

## EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL A PARTIR DE SEMILLA DE CHAN (*Hyptis suaveolens*) TOTAL RNA EXTRACTION FROM CHAN (*Hyptis suaveolens*) SEEDS

Ortega-González C.; Iturriaga G.; Ramírez-Pimentel J.G.; García-González F.; Raya-Pérez J.C.; \*Aguirre-Mancilla C. L.

Tecnológico Nacional de México / I.T. Roque, km 8, carretera Celaya-Juventino Rosas, C.P. 38110, Celaya Guanajuato, México.

\*ceaguirre@itroque.edu.mx

Recibido 12 dic 2017 aceptado: 7 mayo 2018

Artículo Científico

### RESUMEN

La biotecnología es una ciencia multidisciplinaria que ha permitido plantear soluciones a problemáticas de interés fundamental como la alimentación mediante el uso de tecnología y herramientas disciplinarias como la genética, con ello se ha logrado dotar a los cultivos de interés agrícola o económico de propiedades que permiten resistir el estrés abiótico así como resistencia a plagas y enfermedades ocasionadas por microorganismos fitopatógenos. El desarrollo de una planta genéticamente mejorada requiere de una serie de pasos, por lo que una parte de este proceso se centra en el conocimiento de su material genético y de las técnicas necesarias para su manipulación. Por lo anterior los protocolos de laboratorio requieren una serie de modificaciones debido a que no todos se adaptan a las condiciones de cada organismo al que se aplican. La planta de chan (*Hyptis suaveolens*) es una especie poco conocida que desde tiempos prehispánicos ha tenido uso medicinal y alelopático, este último ha sido objeto de estudio de diversos grupos de investigación que han reportado efecto repelente contra algunos insectos plaga mediante el uso de extractos de las hojas, en semilla se ha identificado una proteína responsable de efecto insecticida la cual posee actividad inhibitoria de proteasas (IPs), es efectiva contra larvas del insecto plaga de maíz *Prostephanus truncatus* y bioquímicamente estable a pH ácidos y altas temperaturas. La semilla de chan se caracteriza por formar un polisacárido de xilano al momento de entrar en contacto con agua.

**Palabras clave:** *Hyptis suaveolens*, semillas de chan, calidad de RNA

### ABSTRACT

Biotechnology is a multidisciplinary science that has allowed to propose solutions to problems of fundamental interest such as feeding through the use of technology and disciplinary tools such as genetics; With this, crops of agricultural or economic interest have been provided with properties that allow resistance to abiotic stress as well as resistance to pests and diseases caused by phytopathogenic microorganisms. The development of a genetically improved plant requires a series of steps, so a part of this process focuses on the knowledge of its genetic material and the techniques necessary for its manipulation. Therefore, laboratory protocols require a series of modifications because not all of them adapt to the conditions of each living being to which they apply. The plant of chan (*Hyptis suaveolens*) is a little known species that since prehispanic times has had medicinal and allelopathic use, the latter has been object of study of several research groups that have reported a repellent effect against some insect pests through the use of extracts of the leaves, a protein responsible for insecticide effect has been identified in seed which possesses protease inhibitory activity (IPs) which is effective against larvae of the corn plague insect *Prostephanus truncatus* and biochemically stable at acidic pH and high temperatures. Chan seed is characterized by forming a xylan polysaccharide when it comes into contact with water.

**Key words:** *Hyptis suaveolens*, chan seeds, RNA quality.

## INTRODUCCIÓN

La generación de conocimiento científico en los últimos años ha permitido el desarrollo de tecnología y su aplicación en la solución a problemas, tal es el caso de la biotecnología, ciencia multidisciplinaria que engloba conocimiento de diversas disciplinas como la microbiología, bioquímica, genética, genómica y bioinformática convirtiéndola en una ciencia clave para la obtención de organismos genéticamente mejorados, con el propósito de desarrollar mejores sistemas biológicos (Martínez et al., 2004); en plantas se ha generado un amplio número de aplicaciones, se les han conferido propiedades específicas como: mejora en la calidad de nutrientes de semillas y frutos, resistencia a insectos y virus así como resistencia a hongos fitopatógenos y bacterias, tolerancia a estrés abiótico, uso como biorreactores, plantas tolerantes a herbicidas o plantas resistentes a insectos plaga (Bolívar, 2011).

El desarrollo de un organismo genéticamente modificado (OGM) implica distintas etapas primordiales las cuales comprenden la inserción, integración, expresión y herencia del nuevo fragmento de DNA que confiere la característica deseada (Akhond et al., 2009). Sin embargo, uno de los pasos fundamentales para llevar a cabo la transformación genética de cualquier organismo requiere en primer instante el análisis de la función del gen que expresa la característica deseada, así como uso de vectores y enzimas de restricción que facilitan la inserción del gen de interés (Quiróz-Chavez et al., 2012).

El chan (*Hyptis suaveolens*), también conocido como chana o chía gorda (Colima), chía de Colima (Jalisco y Colima) (Duno, 2010) pertenece a la familia *Lamiaceae* cuyo centro de origen se extiende desde América central hasta Sudamérica (BDMTM, 2009). En el estado de Colima se localizaron tres formas biológicas de chan (Harlan, 1992): la que crece dentro de la vegetación natural o forma silvestre (variedad violeta), una forma arvense (variedad híbrida) sembrada por el agricultor, aunque también se le encuentra de modo poco frecuente en vegetación natural, y la variedad domesticada (variedad blanca) sólo presente en campos cultivados (Pool, 2009).

Es una planta que puede medir hasta 2 m de altura y normalmente presenta 1-2 semillas por fruto. Sus usos han sido diversos; ya que desde tiempos

prehispánicos se utilizaba por sus propiedades nutricionales, medicinales e insecticidas (Vergara-Santana y Madrigal-Ambriz, 2008). En distintos trabajos se ha estudiado la propiedad insecticida que contiene la planta en donde se ha medido la eficiencia de extractos de hojas de chan por Lloba y Ekraene (2006) quienes usaron concentraciones de alimento para insectos de 1.5 g, 2.5 g y 3.5 g/ 80 g de extractos de hojas de *Hyptis suaveolens*, *Ocimum gratissimum* y *Azadiracta indica* para evaluar su efecto insecticida contra *Callosobruchus maculatus* y *Sitophilus zeamais*, obtuvieron una mortalidad promedio de 94.3 % cuando se usó la concentración más baja de *H. suaveolens*, siendo éste el mejor de los tres extractos evaluados para control de los insectos plaga del estudio.

Otro trabajo para evaluar el efecto insecticida del chan fue realizado por Keita et al. (2006), trabajaron con concentraciones de 1.25, 2.5, 5 y 10 % v/v de la semilla de chan contra larvas del segundo instar de *Plutella xylostella*, quienes encontraron que a la concentración más alta (10%) evaluada a las 24 y 48 horas había mortalidad del 63 y 82% de las larvas, respectivamente.

En relación con las semillas de chan, se ha caracterizado el inhibidor de proteasas en un trabajo previo realizado por Aguirre et al. (2004), donde se encontró que la proteína tiene estabilidad térmica a la desnaturalización hasta los 80 °C a valores de pH de 3.4 a 7. La actividad inhibitoria se evaluó contra enzimas digestivas del insecto plaga de maíz *Prostephanus truncatus* en donde se observó la inhibición de casi el 90% de la actividad proteolítica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con semillas completas (con testa) y cotiledones (sin testa) de chan variedad violeta (negra), para la obtención de los cotiledones se quebró semilla con ayuda de molino marca IKA (modelo M 20 S3) y se realizó la separación de testa y cotiledones con ayuda de pinzas de disección. Los cotiledones obtenidos se separaron en muestras de 0.1 g, se sumergieron en N<sub>2</sub> líquido y posterior almacenamiento a -80 °C hasta su uso.

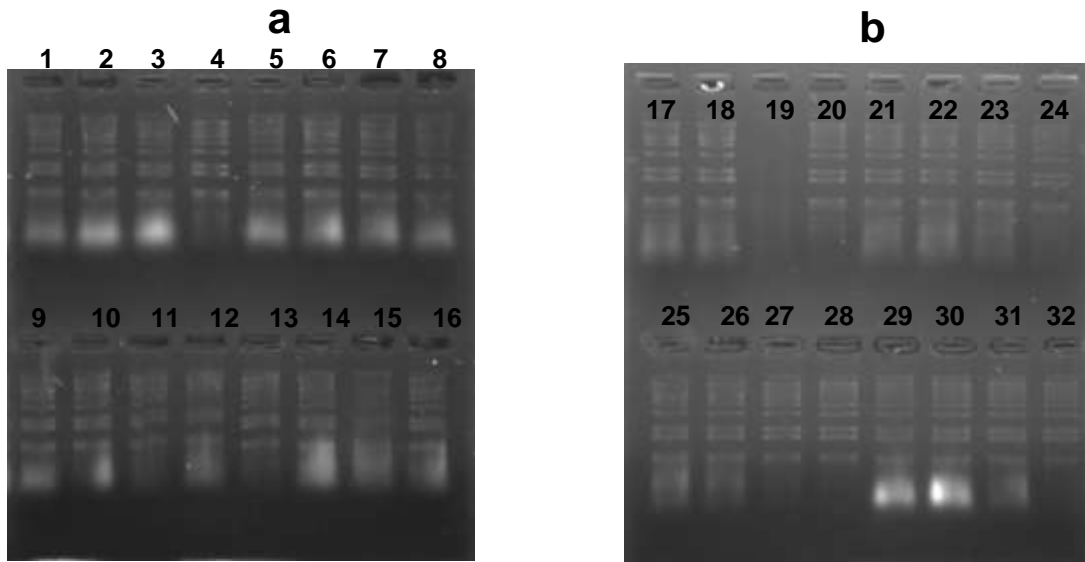
La extracción de RNA total a partir de semilla madura entera (con testa) y de cotiledones de semilla chan se realizó por técnica de Trizol método descrito por Chomczynski en 1993, para lo cual, se tomaron 0.1 g de muestra (semilla entera y cotiledones sin testa), se molieron con Nitrógeno líquido, posteriormente se

añadió 1 ml de Trizol y se transfirieron a tubos de 1.5 ml, los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo y se agitó vigorosamente, se centrifugaron a 10 000 rpm por 15 min a 4°C, la fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo, se adicionaron 800  $\mu$ l de 2-propanol y a algunas muestras se le adicionaron 80  $\mu$ l de acetato de sodio 3M, las muestras se dejaron incubar por 1 h a -80 °C o durante toda la noche a -20° C y posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm por 15 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol al 70% a -20 °C y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min a 4 °C (este paso se repitió dos veces), el tercer lavado se realizó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min a 4°C, una vez realizado el último lavado se dejó secar la pastilla por 15 min a temperatura ambiente, después, la pastilla fue resuspendida en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC y finalmente las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. La determinación de la calidad de RNA para cada una de las muestras se realizó en electroforesis en gel de agarosa al 1% con Bromuro de etidio, el tampon de corrida empleado fue TAE (Tris, Ácido acético glacial, EDTA 0.5 M pH 8) 1X, tomando 1  $\mu$ l de muestra y 2  $\mu$ l de tampon de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 40% sacarosa), se corrió a 70 volts por 40 min. Posteriormente el gel se visualizó en el equipo Fotodocumentador Gel Doc EZTM Imager de Bio Rad con el programa Image Lab™ Software Versión 5.1 para RNA. La concentración de RNA total se determinó en equipo Nanodrop a partir de 1  $\mu$ l de muestra cuyo resultado se expresó en ng/ $\mu$ l, el programa utilizado fue Nano Drop 2000/2000c Thermocientific para RNA. Antes de utilizar el equipo se llevaron cabo de dos a tres lavados con agua mili-Q estéril a fin de evitar interferencia en los resultados debido a residuos de otras muestras. El equipo se calibró con un blanco que fue H<sub>2</sub>O-DEPC estéril y posteriormente se realizó la lectura de las muestras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción de RNA total de semilla completa (con testa)

En la electroforesis (figura 1) se observan bandas definidas en la mayoría de las muestras, lo que podría sugerir que es material genético de calidad debido a que no se observaron barridos como indicativo de degradación del mismo como consecuencia a una inadecuada manipulación de la muestra, sin embargo en los resultados de las lecturas en equipo Nanodrop se obtuvo un intervalo promedio de A 260/280 entre 1.1-1.5 valores considerados bajos en la escala de pureza de material genético debido a su contaminación por otros componentes celulares y con una concentración promedio de 570 ng/ $\mu$ l, la cual se consideró baja, lo anterior debido a que independientemente de la técnica de extracción empleada y la especie de trabajo no se ha reportado un estándar óptimo de concentración pues dicho valor se encuentra ligado a parámetros como los ya mencionados , sin embargo éste se puede estimar de manera aproximada en base a la intensidad y definición de banda obtenida por electroforesis y haciendo una relación en cuanto a los valores obtenidos por espectrofotometría.

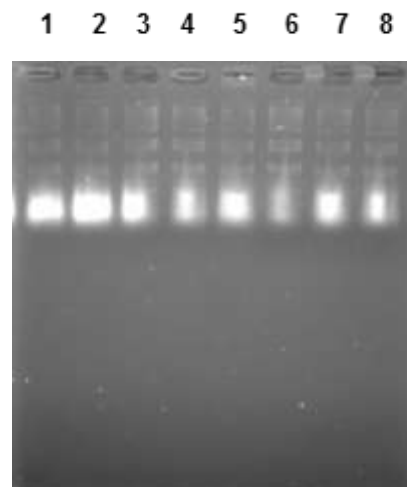


**Figura 1.-** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de 32 muestras (figura 1a y 1b) de RNA de semilla de chan variedad violeta.

#### **Extracción de RNA total de cotiledones (sin precipitar con acetato de sodio 3 M)**

Dado la baja calidad de material genético obtenida en muestras de semilla con base en los resultados de la determinación de concentración y absorbancia se dedujo que la formación de mucílago observado en el proceso de manipulación de la semilla pudiese haber interferido en la técnica de extracción, por lo que se eliminó la testa de la semilla y se trabajó con los cotiledones, como se observa en la determinación de la calidad de RNA por electroforesis (Figura 2) se observan bandas menos definidas que en los procesos anteriores, sin embargo en la relación A 260/280 se obtuvo un rango promedio de 1.8- 2 indicativo de aumento en la pureza del RNA extraído cuya concentración promedio fue de aproximadamente 950 ng/ $\mu$ l.

Una vez confirmado con ello que el mucílago formado en la testa interfiere en la calidad de RNA total obtenido se procedió a trabajar en el incremento de la concentración de material genético en base a la precipitación del mismo con acetato de sodio 3M.



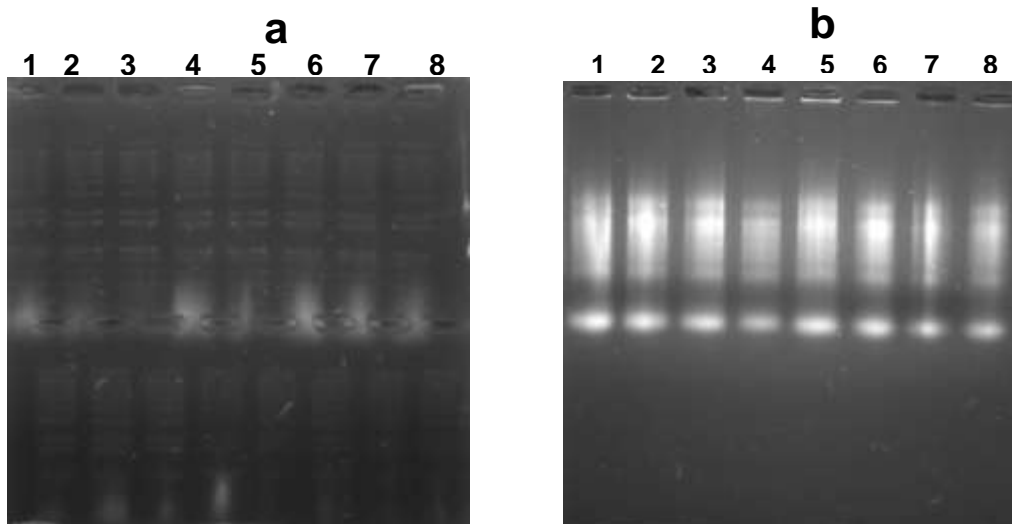
**Figura 2.-** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de 8 muestras de RNA de cotiledones de semilla de chan variedad violeta (se cargó 1  $\mu$ l de cada muestra correspondiente).

### Extracción de RNA total a partir de cotiledones de semilla con acetato de sodio 3M

En las muestras de cotiledones de chan de la electroforesis correspondiente a la Figura 3a y 3b respectivamente, la precipitación de RNA se realizó con acetato de sodio 3M en donde, el tiempo de precipitación de las muestras se evaluó en periodos de tiempo distintos ya que en la figura 3a son muestras que se dejaron precipitar por 1 hora a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  con acetato de sodio 3M, en tanto las muestras de la figura 3b se dejaron precipitar durante toda la noche con acetato de sodio 3M a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la imagen de electroforesis indica que las muestras que permanecieron más tiempo a temperaturas más altas ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) precipitando con acetato de sodio 3M se obtuvieron de mejor calidad a diferencia de las restantes (figura 3a) en donde no se aprecia

definición de bandas, lo que se confirma en la cuantificación de concentración el valor promedio para las muestras que se precipitaron durante 1 hora a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 3a) fue de  $900\text{ ng}/\mu\text{l}$  con una relación A 260/280 de 1.8-2, y para las muestras tratadas toda la noche a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 3b) la concentración promedio fue  $1210\text{ ng}/\mu\text{l}$  con una relación A 260/280 de 1.8-2.

Con base en los resultados probablemente la precipitación a una temperatura más alta ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por más tiempo permite obtener material genético en mayor concentración e integridad, sugiriendo que la temperatura es un factor clave en el proceso de precipitación de material genético por el método del Trizol.



**Figura 3.-** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de RNA de cotiledones de semilla de chan variedad violeta. En la figura 3a corresponde a muestras de RNA total precipitadas con acetato de sodio 3M durante 1 hora a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la figura 3b corresponde a muestras de RNA total precipitadas con acetato de sodio 3M “toda la noche” a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## CONCLUSIONES

La calidad de RNA total se determina mediante una escala de referencia basada en la lectura de concentraciones expresada en ng/ $\mu$ l y evaluada en una relación de absorbancia de 260/280 nm en la cual se considera que el material genético es de alta pureza si se encuentra en un rango superior a 1.8-2.0, si es inferior a 1.6 se encuentra contaminado por solventes o constituyentes propios de la semilla, si se encuentra superior a 1.6 pero inferior a 1.8 se deduce que no todos los contaminantes de material genético fueron excluidos.

Se obtuvo una metodología que mejora la calidad y cantidad de RNA total con muestras de chan libre de testa en base a la escala de pureza descrita anteriormente debido a que el mucilago de la muestra interfiere en la disponibilidad del material genético para su purificación, lo cual se demostró en mejor concentración de RNA obtenido a partir de muestras sin testa como se expresa en los resultados..

El uso de agentes precipitantes como acetato de sodio 3M permite obtener material genético de mejor calidad y cantidad si las muestras procesadas se precipitan por un periodo mínimo de tiempo de 12 h a -20 °C

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre C.; Valdéz S.; Mendoza G.; Domínguez A. y Blanco A. (2004). A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *El selvier. Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 138 (2004). pp 81–89.
- Akhond, M.A.Y. and Machray G. C. (2009). *Biotech crops: technologies, achievements and prospects*. *Euphytic*. 166(1). 47-59.
- Bolivar, Z. F. G. (2011). *Por un uso razonable de los organismos genéticamente modificados*. Academia Mexicana de Ciencias. 184 pg.
- Duno (2010). *Hyptis suaveolens*. Flora de la península de Yucatán. Disponible en línea: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/amiaceae/hyptis-suaveolens/fichas/ficha.htm>
- Harlan, J. R. (1992). *Crops and man* (Second edition ed.). Madison Wisconsin USA: American Society of Agronomy Inc. Crop. Sci. Soc. Am., Inc. <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2005/sept/5.pdf>
- Lloba, B. N. and Ekrakene T. (2006). Comparative Assessment of Insecticidal Effect of *Azadirachta indica*, *Hyptis suaveolens* and *Occimum gratissimum* o *Soto philus zeamais* and *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Biological Sciences* 6(3):626-630.
- Keita, S. S., Umoetok B. A., Smith J. G. (2006). The insecticidal activity of petroleum ether extract of *Hyptis suaveolens* Poit. (Labiatae) seed on *Plutella xylostella* L.) (Lepidoptera and ponomeutidae). *Agricultural Journal* 1(1):11-13.
- Meinke, D.W., Cherry M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneek M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682.
- Pool, A. (2009). *Hyptis*. Origen y distribución geográfica. En flora de Nicaragua. Consultado en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/amiaceae/hyptis-suaveolens/fichas/ficha.htm#2>
- Quiroz-Chávez, J.; García-Pérez, L. M. Quiroz-Figueroa, F. R. (2012). Mejoramiento vegetal usando genes con funciones conocidas. *Ra Ximhai*, vol. 8, núm. 3b, septiembre-diciembre, 2012, pp. 79-92 Universidad Autónoma Indígena de México El Fuerte, México.
- Vergara-Santana M.A., Madrigal Ambriz L.V., Lemus Juárez S., (2008). Obtención de harina de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit con alto nivel nutritivo y máximo desprendimiento de

mucílago y su utilización en la elaboración de productos alimenticios. Patente No. 264267 Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual, Mexico.