Doc® (BIO-RAD).

Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Software R (R Development Core Team, 2008). Se calculó la desviación estándar, coeficiente de variación (CV%) inter-ensayo (porcentaje de la desviación estándar en comparación con el promedio) y el promedio del

Tabla 2. Muestras control incluidas en las reacciones de amplificación.

Control	Muestra
Positivo	Planta de <i>S. tuberosum</i> Grupo Phureja sintomática para PYVD que había resultado positiva por RT-PCR para el gen CP-PYVV
Negativo	Planta de <i>S. tuberosum</i> Grupo Phureja Clon 1 obtenida a partir de cultivo de meristemos in vitro (libre de virus)
	Planta de <i>Citrofortunella madurensis</i> , Lour; infectada con el virus <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV).

rendimiento, la integridad y calidad por cada método de extracción y por cada órgano. La distribución de todos los datos fue evaluada utilizando el test de normalidad Shapiro Wilk. Debido a que no presentaron una distribución normal las comparaciones entre los órganos por método de extracción y entre métodos de extracción por órgano se determinaron mediante la aplicación de una prueba Mann-Whitney acompañada de la corrección de Bonferroni a nivel de significancia ($p < 0.05$) para controlar la tasa de error (Yuan *et al.*, 2006). Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales para evaluar las relaciones entre los parámetros cuantitativos.

Resultados y Discusión

Rendimiento de la extracción de RNA, radio de la absorbancia 260/280nm y radio de la intensidad de las subunidades ribosomales 28S/18S.

El rendimiento de RNA obtenido con Trizol® (Invitrogen) fue casi el doble y significativamente mayor (414.25 ± 24 ngRNA/mg de material) que el de los otros dos métodos de extracción (Sephadex: 283.17 ± 14.43 y CTAB: 248.99 ± 16) ($p < 0.05$) entre los que no se presentó diferencias significativas (tabla 3). Al evaluar el rendimiento por órgano, el mayor promedio se presentó en los extractos obtenidos por Trizol® (Invitrogen) para todos los órganos (tabla 4), y aunque en todos los casos el rendimiento no fue significativamente mayor (solamente en antera, foliolo y peciolo; $p < 0.05$), la tendencia mostró que con Trizol® (Invitrogen), había una mayor probabilidad de obtener un rendimiento más alto que el alcanzado con los otros dos métodos de extracción. Antera y pedúnculo floral fueron los órganos en los que se presentó el mayor rendimiento de extracción, cuyos valores fueron superiores a 500ng RNA/mg de tejido vegetal, mientras que la mayoría de los órganos presentaron un rendimiento menor (tabla 4).

De acuerdo a la relación de las lecturas espectrofométricas a 260nm y 280nm, en los extractos obtenidos

por Trizol® (Invitrogen) el rango estuvo entre 1.65 y 2.05, lo que indica que por este método de extracción la contaminación con proteínas fue baja, mientras que con los otros dos métodos de extracción (que presentaron rangos similares) el rango fue más amplio mostrando que en algunos extractos hubo contaminación con proteínas (tabla 3). Al evaluar la calidad por órgano no se presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tres métodos de extracción, a pesar de esto por Trizol® (Invitrogen) se obtuvo el mayor promedio de la relación 260/280nm en la mayoría de los órganos (tabla 4), lo que indica que hay una mayor tendencia a obtener mejor calidad (relación 260/280nm cercana a dos) cuando se utiliza este método, sugiriendo que este resultaría más eficiente en la eliminación de proteínas que los otros dos métodos.

Con respecto a la integridad, se observó que en la mayoría de las muestras, en los geles de agarosa denaturantes se visualizaron dos bandas claras, que representan las subunidades ribosomales 18S y 28S. La integridad fue similar en los tres métodos de extracción (tabla 3), con un rango entre uno y dos, indicando que en algunos extractos se presentó degradación de RNA, mientras que en otros se conservó la integridad.

En la tabla 4 se observan los valores de la relación de las intensidad de las bandas 28S/18S en cada órgano por método de extracción, en ningún órgano se presentó diferencias significativas entre los tres métodos ($p > 0.05$), sugiriendo que la integridad no es afectada por el método de extracción. Adicionalmente, se pudo observar que raíz presentó la menor integridad con respecto al resto de los órganos, esto puede deberse a que raíz es muy difícil de macerar, y la maceración es crítica para conservar la integridad del RNA, si este proceso no se realiza adecuadamente se puede producir la liberación de nucleasas que conducen a la degradación de los ácidos nucleicos.

Para poder seleccionar el mejor método de extracción teniendo en cuenta las variables analizadas, se hizo un análisis de componentes principales (ACP),

Tabla 3. Resumen de resultados en los parámetros evaluados

	Trizol	CTAB	Sephadex
Promedio del rendimiento (ng RNA/mg material vegetal)	414.25±24	248.99±16	283.17±14.43
Rango de la calidad (260/280nm)	1.65 - 2.05	1.34 - 1.93	1.39 - 1.98
Rango de la integridad (28S/18S)	1 - 1.98	1.17 - 2.13	0.87 - 1.97
Muestras amplificadas por RT-PCR	75/84	71/84	72/84

Tabla 4. Resultados de RT-PCR, rendimiento, calidad e integridad obtenidos en los extractos obtenidos a partir de diferentes órganos utilizando los tres métodos de extracción de RNA

Órgano	Extracción	RT-PCR	Rendimiento			Calidad			Integridad		
			Promedio	Error estándar	%CV	Promedio	Error estándar	%CV	Promedio	Error estándar	%CV
Antera	CTAB	4/4	583,84	25,32	8,67	1,69	0,031	3,64	1,56	0,13	8,67
	Sephadex	4/4	638,78	24,24	7,59	1,78	0,029	3,25	1,63	0,07	7,59
	Trizol	4/4	956,71	74,25	15,52	1,83	0,018	2,00	1,66	0,04	15,52
Foliolo	CTAB	9/10	109,72	11,30	32,57	1,62	0,045	8,84	1,37	0,03	32,57
	Sephadex	8/10	253,56	11,70	14,59	1,67	0,030	5,71	1,59	0,05	14,59
	Trizol	9/10	414,54	23,88	18,22	1,89	0,031	5,16	1,74	0,03	18,22
Peciolo	CTAB	7/10	50,12	7,09	44,74	1,80	0,029	5,13	1,41	0,05	44,74
	Sephadex	8/10	100,88	9,84	30,83	1,78	0,021	3,67	1,67	0,03	30,83
	Trizol	10/10	216,27	8,64	12,63	1,89	0,029	4,83	1,75	0,04	12,63
Pedúnculo floral	CTAB	10/10	607,86	47,56	24,74	1,73	0,029	5,37	2,02	0,03	24,74
	Sephadex	9/10	613,16	31,14	16,06	1,65	0,046	8,76	1,77	0,10	16,06
	Trizol	10/10	876,29	33,86	12,22	1,86	0,025	4,24	1,69	0,03	12,22
Pétalo	CTAB	7/10	238,53	13,21	17,51	1,77	0,022	3,95	1,38	0,05	17,51
	Sephadex	8/10	240,34	9,63	12,67	1,80	0,035	6,12	1,41	0,04	12,67
	Trizol	10/10	301,47	15,98	16,77	1,82	0,030	5,20	1,52	0,06	16,77
Tallos	CTAB	10/10	98,18	9,11	29,34	1,71	0,031	5,83	1,54	0,04	29,34
	Sephadex	9/10	148,11	7,23	15,44	1,59	0,047	9,25	1,43	0,06	15,44
	Trizol	8/10	224,04	11,94	16,85	1,92	0,023	3,81	1,82	0,03	16,85
Brote de Tubérculo	CTAB	9/12	275,17	17,63	22,19	1,72	0,021	4,24	1,44	0,03	22,19
	Sephadex	7/10	202,62	13,03	20,33	1,72	0,037	6,71	1,63	0,06	20,33
	Trizol	8/10	327,54	21,77	21,02	1,85	0,020	3,45	1,82	0,03	21,02
Raíz Primaria	CTAB	8/10	143,56	10,83	23,85	1,75	0,021	3,82	1,54	0,04	23,85
	Sephadex	9/10	164,54	8,52	16,37	1,81	0,039	6,77	1,52	0,07	16,37
	Trizol	9/10	165,02	13,95	26,73	1,81	0,011	2,00	1,55	0,05	26,73
Raíz Secundaria	CTAB	8/10	133,96	7,07	16,69	1,72	0,021	3,89	NA	NA	NA
	Sephadex	8/10	186,51	14,50	24,58	1,70	0,020	3,79	1,00	0,05	24,58
	Trizol	7/10	246,39	11,70	15,01	1,80	0,033	5,77	0,85	0,04	15,01

El promedio del rendimiento se estimó en ng de RNA/mg de material vegetal procesado.

eligiendo el método que presentara mayor calidad e integridad, parámetros que tienen gran influencia sobre la amplificación por RT-PCR. En la figura 1 se muestran los resultados de este análisis, en donde en la figura 1A se encuentra el círculo de correlaciones entre las tres variables, integridad y rendimiento se encuentran correlacionadas; mientras que calidad (260/280nm) es independiente de estos dos parámetros. Este análisis mostró que al relacionar la integridad, la calidad y el rendimiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres métodos de extracción, lo que ya se había observado al analizar cada uno de los parámetros independientemente (figura 1B), a pesar de esto los resultados sugieren que con Trizol® (Invitrogen) los extractos presentan mejor calidad, rendimiento e integridad, los otros dos métodos de extracción fueron prácticamente idénticos en términos de los tres parámetros analizados debido a que los datos se superponen.

Al evaluar los grupos formados en el ACP según órgano (figura 1C) se encontró que se formaron tres grupos: uno formado por foliolo, peciolo, pétalos, tallo, tallo subterráneo y brotes de tubérculo; pedúnculo floral y antera que fueron los órganos que presentaron mayor

rendimiento e integridad; y raíz secundaria que fue el órgano que presentó los menores valores en los tres parámetros evaluados (en particular en integridad). Estos resultados sugieren que antera y pedúnculo floral podrían ser útiles a la hora de seleccionar órganos de plantas de papa para procesos de extracción de RNA porque en estos dos órganos se presentaron los mayores valores de rendimiento, integridad y calidad.

RT-PCR del gen CP de PVV

Para una síntesis de cDNA viral adecuada y el subsecuente uso para amplificación de genes, es necesario partir de una extracción de RNA, que permita obtener un material de alta cantidad y calidad. Para evaluar los extractos obtenidos por los tres métodos de extracción de RNA en los órganos analizados se amplificó el gen completo de la proteína mayor de la cápside de PVV. Se obtuvieron amplificados del tamaño esperado (769pb) en todos los órganos evaluados por los tres métodos de extracción (tabla 3 y figura 2), aunque en algunos órganos el porcentaje de detección no fue del 100% (tabla 4).

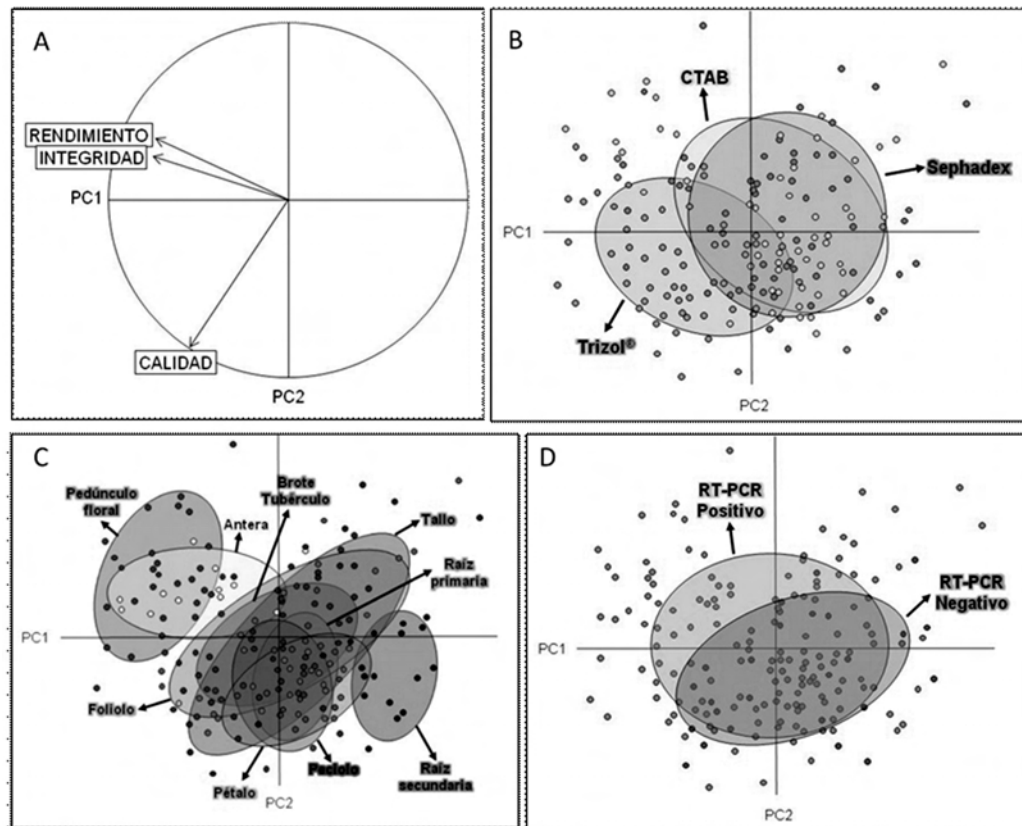


Figura 1. Gráficos del ACP. A. Círculo de correlaciones entre rendimiento, integridad y calidad. B. Agrupación de los resultados del ACP según método de extracción. C. Agrupación de los resultados del ACP según órgano. D. Agrupación de los resultados del ACP según resultado de RT-PCR.

Por Sephadex se pudo amplificar el gen de la proteína mayor de la cápside de PVV en el 83.3% de las muestras analizadas, por CTAB en el 85.7% y por Trizol® (Invitrogen) en el 89.3%. En algunos órganos (foliolo, brote de tubérculo, tallo subterráneo y raíz secundaria) no se logró detectar el virus en todas las muestras evaluadas por los tres métodos de extracción, aunque hay que tener en cuenta que se logró detectar entre el 70% y el 90% de las muestras evaluadas, en antera se logró la detección en todas las muestras obtenidas por los tres métodos de extracción, en pedúnculo floral se logró detectar el virus en casi todas las muestras (29/30) (tabla 4).

Estos dos órganos fueron los que presentaron el mayor rendimiento, pero no se puede relacionar la detección del virus por RT-PCR con el rendimiento de la extracción de RNA, debido a que el agrupamiento del ACP por resultado de RT-PCR indicó que no hubo diferencias significativas en términos de los tres parámetros evaluados entre muestras RT-PCR positivas y negativas (figura 1D).

Raíz presentó un bajo porcentaje de detección de PVV por RT-PCR que en los demás órganos (tabla 4), además fue el órgano en el que se presentó menor rendimiento, calidad e integridad (tabla 4 y figura 1C), esto podría ser debido a la acumulación diferencial de algunas sustancias en este órgano que afectan los procesos de extracción. Por ejemplo los polisacáridos, presentan un mayor contenido en la zona radical de plantas de papa (St-Pierre *et al.*, 1996), es posible que en los tres métodos utilizados no se haya

eliminado completamente estas sustancias lo cual interfirió con los extractos obtenidos a partir de este tejido.

Otra de las sustancias que hace que raíz sea menos adecuada para la detección del virus es que se acumula la polifenol oxidasa (PPO) que es la enzima relacionada con el pardeamiento enzimático, la cual se distribuye principalmente en tejidos en desarrollo como por ejemplo flores y en la zona radical (Thygesen *et al.*, 1995). Se esperaría que en estos órganos se vea afectada la extracción de RNA, lo cual se evidenció en las muestras de la zona radical en donde se obtuvieron los menores valores de los tres parámetros evaluados (tabla 4 y figura 1C) y el menor porcentaje de detección de PVV por RT-PCR, pero no se relacionó con flor (pedúnculo, antera y pétalos), a pesar de que hay una alta acumulación de esta enzima en este órgano, en los extractos obtenidos los valores de los tres parámetros fueron aceptables, además por RT-PCR se logró la detección del virus (figura 2) (confirmando que los extractos obtenidos eran adecuados en procesos de síntesis de cDNA y amplificación), lo que sugiere que los procesos de extracción permitieron la eliminación de estas sustancias en los extractos obtenidos a partir de órganos florales, es posible que el procesamiento del material vegetal sea más fácil en muestras de órganos florales que en la zona radical de la planta en donde en el proceso de maceración se da oxidación del material (probablemente por la actividad de la enzima PPO).

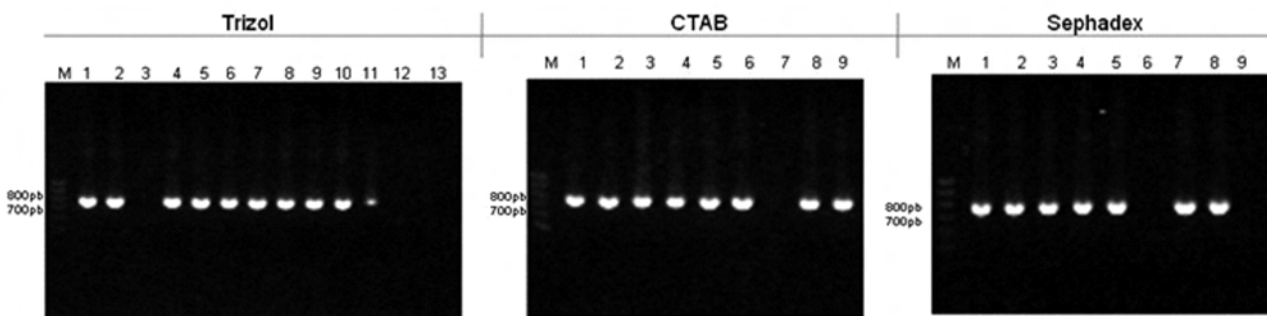


Figura 2. Gel de agarosa 1% de los productos de RT-PCR del gen de la proteína mayor de la cápside con extractos de todos los órganos evaluados extraídos con las tres metodologías de extracción (Tamaño esperado 769pb). Para los tres gels M corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler 100pb (Fermentas), carril 1: antera, carril 2: foliolo, carril 3: peciolo, carril 4: pedúnculo floral, carril 5: pétalo, carril 6: brote de tubérculo, carril 7: tallo, carril 8: tallo subterráneo, carril 9: raíz secundaria, carriles 10 y 11: controles positivos, carril 12: muestra de *S. tuberosum* Grupo Phureja obtenida a partir de cultivo de meristemos y carril 13: muestra de *C. madurensis*, Lour infectada con CTV.

Diferencias entre los tres métodos de extracción

Algunas diferencias entre los métodos de extracción podrían afectar el rendimiento, integridad y calidad. El detergente utilizado para el rompimiento de las células y la denaturación de proteínas fue diferente en los tres métodos: en Sephadex se utilizó el detergente aniónico SDS; con el método basado en CTAB se empleó la acción conjunta del detergente catiónico CTAB y del cloroformo:isoamilalcohol, algunos autores han reportado el uso de más de un detergente para potenciar las actividades llevadas a cabo por estas sustancias (Niu *et al.*, 2008); y en Trizol® (Invitrogen) además de la utilización del detergente aniónico Sarkosyl, esta función es complementada con la actividad del agente caotrópico tioisocianato de guanidina, que también es utilizado por su actividad de inhibición de RNasas, aspecto crítico en los protocolos de extracción porque afecta el rendimiento, la calidad y la integridad; el tioisocianato de guanidina es muy eficiente para cumplir con esta función, debido a que puede actuar sobre cualquier RNasa, lo que no ocurre con EDTA, sustancia utilizada para cumplir con esta función en los otros dos métodos de extracción, este es un agente quelante y sólo actúa sobre las nucleasas que tienen como cofactor Mg^{2+} (Sambrook *et al.*, 1989) (tabla 1); además hay que tener en cuenta que Trizol® (Invitrogen) tiene otros agentes denaturantes fuertes (no revelados) (Liu *et al.*, 1998) haciendo que este método sea más eficiente que los otros dos en términos del rompimiento de las células y denaturación de proteínas.

El rendimiento también puede ser afectado por la precipitación, la cual fue diferente entre los tres métodos, en particular en Sephadex, en donde no se hace una precipitación como tal, en este método los extractos son purificados a través de columnas de Sephadex G-50, recuperando moléculas de alto peso molecular (RNA), en la resina quedan atrapadas moléculas pequeñas como polifenoles y sales (contaminantes entre 1.5 Y 30KDa) (Amershan Biosciences, 2002). En los otros dos métodos de extracción si se hace una precipitación, pero la sustancia utilizada en cada método fue diferente; en Trizol® (Invitrogen) se utiliza isopropanol, que es eficiente para la precipitación de RNA, pero si no se usa a la temperatura y el tiempo adecuado, se puede ocasionar la precipitación de otras sustancias como proteínas y carbohidratos, por lo tanto la fase inicial (fase de extracción) debe ser realizada con el objetivo de separar estas sustancias, para que no se sedimenten en la fase de precipitación; en el método basado en CTAB se utiliza LiCl el cual permite hacer una precipitación diferencial del RNA, su gran utilidad se ha atribuido a que este no es eficiente para

precipitar sustancias como DNA, proteínas y carbohidratos, permitiendo una precipitación eficiente del RNA (Barlow *et al.*, 1993). A pesar de esto, Chan *et al.*, (2004) y Rubio y Zapata (2011) han reportado que en algunas ocasiones, las altas concentraciones de LiCl pueden contribuir con un incremento en las cantidad de impurezas (polifenoles y carbohidratos), afectando la concentración y calidad del RNA (Chan *et al.*, 2004) (tabla 1).

A pesar de que con Trizol® (Invitrogen) se obtuvo el mayor promedio del rendimiento, hay que prestar atención al tipo de moléculas que se recupera en la extracción; en Trizol® (Invitrogen) y CTAB se obtiene RNA total, mientras que por Sephadex el material recuperado es RNA de doble cadena, estas estructuras son típicas de los virus, a pesar de que los extractos obtenidos por este método no presentaron un rendimiento tan alto, estos extractos estarían enriquecidos en RNAs de origen viral (tabla 1).

Otro parámetro a tener en cuenta es el tiempo requerido para el procesamiento, este contribuye en el mantenimiento de la integridad de los extractos. Sephadex fue el que presentó menor tiempo de procesamiento, a pesar de esto este parámetro no afectó la integridad, debido a que los valores fueron similares entre los tres métodos de extracción.

Con respecto a los costos, los métodos utilizados en este trabajo resultan más económicos que algunos kits comerciales. CTAB fue el más económico y sería una excelente opción cuando se necesita hacer la evaluación de un alto número de muestras, este fue seguido de Sephadex y el de mayor valor fue Trizol® (Invitrogen) (tabla 1).

Conclusión

En términos de rendimiento, calidad e integridad no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres métodos de extracción y los tres permitieron la detección del virus en todos los órganos evaluados, sin embargo, los resultados sugirieron que los extractos obtenidos por Trizol® (Invitrogen) tenían una mayor probabilidad de presentar mayor rendimiento y una menor contaminación con proteínas, además es un método rápido que permitió la amplificación de CP-PYVV a partir de cualquier órgano; estos atributos lo hacen un buen método de extracción para la detección de PYVV por RT-PCR en diferentes órganos de plantas infectadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo son útiles para monitorear la presencia, acumulación, y dispersión del

virus en diferentes órganos, lo que puede ser de gran utilidad para el apoyo de los programas de fitomejoramiento, de certificación de semillas e indexado de material vegetal.

Agradecimientos

Esta investigación se realizó gracias al apoyo económico y técnico del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y a Colciencias (201010016538).

Referencias bibliográficas

- Alba, V. 1950. Viropatógenos. Memorias de la Conferencia Latinoamericana de Especialistas en Papa (Bogotá, Colombia) pp. 52–58.
- Amersham Biosciences, 2002. Gel filtration: Principles and methods. 6th edition. Handbook. Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden.
- Buriticá, P. 1971. Estudios de transmisión del amarillamiento de las venas de la papa. Informe Anual Programa de Fitopatología ICA (Bogotá-Colombia) 111–113.
- Chan, C., Teo, S.; Ho, C, Othman, R., Phang, S. 2004. Optimisation of RNA extraction from *Gracilaria changii* (Gracilariales, *Rhodophyta*). *Journal of Applied Phycology*. 16: 297–301.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, 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, M., Canovas, S. 1998. Rapid high quality RNA preparation from Pine seedlings. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16: 9–18.
- Conde, M., Nedel, F., Campos, V., Smith, A., Nör, J., Demarco, F., Tarquinio, S. 2012. Odontoblast RNA stability in different temperature-based protocols for tooth storage. *International Endodontic Journal*. J. 45: 266–272.
- Guzmán, M. Ruiz, E., Arciniegas, N., Coutts, R. 2006. Occurrence and variability of *Potato yellow vein virus* in three departments of Colombia. *Journal of Phytopathology*. 154: 748–750.
- Guzmán, M., Román, V., Franco, L., Rodríguez, P. 2010. Evaluación serológica de cuatro virus en accesiones colombianas de papa (*Solanum* spp.). *Agronomía Colombiana*. 28: 225–234.
- Guzmán, M., Franco, L., Rodríguez, D., Vargas, L., Fierro, J. 2011. Disminución de la producción de papa criolla (*Solanum phureja*) Juz et Buk (cultivar Colombia) infectada con *Potato yellow vein virus* estimada en un modelo de campo en Cundinamarca. Memorias del XXX Congreso Colombiano y XIV Latinoamericano de Fitopatología. Memorias del XXX Congreso Colombiano y XIV Latinoamericano de Fitopatología.
- Kim, S., Hamada, T. 2005. Rapid and reliable method of extracting DNA and RNA from sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L). *Lam. Biotechnology Letters*. 27: 1841–1847.
- Liu, J., Goh, C., Loh, C., Liu, P., Pua, E. 1998. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16: 1–6.
- Livieratos, I., Eliasco, E., Müller, G., Olsthoorn, R., Salazar, L., Pleij, C. Coutts, R. 2004. Analysis of the RNA of *Potato yellow vein virus*: Evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus *Crinivirus*. *Journal of General Virology*. 85: 2065–2075.
- López, R., Asencio, C., Guzmán, M., Boonham, N. 2006. Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of *Potato yellow vein virus* (PYVV). *Journal of Virological Methods*. 136: 24–29.
- Martelli, G., Agranovsky, A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R., Dolja, V., Hu, J., Jelkmann, W., Karasev, A., Martin, R., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. 2012. Family Closteroviridae. In: King, A., Adams, M.J., Carstens, E.B., and Lefkowitz E. (eds). *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 987-1001. Elsevier-Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Niu, C., Kebede, K., Auld, D., Woodward, J., Burow, G., Wright, R. 2008. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*. 7: 2818–2822.
- OEPP/EPPO. 1979. Data sheets on quarantine organisms No. 29, Potato vein yellowing virus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 9 (2). [http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Potato_yellow_vein_virus/PYVV00_ds.pdf].
- Offei, S., Arciniegas, N., Müller, G., Salazar, L., Coutts, R. 2004. Molecular variation of *Potato yellow vein virus*. *Archives of Virology*. 149: 821–827.
- Rasband, W. 1997. Image J v1.37. National Institutes of Health, USA. [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>].
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 [<http://www.R-project.org/>].
- Rodríguez, P., Cháves, G., Franco, L., Guzmán, M. 2009. Low molecular variability of *Potato yellow vein virus* (PYVV) isolated from *Solanum phureja* and *Solanum phureja* in Colombia. Ponencia en Joint Meeting of the Florida Phytopathological Society and the American Phytopathological Society Caribbean Division. Florida.
- Rubio, J., Zapata, O. 2011 Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of Mangrove plants. *Electron. J. Biotechn.* (14)5 [<http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue5-fulltext-10>]
- Salazar, L., Müller, G., Querci, M., Zapata, J., Owens, R. 2000. *Potato yellow vein virus*. Its host range, distribution in South America and identification as a *crinivirus* transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology*. 137: 007–019.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York.

- Schneiderbauer, A. Sandermann, H., Ernst, D. 1991. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Analytical Biochemistry*. 197: 91–95.
- Staub, U., Polivka, K., Gross, H. 1995. Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves rich in polyphenols and polysaccharides: Application for sensitive detection of grapevine viroids. *Journal of Virological Methods*. 52: 209–218.
- St-Pierre, B., Bertrand, C., Camirand, A., Cappadocia, M., Brisson, N. 1996. The starch phosphorylase gene is subjected to different modes of regulation in starch-containing tissues of potato. *Plant Molecular Biology*. 30: 1087–1098.
- Thyngesen, P., Dry, I., Robinson, S. 1995. Polyphenol oxides in potato. *Plant Physiology*. 109: 525–531.
- USDA – APHIS. 2000. Regulated plant pest list. [http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/plant_imports/downloads/RegulatedPestList.pdf].
- Wei, T., Lu, G., Clover, R. 2009. A multiplex RT-PCR for the detection of *Potato yellow vein virus*, *Tobacco rattle virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in potato with a plant internal amplification control. *Plant Pathology*. 58: 203–209.
- Yuan, J., Reed, A., Chen, F., Stewart, C. 2006. Statistical analysis of real time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7(85).