

AISLAMIENTO DE RNA DE ALTA CALIDAD A PARTIR DE CÉLULAS EN CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.).

Margarita Ivonne Garrido Gutiérrez*, Rosalio Ramos Payán, Elba Reyes Maldonado, Iris Citlalli Elvira Estrada García, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Casco de Santo Tomás C.P. 11340, *migarrido@hotmail.com.

Palabras clave: aislamiento de RNA, café, células vegetales en suspensión.

Introducción. La extracción de RNA de alta calidad para reacciones enzimáticas es un requisito para estudios de respuestas moleculares durante el proceso de desarrollo en café. Los actuales métodos para el aislamiento de RNA implican procedimientos con gran número de pasos los que favorecen la degradación del RNA y requieren de al menos 1 g de material vegetal para la extracción. Asimismo, el procedimiento de lisis celular es determinante para lograr una alta calidad del RNA extraído de células en cultivo en suspensión (1). La lisis celular tradicionalmente se realiza por macerado en mortero con pistilo, esto dificulta la recuperación de la muestra. Por lo anterior, es menester contar con formas alternativas para romper las células de los cultivos en suspensión y aislar su RNA, empleando pequeñas cantidades de material vegetal.

Este trabajo tiene la finalidad de obtener RNA total de alta calidad a partir de células en cultivo en suspensión de café (*Coffea arabica* L.) usando el aparato RiboLyser (Hybaid) y siguiendo el procedimiento modificado de TRIzol®.

Metodología. La extracción de RNA se realizó a partir de cultivos de células de café (*Coffea arabica* L.) en suspensión de las variedades *Arabica* y *Catimor 45*. A 250 µg de células recién cosechadas se les adicionaron 1 ml de TRIzol®. La lisis celular se hizo en tubos SARSTEDT de 2 ml con 500 µg de perlas de vidrio de 150-212 µm de diámetro (SIGMA). Los tubos se agitaron en el aparato RiboLyser (Hybaid). Las muestras lisadas se mezclaron dos veces con TRIzol® y cloroformo. El RNA de la fase acuosa se precipitó con isopropanol y 0.2 mg de glicogeno. El RNA se resuspendió en agua DEPC. La concentración del RNA fue determinada por espectrofotometría.

Resultados y discusión. Los resultados indicaron que el procedimiento de lisis celular con el aparato RiboLyser (Hybaid) fue muy eficiente para la obtención de RNA de alta calidad, a partir del material descrito. Con este procedimiento de lisis celular se obtuvieron cerca de 20 µg de RNA por gramo de células (Tabla 1). El rendimiento de RNA está en correspondencia con la cantidad de agua (90%) que presentan las células (de tipo parenquimatoso) en los cultivos en suspensión.

La eficacia en la eliminación de metabolitos secundarios presentes en las células de café se observó mediante la relación de A_{260}/A_{280} (tabla 1). Una proporción de A_{260}/A_{280} cercana a 2.0, indica la carencia de contaminación por polisacáridos y compuestos polifenólicos (2). La integridad del RNA obtenido

Tabla 1. Rendimiento y proporción de absorbancia del RNA obtenido de células en suspensión de café (*Coffea arabica* L.).

Protocolo	Varietal de café	Proporción de A_{260}/A_{280}	Rendimiento (µg de RNA/g de células)
TRIzol®	<i>Arabica</i>	2.4	18.6 ± 2.5
	<i>Catimor 45</i>	2.5	19.9 ± 9.3

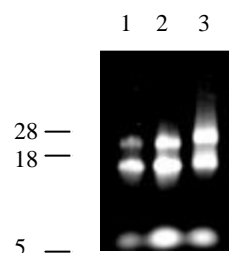


Figura 1. Gel de formamida al 1% de agarosa, teñido con bromuro de etidio, del RNA obtenido de células en suspensión de café de las variedades *Arabica* (carril 1) y *Catimor 45* (carril 2 y 3). Se muestran las especies de rRNA (28S, 18S y 5S).

se observó en un gel con formamida (figura 1). El RNA aislado de esta forma, fue útil para realizar DD RT-PCR (differential display reverse transcription-polymerase chain reaction, datos no mostrados).

Conclusiones. El RNA obtenido con el procedimiento de lisis celular realizado en el aparato RiboLyser (Hybaid) presentó una considerable integridad, siendo el método aplicable a pequeñas cantidades de células de café en cultivos en suspensión. Asimismo, permite emplear el RNA en técnicas moleculares como el DD RT-PCR.

Agradecimiento. Esta investigación fue sustentada por una beca otorgada por el CONACyT a Garrido Gutiérrez.

Bibliografía.

- Liao, Y.-C., Drossard, J., Nähring, J.M., y Fischer, R. 1997. Isolation of RNA from plant cell suspension cultures and calli by sonication. *BioTech.* 23:996-1000.
- Bugos, R.C., Chiang, V.L., Zhang, X.-H., Podila, G.K., y Campbell, W.H. 1995. RNA isolation from plant tissue recalcitrant to extraction in guanidine. *BioTech.* 19:734-737.