

ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO EN CEPAS DE *colletotrichum gloeosporioides* AISLADOS EN PLANTAS DE MANGO (*Mangifera Indica L.*)

STANDARDIZATION PROTOCOLS FOR EXTRACTING CHROMOSOMAL DNA OF *colletotrichum gloeosporioides* STRAINS ISOLATED IN MANGO PLANTS (*Mangifera indica L.*)

Luis Alberto Valdés¹, Adys Gómez², María Elena Carballo³, Maricela Capote²,
Ingrid González² y Rohde W.⁴

¹Universidad Politécnica Salesiana, Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid. Quito, Ecuador.

²Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), Calle 7^{ma} número 5005 entre 30 y 32. Playa. La Habana, Cuba.

³Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 N°. 455 Vedado, Cuba

⁴Max Planck Institute for Plant Breeding Research (MPI). Carl-von-Linne-Weg 10, 50829 Köln, Alemania.

Autor para correspondencia: lvaldes@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 26 de enero de 2015. Aceptado, tras revisión, el 20 de noviembre de 2015.

Resumen

Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz & Sacc. es la especie responsable de la antracnosis en el mango; esta enfermedad afecta toda la parte aérea de la planta, produciendo pérdidas hasta de 12 % de la producción. La identificación y caracterización microbiana es importante para la toma de medidas de prevención y control del patógeno en plantaciones. Esta investigación tuvo como objetivo estandarizar protocolos de aislamiento de ADN genómico en cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., que garantice su calidad y concentración para futuros trabajos moleculares en diferentes representantes de esta especie fúngica. El aislamiento de ADN genómico se realizó por tres metodologías: CTAB Doyle y Doyle (1990); Kuramane-Izioka (1997), con modificaciones y CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) conjugadas con juegos de reactivos comerciales NucleoSpin. La calidad del ADN obtenido fue comprobada por absorbancia medida a 260 y 280nm. El primero de los métodos no resultó efectivo mientras que con los otros se obtuvo ADN genómico con la calidad y concentraciones adecuadas para investigaciones moleculares con la especie. Las modificaciones realizadas al método Kuramane-Izioka (1997), contribuyeron a la efectividad del mismo. El método CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) constituye el primer informe de su uso para representantes del reino Fungi.

Palabras clave: *Colletotrichum gloeosporioides*, ADN cromosómico, CTAB Doyle y Doyle; Kuramane-Izioka y CTAB California modificado por Ramirez *et al.*

Abstract

Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz & Sacc. is responsible for anthracnose in mango, a disease that affects all aerial parts of the plant, causing losses of up to 12% of production. Microbial identification and characterization is important for determining prevention and pathogen control measure in plantations. This research aimed to standardize protocols for isolation of genomic DNA in strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., to ensure quality and concentration for future molecular studies in different representatives of this fungal species. Isolation of genomic DNA was performed by three methods: CTAB Doyle y Doyle (1990); Kuramane-Izioka (1997) with modifications and CTAB California modified by Ramirez et al., (2004) combined with NucleoSpin commercial reagent kits. The quality of the DNA obtained was tested by absorbance measurement at 260 and 280nm. The first method was not effective while the other methods yielded were obtained with genomic DNA with the appropriate concentrations for molecular research on the species. Modifications to the Kuramane-Izioka (1997) method, contributed to its effectiveness. The California CTAB method modified by Ramirez et al. (2004) constitutes the first report of its use for representatives of the Fungi kingdom.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, DNA chromosomal, CTAB Doyle y Doyle; Kuramane-Izioka and CTAB California modified by Ramirez et al.

Forma sugerida de citar: Valdés, L., A. Gómez, M. Carballo, M. Capote, I. González y W. Rohde. 2015. **Estandarización de protocolos para la extracción de ADN cromosómico en cepas de *colletotrichum gloeosporioides* aislados en plantas de mango (*Mangifera Indica L.*)**. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 22(2): 40-49. ISSNp: 1390-3799, ISSNe: 1390-8596.

1. Introducción

Los hongos filamentosos del género *Colletotrichum* y su teleomorfo *Glomerella* son considerados los patógenos de plantas más ampliamente distribuidos a nivel mundial, causantes de la antracnosis. Esta enfermedad es común a numerosos cultivos económicos y plantas ornamentales, fundamentalmente en zonas húmedas y semihúmedas de la región comprendida entre los Trópicos (Araúz, 2000; Sangeetha y Rawal, 2008; Thaug, 2008).

La especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc. fase perfecta *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld & Schrenk es la responsable de la antracnosis en el mango. Esta enfermedad en las plantaciones se manifiesta por la caída de la inflorescencia y la afectación de los frutos, hojas y ramas jóvenes. También aparece como una enfermedad poscosecha de los frutos maduros durante el almacenamiento (Sangeetha y Rawal, 2008).

El control de las enfermedades producidas por las especies del género *Colletotrichum*, representa un reto para el agricultor, donde la estrategia de protección preventiva, conjugada con las atenciones agronómicas a las plantaciones, son elementos indispensables para la obtención de más productividad en las cosechas. Por tanto, se hace necesario integrar medidas de manejo con el uso de alternativas ecológicamente sustentables para todos en general (Prusky *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2005; Lemus, 2009).

La caracterización de la diversidad microbiana y su utilidad para el diagnóstico, prevención y control de la antracnosis, han sido de los temas más importantes a debatir en la interacción planta-patógeno. El desarrollo de sistemas basados en marcadores moleculares constituye un campo de particular interés, al considerar que los métodos tradicionales microbiológicos relacionados con los estudios de patogenicidad y de detección en huéspedes son lentos y costosos (Alvarez *et al.*, 2006; Whitelaw *et al.*, 2007).

Debido a las problemáticas presentes en las investigaciones para la caracterización microbiológica adecuada, este trabajo tuvo como objetivo estandarizar protocolos de aislamiento de ADN genómico que permitan la obtención de esta molécula con la calidad y concentración requeridas para la caracterización de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc.

2. Materiales y Métodos

Se emplearon 25 cepas de la especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., pertenecientes a la micoteca del grupo de Micología del Departamento de Fitopatología del Instituto en Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), La Habana, Cuba.

El crecimiento de los aislados en Agar Papa Dextrosa (PDA) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante siete días, constituyó la base para la recolecta de la masa micelial cada 24 horas. Este procedimiento se realizó por centrifugación a $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (Cerón *et al.*, 2007) y secado en estufa. Las muestras se conservaron en frío a -20°C para el proceso de extracción del ADN genómico. Se colectaron tres repeticiones por cepa.

El aislamiento de ADN genómico se realizó por tres siguientes metodologías. La primera fue el método CTAB (hexadeciltrimetilamonio) Doyle y Doyle (1990); la segunda la propuesta por Kuramane-Izioka (1997) con las siguientes modificaciones: buffer de extracción sin adición de proteinasa K, la adición de PVP (Polivinilpirrolidona) al buffer, la incubación con isopropanol durante 24 horas a -20°C después del empleo de la mezcla de cloroformo isoamilalcohol (24:1) y el pellet resuspendido en buffer TE 1x y RNAsa ($200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Incubación a 37°C durante una hora. Conservación del ADN extraído a -20°C . La tercera de las metodologías fue CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004).

Para la purificación se emplearon juegos de reactivos comerciales NucleoSpin (Macherey-Nagel, 2002) donde se mezclaron $50\ \mu\text{L}$ de ADN crudo con $300\ \mu\text{L}$ de Binding Buffer (NT) y se pasó por columnas de purificación. Se centrifugó a $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ durante 2 min. Se lavó con $300\ \mu\text{L}$ Wash buffer (NT3) y se centrifugó a $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ durante 2 min, lavado que se repitió dos veces. Se secaron las columnas en papel de filtro durante 15-20 minutos para eliminar cualquier resto de alcohol que pudo quedar en el interior. Se diluyeron en $30\ \mu\text{L}$ Elution Buffer (NE), previamente calentado a 60°C y se centrifugó a $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ durante 1 min. Este paso se repitió tres veces hasta obtener un volumen final de $90\ \mu\text{L}$.

La calidad del ADN obtenido se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con bromuro de etidio, marcador de peso molecular GIBCO-BRL (1 Kb) y transiluminador ultravioleta. Las concentraciones C(ADN) se determinaron a partir de lec-

turas de absorbancia a 260 y 280 nm, mediante la fórmula:

$$C(ADN) = A \times 50 \times F.D$$

Donde la $C(ADN)$: Concentración de ADN; A : Lectura de absorbancia medida en espectrofotómetro y $F.D$: Factor de dilución (Ausubel *et al.*, 2005).

3. Resultados y Discusión

3.1 CTAB de Doyle y Doyle (1990)

En la Figura 1 se muestran los resultados del aislamiento de ADN de las 25 cepas donde se pudo apreciar que no resultó efectivo, ya que en ninguna de las muestras evaluadas se detectó la presencia de ácido nucleico en el gel de agarosa al 0,7 %. Estos

resultados no se corresponden con lo informado en la literatura, la que refiere el amplio uso de esta metodología en diferentes sistemas biológicos (Brusés *et al.*, 2012; Ausubel *et al.*, 2005; Rodríguez, 2010).

La ineffectividad de este método, puede estar dada por varios factores: la digestión no exitosa de la pared celular y membranas celulares de las hifas; la formación de complejos insolubles entre componentes estructurales y metabolitos celulares con los ácidos nucleicos a consecuencia de la lisis por maceración en frío, durante el proceso de aislamiento; la poca conjugación y/o interacción entre la estructura química de las células fúngicas y las sustancias que conforman el buffer de extracción (CTAB, PVP, β -mercaptoetanol, etc.) y concentración de los compuestos químicos activos dentro del buffer de extracción y su ineffectividad en las funciones que realizan (Suenaga, 2005).

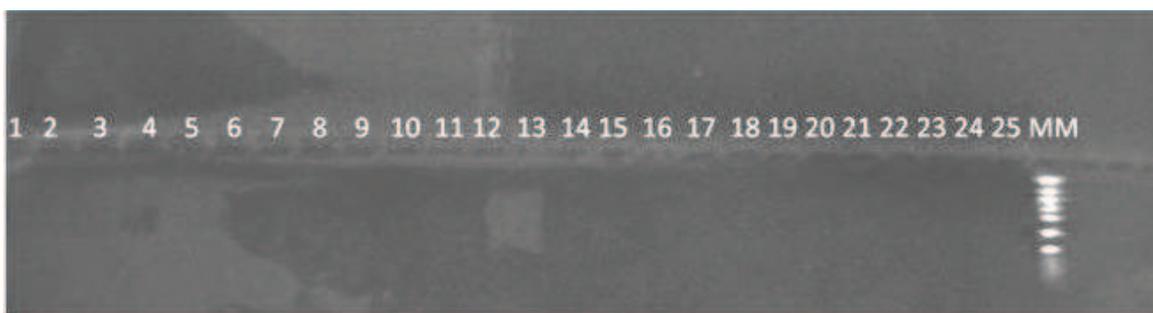


Figura 1. Imagen del gel de electroforesis de las muestras de ADN de los aislados fúngicos extraído por el método CTAB de Doyle y Doyle (1990). (MM= marcador de peso molecular 1Kb GIBCO-BRL).

Vale destacar que la ineffectividad de este método, por la incidencia de los factores anteriormente planteados, puede estar fundamentada, entre otras causas, en la composición química de la pared celular de los miembros de este género. Esta estructura está formada por capas o estratos, constituido por diferentes polímeros de polisacáridos fibrilares, como la quitina (polímetro β -1,4 de N-acetilglucosamina), la celulosa (polímetro β -1,4 de glucosa), glucanos (polímetro β -1,6 ramificados de glucosa) y mananos (polímetro β -1,6 ramificados de manosa) además, de proteínas asociadas a los poli-

sacáridos y lípidos (Prusky *et al.*, 2001; Wharton y Diéguez, 2004; Peres *et al.*, 2005), componentes que pudieran limitar diferentes etapas del método.

3.2 Kuramane-Izioka (1997) modificado

Los resultados obtenidos por este método se muestran en la Figura 2, donde se aprecian bandas fluorescentes correspondientes al ADN genómico de los aislados con una talla molecular en correspondencia con el marcador molecular.

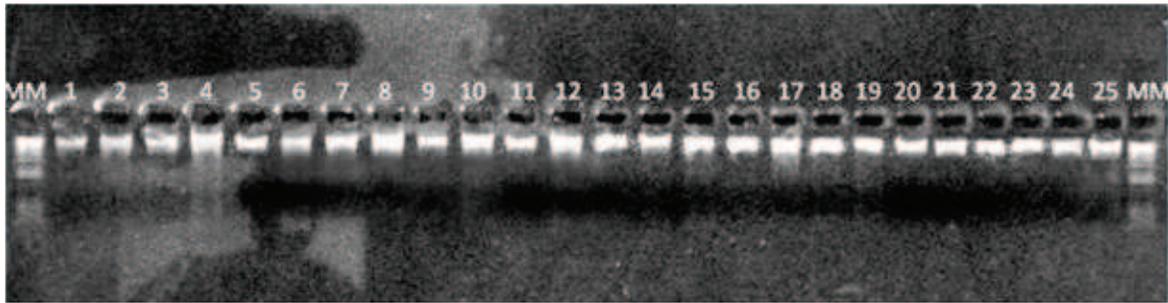


Figura 2. Imagen del gel de electroforesis de las muestras de ADN de los aislados fúngicos extraído por el método Kuramane-Izioka (1997) modificado en combinación con el juego de reactivos NucleoSpin. MM= marcador de peso molecular 1Kb GIBCO-BRL).

La acción de los componentes del tampón de extracción tributó favorablemente a los resultados. El uso de PVP (Polivinilpirrolidona) en el buffer pudo prevenir la actividad de polifenoloxidasas presentes en algunos tejidos de los organismos (Rogers y Bendich, 1988; Ramirez *et al.*, 2004). Esto se sustenta en la no detección de cambio de coloración en el sobrenadante que contenía el ADN por la acción de estas enzimas.

Otra de las modificaciones aportadas en esta investigación fue la incubación a bajas temperaturas (-20°C) con isopropanol, por 12 h. Estas condiciones pudieron posibilitar la separación de las moléculas proteicas, lo que permite la obtención de un pellet más libre de impurezas. Además, el uso de RNasa permite sugerir su contribución en la degradación de ARN, molécula frecuentemente contaminante del ADN. De esta manera no resultó necesario

la adición de proteinasa K (Weir *et al.*, 1996; Suárez, 2005; Campa *et al.*, 2010).

3.3 CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004)

Los resultados que se muestran en la Figura 3 permitieron detectar bandas fluorescentes de ADN, correspondientes a las muestras de los 25 aislados fúngicos, con una talla molecular superior a 12 (216 pb). A partir de estos resultados fue posible corroborar la efectividad de este método en comparación con el método Kuramane-Izioka (1997) modificado. Consecuentemente, se sustenta la aplicación del método CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) para la extracción del ADN genómico en especies de hongos, lo que anteriormente no ha sido informado en la literatura especializada.



Figura 3. Imagen del gel de electroforesis de las muestras de ADN de los aislados fúngicos extraído por el método CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) en combinación con el juego de reactivos NucleoSpin. MM= marcador de peso molecular 1kb GIBCO-BRL).

A la eficiencia tributó la composición del tampón de extracción, rico en compuestos como: el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); el ácido dietilditiocarbámico (DIECA), ascorbato de sodio y bisulfito de sodio, que reaccionan con los polifenoles, oxidándolos y formando un precipitado que por centrifugación puede eliminarse del sobrenadante. Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, por lo que son muy reactivos (Rogstad *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2002; Gutiérrez, 2002).

La eficiencia de la extracción del ADN por el método CTAB California ha sido confirmada en el reino *Plantae*, en el aislamiento de ADN de calidad a partir del aguacatero y del guayabo, con las aplicaciones de las modificaciones realizadas por Ramirez *et al.* (2004). Este mismo año fue empleado en muestras de diferentes miembros del género *Pouteria* (Carrara *et al.*, 2004).

Los resultados positivos del aislamiento del ADN genómico de cepas fúngicas de la especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., presentados en este trabajo pueden ser atribuidos a los componentes del tampón de extracción, tales como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); el ácido dietilditiocarbámico (DIECA), el ascorbato de sodio, así como el bisulfito de sodio. Estos compuestos provocan la oxidación de los polifenoles y la formación de un precipitado, que puede ser eliminado por centrifugación. Los grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas que contienen el conjunto heterogéneo de moléculas que conforman los polifenoles, son los que permiten la interacción de estos con los componentes del tampón (Rogstad *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2002; Gutiérrez, 2002).

En adición a lo anterior, es importante considerar que la acción del CTAB como detergente propicia la destrucción de las membranas celulares, durante la maceración del material. Además, se enlaza fuertemente al ADN y lo protege de la degradación. Otras funciones del CTAB están relacionadas con el desplazamiento de proteínas y la solubilización de polisacáridos (Csai *et al.*, 1998; Huescas, 2004).

Otro componente del tampón de extracción es el compuesto Polivinilpirrolidona (PVP) que formar complejos con los polifenoles, a través de enlaces por puente de hidrógeno. Estos complejos son separados del ADN por centrifugación en presencia

de cloroformo, lo que permite la obtención de un producto final con menos impurezas (Porebski *et al.*, 1997; Xiang *et al.*, 2002). Las potencialidades de la combinación de CTAB y PVP como agentes antioxidante para la eliminación de compuestos fenólicos y polisacáridos, ha sido fundamentada en trabajos previos (Weir *et al.*, 1996; Gutiérrez, 2002).

En el análisis de la efectividad del CTAB y del PVP en la eliminación de polisacáridos celulares, es válido considerar que son los contaminantes mayoritarios del proceso de aislamiento y purificación del ADN (Huescas, 2004), por constituir componentes de pared celular de los hongos. Esta estructura puede estar conformada por quitina, celulosa, glucanos y mananos, lo que indica la variedad de polisacáridos en su composición. La separación de estos contaminantes de la muestra de ADN, es también favorecida por los lavados con cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y por las altas concentraciones de sales (NaCl) presentes en el tampón de extracción (Sharma *et al.*, 2000; Drábková *et al.*, 2002).

3.3.1 Calidad del ADN extraído

La Tabla 1 muestra la relación entre la absorbancia 260/280 nm para los métodos de extracción de ADN genómico de las cepas fúngicas, que resultaron efectivos. La selección del tiempo para colectar la biomasa se basó en insuficiente crecimiento micelial antes de los tres días de incubación.

Los valores extremos de la relación entre la absorbancia con el método California modificado por Ramírez *et al.*, (valor máximo: 1.9198 y valor mínimo: 1.6016), así como con el método Kuramane-Izioka (1997) modificado (valor máximo: 1.8947 y valor mínimo: 1.6510) fueron obtenidos al tercer día en aislados diferentes. No existieron diferencias significativas entre estos valores en ambos métodos conociendo que para el estudio siempre se contó con la misma biomasa desde el tercero hasta el séptimo día de trabajo, lo que puede ser explicado por las características de la biomasa que una vez alcanzada el estadio fisiológico de máxima síntesis de ADN, este se mantuvo constante a partir de los tres días durante el tiempo de incubación y de muestreo (7 días).

La relación de absorbancia, 260/280 nm establece una medida cualitativa de la pureza del ADN, cuando los valores están entre 1.6 y 2.0. Una relación menor indica contaminación con proteínas o fenoles y valores superiores a 2.0 significa que hay ARN

disperso (Doulis *et al.*, 2000; Brusés *et al.*, 2012). Al tener en cuenta que los valores mínimos y máximos de absorbancia, detectados en las muestras de ADN de los aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*, se encuentran en este rango es posible inferir la cali-

dad del ADN extraído por los métodos Kuramane-Izioka (1997) modificado y CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004). De esto se deduce que ambos métodos son confiables y efectivos en diferentes cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tabla 1. Relación de las absorbancias a 260 y 280nm de las muestras de ADN extraídas por el método de CTAB California modificado por Ramirez *et al.* (2004) y Kuramane-Izioka (1997) modificado.

Aislados	Tiempo de colecta de la biomasa (días)									
	CTAB California					Kuramane-Izioka				
	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7
LA 1	1.7744	1.7480	1.6720	1.7518	1.7448	1.8210	1.7832	1.8212	1.7518	1.7448
LA 2	1.9198	1.7810	1.7370	1.6880	1.6781	1.7900	1.7562	1.7215	1.6880	1.6781
LA 3	1.6821	1.7830	1.8210	1.7712	1.7183	1.6510	1.7745	1.7453	1.7712	1.7183
LA 4	1.7563	1.7680	1.7470	1.6660	1.8680	1.7610	1.8333	1.8236	1.6660	1.8680
LA 5	1.7518	1.8800	1.6932	1.6754	1.8238	1.7245	1.8235	1.8129	1.6754	1.8238
LA 6	1.6016	1.7580	1.7071	1.8021	1.7258	1.7777	1.8123	1.8745	1.8021	1.7258
LA 7	1.7875	1.8160	1.6977	1.7929	1.8116	1.8111	1.8003	1.8245	1.7929	1.8116
LA 8	1.7600	1.6880	1.7127	1.7591	1.6588	1.8456	1.8553	1.8001	1.7591	1.6588
LA 9	1.7739	1.8250	1.8005	1.7386	1.8025	1.7821	1.7893	1.8078	1.7386	1.8025
LA 10	1.7442	1.7780	1.8215	1.7553	1.7678	1.8561	1.7777	1.7856	1.7553	1.7678
LA 11	1.7621	1.7823	1.6988	1.8253	1.7812	1.7901	1.8343	1.8814	1.8253	1.7812
LA 12	1.7951	1.7832	1.7564	1.7680	1.7833	1.7864	1.8193	1.8675	1.7680	1.7833
LA 13	1.7392	1.7843	1.7712	1.7814	1.7844	1.6999	1.8813	1.8560	1.7814	1.7844
LA 14	1.7579	1.7756	1.7227	1.7923	1.7766	1.8451	1.8334	1.8234	1.7923	1.7766
LA 15	1.7600	1.6989	1.8102	1.7743	1.6919	1.8481	1.8457	1.7699	1.7743	1.6919
LA 16	1.7929	1.7882	1.8033	1.7766	1.7883	1.8135	1.8605	1.8281	1.7766	1.7883
LA 17	1.7591	1.7845	1.7740	1.6989	1.7346	1.8068	1.8564	1.8281	1.6989	1.7346
LA 18	1.7386	1.7825	1.7600	1.7882	1.7908	1.8947	1.8326	1.8453	1.7882	1.7908
LA 19	1.7553	1.7680	1.7770	1.7845	1.7568	1.7415	1.8490	1.8001	1.7845	1.7568
LA 20	1.7292	1.7830	1.7670	1.7825	1.7883	1.8208	1.8342	1.8417	1.7825	1.7883
LA 21	1.7832	1.7840	1.7670	1.7834	1.7864	1.8387	1.8407	1.8497	1.7834	1.7864
LA 22	1.7719	1.7680	1.7870	1.7854	1.7628	1.8117	1.8251	1.7807	1.7854	1.7628
LA 23	1.7930	1.7380	1.7270	1.6890	1.7368	1.8296	1.8495	1.8479	1.6890	1.7368
LA 24	1.7630	1.7865	1.7700	1.6989	1.7867	1.8403	1.8385	1.7956	1.6989	1.7867

3.3.2 Determinación de la concentración de ADN genómico

La Figura 4 muestra la media de las concentraciones calculadas para ambos métodos de extracción.

Desde el tercer día de incubación se contó con la cantidad suficiente de ADN para la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), la que requiere de concentraciones en el rango de los 20 a 25 ng.ml⁻¹ Esto coincide con investigaciones pre-

cedentes con *Colletotrichum* spp., aisladas de fresa (Denoyes-Rothan *et al.*, 2003), guanábana (Alvarez *et al.*, 2006) y mango (Gupta *et al.*, 2010).

Ausubel *et al.* (2005) refirió que la concentración de ADN en diferentes muestras puede variar de

acuerdo a tres factores fundamentales: pureza, características de la molécula (dimensión y/o espacialidad) y tipo de polimerasa a emplear en los procedimientos moleculares. Por lo que se hace necesario y aconsejable estandarizar la técnica siempre, que sea posible.

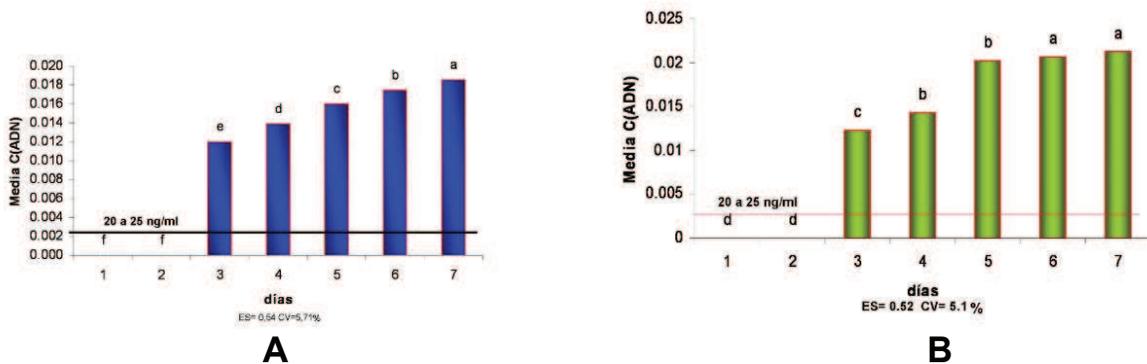


Figura 4. Medias de las concentraciones calculadas por la Ley de Beer, para ambos métodos (A- CTAB California y B- Kuramane-Izioka) (Letras indican diferencia significativa a $p \leq 0.01$).

4. Conclusiones

El método CTAB de Doyle y Doyle (1990) no fue efectivo para la extracción de ADN genómico en cepas del género *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, aisladas de mango por las características propias de las paredes celulares de los hongos filamentosos y la composición de la solución de extracción. Las modificaciones realizadas al método de extracción de ADN, Kuramane-Izioka (1997) y el método CTAB California, propuesto por Ramirez *et al.* (2004) constituyen herramientas confiables y eficientes en la obtención de material genético de la especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. con la calidad y concentración adecuada, por lo que pueden ser utilizados en la caracterización de esta especie fúngica.

Referencias

Alvarez, E., J. Mejía, G. Llano y J. Loke. 2006. **Characterization of colletotrichum gloeosporioides, causal agent of anthracnose in sour sop (annona muricata) in valle del cauca.** Poster: International Center for Tropical Agriculture (CIAT).

Araúz, L. 2000. **Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management.** Plant Diseases, 84(6): 600–611.

Ausubel, F., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith y K. Struhl (editores). 2005. **Current Protocols in Molecular Biology**, tomo 1-4. Greene & John Wiley, New York, E.E.U.U.

Brusés, B., H. Lucero, M. Aguirre y J. Gorodner. 2012. **Comparación de técnicas de extracción de dna para la detección de trypanosoma cruzi mediante la técnica de pcr.** URL <www.unne.edu.ar/cyt/2000/3_medicas/m_pdf/m_011.pdf>.

Campa, A., E. Pérez, C. Rodríguez, R. Giradles y J. Ferreira. 2010. **Disección genética de la resistencia a antracnosis en las variedades diferenciales de judía común tu y mdrk.** HortScience, 39(6): 1196–1207.

Carrara, S., R. Campbell y R. Schnell. 2004. **Genetic variation among cultivated selections of mamey sapote (pouteria spp. [sapotaceae]).** Proc. Fla. State Hort. Soc., 117: 195–200.

Cerón, L., B. Higuera, J. Sánchez, S. Bustamante y G. Buitrago. 2007. **Crecimiento y desarrollo de**

- colletotrichum gloeosporioides f. alatae durante su cultivo en medios líquidos.** Acta Biológica Colombiana, 11(1): 99–109.
- Csaikl, U., H. Bastian, R. Brettschneider, S. Gauch, A. Meir, M. Schauerte, F. Scholz, C. Sperisen, B. Vornam y B. Ziegenhagen. 1998. **Comparative analysis of different dna extraction protocols: A fast, universal maxi-preparation of high quality plant dna for genetic evaluation and phylogenetic studies.** Plant Molecular Biology Reporter, 16(1): 69–86, doi:10.1023/A:1007428009556, URL <http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1007428009556>.
- Denoyes-Rothan, B., G. Guérin, C. Délye, B. Smith, D. Minz, M. Maymon y S. Freeman. 2003. **Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of colletotrichum species from strawberry.** Phytopathology, 93(2): 219–228.
- Doulis, A., A. Harfouche y F. Aravanopoulos. 2000. **Rapid, high quality dna isolation from cypress (*Cupressus sempervirens* L.) needles and optimization of the rapid marker technique.** Plant Molecular Biology Reporter, 17: 1–14.
- Doyle, J. y J. Doyle. 1990. **Isolation of plant dna from fresh tissue.** Focus, 12(1): 13–15.
- Drábková, L., J. Kirschner y Ā. Vlĕk. 2002. **Comparison of seven dna extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of juncaceae.** Plant Molecular Biology Reporter, 20(2): 161–175, doi:10.1007/BF02799431, URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF02799431>.
- Gupta, V. K., A. Pandey, P. Kumar, B. K. Pandey, R. K. Gaur, V. Bajpai, N. Sharma y S. Sharma. 2010. **Genetic characterization of mango anthracnose pathogen colletotrichum gloeosporioides penz. by random amplified polymorphic dna analysis.** African Journal of Biotechnology, 9(26): 4009–4013, doi:10.5897/AJB2010.000-3278.
- Gutiérrez, A. 2002. **Vino, polifenoles y protección a la salud.** Revista Cubana Aliment Nutr, 16(2): 134–141.
- Huescas, M. 2004. **Comparación de diferentes técnicas de extracción de adn aplicadas a quercus eduardii trel.**
- Kuramane-Izioka, E. 1997. **A rapid, easy and high yield protocol for total genomic dna isolation from colletotrichum gloeosporioides and fusarium oxysporum for rapid.** UNIMAR, 19(3): 683–689.
- Lemus, Y. 2009. **Genética de la resistencia a las enfermedades en plantas hortícolas.** Temas de Ciencia y Tecnología, 13(39): 41–44.
- Macherey-Nagel. 2002. **NucleoSpin® Extract II Kits.** Clontech Laboratories Inc., Germany.
- Peres, N. A., L. W. Timmer, J. E. Adaskaveg y J. C. Correll. 2005. **Lifestyles of colletotrichum acutatum.** Plant Disease, 89(8): 784–796, doi:10.1094/PD-89-0784.
- Porebski, S., L. Bailey y B. Baum. 1997. **Modification of a ctab dna extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components.** Plant Molecular Biology Reporter, 15(1): 8–15, doi:10.1007/BF02772108.
- Prusky, D., J. McEvoy, B. Leverentz y W. Conway. 2001. **Local modulation of host ph by colletotrichum species as a mechanism to increase virulence.** Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(9): 1105–1113, doi:10.1094/MPMI.2001.14.9.1105.
- Ramirez, I., N. Rodríguez, J. Valdés-Infante, M. Capote, D. Becker y W. Rohde. 2004. **Isolation of genomic dnas from the tropical fruit trees avocado, coconut, guava and mango for pcr-based dna marker application.** Cultivos Tropicales, 25(1): 33–38.
- Rodríguez, G. 2010. **Técnicas de extracción y análisis de ácidos nucleicos de patógenos de plantas.** Manual de la asignatura optativa especializada. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Rogers, S. y A. Bendich. 1988. **Extraction of dna from plant tissues.** En: Gelvin, S. y R. Schilperoort (editores), **Plant Molecular Biology Manual**, tomo A6, pp. 1–10, Kluwer Academic, Boston.
- Rogstad, S., B. Keane, C. Keiffer, F. Hebard y P. Sisco. 2001. **Dna extraction from plants: The use of pectinase.** Plant Molecular Biology Reporter, 19(4): 353–359, doi:10.1007/BF02772833.

- Sangeetha, C. y R. Rawal. 2008. **Nutritional studies of colletotrichum gloeosporioides (penz.) penz. and sacc. the incitant of mango anthracnose.** African Journal of Biotechnology, 9(21): 3086–3090.
- Sharma, A., P. Gill y P. Singh. 2002. **Dna isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants.** Plant Molecular Biology Reporter, 20(4): 415, doi:10.1007/BF02772129.
- Sharma, K., M. Lavanya y V. Anjaiah. 2000. **A method for isolation and purification of peanut genomic dna suitable for analytical applications.** Plant Molecular Biology Reporter, 18(4): 393, doi: 10.1007/BF02825068.
- Suenaga, H., E. y Nakamura. 2005. **Evaluation of three methods for effective extraction of dna from human hair.** Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the Biomedical and Life Science, 820: 137–141.
- Suárez, L. 2005. **Extracción y purificación del adn de moniliophthora roreri, hongo que ataca el cacao, en norte de santander.** Revista Respuestas Universidad Francisco de Paula Santander, 10(2): 4–8.
- Thaung, M. 2008. **Coelomycete systematics with special reference to colletotrichum.** Mycoscience, 49(6): 345–350, doi:10.1007/s10267-008-0432-6, URL <http://dx.doi.org/10.1007/s10267-008-0432-6>.
- Weir, B., P. Pierre y N. Chibbar. 1996. **Isolation of dna for rapid analysis from leaves of the saskatoon (amelanchier alnifolia nutt) and other horticultural crops.** Canadian Journal of Plant Science, 76: 819–824.
- Wharton, P. y J. Diéguez. 2004. **The biology of colletotrichum acutatum.** Anales del Jardín Botánico de Madrid, 61(1): 3–22.
- Whitelaw, M., S. Curtin, R. Huang, C. Steel, C. Blanchard y P. Rofey. 2007. **Phylogenetic relationships and pathogenicity of colletotrichum acutatum isolates from grape in subtropical australia.** Plant Pathol, 56: 448–463.
- Xiang, Y., Z. Xian y F. Chen. 2002. **Rapid extraction of genomic dna from leaves and bracts of dove tree (davidia involucrata).** Plant Molecular Biology Reporter, 20: 185.