

## **Protocolo: La extracción no destructiva de ADN de los Psílicos**

*Este protocolo es utilizado para extraer ADN de los psílicos perforándolos con un alfiler, conservando de este modo un espécimen de referencia (exoesqueleto) después de la extracción. Los psílicos se almacenaron previamente en etanol al 95% y glicerol al 5%. Este protocolo utiliza el kit QIAGEN DNeasy Blood & Tissue y fue modificado de Percy (2003) Evolution: 57, 2540-56. Este protocolo fue creado como parte del Proyecto CRF Psyllid, financiado por el Gobierno escocés, y el proyecto POnTE. Para obtener más información, comuníquese con Jennifer Sjölund ([jennifer.sjolund@sasa.gsi.gov.uk](mailto:jennifer.sjolund@sasa.gsi.gov.uk)).*

### Antes de empezar

- Preparar las soluciones tampón del kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Preparación de la muestra de Psílido

1. Retirar el psílido del tubo, secar presionando cuidadosamente con papel.
2. Colocar sobre el material de fijación, debajo de un microscopio de disección.
3. Perforar el psílido con un alfiler de 0,1 mm por dos lugares; a través del abdomen, y parcialmente a través de la parte superior del tórax.
4. Colocar en un tubo de microcentrifugación con cierre de seguridad de 1,5 ml / 2 ml.

### Extracción de ADN: Día 1

5. Añadir 180 µl de tampón ATL y 20 µl de proteinasa K a cada muestra.
6. Mezclar con agitador vortex y centrifugar brevemente.
7. Incubar durante la noche a 56 °C en un bloque térmico de agitación lenta.

### Extracción de ADN: Día 2

8. Mezclar con agitador vortex durante 15 segundos y centrifugar brevemente.
9. Añadir 200 µl de tampón AL. Mezclar con agitador vortex y centrifugar brevemente.
10. Incubar a 56 °C durante 10 minutos.
11. Añadir 200 µl de etanol (96-100 %). Mezclar con agitador vortex y centrifugar brevemente.
12. Transferir el líquido a la columna de centrifugación colocada en un tubo colector de 2 ml. y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Conservar el espécimen del psílido en la parte inferior del tubo.
  - Almacenar los restos del espécimen de psílido de referencia en etanol (95%) y glicerol (5%).
13. Desechar el tubo que contiene el filtrado. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recogida.
14. Añadir 500 µl de tampón AW1. Centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm.
15. Desechar el tubo que contiene el filtrado. Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recogida.
16. Añadir 500 µl de tampón AW2. Centrifugar durante 3 minutos a 14000 rpm.
17. Desechar el tubo que contiene el filtrado. Colocar la columna de centrifugación en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml.
18. Añadir 100 µl de tampón AE. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar durante 1 minuto a 8000 rpm.