



**Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones  
Agropecuarias**

**FECHA DE PRESENTACIÓN:** Diciembre 2009

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL:** Santa Catalina

**DEPARTAMENTO/PROGRAMA:** BIOTECNOLOGIA (DNB)  
FRUTICULTURA

**PROYECTOS:** Lulo y mora (FONTAGRO)  
Biotecnología (D212-023)

**ACTIVIDAD:** Identificación molecular y caracterización genética y patológica de *Colletotrichum sp.* aislados de naranjilla (*Solanum quitoense Lam*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y chirimoya (*Annona cherimola Mill*) provenientes de zonas productoras en Ecuador.

**RESULTADO:** Patología Molecular

**UBICACIÓN:** Estación Experimental Santa Catalina, INIAP

**AUTOR:** Egdo. Diego Javier Cárdenas Ampudia

**COLABORADORES:** Ing. José Ochoa (DNPV)

**FECHA DE INICIO:** 2010-01  
**FECHA DE TERMINACIÓN:** 2010-12

**PRESUPUESTO:** \$ 6421.80 USD

**FUENTE DE FINANCIAMIENTO:** FONTAGRO 65%  
BIOTECNOLOGIA (D212-023) 35%

## 1. ANTECEDENTES.

La antracnosis es una enfermedad que afecta a varios cultivos de importancia económica, es causada por especies de hongos del género *Colletotrichum* (Bailey y Jeger, 1992; Pérez, 1993). Esta enfermedad genera lesiones oscuras en donde se producen acérvulos que posteriormente presentarán esporas asexuales (Agrios, 1997). La antracnosis puede ser considerada la enfermedad más cosmopolita del mundo, presentando una mayor severidad en regiones tropicales y subtropicales. Los síntomas son muy diversos y varían según el huésped e incluso de acuerdo al órgano o tejido afectado teniendo un efecto devastador a nivel de inflorescencias y frutos (Bailey y Jeger, 1992; Pérez, 1993). Su distribución es mundial y actualmente el taxón se considera constituido por 39 especies entre los que se encuentran especies tanto saprofitas como parásitas (Sutton, 1992).

La identificación taxonómica clásica de especies dentro del género *Colletotrichum* está usualmente basada en más de una característica, como su apariencia física en el medio de cultivo, la morfología del patógeno y/o en la patogenicidad. (Freeman, 2000)

Muchas especies de *Colletotrichum* infectan simultáneamente al mismo hospedero (Freeman, 2000), y una misma especie más de un hospedero. Se ha reportado por ejemplo que *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, y *C. coccodes* causan antracnosis en pimiento en Florida. (Roberts *et al*, 2001). Este tipo de identificación en especies de *Colletotrichum* es en la mayoría de casos subjetiva y se basa muchas veces en los criterios del autor. Esta subjetividad se debe principalmente a que en la clasificación se usan muchos criterios entre ellos morfológicos *in vitro* o de patogenicidad de hospederos, que son significativamente afectados por el ambiente, lo que dificulta su correcta identificación (Sutton, 1992; Cannon *et al.*, 2000)

Las especies patogénicas causan serias pérdidas en un amplio número de plantas cultivadas entre las que se cuentan cereales, pastos, frutales, leguminosas y cultivos perennes en regiones tropicales y subtropicales. (Rodríguez, 2007). En cultivos como la chirimoya (*Annona cherimola* Mill) que por sus excelentes características organolépticas se considera la mejor fruta dentro de las anonáceas, (Nakasone y Paull, 1998) las enfermedades causadas por patógenos, particularmente por *Colletotrichum* spp pueden causar pérdidas importantes. En México se ha asociado a *C. gloeosporioides* con la antracnosis del fruto de chirimoya, con incidencia del 50 al 70%, reduciendo la calidad comercial del producto (Nava-Díaz *et al.*, 2000). La naranjilla, cuyo origen esta entre Ecuador y Colombia, donde es altamente cultivada (Heiser, 1985), también es afectada por la antracnosis, especialmente a los frutos, donde se manifiesta como una mancha negra que va aumentando hasta cubrirlos completamente. La antracnosis también afecta al tomate de árbol causando pérdidas de hasta un 90%, incrementando significativamente los costos de producción (Girard, 1977). En este cultivo los síntomas y los principales daños también se presenta en los frutos. Estas manchas reducen la calidad de presentación del fruto, por lo tanto su valor comercial en el mercado es inferior. Sin embargo, también se han observado ataques severos del hongo en ramas, las mismas que se secan. (Feicán *et al*, 1999)

Por la alta diversidad del género *Colletotrichum* la identificación de especies ha sido problemática, por lo que se requiere la identificación precisa y el comportamiento

nivel de variabilidad genética en los diferentes hospederos, y su eventual correlación con su grado de patogenicidad, lo que permitirá orientar de mejor manera el control e incluso desarrollar programas de investigación en temas relacionados a la resistencia y mejoramiento genético.

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1. Objetivo General:**

- Identificar molecularmente y caracterizar genética y patológicamente aislados de *Colletotrichum* sp. procedentes de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y chirimoya (*Annona cherimola* Mill) provenientes de zonas productoras en Ecuador.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

- Identificar las especies de *Colletotrichum* presentes en los tres cultivos mediante características morfológicas y técnicas de marcadores moleculares
- Determinar la variabilidad genética dentro de las especies identificadas de *Colletotrichum* y asociar con la epidemia de la enfermedad.
- Generar una colección de referencia de *Colletotrichum* sp.

### **4. HIPÓTESIS.**

Ho. No existe variabilidad genética, diferencias morfológicas ni variabilidad epidemiológica entre los aislados de *Colletotrichum* sp. que afectan a chirimoya, tomate de árbol y naranjilla del callejón interandino del Ecuador

### **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **5.1. Materiales, Reactivos y Equipos.**

Los materiales, reactivos y equipos a utilizarse se detallan en el anexo 1.

#### **5.2. Metodología**

##### **5.2.1. Características del sitio experimental**

###### **5.2.1.1. Ubicación**

La caracterización molecular se realizará en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología (DNB). La caracterización morfológica y las pruebas de patogenicidad se llevaran a cabo en los laboratorios e invernaderos del Departamento Nacional de Protección Vegetal, respectivamente, de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP.

### 5.2.2.2. Etapa 1b. Caracterización Molecular utilizando RFLPs

#### 5.2.2.2.1. Factores en Estudio

##### a) Aislamientos de *Colletotrichum sp.*

Los mismos que en la Etapa 1a. Anexo 2

##### b) Primers

- ITS1 – ITS 4

##### c) Enzimas de restricción

- *Hae* III
- *Rsa* I

#### 5.2.2.2.2. Tratamientos

Los tratamientos resultan de la combinación de los factores en estudio: Aislamientos de *Colletotrichum sp.*, Primers y Enzimas de restricción.

#### 5.2.2.2.3. Análisis Molecular

Mediante la utilización de la técnica de RFLP's, las bandas obtenidas al realizar la digestión de los ADNs, amplificados con los primers ITS1 - ITS4, con las enzimas *Hae* III y *Rsa* I, al igual que las anteriores (Etapa 1a) serán evaluadas mediante el peso molecular esperado, que se encuentra reportado por Álvarez, *et al* 2005, (Cuadro 1) y de esta manera se asignara cada muestra a la especie correspondiente.

**Cuadro 1.** Fragmentos de corte esperados para las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, con las enzimas *Hae* III y *Rsa* I INIAP, Cutuglahua – Pichincha 2009

Enzima	Especie de <i>Colletotrichum</i>	Fragmentos esperados
<i>Hae</i> III	<i>C. gloeosporioides</i>	290pb, 180pb, 105pb
	<i>C. acutatum</i>	290pb, 180pb, 95pb
<i>Rsa</i> I	<i>C. gloeosporioides</i>	380pb, 190pb
	<i>C. acutatum</i>	No hay sitio de corte

#### 5.2.2.3. Etapa 2. Evaluación de características morfológicas.

##### 5.2.2.3.1. Factores en Estudio

##### 5.2.2.3.1.1. Aislamientos de *Colletotrichum sp.*

Se utilizarán los mismos que en la Etapa 1. (Anexo 2)

##### 5.2.2.3.2. Tratamientos

50 aislamientos de *Colletotrichum sp.* (Anexo 2)

### **5.2.3. Estudio 2. Estudio poblacional.**

#### **5.2.3.1.1. Factores en Estudio**

##### **a) Aislamientos de *Colletotrichum sp.***

Se utilizarán los mismos que en el Estudio 1, divididos en grupos, los mismos que serán formados por la especie a la cual fue asignada basándose en los resultados que se obtendrán del Estudio 1.

##### **b) Primers**

➤ RAPD-operon

#### **5.2.3.1.2. Tratamientos**

Los tratamientos resultan de la combinación de los factores en estudio: Aislamientos de *Colletotrichum sp.* y Primers, estos últimos serán elegidos después de realizar un screening preliminar, por lo que el número de RAPD-operon a utilizarse aún no se lo puede precisar.

#### **5.2.3.1.3. Análisis Multivariado**

El registro de polimorfismos RAPDS o ISSRs se realizará por inspección visual de los productos de amplificación. Las bandas se considerarán como polimórficas si estas se encuentran presentes o ausentes al menos en dos genotipos. Para los polimorfismos que se registren, su peso molecular en pares de bases se estimará en función de su distancia de migración comparada a la migración de una molécula comercial de peso conocido (100 bp, INVITROGEN). De esta manera, cada polimorfismo se identificará con el código comercial del primer utilizado, seguido del peso molecular estimado en pares de bases. Los polimorfismos se codificarán en una matriz binaria de ausencia o presencia de los polimorfismos. La presencia de un polimorfismo se codificará con "1" y la ausencia con "0". Para cada marcador se realizarán los siguientes análisis estadísticos:

*a) Similitud genética:* la matriz de datos binarios (ausencia y presencia) en Excel se importa al programa NTSYS ver. 2.20 (Rohlf 2002) para obtener una matriz de similitud genética entre todas las combinaciones posibles entre genotipos. Se empleará como algoritmo matemático el coeficiente de Dice o Jaccard que permite cuantificar la similitud entre cada par posible de genotipos. Este coeficiente no considera a las dobles ausencias (d) como índice de similitud debido al carácter dominante del marcador utilizado (RAPD, e ISSR), por lo cual es propicio para la estimación de la similitud entre pares de genotipos. El índice de similitud de DICE (1945), varía entre 0 y 1, correspondiendo 1 a la máxima similitud.

*b) Estructura genética:* a partir de la matriz de similitud se realizarán en NTSYS dos análisis con el fin de determinar la estructura genética de las muestras analizadas: un análisis de agrupamiento (*Cluster Analysis*) y un análisis de Coordenadas Principales (PCO). Para el análisis de agrupamiento se empleará el método no ponderado UPGMA para la obtención de un árbol o fenograma que

#### 5.2.4.3. Unidad experimental

La Unidad Experimental será una planta de 20 cm sembrada en una funda con sustrato estéril y un fruto de cada especie.

#### 5.2.4.4. Diseño experimental

Se utilizará un diseño completamente al azar con arreglo factorial de la forma A x B +4, con cuatro observaciones.

#### 5.2.4.5. Análisis Estadístico

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) se presenta a continuación:

**Cuadro 3.** ADEVA para la evaluación de la patogenicidad de *Colletotrichum sp.* en plantas y frutos, INIAP, Cutuglahua – Pichincha 2009.

FdV	Gl
Total	148
Tratamientos	39
Aislamientos de <i>Colletotrichum sp.</i> (A)	8
Material Vegetativo (B)	3
A x B	24
Factor x Adicional 1	1
Adicional 1 x Adicional 2	1
Adicional 2 x Adicional 3	1
Adicional 3 x Adicional 4	1
Error Experimental	109

#### 5.2.4.6. Análisis Funcional

Se calculará el coeficiente de variación y se determinará las diferencias estadísticas que podrían presentarse en las variables de estudio y que resulten significativas, serán determinadas a partir de la comparación de medias a través de la prueba de Tukey al 5%.

#### 5.2.4.7. Variables

Para la patogenicidad del hongo se evaluará:

**Período de incubación:** Se contabilizará el número de días desde la inoculación hasta el apareamiento de los primeros síntomas.

**Tamaño de lesión:** Se medirá el diámetro de las lesiones en hojas, tallos y frutos utilizando un calibre. Los datos se expresarán en milímetros y las evaluaciones se realizarán a partir del día 3 después de la inoculación, cada tres días (en caso de que los aislamientos resulten diferentes, caso contrario solo se evaluará la presencia de síntomas).

Las pruebas se realizarán en plantas de tomate de árbol y naranjilla. El inóculo para las pruebas será obtenido de los aislamientos de *Colletotrichum* ya purificados y previamente seleccionados por el análisis molecular, selección basada en la variabilidad genética que presenten los aislamientos, y será preparado sumergiendo segmentos de medio de cultivo con micelio en agua estéril para posteriormente ajustar la concentración mediante una cámara de New Vahuer, a  $1 \times 10^5$  esporas/ml. (Viera, 2002).

Cuando las plantas lleguen a los 20 cm, se colocarán en un ambiente húmedo (cámara de humidificación) por dos horas, posteriormente se inocularán utilizando un microaspersor y una bomba de vacío a una dosis de 1ml por planta. Se realizarán humidificaciones diariamente por el lapso de 4 horas, hasta observar síntomas de la enfermedad.

En frutos de tomate de árbol y naranjilla, se realizarán pequeños orificios con una aguja estéril y se colocará sobre el orificio una gota (10 ul) del mismo inóculo preparado para las plantas. Los frutos serán colocados en cámaras húmedas y serán incubados a 25°C.

### 5.3.7. Caracterización molecular

#### 5.3.7.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se multiplicará el hongo en medio líquido papa dextrosa a 24°C por 10 días, se tomará discos de micelio los cuales serán secados utilizando vacío, estos discos se colocarán en cajas petri estériles y se los incubará a 36°C por 3 días, los discos se macerarán en un mortero utilizando nitrógeno líquido hasta quedar en ceniza, la cual será guardada en tubos eppendorf. Para la extracción de ADN se utilizará el protocolo adjunto en el Anexo 5.

#### 5.3.7.2. Identificación genética

Los aislados del hongo serán identificados taxonómicamente utilizando la técnica de PCR mediante la amplificación con primers universales de la región conservada del ADN ribosómico (ADNr) y el cual involucra el uso de tres cebadores o primers ITS (White et al, 1990) (Cuadro 3), los cuales serán combinados de la siguiente manera: ITS1-ITS2, ITS1-ITS4.

**Cuadro 3.** Secuencias de los cebadores universales ITS (secuencias internas conservadas)

Cebador Universal	SECUENCIA
ITS 1	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'
ITS 2	5' GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC3'
ITS 4	5' TCC CTT TCA ACA ATT TCA CG 3'

Además, se utilizarán los cebadores específicos *CgInt* y *CaInt2*, descritos en el cuadro 4 combinados con la secuencia-ITS 4 de la región conservada del gen 25/28S del ADNr (Afanador et al 2006; Brown et al 1996)

7. PRESUPUESTO:

<i>Rubro</i>	<i>Unidad</i>	<i>Precio Unitario (USD)</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Total (USD)</i>
<b>I. PERSONAL REQUERIDO PARA EL PROYECTO</b>				
Becario	Mes	280.50	12	3366
<b>Subtotal</b>				<b>3366</b>
<b>II. COLECTA DE MATERIAL VEGETAL</b>				
Colecta de muestras ( <i>Colletotrichum sp</i> ) en diferentes provincias, 6 viajes (4 de un día y 2 de dos días por 2 personas). Incluye gastos de logística				800
<b>Subtotal</b>				<b>800</b>
<b>III. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR</b>				
Extracción y Cuantificación ADN	u	5.0	100	500
Amplificación por RAPD e ISSR	u	1	600	600
Digestión RFLPs	u	2.5	100	250
Insumos y reactivos varios				630
<b>Subtotal</b>				<b>1980</b>
<b>IV. ELABORACION DEL DOCUMENTO FINAL</b>				
Fotocopias, impresión y otros	hojas	0.2	500	100,00
Empastados.	1	20	6	120,00
<b>Subtotal</b>				<b>220,00</b>

Presupuesto global

<b>RUBRO</b>	<b>SUBTOTAL (USD)</b>	<b>FUENTE FINANCIAMIENTO</b>
I. Muestreo y colecta	800	P. FONTAGRO
II. Caracterización molecular	1980	P. BIOTEC
III. Personal requerido para el proyecto	3366	P. FONTAGRO
IV. Costos elaboración del documento final	220	P. FONTAGRO
Subtotal	6366	
Imprevistos (5%)	318.30	
<b>COSTO TOTAL</b>	<b>6684.30</b>	

<b>FUENTE DE FINANCIAMIENTO</b>	<b>% Aporte</b>
FONTAGRO	65%
PROYECTO BIOTECNOLOGIA	35%
TOTAL	100%



- MARULANDA, M.; LÓPEZ, A.; AGUILAR, S. 2007. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. In: crop breeding applied biotechnology 7:242-252. BR.
- NAKASONE, H.; PAULL, R. 1998. Annonas. In: Tropical fruits. CABI. Wallingford, UK. p. 45-75.
- NAVA-DÍAZ, C.; OSADA-KAWASOE S.; RENDÓN-SÁNCHEZ G.; AYALA-ESCOBAR V. 2000. Organismos asociados a chirimoya (*A. cherimola* Mill.) en Michoacán, México. Agrociencia 34:217-226.
- PEAKALL R.; SMOUSSE P. 2001. GenAIEx V5: Genetic Analysis in Excel. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx/>
- PÉREZ, L. 1993. Enfermedades de las plantas. Medellín. p. 46-51.
- REYES, C.; MORALES, L. 2007. Determinación de la temperatura óptima de desarrollo *in Vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* en aguacate “Hass”, en la zona aguacatera de Michoacán, México.
- ROBERTS, P.; PERNEZNY, K.; KUCHARAK, T. Anthracnose caused by *Colletotrichum sp* on Pepper. p. 178
- RODRÍGUEZ, A. 2007. Caracterización molecular de Poblaciones de *Colletotrichum spp.* Asociados a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico de CBD. Bogota, CO.
- ROHLF F. 2002. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY. Sokal, R.R and P.H.A. Sneath. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. San Francisco. 359 p.
- SALDARRIAGA, A.; CASTAÑO, J.; ARANGO R. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. CO
- SUTTON B. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Bailey, J. A., and M. J. Jeger (eds). CAB Internacional. Wallingford, UK. pp: 1-26.
- VÉLIZ, D. 2005. Caracterización molecular de aislamientos de *Colletotrichum sp.* causante de antracnosis en lupino (*Lupinus sp. L*) mediante marcadores ITS-RFLPs y RAPDs. Valdivia, CH.
- VIERA, W. 2002. Evaluación de fungicidas y pruebas de resistencia de 5 variedades de Tomate de Árbol (*Solanum betaceum cav.*) para antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), Cutuglahua, Pichincha. Tesis Ing. Agr. Quito, EC, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agronómicas.
- WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. London, UK. Academic Press p. 315-322.

**Anexo 2.** Aislamientos de *Colletotrichum sp*

<b>Ordinal</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Órgano afectado</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Sitio de recolección</b>
1	A 1	Hoja	Tomate de árbol	Sitio 1
2	A 2	Hoja	Tomate de árbol	Sitio 1
3	A 3	Hoja	Tomate de árbol	Sitio 2
4	A 4	Hoja	Tomate de árbol	Sitio 3
5	A 5	Hoja	Tomate de árbol	Sitio 3
6	A 6	Tallo	Tomate de árbol	Sitio 1
7	A 7	Tallo	Tomate de árbol	Sitio 1
8	A 8	Tallo	Tomate de árbol	Sitio 2
9	A 9	Tallo	Tomate de árbol	Sitio 3
10	A 10	Tallo	Tomate de árbol	Sitio 3
11	A 11	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 1
12	A 12	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 1
13	A 13	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 2
14	A 14	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 3
15	A 15	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 3
16	A 16	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 1
17	A 17	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 1
18	A 18	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 2
19	A 19	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 3
20	A 20	Fruto	Tomate de árbol	Sitio 3
21	A 21	Hoja	Naranjilla	Sitio 1
22	A 22	Hoja	Naranjilla	Sitio 1
23	A 23	Hoja	Naranjilla	Sitio 2
24	A 24	Hoja	Naranjilla	Sitio 3
25	A 25	Hoja	Naranjilla	Sitio 3
26	A 26	Flor	Naranjilla	Sitio 1
27	A 27	Flor	Naranjilla	Sitio 1
28	A 28	Flor	Naranjilla	Sitio 2
29	A 29	Flor	Naranjilla	Sitio 3
30	A 30	Flor	Naranjilla	Sitio 3
31	A 31	Fruto	Naranjilla	Sitio 1
32	A 32	Fruto	Naranjilla	Sitio 1
33	A 33	Fruto	Naranjilla	Sitio 2
34	A 34	Fruto	Naranjilla	Sitio 3
35	A 35	Fruto	Naranjilla	Sitio 3
36	A 36	Fruto	Naranjilla	Sitio 1
37	A 37	Fruto	Naranjilla	Sitio 1
38	A 38	Fruto	Naranjilla	Sitio 2
39	A 39	Fruto	Naranjilla	Sitio 3
40	A 40	Fruto	Naranjilla	Sitio 3
41	A 41	Hoja	Chirimoya	Sitio 1
42	A 42	Hoja	Chirimoya	Sitio 1
43	A 43	Hoja	Chirimoya	Sitio 2
44	A 44	Tallo	Chirimoya	Sitio 3
45	A 45	Tallo	Chirimoya	Sitio 3
46	A 46	Fruto	Chirimoya	Sitio 1

**Anexo 4.** Lugares de colecta y número de muestras de antracnosis a tomar por cultivo.

Frutales	Zona Productora	Nº de muestras
Naranjilla	Noroccidente, El Chaco, Tandapi.	20
Chirimoya	Guayllabamba, Urcuquí	10
Tomate de árbol	Tungurahua, Imbabura, Tumbaco, Patate, Pelileo	20

**Anexo 5.** Protocolo de extracción de ADN según CIAT, 2007

1. Pesar 0.3g de tejido macerado (equivalente a 300ul). Adicionar 900ul de buffer de extracción más 1.5ul de Proteinasa K (10 mg/ml). Mezclar en vortex hasta obtener una solución homogénea- Incubar a 65°C por 1 hora. El volumen de buffer puede reducirse a 600ul en caso de usar cantidad menor de micelio macerado (100ul).
2. Adicionar 200ul de acetato de amonio 7.5M dejando a temperatura ambiente por 10 min.
3. Centrifugar a 12.000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a otro tubo. Adicionar igual volumen de cloroformo: isoamil alcohol (24:1). Mezclar por inversión. Centrifugar a 12.500 rpm por 10 minutos. Recuperar el sobrenadante.
4. Repetir el lavado con cloroformo: isoamil.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Adicionar igual volumen de isopropanol frío y llevar a -20°C toda lo noche.
6. Centrifugar a 12.500rpm por 10 minutos y descartar el sobrenadante.
7. Lavar el pellet con 500ul de etanol frío al 70%, golpeando suavemente para desprenderlo de las paredes del tubo. Centrifugar a 12.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Lavar dos veces descartando siempre el sobrenadante.
8. Secar por 1 hora a 37°C en incubadora boca arriba o los tubos invertidos sobre una toalla.
9. Resuspender en TE (50 a 100ul dependiendo del tamaño del pellet) y adicionar luego 1 ul de RNAsa (conservar la relación 50ul de muestra: 1ul de RNAsa) e incubar a 37°C por 1 hora. Luego almacenar muestras a 4°C. Es importante que se haga una resuspensión completa del ADN en el TE más RNAsa antes de incubar las muestras a 37°C.
10. Evaluar ADN en gel de agarosa al 0.8%, en caso de tener barrido de ARN, repetir tratamiento con RNAsa. Se toma 2ul de ADN más 10ul de buffer de carga y de la mezcla se siembra 10ul en cada pozo. Como referencia se utiliza 3ul de marcador de peso molecular 1 Kb.

**Buffer de extracción**

**Condición Inicial (Stock)**

NaCl 5M  
EDTA 500 mM  
Tris- HCl 1M  
SDS  
Proteinasa K (10 mg/ml) 1.5ul

**Condición Final**

1.4 M  
20 mM  
100 mM  
1%  
0.016 mg/ml