



Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

FECHA DE PRESENTACIÓN: Marzo 2008
ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina
DEPARTAMENTO: Departamento Nacional de Biotecnología (DNB)

PROYECTO: PRODUCTORES DE MORA COMPETITIVOS MEDIANTE SELECCIÓN PARTICIPATIVA DE CLONES ÉLITE, MANEJO INTEGRADO DEL CULTIVO Y FORTALECIMIENTO DE CADENAS DE VALOR

ACTIVIDAD: Análisis de la diversidad genética de la mora cultivada (*Rubus glaucus* Benth.) y especies emparentadas en zonas productivas del Ecuador mediante marcadores moleculares

RESULTADO: Caracterización de germoplasma

UBICACIÓN: Estación Experimental Santa Catalina

AUTOR: Egda. Patricia Garrido

COAUTORES: Eduardo Morillo, PhD
Wilson Vasquez, PhD

COLABORADORES: Programa de Fruticultura
DENAREF
Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

FECHA DE INICIO: 2008-03
FECHA DE TERMINACIÓN: 2008-12

PRESUPUESTO: \$ 7790

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: FONTAGRO 90%
INIAP 10 %

1. ANTECEDENTES

La mora es un frutal nativo de los Andes con gran potencial agronómico. Conocida como mora de castilla, *Rubus glaucus* se cultiva en forma comercial en muchos países a lo largo de todo el continente como son: Estados Unidos, México, Guatemala, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú y Chile. Pertenece al género *Rubus* el cual comprende alrededor de 750 especies y exhibe una gran diversidad morfológica, incluyendo numerosas especies, leñosas, herbáceas, sermiherbáceas, especies rastreras y trepadora (Waugh *et al.*, 1990; Robertson, 1974; Gu *et al.*, 1993). Otras especies del género se cultivan también, como *R. floridundus*, *R. figantus*, *R. adenotrichas*, *R. notingensis*, *R. poephyromallus*, *R. urticaefolius*, (zarzamora), sin embargo la de mayor importancia en Ecuador es *R. glaucus* con dos principales variedades: Brazos y Mora de Castilla (SICA, 2007).

Según Ballington *et al.*, (1991), algunas de las especies del género *Rubus*, por sus características organolépticas pueden aportar genes valiosos para especies cultivadas como es el caso de *Rubus* sbg. *Orobatus*: *R. macrocarpus* y *R. roseus* y las especies *Rubus* subg. *Rubus* : *R. adenothallus* y *R.*

En Ecuador las zonas de producción de mora se encuentran ubicadas principalmente en Carchi, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo y Bolívar (SICA, 2007). Los agricultores la propagan vegetativamente por ser el método más económico y recomendado a nivel comercial. La reproducción sexual no se emplea sino solo experimentalmente porque las semillas tienen un bajo poder germinativo. Las plántulas que logran emerger, crecen en forma lenta (PROEXANT, 2007). El método óptimo de propagación es a través de acodo o punta terminal (donde se toma a la planta madre que posea la mejor característica y se la reproduce con el objetivo de obtener un cultivo uniforme), lo cual implica una producción con escasa diversidad genética. Sin embargo, según Kollmann *et al.* (2000) de vez en cuando, se usa la reproducción sexual, lo cual contribuiría al mantenimiento de la variación genética.

Varios estudios concluyen que la variabilidad genética en *Rubus* está determinada por el sistema de propagación que es un efecto de la polinización cruzada entre las especies del género *Rubus*. Este tipo de entrecruzamiento influye positivamente en la calidad del fruto y semilla, incrementando niveles de ploidía y proximidad taxonómica (Kollmann *et al.* 2000; Marulanda *et al.* 2007; Morillo, *et al.* 2005). Debido a esto según Graham *et al.* (1997) en áreas donde las especies silvestres crecen junto a las cultivadas, existe una gran posibilidad de que ambas especies intercambien material genético. En el estudio de caracterización realizado por Morillo, *et al.* (2005) donde se evaluó la colección colombiana de mora se pudo evidenciar una moderada variación entre individuos de los diferentes departamentos muestreados, sugiriendo una baja incidencia de flujo de genes de especies cultivadas a silvestres.

2. JUSTIFICACIÓN

La mora de castilla es uno de los frutales andinos con mayor presencia en los mercados nacionales e internacionales. Aunque es un cultivo de gran importancia en el país, la base genética del cultivo es desconocida. Este estudio es pionero en el país y busca analizar la diversidad genética de mora en el Ecuador mediante el uso de marcadores moleculares. Además al ser centro de diversidad de especies potenciales de uso, su análisis molecular permitirá determinar las relaciones genéticas de éstas con el cultivo y de determinar su posible contribución a la forma cultivada. El conocimiento de la diversidad representada en la forma cultivada, así como el de las relaciones con otras especies de interés, tendrá sin duda implicaciones en materia de conservación y uso de recursos genéticos de mora así como abrirá perspectivas para el mejoramiento de este frutal de importancia local y regional.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

- Determinar la diversidad genética del cultivo de mora en provincias productoras del Ecuador y sus relaciones genéticas con otras especies del género con potencial agronómico

3.2 ESPECÍFICOS

- Muestrear y coleccionar germoplasma cultivado y silvestre, en las principales zonas productoras de las provincias de Bolívar, Cotopaxi y Tungurahua.
- Caracterizar molecularmente el ADN de las muestras mediante técnicas de marcaje aleatorio (RAPDs/RAMs y AFLPs).
- Determinar el grado de parentesco genético de *Rubus glaucus* con otras especies de *Rubus*, con potencial agronómico.
- Comparar la diversidad de mora en el Ecuador con germoplasma de referencia de Colombia siguiendo las normativas vigentes sobre intercambio de ADN.

4. HIPÓTESIS

Ho.

- No existe diversidad genética en el cultivo de mora producido en las Provincias de Tungurahua, Cotopaxi y Bolívar.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio consta de dos fases experimentales: una primera en campo para coleccionar germoplasma y muestrear la diversidad de la mora cultivada y especies silvestres emparentadas, especialmente las de potencial agronómico. Una segunda fase comprende el análisis molecular en laboratorio, para ello se emplearán tres tipos de marcadores moleculares, los RAPDS (Random Amplified Polymorphisms DNA, Williams, *et al*, 1990) que se basan en el polimorfismo de fragmentos amplificados con un primer corto y de secuencia aleatoria, los RAMs (Random Amplified Microstellite,

Hantula *et al*, 1996) que permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN y los AFLPs (Amplified Fragments Length Polymorphisms, Vos *et al*, 1995) que combina el uso de enzimas de restricción y oligonucleótidos para PCR, de manera que se obtienen marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad.

5.1. FASE DE CAMPO: COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

5.1.1. MATERIALES

A) RECURSOS

Recursos Materiales	Recursos Humanos	Recursos de oficina
Azadones pinzas	Técnicos INIAP (DENAREF)	Libro de colecta
Fundas plásticas / de papel	Becario	Computadora
Papel periódico		Hojas
Campana de colecta		Cámara fotográfica
Silica gel		Gps
Alcohol		Altímetro
Prensa botánica		Marcadores
		Mapa del Ecuador

5.1.2. MÉTODOS

5.1.2.1 COLECTA DE MATERIAL VEGETAL

Muestreo:

En primera instancia se realizará un diagnóstico de las principales zonas de producción de mora en el Ecuador, posteriormente se recopilará información de la ubicación y descripción Botánica, de especies del género *Rubus* en base a la información del Herbario Nacional del Ecuador y del Herbario de la PUCE. Con esta información se planificarán las misiones de colecta y muestreo en campo.

El método a aplicarse para el muestreo es al azar simple, en el cual todos los individuos de la población tienen la misma probabilidad de ser muestreados, evitando muestrear plantas cercanas debido a la similitud genética que implica el método de propagación utilizado por los agricultores (acodos). En base también a la diversidad morfológica existente en cada lote, se colectarán plantas de cada variedad, tomando en cuenta en lo posible criterios agronómicos de importancia.

El material silvestre se lo colectará en los lugares cercanos a los cultivos, bordes del camino y jardines. Contando con la ayuda de agricultores locales, se colectarán: hojas jóvenes para la extracción de ADN; varetas para conservación *ex situ* y muestras para herbario. Se fotodocumentarán los procesos y adicionalmente se tomarán los datos pasaporte durante la colecta. Con las muestras colectadas para herbario se realizará la identificación taxonómica.

Cada accesión será codificada con un número, y en el caso de más de un individuo por población se codificará con el número seguido del número de individuos encontrados (por ej: 5.1, 5.2, 5.3, 5.4).

5.2. FASE DE LABORATORIO: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

5.2.1. MATERIALES

5.2.1.1. REACTIVOS, EQUIPOS E INSTALACIONES:

Los reactivos, equipos e instalaciones necesarios para la realización de esta investigación se hallan descritos en el anexo 1.

5.2.1.2. RECURSOS:

Recursos humanos	Recursos de laboratorio
Técnicos INIAP (DNB)	Baño María
Becario	Centrífuga
	Vórtex
	Refrigerador
	Sistema de fotodocumentación de geles
	Termocicladores
	Cámaras electroforéticas
	Agitador
	Estufa
	Sorbona
	Balanza analítica
	Genotipador de ADN
	Insumos varios (tips, tubos, placas PCR)

5.2.2 MÉTODOS

5.2.2.1 CARACTERÍSTICAS DEL LABORATORIO

La caracterización molecular se realizará en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, INIAP. El mismo que dispone de una sala de extracción. Dos salas de PCR, una sala de electroforesis y una sala de revelado.

5.2.2.2 TRATAMIENTOS

En este tipo de estudios no es aplicable la utilización de un diseño experimental. Más adelante se explica el método de evaluación y análisis de datos.

5.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los polimorfismos RAPDs y/o RAMs y AFLPs se codificarán en una matriz binaria de ausencia o presencia de los polimorfismos. La presencia de un polimorfismo se

codificara con “1” y la ausencia con “0”. Para cada marcador se realizarán los siguientes análisis estadísticos:

5.2.3.1 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, RAMs y AFLP), 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.

5.2.3.2 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 empleara el método no ponderado UPGMA para la obtención de un árbol o fenograma que grafica las relaciones entre genotipos. El PCO en cambio es un método no paramétrico que permite proyectar en un plan de dos o tres dimensiones el conjunto de muestras analizadas (Plot) en función de sus relaciones sobre dos o tres ejes de varianza. Cada eje o coordenada representa al primer, segundo y tercer eje de varianza que explican una fracción mayoritaria de la diversidad total observada.

5.2.3.3 Análisis molecular de varianza (AMOVA).- Este test permite realizar una descomposición de la varianza molecular observada. Este método estadístico permite el cálculo de parámetros F' o sus análogos a través de la descomposición entre grupos jerárquicos (variedades, poblaciones, regiones, etc.). El cálculo del AMOVA con el macro GenALEx ver. 6 (Peakall y Smousse, 2001), está adaptado a diferentes tipos de marcadores genéticos permitiendo una estimación de la diferenciación entre poblaciones o grupos a partir de una matriz de datos binarios. El parámetro PhiPT, análogo al tradicional F_{st} , varía en un rango de 0 a 1 según el grado de diferenciación genética entre los grupos. Para nuestro análisis, el soporte estadístico de PhiPt se calculará con 1000 permutaciones aleatorias. Un AMOVA se obtendrá entre los grupos determinados por el análisis de agrupamiento. Además GenALEx realiza un cálculo de frecuencias de los polimorfismos dentro de cada grupo lo que permite identificar bandas diagnóstico (exclusivas de un grupo o genotipo) útiles en los trabajos de identificación de un grupo genético o variedad determinada.

5.2.4. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

5.2.4.1 Extracción de ADN

Las hojas debidamente secas con sílica gel serán maceradas en mortero para la extracción de ADN. Se ensayarán varios protocolos de extracción para la determinación del método más apropiado en cantidad y calidad para la posterior extracción del total de muestras colectadas. Para las muestras que se analicen con AFLPs, se extraerá nuevamente el ADN utilizando un kit comercial de Invitrogen

(PureLink Plant Total DNA Purification Kit), el cual permite obtener una mejor calidad de ADN requerido para esta técnica.

5.2.4.2 Sondeo preliminar de la diversidad

Un análisis preliminar de la diversidad genética del ADN de las muestras colectadas se realizará mediante el empleo de marcadores RAPDs y/o RAMs. Se probarán en un screening 100 *primers* RAPDs de Operon Technologies y 20 *primers* RAMs screening con cinco ADN de variedades de mora cultivada. Con al menos 10 *primers* seleccionados según el polimorfismo y la calidad de la amplificación, se caracterizará el ADN de todas las muestras colectadas. Del análisis estadístico se establecerá un grupo representativo de materiales para su posterior caracterización con AFLPs.

5.2.4.3 Genotipaje con RAPDs y/o RAMs: La reacción de amplificación en volúmenes de 10 µl contiene 1.5-2 µl de DNA genómico, 0,4 µl de *primer* 10 mM, 0,4 µl dNTPs 10 mM, 0,05 unidades de Taq DNA Polimerasa (GoTAQ), 2,2 µl de buffer 5X PCR (50 mM Tris pH 8,5; 10 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 500 µg/ml BSA; 0,01% Xilene cyanole; y, 1,5% Ficoll 400) y 5 µl de agua ultrapura. Se utilizara un termociclador usando el siguiente programa: ciclo inicial de desnaturalización a 94° C por 5 min, 40 ciclos de desnaturalización cíclica a 94° C por 30 segundos, 1 minuto de anillamiento a 42° C, 2 minutos de elongación cíclica a 72°C, y un ciclo final de elongación a 72° C por 7 minutos. Los productos de amplificación se analizarán por electroforesis en geles de agarosa 2,5% en tampón TAE utilizando un marcador de referencia (*1 Kb DNA Ladder, Invitrogen Cat. No. 10511-012*). Las bandas de ADN serán visualizadas en un sistema de fotodocumentación (*UVP Gel Documentation System*) bajo luz ultravioleta y las imágenes impresas en papel térmico.

5.2.4.4 Genotipaje con AFLPs

Se trabajará con un grupo representativo definido del análisis RAPD y/o RAMs. Se utilizará la metodología propuesta para el secuenciador LI-COR modelo 4300S y según las recomendaciones técnicas del kit comercial AFLP de LI-COR (*IRDye[®] infrared dye Genomic AFLP[®] Kit*). El ADN genómico será digerido con las enzimas EcoRI y TruI para las reacciones de ligación y preamplificación (PCR+1) según el protocolo original de Vos *et al* (1995). Para identificar las mejores combinaciones de *primers* en función del polimorfismo y la calidad de amplificación, se realizará un screening con al menos 15 combinaciones de *primers* con tres nucleótidos selectivos. Los *primers* Eco son marcados por fluorescencia en 700 o 800 nm con una secuencia M13 (método M13 tailing) para ser detectados por los lectores laser del secuenciador LI-COR (IR2; LI-COR Biosciences). Los productos de amplificación selectiva (PCR+3) serán cargados en un gel de acrilamida 6.5% para una migración de 3 horas a 1500V según el protocolo de Myburget *et al* (2001). La adquisición de imágenes del gel será efectuada por el secuenciador para su lectura en el asistente de lectura SAGA MX - AFLP[®].

5.2.5 REGISTRO DE DATOS

El registro de polimorfismos RAPD y/o RAMs 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 (1 Kb Ladder, INVITROGEN). De esta manera, cada polimorfismo se identificará con el código comercial del primer utilizado, seguido del peso molecular estimado en pares de bases. Para los AFLPs se utilizará el software SAGA MX - AFLP® que es un asistente de lectura de las imágenes proporcionadas por el LI-COR. Únicamente se registrarán bandas que no presten a la ambigüedad en la lectura.

6. CRONOGRAMA DE TRABAJO:

ACTIVIDAD	MES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Preparación y presentación de anteproyecto	■	■										
Colecta de mora y taxa relacionados	■	■										
Identificación taxonómica del material	■	■										
Procesamiento de muestras colectadas	■	■										
Extracción de ADN	■	■	■									
Screening RAPD y/o RAMs		■	■	■								
Genotipaje RAPDs y/o RAMs			■	■	■							
Genotipaje de AFLPs				■	■	■	■					
Análisis estadístico e interpretación					■	■	■	■	■			
Redacción de Tesis								■	■	■	■	■

6. PRESUPUESTO

<i>Rubro</i>	<i>Unidad</i>	<i>Precio Unitario (USD)</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Total (USD)</i>
PERSONAL REQUERIDO PARA EL PROYECTO				
Becario	Mes	150	12	1800
Subtotal				1800
COLECTA DE MATERIAL VEGETAL				
Viáticos para colecta (Bolívar, Cotopaxi y Tungurahua)	días	90	16	1440
Subsistencias	días	45	10	450
Combustible	días			110
Subtotal				2000
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR				
Extracción y Cuantificación ADN	u	5.0	100	500
Amplificación por RAPD y RAMs	u	1	600	600
Kit AFLP-LICOR (100 reacciones)	Kit	1370	1	1370
Corridas de AFLPs en LI-COR	l gel	20	15	300
Insumos y reactivos varios				630
Subtotal				3400
ELABORACION DEL DOCUMENTO FINAL				
Fotocopias, impresión y otros	hojas	0.2	500	100,00
Empastados.	l	20	6	120,00
Subtotal				220,00

RUBRO	SUBTOTAL
I. MUESTREO Y COLECTA	2000
II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	3400
III. PERSONAL REQUERIDO PARA EL PROYECTO	1800
IV. COSTOS ELABORACION DEL DOCUMENTO FINAL	220
SUBTOTAL	7420
IMPREVISTOS (5%)	371
COSTO TOTAL	7791

FUENTE DE FINANCIAMIENTO	% Aporte
FONTAGRO	90
INIAP (Instalaciones del laboratorio de Biología molecular, banco de germoplasma)	10
TOTAL	100

BLOGRAFÍA

- Ballington, J.R., Luteyn, J.L., Thompson, M.M., Romoleroux, K.; Castillo T, R. 1991. Rubus and vacciniaceous germplasm resources in the Andes of Ecuador Plant Genetic Resources Newsletter (IBPGR/FAO), Bulletin des Ressources Genetiques Vegetales (CIRP/FAO). 93:9-15.
- DICE, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology, 26:297-302.
- Graham J, Squire GR, Marshall B and Harrison RE. 1997 Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus* detected using RAPD markers. Molecular Ecology 6: 1001-1006.
- Gu, Y., Zhao, C. M., Jin, W., Li, W. L. 1993. *Rubus* resources in Fujian and Hunan provinces. *Acta Horticulturae*. [Versión electrónica], 345: 117–125.
- J. Hantula., Dusabenyagasani M., Hamelin, R. (1996) Random amplified microsatellites (RAMS). A novel method for characterizing genetic variation within fungi. Forest Pathology 26 (3)
- Kollmann, J., Steinger T., Roy BA . 2000 Evidence of sexuality in European *Rubus* (Rosaceae) species based on AFLP and allozyme analysis. American Journal of Botany 87: 1592-1598.
- Marulanda, M.L., López, A.M., Aguilar, S.B. 2007. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology 7: 242-252.
- Marulanda, M. L., Márquez, M. P. 2001. Caracterización de la diversidad genética de *Rubus glaucus* Benth con Marcadores Moleculares RAPDs. Actual Biol. 23 (74): 57 – 63.
- Morillo, Y; Cruz, A; Muñoz, J; Vásquez, H; Zámorano, A; .2005. Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, *Rubus* spp, de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
- Myburg, A.A. , Remington, D.L. , O'malley, D.M. , Sederoff, R.R., Whetton, R.W., 2001 High-Throughput AFLP® Analysis Using Infrared Dye-Labeled Primers and an Automated DNA Sequencer. BioTechniques 30(2): 348-357.
- Peakall R., Smousse P.E. 2001. GenAIEx V5: Genetic Analysis in Excel. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx/>
- PROEXANT. Página consultada: www.proexant.org, Fecha de consulta: 20 de Diciembre del 2007.
- Robertson, K. R. 1974. The genera of Rosaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*. [Versión electrónica]. 55: 352–360.
- Rohlf F. J. 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. Freeman San Francisco. 359 p.

- Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. El cultivo de la mora en Ecuador. www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/ing%20rizzo/nuevos%20exportables/mora/cultivo.htm. Quito – Ecuador
- Vos, P., Hogers R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, F., Kuiper, M., Zabeau M. 1995. AFLP A New Technique For Dna Fingerprinting. *Nucl Acid Res* 23:4407-4414
- Waugh, R., W. T. G. van de Ven, M. S. Phillips, and W. Powell. 1990 Chloroplast DNA diversity in the genus *Rubus* (Rosaceae) revealed by Southern hybridization. *Plant Systematics and Evolution* 172: 65–75.
- Williams, J.G.K., Kubelik, K.J., Livak, J.A., Rafalski, S.V., Tingy. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

ANEXOS

Anexo 1. Reactivos y Equipos necesarios,

Reactivos	Equipos e Instalaciones	Materiales
Tris Hcl	Invernadero	Cajas Petri
Nacl	Baño María	Papel Filtro
Edta Ph8,0,5m	Centrífuga	Sustrato (Tierra Negra + Champiñón)
Pvp	Vórtex	Macetas
Ctab	Refrigerador	Tubos Eppendorf
B-Mercaptoetanol	Transiluminador UV	Hielo
Cia	Termociclador	Maceradores
Etanol	Cámaras Electroforéticas	Puntas 1 MI, 200 UI Y 1000 UI
Acetato De Amonio	Agitador	Papel Parafilm
Tris/EDTA	Estufa	Pipetas
Bromuro De Etidio	Sorbona	Papel Absorbente
Blue Juice	Balanza Analítica	Placas De Vidrio
Agarosa	Secuenciador De ADN	Separadores, Peines
Tae		
Mgcl ₂		
10XPCR Buffer		
Dntp's		
Primers		
Taq Polimerasa		
Agua Ultrapura		
Aceite Mineral		
Marcador De Peso Molecular		
Cloroformo		
Atractivo		
Repelente		
Úrea		
Acrilamida		
Bisacrilamida		
Buffer TBE 10 X		
Aps		
Temed		
Ácido Acético		
Ácido Nítrico		
Nitrato De Plata		
Formaldehído		
Carbonato De Sodio		
Tiosulfato De Sodio		