

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación

**Estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la
Polimerasa (PCR) para la identificación de la enfermedad de escaldadura
de la hoja en la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)**

Estudiantes

Cecilia Nicole Sagastume Fernandez

Andres Mauricio Vedia Quispe

Asesores

Carolina Avellaneda, Ph.D.

Raphael W Colbert, Ph.D.

Honduras, julio 2023

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	4
Índice de Figuras	5
Índice de Anexos	7
Resumen.....	8
Abstract	9
Introducción	10
Materiales y Métodos	13
Localización del Estudio	13
Toma de Muestras	13
Aislamiento e Identificación de Bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i>	14
PCR para Determinar Control Positivo	16
Extracción de ADN de Caña de Azúcar	17
Cuantificación y Evaluación de ADN de las Muestras de Caña de Azúcar	18
Diluciones de ADN.....	18
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
Electroforesis en Gel de Agarosa	20
Resultados y Discusión	22
Aislamiento de la Bacteria.....	22
Extracción de ADN Bacteriano para Control Positivo	24
Cuantificación de ADN de las Muestras de Caña de Azúcar	25
Ensayos para Estandarización de PCR Especifico para LSD.....	26
PCR de todas Muestras de Caña de Azúcar.....	27
Conclusiones	30
Recomendaciones	31
Referencias.....	32
Anexos.....	35

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Lista de 54 variedades de caña de azúcar pertenecientes al banco de germoplasma de la compañía azucarera Tres Valles evaluadas en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, para determinar la presencia de <i>Xanthomonas albilineans</i> mediante prueba PCR.	14
Cuadro 2 Secuencia de iniciadores para detectar <i>Xanthomonas albilineans</i> en caña de azúcar amplificadas a un tamaño de 360 pb mediante reacción en cadena a la polimerasa.	19
Cuadro 3 Volumen y materiales utilizados para la preparación de la mezcla maestra de una muestra (1X) para amplificación de PCR para la detección de <i>Xanthomonas albilineans</i> en caña de azúcar.	20
Cuadro 4 Mejor perfil térmico de PCR con los primers L1 y Ala4 para la identificación de <i>Xanthomonas albilineans</i> en caña de azúcar.	20
Cuadro 5 Cuantificación y calidad de ADN de 54 muestras de caña de azúcar del banco de germoplasma de la azucarera Tres Valles obtenidas mediante el uso de un espectrofotómetro en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.	25
Cuadro 6 Perfiles térmicos probados en el proceso de estandarización de reacción en cadena a la polimerasa para el diagnóstico de <i>Xanthomonas albilineans</i> en dos variedades de caña de azúcar (LAICA 00-301 Y B69-566).	26
Cuadro 7 Número de muestra y variedades que dieron positivo a la presencia de <i>Xanthomonas albilineans</i> de las 54 muestras de caña de azúcar evaluadas mediante PCR en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.	29

Índice de Figuras

Figura 1 Aislamiento e identificación de la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> presente en las variedades LAICA 00-301 y B69-566 de caña de azúcar en el laboratorio de Fitopatología, Zamorano, Honduras.....	15
Figura 2 Técnica de tinción de Gram a bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> presente en las variedades LAICA 00-301 Y B 69-566 de caña de azúcar realizada en el laboratorio de Fitopatología, Zamorano, Honduras.	16
Figura 3 Proceso de extracción de ADN de hojas de caña de azúcar mediante el método convencional a las 52 variedades pertenecientes al banco de germoplasma de la compañía azucarera Tres Valles, Honduras.	17
Figura 4 Dilución de ADN para lograr una concentración de 50 ng/ μ L en las muestras extraídas de 54 variedades de caña de azúcar.	18
Figura 5 Colonia de bacterias <i>Xanthomonas albilineans</i> aislada de la variedad B 69-566 de caña de azúcar en medio de cultivo Agar Nutritivo en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.	22
Figura 6 Colonia de bacterias <i>Xanthomonas albilineans</i> aislada de la variedad LAICA 00-301 de caña de azúcar en medio de cultivo Agar Nutritivo en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.....	23
Figura 7 Vista al microscopio en lente de 40X del resultado de tinción de Gram aplicada a la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> aislada en medio Agar Nutritivo en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.	23
Figura 8 Visualización de las bandas en gel de agarosa al 1% correspondientes a control positivo de dos variedades de caña de azúcar (LAICA 00-301 Y B69-566) en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.....	24

Figura 9 Amplificación de bandas en gel de agarosa al 1% a una temperatura de 57.5 °C en la etapa de hibridación de 54 muestras de caña de azúcar para la detección de *Xanthomonas albilineans* en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras. 28

Índice de Anexos

Anexos A Protocolo de extracción de ADN	35
---	----

Resumen

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia económica en Honduras, por tener una producción anual de más de cinco millones de toneladas. La caña de azúcar es susceptible a diversas enfermedades bacterianas siendo la más importante escaldadura de la hoja o LSD (Leaf Scald Disease), por sus siglas en inglés, cuyo agente causal es *Xanthomonas albilineans*. El objetivo del estudio fue la estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de la enfermedad en 54 variedades de caña de azúcar. Las muestras fueron recolectadas en la finca Azacualpa 2 lote 21 y finca los Micos, lote 7 de la Compañía Azucarera Tres Valles S.A, a dichas muestras se les extrajo el ADN evaluando su calidad y concentración para posteriormente identificar la presencia de la enfermedad a nivel molecular mediante la técnica de PCR. Mediante esta técnica se identificó la presencia de la bacteria *Xanthomonas albilineans* en 17 de las variedades analizadas de igual manera se determinó que la temperatura 57.5° C para la etapa de hibridación fue la más adecuada para obtener bandas claras en la electroforesis en muestras positivas validando de esta forma el perfil térmico de la PCR.

Palabras clave: caña de azúcar, escaldadura de la hoja, estandarización, PCR, *Xanthomonas albilineans*.

Abstract

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is an important crop for Honduras, with an annual production of more than five million tons. Sugarcane is susceptible to several bacterial diseases, the most important of which is leaf scald disease (LSD), whose causal agent is *Xanthomonas albilineans*. The objective of the study was the standardization of the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for the identification of the disease in 54 varieties of sugarcane. Samples were collected from Azacualpa 2, lot 21 and Los Micos, lot 7 of Compañía Azucarera Tres Valles S.A. DNA was extracted from these samples, evaluating their quality and concentration to later identify the presence of the disease at the molecular level using the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique. This technique identified the presence of the bacterium *Xanthomonas albilineans* in 17 of the varieties analyzed. It was also determined that the temperature of 57.5°C for the annealing was the most appropriate for obtaining clear bands in the electrophoresis of positive samples, thus validating the thermal profile of the PCR.

Keywords: Leaf scald, PCR, standardization, sugarcane, *Xanthomonas albilineans*.

Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es una planta gramínea proveniente de Nueva Guinea (Olalla 2008). Es una herbácea perenne que produce entre 5 a 12 tallos que crecen hasta alcanzar una altura de 3 a 5 metros. Como planta C4, la caña de azúcar tiene una tasa fotosintética muy alta. Alrededor de 150-200% más alto que el promedio de otras plantas. Después de la etapa de macollamiento, la planta entra en un período de rápido crecimiento. En esta etapa de crecimiento, la planta requiere el apoyo de un programa nutricional completo (Yara 2023). Los tallos de caña de azúcar se consideran frutos agrícolas debido a que en ellos se distribuyen y almacenan azúcar. Contienen aproximadamente un 75 % de agua y están formados por nudos y entrenudos. Es cultivado principalmente para la producción de azúcar, pero también es utilizado como materia prima para la elaboración de diversos subproductos (Agricultura Nayarit 2018).

Honduras produce anualmente más de cinco millones de toneladas de caña de azúcar y distribuye más de 80.000 manzanas. El 60% de eso viene de la industria y el 40% restante de productores independientes. Esto convierte a la industria azucarera del país en la principal fuente de empleo más influyentes en sus regiones, proporcionando puestos de trabajo al 44% de la población económicamente activa de la región (Fundación Hondureña de Responsabilidad Social Empresarial (FUNDAHRSE) 2022).

Gutierrez et al. (2014) afirman que la escaldadura de la hoja (LSD, por sus siglas en inglés, Leaf Scald Disease) es una enfermedad bacteriana vascular sistémica causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans*. Esta enfermedad fue reportada por primera vez en Louisiana en el año de 1993 y ya se cuenta con reportes en 66 diferentes países. Afirma que debido a su gran importancia en el cultivo de la caña se han desarrollado varios métodos para detectar su agente causal *Xanthomonas albilineans*, estos métodos permiten detectar infecciones, identificar cepas y analizar germoplasma. Se han evaluado numerosas estrategias para mitigar el daño económico

que provoca esta enfermedad en diferentes partes del mundo. Sin embargo, el uso de variedades resistentes es la mejor manera de controlar la enfermedad (López et al. 2016).

Gutiérrez et al. (2016) afirman que la escaldadura de la hoja es una enfermedad de gran importancia en la caña de azúcar distribuida a nivel mundial. La enfermedad puede significar un problema grave debido a numerosas pérdidas en toneladas de caña por hectárea y a una reducción en la calidad del jugo. *Xanthomonas albilineans* produce una toxina en el huésped, la albicidina quien es responsable de las tres fases de infección y sintomatología en la caña de azúcar. Li M et al. (2022) afirman que la albicidina es una toxina que evita la formación de cloroplastos lo que provoca una coloración blanca en las hojas.

De acuerdo con Jiménez y Contreras (2009) los síntomas de esta enfermedad pueden mostrarse en tres fases, fase crítica, aguda y latente. En la fase crítica se presentan estrías blancas en la nervadura central; en la fase aguda la planta sufre un descenso a causa de altas precipitaciones a sequías y no se muestra ningún síntoma relacionado a la fase crítica y por último la fase latente donde en ocasiones en la planta se presentan rayas pequeñas con coloración rojiza, sin embargo, cuando la planta se encuentra en esta fase solo puede darse un diagnóstico de la enfermedad mediante pruebas serológicas. Así mismo Cervantes et al. (2021), afirma que en la fase aguda aparecen líneas de lápiz, decoloración y necrosis en las hojas previo a la escaldadura del tallo y su posterior muerte. Según López et al. (2016), esta enfermedad tiene efectos negativos estimando pérdidas de hasta el 90% esto porque baja el rendimiento y la calidad del jugo; la producción en campo puede representar pérdidas del 15% afectando los grados Brix y concentración de sacarosa.

De acuerdo con Tamay de Dios et al. (2013) la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanca es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Según Rodríguez y Barrera (2004) las pruebas de

PCR permiten amplificar secuencias correspondientes a una bacteria de manera específica y más sensible; esto gracias al uso de iniciadores que están diseñados para unirse a la secuencia de interés en el ADN bacteriano.

Las etapas de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) requieren de diferentes temperaturas, la primera etapa desnaturalización donde se separa la doble hélice debido a que los puentes de hidrogeno se rompen se da a altas temperaturas entre 94-96° C; la segunda etapa hibridación donde se da la unión de los iniciadores a la zona 3' complementarias ocurre con un descenso de temperatura que va desde 45 hasta 65° C y la última etapa, extensión que consiste en la síntesis de una cadena sencilla a partir del extremo 3' requiere una temperatura de 72° C. (Salcedo et al. 2014). Para la posterior interpretación de los resultados de la PCR se corre una electroforesis, la técnica permite la visualización de las bandas de ADN de patógenos y descubrir cambios o mutaciones a nivel genético (Yábar 2003). Los ácidos nucleicos gracias al gel agarosa que es una malla tridimensional permiten que las moléculas de mayor tamaño migren lentamente en cambio las de menor tamaño avanzan mucho más rápido, por lo tanto, las moléculas son separadas de acuerdo con su tamaño, así como también las moléculas de ADN y ARN poseen diferentes estructuras tridimensionales lo que genera un comportamiento diferente en presencia de la malla del polímero lo que facilita la separación (Ramírez et al. 2014).

Actualmente el laboratorio no cuenta con un perfil térmico estandarizado para realizar análisis de *Xanthomonas albilineans* en caña de azúcar por lo que la estandarización de esta prueba PCR es importante para el laboratorio de Fitopatología de Zamorano debido a que con este estudio se puede lograr la detección y diagnóstico temprano a *Xanthomonas albilineans* al ser esta una técnica eficaz, altamente específica y sensible ya que amplifica y detecta secuencias específicas a esta bacteria.

El objetivo de esta investigación fue estandarizar un protocolo de PCR para la identificación la bacteria *Xanthomonas albilineans* en caña de azúcar.

Materiales y Métodos

Localización del Estudio

Este estudio se llevó a cabo en la finca Azacualpa, 2 lote 21 y los Micos, lote 7 de la compañía Azucarera Tres Valles S.A, localizada en El Porvenir, San Juan de Flores en el departamento de Francisco Morazán, Honduras. Para dicho estudio se tomó en cuenta 54 variedades diferentes de caña de azúcar. Las identificaciones fueron hechas específicamente en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Se emplearon en total 54 variedades de caña de azúcar, las cuales se obtuvieron del banco de germoplasma de Tres Valles. Este banco se divide en dos fincas, Azacualpa 2, lote 21 y los Micos, lote 7 (Cruz 2022).

Toma de Muestras

La detección de *Xanthomonas albilineans*, se realizó mediante las muestras recolectadas por Cruz (2022), las cuales fueron tomadas en el mes de marzo cuando el cultivo se encontraba en su tercer mes después de establecido, muestras colectadas al azar de manera representativa y posteriormente se tomó 30 cm del tercio medio de entre 5 a 8 hojas que presenten su cuello visible o la hoja TVD (Top Visible Dewlap).

Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas debidamente rotuladas con su número de variedad y ubicación del lote de donde fueron colectadas (Cuadro 1). Por último, las muestras se llevaron al laboratorio de Fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano donde fueron almacenadas con una temperatura de entre 2 a 8 °C para evitar daños en el tejido foliar.

Cuadro 1

*Lista de 54 variedades de caña de azúcar pertenecientes al banco de germoplasma de la compañía azucarera Tres Valles evaluadas en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, para determinar la presencia de *Xanthomonas albilineans* mediante prueba PCR.*

N° muestra	Variedad	N° muestra	Variedad
1	B 69-566	28	LAICA 00-309
2	BJ 7938	29	LAICA 01-604
3	BR 000-10	30	LAICA 03-805
4	CC 8325	31	LAICA 04-809
5	CG 00-102	32	LAICA 05-802
6	CG 02-163	33	LAICA 05-805
7	CP 02-2113	34	LAICA 0720
8	CP 05-1791	35	LAICA 0726
9	CP 07-1210	36	LAICA 07-801
10	CP 08-2042	37	LAICA 08-390
11	CP 09-1823	38	LAICA 09-370
12	CP 09-2498	39	LAICA 10-207
13	CP 11-2216	40	LAICA 12-340
14	CP 72-1210	41	LAICA 1259
15	CP 72-2086	42	LAICA 1649
16	CP 73-1547	43	LCP 85-384
17	CP80-1743	44	MEX 69-290
18	CP 81-2143	45	MEX 79-431
19	CP 84-1198	46	RB 72-454
20	CP89-2143	47	RB 83-594
21	CP 96-1252	48	RB 85-5035
22	CPCL 05-1201	49	RB 86-7515
23	CPCL 92-2730	50	RB 92-579
24	HOCP 91552	51	SP 79-1011
25	LAICA 05-109	52	SP 81-1842
26	ITV 92-1424	53	SP 81-2068
27	LAICA 00-301	54	SP 81-3250

Nota. las variedades de caña de azúcar son nombradas con las iniciales de su origen geográfico seguido por dos números separados por un guion, el primero indica el año que a variedad fue seleccionada por primera vez y el segundo representa el número correlativo de selección. CP: Canal Point (EUA), CPCL: Canal Point Clewiston (EUA), HOCP: Houma-Canal Point, LAICA: Costa Rica, LCP: Luisiana, MEX: México, PR: Puerto Rico, RD: Republica de Brasil, SP: Sao Paulo (Brasil).

Aislamiento e Identificación de Bacteria *Xanthomonas albilineans*

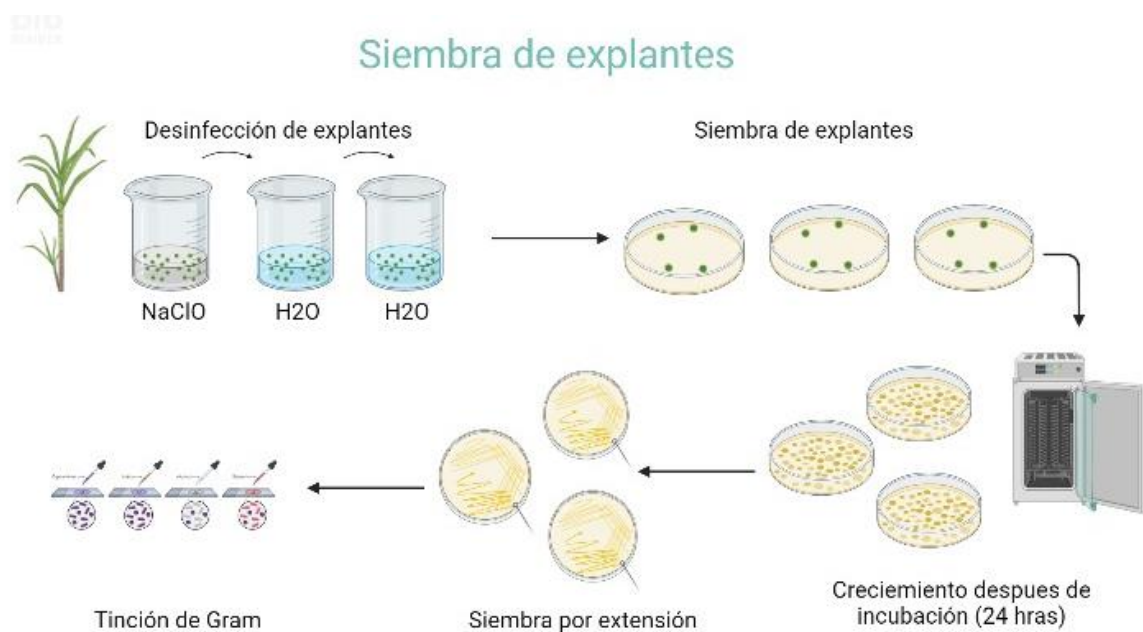
Se cortaron de cada muestra (LAICA 00-301 y B 69-566) cuatro trozos pequeños con un bisturí estéril que presentaban la sintomatología deseada. Para la desinfección se hizo un lavado con hipoclorito de sodio (NaClO) con ingrediente activo ion hipoclorito (OCI-) al 3% de concentración durante 3 minutos y dos lavados con agua destilada estéril durante 1 minuto cada uno luego fueron secados en papel filtro. Los explantes ya secos, fueron sembrados en medio

de agar nutritivo, los cuales fueron posteriormente incubados durante un periodo de 24 horas a 37 °C.

Se tomó el cultivo de la placa Petri y se inoculó mediante el método de Frobisher en medio de agar nutritivo y nuevamente se incubó durante 24 horas a 37°C.

Figura 1

Aislamiento e identificación de la bacteria Xanthomonas albilineans presente en las variedades LAICA 00-301 y B69-566 de caña de azúcar en el laboratorio de Fitopatología, Zamorano, Honduras.



Nota. Diagrama de cinco pasos a seguir para aislar e identificar la bacteria presente en cultivo de caña de azúcar.

Se usó la técnica de tinción de Gram (Figura 2) para diferenciar la bacteria entre dos grupos, Gram positiva y Gram negativa. La tinción de Gram permite distinguir entre bacterias Gram positivas y Gram negativas sobre la base de una tinción diferencial con un complejo de yodo y violeta cristalino y una contra tinción de safranina. Las paredes celulares de los organismos Gram positivos retienen este complejo tras el tratamiento con alcohol y aparecen de color púrpura, mientras que los organismos Gram negativos se decoloran tras dicho tratamiento y aparecen de color rosa (Coico 2005). Se llevó a cabo la prueba siguiendo un protocolo establecido en el Laboratorio de Fitopatología. En un portaobjetos se colocó una gota

de agua destilada y se mezcló una pequeña cantidad de la bacteria con movimientos giratorios hasta que se secó por completo. Se cubrió el frotis con cristal violeta durante un minuto y se enjuagó con agua destilada. Una vez seco, se repitió el proceso con gotas de Lugol durante un minuto. Posteriormente, se aplicaron gotas de alcohol acetona durante 5 segundos y se lavó rápidamente con agua destilada. Finalmente, se agregaron gotas de safranina durante un minuto y se lavó con agua destilada. Mediante el uso de un microscopio se observó el resultado de la prueba y la forma de la bacteria.

Figura 2

Técnica de tinción de Gram a bacteria Xanthomonas albilineans presente en las variedades LAICA 00-301 Y B 69-566 de caña de azúcar realizada en el laboratorio de Fitopatología, Zamorano, Honduras.

Tinción de Gram



Nota. Diagrama de cuatro pasos a seguir para identificar bacteria como Gram positiva o Gram negativa.

PCR para Determinar Control Positivo

Previo a la extracción de ADN, se utilizó muestra de bacteria anteriormente aislada de los cultivos que mostraron desarrollo, para su posterior crecimiento en 100 mL de medio líquido Luria Broth, y colocado en la orbital a 200 rpm por 5 días. Una vez finalizado los cinco días, se transfirió la bacteria del Erlenmeyer a tubos Falcon de 50 mL y fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10 minutos. Saliendo de la centrifuga, en la cámara de flujo laminar se removió el sobrenadante de los tubos para la obtención de los pellets dónde se transfirió 200 µL de pellet

ya re-suspendido a cada tubo Eppendorf de 1.5 mL. Los tubos fueron sometidos al protocolo de extracción DNeasy Blood & Tissue Kit de la empresa QIAGEN®.

Extracción de ADN de Caña de Azúcar

Se separó la lámina foliar de la nervadura principal de las muestras recolectadas, las cuales, fueron maceradas gracias al uso de un mortero, un pistilo y nitrógeno líquido evitando así la deshidratación, oxidación y degradación de estas. Las muestras fueron almacenadas en tubos Falcon debidamente rotulados a -20°C para su conservación (Figura 3). La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio de fitopatología de Zamorano.

Figura 3

Proceso de extracción de ADN de hojas de caña de azúcar mediante el método convencional a las 52 variedades pertenecientes al banco de germoplasma de la compañía azucarera Tres Valles, Honduras.



Nota. Diagrama de ocho pasos a seguir para la extracción de ADN de las 54 variedades de caña de azúcar

Cuantificación y Evaluación de ADN de las Muestras de Caña de Azúcar

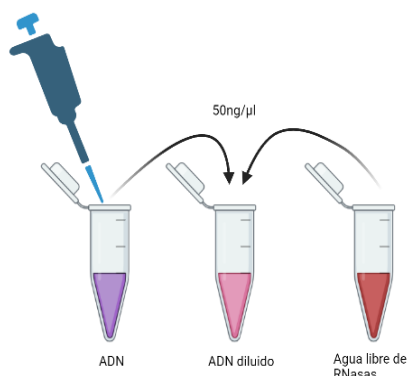
La evaluación fue hecha mediante el uso del NanoDrop® NP1000 espectrofotómetro del laboratorio de fitopatología, para evaluar la concentración se tomaron 2 µL por muestra obteniendo la lectura de la concentración en nanogramos por microlitro ng/µL y la calidad mediante la relación de absorbancia A260/280.

Diluciones de ADN

Para la realización de la PCR, se utilizaron muestras con una concentración aproximada de 50 ng/µL. Por lo que se diluyó aquellas muestras con concentraciones mayores usando la fórmula de dilución de las soluciones concentradas, en el cual el resultado obtenido será usado para la cantidad de µL de solución madre que se utilizará y aforando con agua libre de RNasas a 50 µL.

Figura 4

Dilución de ADN para lograr una concentración de 50 ng/µL en las muestras extraídas de 54 variedades de caña de azúcar.



Nota. Dilución mediante el uso de agua libre de RNasas para alcanzar una concentración de 50 ng/µL de ADN.

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2 \quad [1]$$

$$V1 = \frac{V2 \cdot C2}{C1}$$

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La detección de la bacteria *Xanthomonas albilineans* se realizó mediante la técnica PCR convencional que comprende la amplificación de una secuencia de interés mediante el uso de iniciadores. Esta fue realizada en un termociclador de la marca MJ Research Ink PTC-100 Para esta prueba PCR se utilizó los iniciadores L1 (delantero) y Ala4 (reverso) cuya secuencia se encuentra en el Cuadro 2.

Cuadro 2

Secuencia de iniciadores para detectar Xanthomonas albilineans en caña de azúcar amplificadas a un tamaño de 360 pb mediante reacción en cadena a la polimerasa.

Nombre	Iniciador	Secuencia 5'-3'	Temperatura de anillamiento	Tamaño (pb)	Referencia
LSD	L1 Ala4	CAAGGCATCCACCGT CCCGACTGGCTCCACCACTG	52.1 °C 62.8 °C	360	Pan et al. (1997)

Previo a la elaboración de la mezcla maestra, se realizaron diluciones de los iniciadores y dNTP's siguiendo el protocolo de Cenicaña (2016), ambas diluciones fueron hechas mediante el uso de la formula descrita en la Ecuación 1. La primera dilución se realizó a los dNTP's ya que estos se encontraban una concentración de 10 mM y se llevaron a una concentración de 2 mM. Por otro lado, los iniciadores a utilizar se encontraban a una concentración de 100 µM/µL y fue necesario llevarlos a una concentración de 10 µM/µL.

Se realizaron pruebas PCR utilizando un volumen total de 10 µL de la mezcla maestra (Cuadro 3) por cada tubo Eppendorf de 0.5 mL y para cada reacción de PCR se utilizó el siguiente perfil térmico (Cuadro 4). Durante la prueba se utilizó una temperatura de 57.5 °C en la hibridación, la cual es el promedio de las requeridas para los iniciadores L1 = (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') a 52.1 °C y Ala4 = (5'-CCCGACTGGCTCCACCACTG-3') a 56.8 °C teniendo como promedio de temperatura 57.5 °C.

Cuadro 3

Volumen y materiales utilizados para la preparación de la mezcla maestra de una muestra (1X) para amplificación de PCR para la detección de Xanthomonas albilineans en caña de azúcar.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer 5x	2
MgCl ₂ (25 mM)	0.5
dNTP's (2mM)	1
Iniciador L1 (10 μM)	0.4
Iniciador Ala 4 (10 μM)	0.4
Taq Polimerasa (5U/ μL)	0.1
Agua libre de RNasas	4.6
ADN (50 ng/ μL)	1
Volumen total	10

Cuadro 4

Mejor perfil térmico de PCR con los primers L1 y Ala4 para la identificación de Xanthomonas albilineans en caña de azúcar.

Paso	Tiempo (sec.)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	N° Ciclo
Desnaturalización inicial	300	94	1
Desnaturalización	30	94	
Hibridación	40	57.5	35
Extensión	40	72	
Extensión final	300	72	1

Electroforesis en Gel de Agarosa

Para la interpretación de los resultados del producto de la PCR se preparó un gel de agarosa al 1% siguiendo el protocolo de laboratorio de fitopatología colorado con 7.5 μL de bromuro de etidio. Una vez solidificado el gel, se colocó en la cámara de electroforesis modelo Owl EasyCast B2-BP marca Thermo Scientific® y se añadió 850 mL de la solución buffer, se retiraron los peines.

Se llenaron los pozos del gel con una mezcla de 2 μL de tinte de carga como buffer de carga más 4 μL del producto de la PCR, teniendo como primer carril un marcador molecular (1Kb) y los últimos tres carriles con una muestra en blanco, control positivo y control negativo. Una vez colocada todas las muestras y puesto el gel dentro de la cámara, se corrió la electroforesis

durante 1 hora 10 minutos a 80 voltios mediante el uso de una fuente de poder PowerPac 3000 de marca BIORAD. Una vez concluida la etapa se expuso el gel en un transiluminador de luz UV de marca Spectroline a 312 nm y se realizó un diagnóstico.

Resultados y Discusión

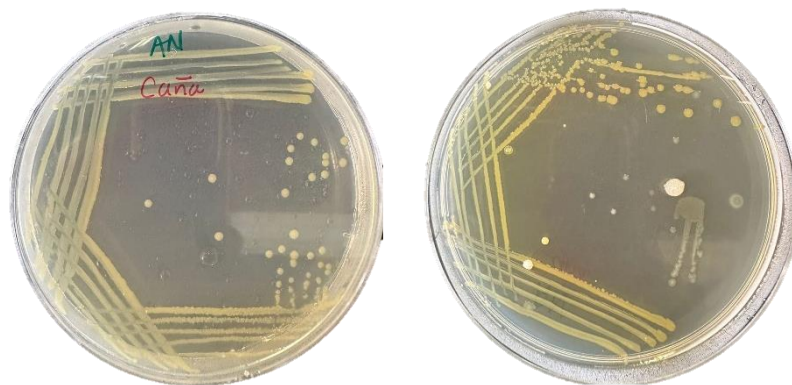
Aislamiento de la Bacteria

En las Figuras 5 y 6 se observan las dos variedades (LAICA 00-301 y B 69-566), las dos muestras cultivadas produjeron colonias convexas de color amarillo de aspecto mucoso en el medio de cultivo agar nutritivo. Según Li M et al. (2022), las colonias para identificación de *X. albilineans* son de color amarillento claro, son superficies lisas y brillantes.

Siendo similar a lo reportado por Díaz et al. (2013) quién también encontró los mismos resultados con la diferencia de que en su estudio se realizó en medio YDC. De la misma forma, las bacterias presentaron morfologías bacilares y reacción negativa a la tinción de Gram, por lo tanto, coloración rojiza (Figura 7). Las bacterias que retienen el cristal violeta y que tiñen de color azul son definidas como Gram positivas, y las que no lo retienen son denominadas Gram negativas (Jiménez Tobón y Vélez Hoyos 2012). Las bacterias Gram negativas presentan una capa más delgada de peptidoglucanos, además de una bicapa de lipoproteínas que puede ser descompuesta durante el proceso de decoloración (Rodríguez y Arenas 2018).

Figura 5

Colonia de bacterias Xanthomonas albilineans aislada de la variedad B 69-566 de caña de azúcar en medio de cultivo Agar Nutritivo en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.



Nota. Colonias convexas de color amarillo en agar nutritivo

Figura 6

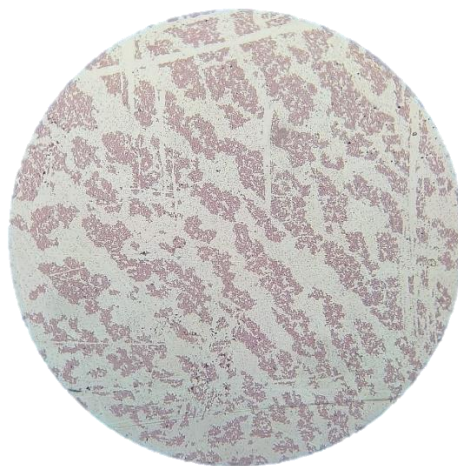
Colonia de bacterias Xanthomonas albilineans aislada de la variedad LAICA 00-301 de caña de azúcar en medio de cultivo Agar Nutritivo en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.



Nota. Colonias convexas de color amarillo en agar nutritivo

Figura 7

Vista al microscopio en lente de 40X del resultado de tinción de Gram aplicada a la bacteria Xanthomonas albilineans aislada en medio Agar Nutritivo en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.



Nota. Bacteria Gram negativa y con forma bacilar.

Extracción de ADN Bacteriano para Control Positivo

Después del uso del DNeasy Blood & Tissue Kit, obtuvimos 8 tubos Eppendorf con ADN, teniendo 4 tubos por cada variedad (LAICA 00-301 y B 69-566) con sus respectivas concentraciones (Cuadro 5).

Se presenta el resultado de la prueba PCR a las cuales fueron sometidas las 8 muestras en el cual se observan bandas amplificadas en 360 pb para las muestras L1, L2, L3, L4 y B3 por lo que se obtuvieron resultados repetibles al protocolo publicado por Pan et al. (1997) (Figura 8).

De acuerdo a Ordoñez (2016) los resultados se expresan cualitativamente en función de la presencia o ausencia de los patógenos en las muestras evaluadas. En el caso de un diagnóstico positivo, resulta la amplificación de los fragmentos/bandas 360 pb. Caso contrario corresponde a un diagnóstico negativo para la presencia del patógeno LSD.

Figura 8

Visualización de las bandas en gel de agarosa al 1% correspondientes a control positivo de dos variedades de caña de azúcar (LAICA 00-301 Y B69-566) en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.



Nota: Muestra L1, L2, L3, L4 pertenecen a la variedad LAICA 00-301 y muestras B1, B2, B3, B4 pertenecen a la variedad B 69-566, muestras positivas L4 y B3. Peso de la banda 2 μ L de tinte de carga y 4 μ L de producto de PCR.

Cuantificación de ADN de las Muestras de Caña de Azúcar

Una vez terminada la extracción de ADN de las 54 muestras para la identificación de la bacteria *Xanthomonas albilineans* se obtuvo la concentración y calidad de ADN de las variedades de caña de azúcar. En el Cuadro 5 se observa la razón de pureza de ADN (260/280) de ADN, que varió entre 1.23 a 2.54, un 57% de las muestras evaluadas se encuentran dentro del rango aceptable, ya que de acuerdo con el estudio realizado por Almendárez (2022) la relación A260/280 es considerada muy estable y de pureza óptima para un ADN con valores entre 1.8-2.0. Valores inferiores a este indican contaminación por proteínas. Por otro lado, la cuantificación de ADN donde se obtuvo un alta de concentración en ng/ μ L. El 44% de las muestras mostraron concentraciones mayores a 1000 ng/ μ L y el 56 % restante inferiores a esta cantidad.

Cuadro 5

Cuantificación y calidad de ADN de 54 muestras de caña de azúcar del banco de germoplasma de la azucarera Tres Valles obtenidas mediante el uso de un espectrofotómetro en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.

Variedad	ng/ μ L	260/280	Variedad	ng/ μ L	260/280
B 69-566	1088.01	1.86	LAICA 00-309	1074.55	1.95
BJ 7938	992.5	1.96	LAICA 01-604	1118.26	1.68
BR 000-10	1425.2	1.83	LAICA 03-805	1230.57	1.68
CC 8325	475.63	1.87	LAICA 04-809	1335.73	1.88
CG 00-102	1028.31	1.79	LAICA 05-802	2307.78	1.61
CG 02-163	452.63	1.86	LAICA 05-805	529.26	1.74
CP 02-2113	499.39	1.9	LAICA 0720	963.99	1.85
CP 05-1791	818.21	1.98	LAICA 0726	482.06	1.87
CP 07-1210	428.44	1.86	LAICA 07-801	448.23	1.77
CP 08-2042	1451.72	1.72	LAICA 08-390	1045.66	1.95
CP 09-1823	479.53	1.59	LAICA 09-370	1676	1.73
CP 09-2498	368.42	1.71	LAICA 10-207	1022.12	1.93
CP 11-2216	1970.22	1.59	LAICA 12-340	462.49	1.7
CP 72-1210	804.78	1.87	LAICA 1259	1452.25	1.7
CP 72-2086	1344.7	1.62	LAICA 1649	976.83	1.88
CP 73-1547	745.82	1.7	LCP 85-384	1806.38	1.69
CP80-1743	1230.39	1.73	MEX 69-290	470.71	1.96
CP 81-2143	432.18	1.8	MEX 79-431	500.21	1.23
CP 84-1198	999.92	1.82	RB 72-454	511.35	1.8
CP89-2143	418.36	1.81	RB 83-594	1187.44	1.81
CP 96-1252	489.82	1.79	RB 85-5035	1312.82	1.94
CPCL 05-1201	471.66	1.78	RB 86-7515	362.32	1.8
CPCL 92-2730	354.15	1.8	RB 92-579	1055.4	1.91

Variedad	ng/ μ L	260/280	Variedad	ng/ μ L	260/280
HOCP 91552	179.03	2.54	SP 79-1011	1076.44	1.77
LAICA 05-109	1057.2	1.78	SP 81-1842	1723.2	1.79
ITV 92-1424	523.8	1.81	SP 81-2068	1109.03	1.99
LAICA 00-301	1022.7	1.86	SP 81-3250	866.04	1.93

Ensayos para Estandarización de PCR Especifico para LSD

En el Cuadro 6 se observa las posibles combinaciones para el perfil térmico, para la temperatura de anillamiento se observó mejor nitidez en las bandas con la temperatura de 57.5 °C, la cual es el promedio de las requeridas para los iniciadores L1 a 52.1 °C y Ala4 a 56.8 °C. Para el ensayo 1 y 3 se obtuvieron bandas con menor intensidad precedente al grado de ser casi imperceptibles.

En su experimento Espinosa (2007) afirma que si los resultados del PCR no son los deseados utilizando las temperaturas estándar, se pueden realizar ajustes en la temperatura de alineamiento. En el caso de una temperatura de anillamiento demasiado baja, la especificidad del PCR será menor, mientras que una temperatura demasiado alta aumentará la especificidad, aunque valores extremadamente altos impedirán la amplificación, debido a la falta de estabilidad en la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios, lo que impedirá que la polimerasa inicie la síntesis.

Cuadro 6

Perfiles térmicos probados en el proceso de estandarización de reacción en cadena a la polimerasa para el diagnóstico de Xanthomonas albilineans en dos variedades de caña de azúcar (LAICA 00-301 Y B69-566).

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C x 300 seg.	94 °C x 300 seg.	94 °C x 300 seg.	1
Desnaturalización	94 °C x 30 seg.	94 °C x 30 seg.	94 °C x 30 seg.	
Hibridación	57 °C x 40 seg.	57.5 °C x 40 seg.	57.7 °C x 40 seg.	35
Extensión	72 °C x 40 seg.	72°C x 40 seg.	72°C x 40 seg.	
Extensión Final	72°C x 300 seg.	72°C x 300 seg.	72°C x 300 seg.	1

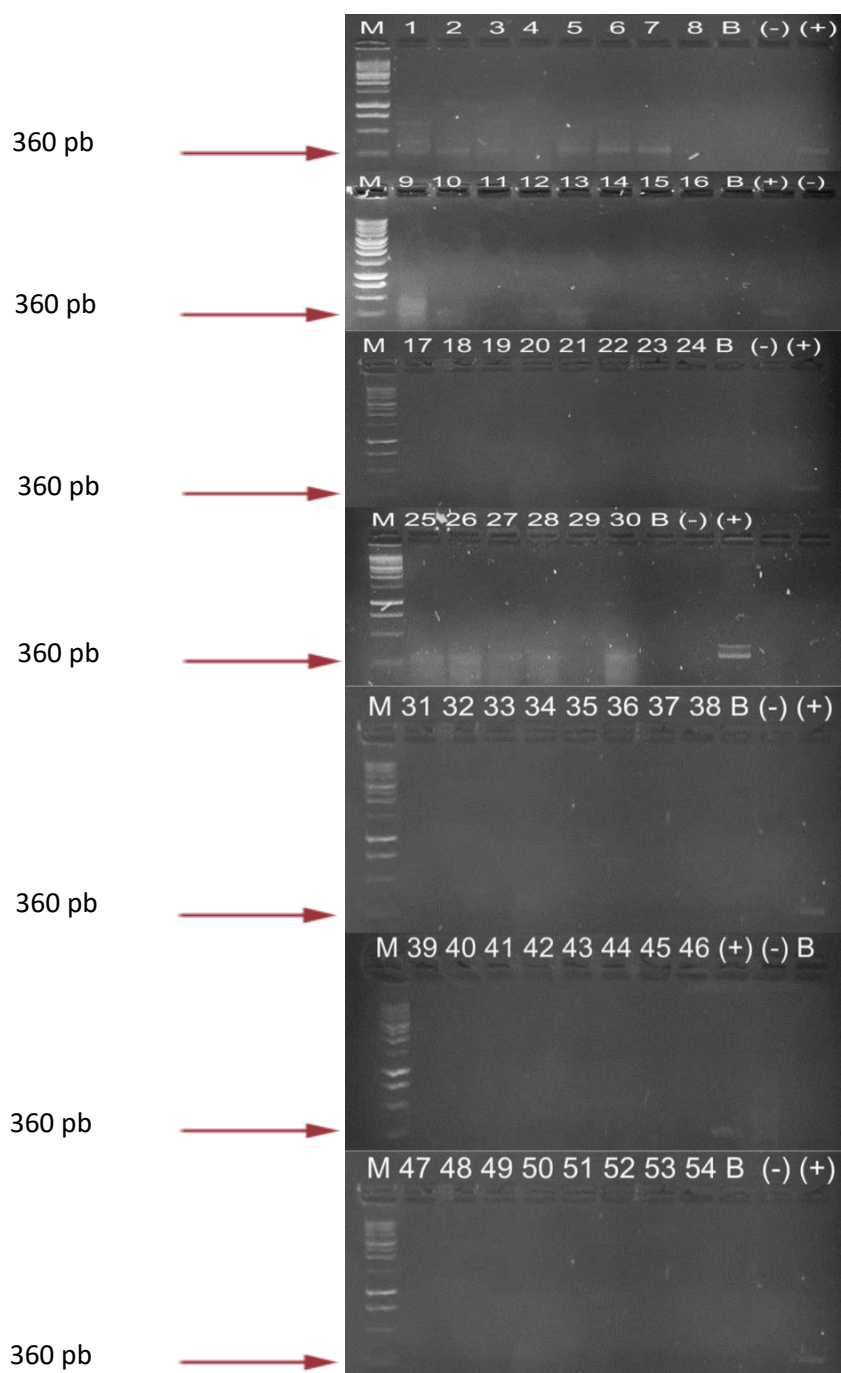
PCR de todas Muestras de Caña de Azúcar

La interpretación de resultados fue hecha una vez corridas las muestras en una electroforesis. Se hicieron un total de 8 de electroforesis de 54 muestras. Los últimos tres carriles del gel de agarosa reflejan una muestra en blanco, control positivo y negativo ya que según Acevedo et al. (2009) el control positivo es quien garantiza la interpretación de los ensayos. Por otro lado Megía (2022) afirma que un control negativo es una muestra que al igual que las demás posee todos los reactivos utilizados en la PCR con la única diferencia que no contiene ADN y este tiene la función de indicar si alguno de los reactivos está contaminado.

La prueba resultó positiva a *Xanthomonas albilineans* para 17 variedades lo que representa un 31% de las variedades de caña de azúcar evaluadas, indeseable a debido a que es el agente causal de la enfermedad de LSD (Cuadro 7).

Figura 9

Amplificación de bandas en gel de agarosa al 1% a una temperatura de 57.5 °C en la etapa de hibridación de 54 muestras de caña de azúcar para la detección de Xanthomonas albilineans en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.



Nota. Primer carril con marcador molecular (1kb), carril 2-9 muestras de caña de azúcar, carril 10-12 muestra en blanco, control negativo y positivo. Marcador molecular(M), Control positivo (+), Control negativo (-). Peso de la banda 2 µl de tinte de carga y 4 µl producto de PCR.

Cuadro 7

*Número de muestra y variedades que dieron positivo a la presencia de *Xanthomonas albilineans* de las 54 muestras de caña de azúcar evaluadas mediante PCR en el laboratorio de Fitopatología de Zamorano, Honduras.*

N° Muestra	Variedad
1	B69-566
3	BR000-10
4	CC8325
5	CG00-102
16	CP73-1547
17	CP80-1743
18	CP81-2143
19	CP84-1198
20	CP96-1252
46	RB72-454
47	RB83-594
48	RB85-5035
49	RB86-7515
50	RB92-579
51	SP79-1011
52	SP81-1842
54	SP81-3250

Nota. Número de muestra y su variedad que resultaron positivas a la prueba PCR para la detección de *Xanthomonas albilineans*.

Conclusiones

Se estandarizó un protocolo de PCR para la identificación de *Xanthomonas albilineans* en caña de azúcar obteniendo resultados confiables ya que se obtuvo la amplificación a 360 pb en 17 de las 54 variedades evaluadas.

Recomendaciones

Se recomienda evaluar diferentes concentraciones de ADN para mejorar visualización de bandas en gel de agarosa.

Evaluar el uso de distintas concentraciones de iniciadores y demás reactivos de la PCR para mejorar nitidez de bandas en gel de agarosa.

Referencias

- Acevedo AM, Santan E, Díaz de Arce H, Pérez LJ, Caballero A, Suárez L, Sánchez O. 2009. Desarrollo de controles positivos para métodos moleculares de detección de virus de influenza aviar. *Salud Anim*; [consultado el 6 de jun. de 2023]. 31(1):50–54. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v31n1/rsa10109.pdf>.
- Agricultura Nayarit. 2018. La caña de azúcar y su importancia para la industria azucarera. México: [sin editorial]; [actualizado el 26 de ene. de 2023; consultado el 26 de ene. de 2023]. <https://www.gob.mx/agricultura/nayarit/articulos/la-cana-de-azucar-y-su-importancia-para-la-industria-azucarera?idiom=es>.
- Almendárez S. 2022. Identificación de los principios géneros fúngicos de la microbiota intestinal y su relación con el modo de Alimentación en Lactantes Sanos. [Tesis]. México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí; [consultado el 12 de jul. de 2023]. <http://ninive.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/7926/TesisM.FCQ.2022.Identificaci%3fb3n.Almend%3a1rez.PDF%28Versi%3cb3n%20P%3%bablica%29.PDF?sequence=1&isAllowed=y>.
- Cenicana. 2020. Servicio de diagnóstico de enfermedades. Colombia: [sin editorial]. <https://www.cenicana.org/servicio-de-diagnostico-de-enfermedades-2/>.
- Cervantes B, Pérez-Rodríguez P, Rott P, Valdez-Balero A, Osnaya-González M, Robledo-Paz A, Hernández-Juárez C, Crossa J, Rosas-Saito GH, Silva-Rojas HV. 2021. Distribution, phylogeny, and pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald in Mexico. *Crop Protection*; [consultado el 14 de jul. de 2023]. 150(105799).
- Coico R. 2005. Gram staining. *Curr Protoc Microbiol*. Appendix 3:Appendix 3C. eng. doi:10.1002/9780471729259.mca03cs00.
- Cruz SJ. 2022. Identificación de la presencia del gen Bru1 en variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) [Tesis]. Francisco Morazán: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 34 p. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstreams/d143f09c-e1bc-439f-926f-aa07bad8864e/download>.
- Díaz C, Garrote H, Vigil A. 2013. Ribonucleic acid quantification for the performance of RT-PCR technique. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 29(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-02892013000300010&script=sci_arttext&tlng=pt.
- Espinosa L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 4 de jul. de 2016; consultado el 7 de jun. de 2023]. <https://hopelchen.tecnm.mx/principal/syllabus/fpdb/recursos/r119344.PDF>.
- Fundación Hondureña de Responsabilidad Social Empresarial (FUNDAHRSE). 2022. La caña de azúcar es proclamada como el cultivo más importante según la Unesco. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 26 de ene. de 2023; consultado el 26 de ene. de 2023]. <https://fundahrse.org/la-cana-de-azucar-es-proclamada-como-el-cultivo-mas-importante-segun-la-unesco/>.
- Gutiérrez AF, Garces FF, Hoy JW. 2014. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. *Plant Disease*. 98(1):121–126. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS-04-13-0431-RE>.

- Jiménez O, Contreras N. 2009. Respuesta de 11 variedades de caña de azúcar a la escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson) y evaluación de dos métodos de inoculación. *Bioagro*; [consultado el 3 de feb. de 2009]. 21(2). https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612009000200009.
- Jiménez Tobón GA, Vélez Hoyos A. 2012. Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. *Medicina & Laboratorio*. 18:557–573. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?idarticulo=93646>.
- Li M, Bao Y, Li Y, Akbar S, Wu G, Du JinXia, Wen R, Chen B, Zhang M. 2022. Comparative genome analysis unravels pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald disease. [sin lugar]: BioMed Central; [actualizado el 14 de jul. de 2023; consultado el 14 de jul. de 2023]. En. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12864-022-08900-2>.
- López J, Valdez A, Silva H, Flores C, Rangel C. 2016. Vista de evaluación a la escaldadura (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson) de la hoja de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agro Productividad*; [consultado el 10 de feb. de 2023]. 9(3). <https://mail.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/734/601>.
- Megía R. 2022. Electroforesis: ¿Qué es y para qué sirve? España: [sin editorial]. *Genotipia*. <https://genotipia.com/electroforesis/>.
- Olalla L. 2008. La Caña de azúcar: un viaje, una historia, un recuerdo. *Péndulo: Revista de Ingeniería y Humanidades*; [consultado el 26 de ene. de 2023]. (19):77–93. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6162023>.
- Ordoñez M. 2016. PCR doble para el diagnóstico simultáneo de RSD y LSD. [sin lugar]: [sin editorial].
- Pan Y, Grisham M, Burner D. 1997. A Polymerase Chain Reaction Protocol for the Detection of *Xanthomonas albilineans*, the Causal Agent of Sugarcane Leaf Scald Disease. *Plant Disease*. 81:123–232. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.189>.
- Ramírez J, Chavez L, Santillán Torrez J, Guzmán León S. 2014. Microarreglos de DNA: fabricación y proceso de análisis. *ResearchGate*. 9–256. https://www.researchgate.net/publication/296695965_Microarreglos_de_DNA_Fabricacion_Proceso_y_Analisis.
- Rodríguez PA, Arenas R. 2018. Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 16(2):166–168. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.
- Rodríguez I, Barrera H. 2004. La reacción en cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 6(3):323–335. https://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf.
- Salcedo J, Chávez L, Santillán J, Guzmán S. 2014. Microarreglos de DNA: Fabricación Proceso y Análisis. En: Cornejo Romero A, Serrato Díaz A, Rendón Aguilar B, Rocha Munive MG, editores. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 1ª ed. [sin lugar]: INECC. p. 203–229. https://www.researchgate.net/profile/jorge-ramirez-salcedo/publication/296695965_microarreglos_de_dna_fabricacion_proceso_y_analisis.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2.

- Yábar C. 2003. Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y ADN. 1ª ed. Lima-Perú: [sin editorial] (Serie de Normas Técnicas). ISBN: 9972 - 857 - 38 - 7.
- Yara. 2023. Principios agronómicos en caña de azúcar | Yara Colombia. Colombia: [sin editorial]; [actualizado el 7 de feb. de 2018; consultado el 26 de ene. de 2023]. <https://www.yara.com.co/nutricion-vegetal/cana-de-azucar/pricipios-agronicos-en-cana-de-azucar/>.

Anexos

Anexos A

Protocolo de extracción de ADN

Se mezcló la totalidad del buffer de extracción con el β -Mercaptoetanol y con SDS al 20%, esto se preparó a partir del número de muestras de cada extracción. Por cada muestra se añadió 800 μ L de buffer de extracción, 2.5 μ L de β -Mercaptoetanol y 50 μ L de SDS al 20%. En un tubo Eppendorf™ para centrifuga de 1.5 mL se agregó 300 gramos de muestra macerada, a esta se le añadió los 852.5 μ L de la solución realizada, se agitó durante 20 segundos en el vórtex y se incubó en baño maría a 65°C durante 30 minutos mezclando cada 10 minutos. Posteriormente se añadieron 250 μ L de acetato de potasio 5M y se volvió a agitar en el vórtex por 20 segundos; luego se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm a una temperatura de 4°C.

Se transfirió un total de 700 μ L del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf™ de 1.5mL. se realizó una limpieza añadiendo 700 μ L de Cloroformo: Alcohol:Isoamyl (24:1) y se mezcló en el vórtex por 10 segundos y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. Se tomó un volumen de 600 μ L del sobrenadante y se volvió a colocar en un nuevo tubo Eppendorf™ de 1.5mL. A los 600 μ L de sobrenadante extraído se le adicionan un volumen de 600 μ L de isopropanol frío, se mezcló con la mano suavemente y se almaceno a -20°C durante 2 horas; una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C; luego se eliminó el sobrenadante. Se limpió el pellet con 500 μ L de etanol frío al 70%, se agitó en el vórtex para soltar el pellet de las paredes del tubo, centrifugar durante 5 minutos a 7000 rpm y 4°C, descartar el sobrenadante y realizar una centrifuga spin a 12000 rpm durante 1 minuto a 4°C. El tubo se deja invertido durante 30 minutos para eliminar el exceso de etanol y se procede a re-suspender con 100 μ L de agua libre de RNasa.