



CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE *Coffea Arabica* Var. COLOMBIA Y EVALUACIÓN CON UNA SECUENCIA HOMÓLOGA A UBIQUITINA

Elsa Leonor Álvarez Méndez^{1,2}, José Salvador Montaña Lara², Ricardo Acuña¹
Álvaro Gaitán¹, Myriam Pacheco de Peña³

1 Federación Nacional de Cafeteros, Chinchiná, Caldas, Colombia

*2 Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología.
Carrera 7a No. 43-82. Bogotá, Colombia.*

*3 Colciencias, Programa Nacional de Biotecnología.
Transversal 9ª Bis No. 132-28. Bogotá, Colombia.*

elsalalvarez@hotmail.com, jose.montana@javeriana.edu.co

RESUMEN

Con el fin de buscar secuencias de interés en el genoma de *Coffea arabica* var. Colombia, se construyó una biblioteca genómica en el vector Lambda FIX II (Stratagene) con un tamaño promedio de inserto de 15Kb y con un título de $1,33 \times 10^6$ ufp/ml que representa aproximadamente 3,7 veces el genoma haploide. La biblioteca fue evaluada utilizando como sonda un producto de PCR amplificado con la combinación de iniciadores InhF - R631 y que presenta alta homología con secuencias tipo ubiquitinas de *Arabidopsis thaliana* y *Oriza sativa*. Se identificaron dos clones recombinantes (cof-ubi1 y cof-ubi2) que hibridizaron con la sonda tipo ubiquitina. Los resultados obtenidos indican que la biblioteca genómica es adecuada para la identificación de secuencias de interés, mapeo genético y estudios sobre regulación de la expresión de genes.

Palabras clave: Biblioteca genómica, clones genómicos, *Coffea arabica*, ubiquitina.

ABSTRACT

A Lambda FIX II genomic library consisting of $1,33 \times 10^6$ pfu/ml with an average DNA insert size of 15 kb was constructed from *Coffea arabica* var Colombia DNA. The haploid coffee genome was represented 3,7 times approximately. The library was evaluated with a coffee PCR product (primers InhF - R631) which has a high homology with *Arabidopsis thaliana* and *Oriza sativa* ubiquitin like sequences. Two recombinant clones were identified (cof-ubi1 y cof-ubi2) that hybridized with the ubiquitin like probe. The results indicate that the library can be used to isolate new sequences of interest in genomic mapping and may contribute in expression and gene regulation studies.

Key words: *Coffea arabica*, genomic clones, Genomic library, ubiquitin.

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los principales productos de exportación agrícola en Colombia y representa una de las principales industrias en el país. De su producción, comercialización y procesamiento derivan el sustento un gran número de familias. La presencia

de la broca en Colombia originó un gran interés hacia la búsqueda de fuentes de resistencia genética en el germoplasma de café existente. Con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante e ingeniería genética, es posible ampliar los métodos tradicionales de mejoramiento, haciéndolos más eficientes para la obtención de nue-

vos variantes genéticos. Además, permite adquirir nuevos conocimientos sobre la información genética asociada con caracteres básicos, ya sea en su estructura o en la regulación de su expresión (Kung y Wu, 1993).

La investigación relacionada con aspectos moleculares en café ha sido de vital importancia. Inicialmente, los estudios estuvieron relacionados con la construcción de mapas genéticos y la identificación de marcadores moleculares específicos asociados a características de interés agronómico tales como: resistencia a enfermedades y arquitectura de la planta, entre otros (Lashermes, et al., 2001 y Chaparro, 2000). Uno de los aspectos fundamentales para obtener mapas moleculares y poder realizar análisis físico de grandes regiones cromosómicas, así como el aislamiento de genes de interés, se basa en la disponibilidad de bibliotecas genómicas.

Una biblioteca genómica es una colección de fragmentos de DNA en la que se espera estén incluidas el mayor número de secuencias posibles de un genoma o las secuencias contenidas en un cromosoma (Alberts, et al., 1994). En una biblioteca genómica es posible seleccionar fragmentos de DNA entre millones de secuencias clonadas en cantidad suficiente para ser analizada. Los fragmentos clonados deben ser de tamaño suficiente para contener, en lo posible, genes con sus secuencias reguladoras, pero no tan grandes que dificulten su discriminación cuando se realice el mapa con las enzimas de restricción.

Hoy día existen diferentes sistemas de clonación para la construcción de bibliotecas genómicas, desde vectores basados en el bacteriófago λ con un tamaño de inserto alrededor de 20 kb, los cromosomas artificiales de levaduras cuya capacidad máxima es de 1 Mb y los cósmidos y bacteriófago P1 que cubren el rango medio

de 40-100 kb, respectivamente (Brown, 1990).

Una vez construida la biblioteca genómica se debe proseguir con la búsqueda e identificación de aquella secuencia de interés. Un gen en particular, sólo representa una muy pequeña parte del genoma de eucariotes. Si un gen es de aproximadamente 5000 pb en un genoma de alrededor de 109 pb, éste representaría un 0,0005% del DNA total. Para identificar estas pequeñas secuencias, el método a utilizar debe seleccionar sólo el clon o los clones que contienen el gen de interés y determinar si el clon contiene todo o parte del gen. Para lograr este objetivo, existen varios métodos: Southern blot, Western blot, ELISA o PCR. La elección del método depende de las circunstancias y la disponibilidad de la información de la secuencia de interés (Glick y Pasternak, 1994 y Heldt, 1997).

En este trabajo se reporta la construcción de una biblioteca genómica representativa del genoma de *Coffea arabica* var. Colombia adecuada para la identificación de secuencias de copia única y que facilitará el aislamiento de genes con sus respectivas regiones reguladoras, así como la búsqueda de nuevos marcadores moleculares propios de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y digestión parcial de DNA total de alto peso molecular

El DNA fue extraído a partir de hojas frescas del genotipo CU1972 de la variedad Colombia, de acuerdo con los métodos propuestos por: Bernatzky y Tanksley (1986), Dellaporta (1983), Vroh et al. (1996) y el kit comercial DNAzol (Gibco BRL). La purificación del DNA de alto peso molecular se llevó a cabo mediante centrifugación en equilibrio con gradientes continuos de cloruro de cesio-bromuro de etidio. La canti-

dad y pureza del DNA se determinaron espectrofotométricamente de acuerdo con Sambrook, et al., 1989.

La digestión del DNA se llevó a cabo utilizando concentraciones desde 1 hasta 0,0033 unidades de la enzima Sau3AI (Promega) por μg de DNA. El producto de la digestión fue analizado en geles de agarosa al 0,6%.

Llenado parcial de los fragmentos Sau3AI y ligación con el vector

Se utilizó el vector de remplazamiento Lambda FIX II /Xho I partial Fill-in. Este vector acepta fragmentos de DNA entre 9 - 23 Kb. Para poder ligar los fragmentos Sau3AI del DNA genómico con los brazos del vector, fue necesario hacer el llenado de los 2 primeros nucleótidos de los extremos *Sau3AI* del DNA (Stratagene, 1999).

Se realizaron ligaciones a pequeña escala para determinar la proporción óptima de vector-inserto. Se escogió la proporción en la cual se produjo el mayor número de recombinantes para elaborar la biblioteca genómica.

Empaquetamiento y título del fago empaquetado

Para el empaquetamiento se utilizó el kit Gigapack III Gold Packaging Extract de Stratagene siguiendo el protocolo del fabricante, utilizando la bacteria hospedera XL1-Blue MRA. El cálculo del número de unidades formadoras de placas (ufp) de acuerdo con:

$$\text{Ufp/ml} = \frac{\text{número de placas} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen de extracto plaqueado}}$$

Para calcular la eficiencia de empaquetamiento se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Recombinantes}/\mu\text{g de DNA} = \frac{\text{ufp/ml}}{\text{Concentración de vector empaquetado}}$$

Evaluación del tamaño de los insertos de la biblioteca genómica de *Coffea arabica* var. Colombia

Para evaluar el tamaño de los insertos de los clones recombinantes de la biblioteca de café, se purificó el DNA de 7 placas de lisis seleccionadas al azar. Cada una de las placas fue retirada de la caja con la ayuda de una punta para micropipeta recortada. La placa de lisis recuperada se colocó en 100 μl de buffer de fago y se guardó a 4°C toda la noche. La purificación del DNA de los clones seleccionados se realizó a partir de un lisado en medio sólido utilizando el kit Wizard Lambda Preps (Promega).

Evaluación de la biblioteca genómica de *Coffea arabica* var. Colombia

La biblioteca fue plaqueada en alta densidad sobre cajas de petri de 150 mm. Los fagos recombinantes fueron transferidos a membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham) siguiendo el método propuesto por Benton y Davis (1977) citado por Darling y Brickel, 1994. Como sonda se utilizó la secuencia de DNA de café clonada que posee homología con la ubiquitina de *Arabidopsis thaliana* y *Oriza sativa*. La sonda se marcó mediante PCR utilizando 3 μl de $\alpha\text{-dCTP}$ 32P Isoblu (ICN). La hibridación se llevó a cabo a una temperatura de 42°C en una solución que contiene 50% de formamida. Se evaluaron alrededor de 350.000 ufp.

Caracterización parcial del fago que contiene la secuencia de interés

Para tal fin se llevó a cabo la preparación de un lisado de fago en medio sólido. La purificación del DNA del fago se realizó utilizando el kit Wizard Lambda Preps (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI y *Hind*III y sometido a un análisis de Southern Blot para identificar el fragmento que contiene la secuencia de interés.

RESULTADOS

Construcción de la biblioteca genómica

La biblioteca fue construida a partir de DNA de alto peso molecular obtenido por el método propuesto por Bernastki y Tanksley, 1986 (figura 1). El método empleado para el aislamiento de DNA de alto peso molecular de café requiere de una purificación mediante ultracentrifugación en un gradiente continuo de cloruro de cesio, lo que permitió aumentar su pureza. El análisis espectrofotométrico del DNA obtenido muestra un espectro con un pico de absorbancia máximo alrededor de 260 nm característico de los ácidos nucleicos y una relación de la absorbancia a 260/280 superior a 1,7 lo que indica que se encuentra libre de impurezas.

Después de una serie de ensayos donde se varió la concentración de la enzima, se observó que una concentración de la enzima *Sau*3AI de 0.05 U/ μ g de DNA era la óptima para obtener un mayor número de fragmentos entre 9-23 kb. Se encontró también, que la mayor concentración de DNA se encuentra en este rango (figura 2).

El llenado parcial de los extremos *Sau*3AI se realizó con el fin de garantizar que los únicos productos de ligación posibles fueran los fragmentos de DNA de café con los

brazos apropiados del vector. En este caso, el DNA de café digerido con la enzima *Sau*3AI y llenado parcialmente con A y G, solamente se ligará con los extremos *Xho*I del vector los cuales han sido parcialmente llenados con C y T.

Con el fin de verificar la eficiencia de los extractos de empaquetamiento, se utilizó el fago silvestre λ ci857 Sam7. En la dilución 10-4 se obtuvo un recuento de 387 placas en una caja y en el duplicado 369. Una vez evaluado el título del fago silvestre empaquetado, se procedió a llevar a cabo los ensayos de ligación a pequeña escala entre el vector FIX II/*Xho* I Partial Fill-in y el DNA de café. Para efectos prácticos, se consideró el brazo derecho y el brazo izquierdo del vector como una sola unidad de 32 kb y para los fragmentos de DNA de café se consideró un tamaño promedio de 15 kb. La tabla 1 muestra las diferentes relaciones molares inserto:vector utilizadas y el número de ufp que se obtuvieron en la dilución 10-2.

La relación molar vector:inserto en la cual se obtuvo un mayor número de unidades formadoras de placas fue 1:3, obteniéndose un título de 5,5 x 10⁵ufp/ml.

Con esta información, se procedió a realizar la ligación para la construcción de la biblioteca genómica de café utilizando la relación molar óptima calculada en el ensayo anterior. El título obtenido en este caso fue de 1,33 x 10⁶ufp/ml.

Caracterización de la biblioteca genómica

Las placas de lisis obtenidas presentaron una morfología definida y un tamaño uniforme (placas translúcidas y redondas). Para confirmar la presencia de los fragmentos de DNA de café se llevó a cabo la purificación del DNA de 7 fagos recombinantes seleccionados al azar. La figura 3 muestra

TABLA 1. Número de ufp obtenido en los ensayos de ligación a pequeña escala

Relación molar inserto:vector	Ufp en la dilución 10 ⁻²
Control inserto (12 Kb)	239
1:1	15
1:2	20
1:3	55
1:5	12
1:8	9

bandas de alto peso molecular que corresponden al DNA total de cada uno de los fagos. La figura 4 muestra los fragmentos producidos después de la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI*, *BamHI* y *SmaI* de tres de los fagos aislados. Se observó un patrón de fragmentos particular para cada fago, con un tamaño promedio de inserto de 15 kb.

Evaluación de la biblioteca genómica de café con la sonda de ubiquitina

A partir del análisis de secuenciación, se seleccionó el producto de PCR amplificado empleando la combinación de iniciadores del inhibidor de α -amilasa (*InhF*) y lectina de fríjol (R631) (Álvarez, et al., 2003).

En la evaluación primaria, se identificaron tres señales positivas fuertes que se mantuvieron tanto en la membrana A como en su duplicado (membrana B) (figura 5). Los clones correspondientes a las tres señales fueron recuperados de las cajas originales y se emplearon en la evaluación secundaria. Después de hibridizar las tres membranas con la sonda marcada, se observó que en sólo dos de las membranas se presenta-

ron señales positivas, indicando la presencia de la secuencia de ubiquitina. Los clones que presentaron señales positivas fueron denominados *cof-ubi1* y *cof-ubi2*. La figura 6 muestra la evaluación terciaria del clon *cof-ubi1*.

Una vez identificados los fagos recombinantes con las características apropiadas, fue necesario analizar su genoma para determinar su relación con la sonda y entre ellos mismos.

En el análisis de Southern blot se observó que el fago *cof-ubi1* al ser digerido con la enzima *BamHI* presentaba una señal de hibridización en un fragmento de aproximadamente 2,7 kb (carril 2, figura 7B), al ser digerido con la enzima *EcoRI* la señal se observó en un fragmento de 4,3 kb aproximadamente (carril 3, figura 7B) y al ser digerido con la enzima *HindIII*, la señal aparece en un fragmento de aproximadamente de 9,4 kb (Carril 4, figura 7B).

En el caso del fago *cof-ubi2*, no se obtiene un patrón de fragmentos cuando fue digerido con la enzima *BamHI*, sin embargo, cuando fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, se observaron señales en los fragmentos con tamaños promedios de 11 kb y 2,1 kb respectivamente (carril 7 y 8, figura 7B).

Este resultado permite suponer que en el genoma del café posiblemente se encuentran secuencias de tipo ubiquitina.

DISCUSIÓN

Una de las ventajas del método propuesto por Bernastki y Tanksley (1986) comparado con los métodos propuestos por Dellaporta (1983), Vroh, et al. (1996) y el kit comercial DNAzol (Gibco BRL) (figura 1) es que utiliza como material de partida hojas frescas, y la extracción del DNA se realiza a partir de los núcleos aislados, evi-

tando el uso de compuestos antioxidantes como el ácido dietil ditiocarbámico DIEICA, polivinyl polipirrolidona PVPP y carbón activado. Además, la preparación del DNA a partir de núcleos minimiza la contaminación con DNA mitocondrial y de cloroplastos (Bernantsky y Tanksly, 1986).

Para el aislamiento de DNA de alto peso molecular además del método empleado, es importante realizar una adecuada selección del material vegetal. Esto incluye, coleccionar material joven pero completamente desarrollado y en buen estado fitosanitario (Dellaporta, 1983). En el caso del café, para estudios bioquímicos y moleculares generalmente han sido utilizados segundos pares de hojas (Almario, 1992 y Chaparro, 1993).

En los métodos en los cuales se utiliza como material de partida hojas liofilizadas, la oxidación del tejido fue evidente, posiblemente debido a la presencia de compuestos fenólicos oxidables presentes. La adición de compuestos antioxidantes para la preparación de extractos crudos de proteínas de café y el aislamiento de DNA total ya ha sido reportada (Almario, 1992 y Chaparro, 1993).

De acuerdo con Glover y Hames (1996) el aislamiento del DNA es un paso crítico en la construcción de bibliotecas genómicas, ya que se constituye en el material de partida que garantiza el éxito de las reacciones en las cuales esté involucrado (digestión y ligación).

Empleando el sistema de llenado parcial de los extremos Sau3AI se garantiza que solamente los fagos recombinantes con los insertos de tamaño adecuado puedan empaquetarse, evitando así el fraccionamiento a través de gradientes de sacarosa, cloruro de sodio o en gel de agarosa, que son tediosos; necesitan una gran cantidad de DNA y un tratamiento con fosfatasa

alcalina (Glover y Hames, 1995). Además, durante el fraccionamiento, normalmente se presenta una baja proporción de moléculas de DNA recombinantes bien sea, muy pequeñas o muy grandes que una vez ligadas a los brazos del vector, producen genomas de fagos que por su tamaño no pueden ser empaquetados, lo que altera la representatividad de la biblioteca.

Cuando se conoce el tamaño de un genoma y éste se quiere representar como una colección de fragmentos de tamaño promedio similar, se debe determinar el tamaño de la colección de fragmentos (biblioteca) que garantice con una probabilidad dada, que una secuencia en particular esté incluida. Aunque en la práctica, es muy difícil controlar todas estas variables, una aproximación para calcular el tamaño de una biblioteca genómica se puede hacer con base en la siguiente ecuación:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-F)$$

Donde,

N= Número de recombinantes necesarios para encontrar la secuencia de interés.

P= Probabilidad de encontrar la secuencia de interés.

F= Proporción del tamaño del fragmento en cada fago con respecto al tamaño del genoma (en las mismas unidades) (Clarke y Carbon, 1976).

Asumiendo que en la biblioteca genómica de café, el tamaño promedio de los fragmentos es de 15 kb, y considerando que el tamaño del genoma haploide es de 1158 Mb (Arumuganathan y Earle, 1991) para encontrar una secuencia en particular con una probabilidad del 99% tenemos:

$$N = \ln(1-0.99) / \ln(1-(1.5 \times 10^4 / 1,158 \times 10^9))$$

$$N = 3,56 \times 10^5$$

De acuerdo con el cálculo anterior el genoma haploide de café está representado en $3,56 \times 10^5$ ufp, por lo tanto, en el título $1,33 \times 10^6$ ufp/ml hay aproximadamente 3,7 genomas de café representados. Zilsel, et al. (1992) recomiendan sobrestimar de 2 a 4 veces la población de clones necesarios para encontrar una secuencia determinada. Por consiguiente, el título obtenido en la biblioteca tiene representado al menos 3 veces el genoma haploide del café, lo que aumenta la probabilidad de éxito para aislar genes específicos en la biblioteca construida.

Una de las ventajas de las bibliotecas genómicas construidas en vectores lambda de reemplazamiento, es la posibilidad de obtener genes clonados con sus secuencias reguladoras pero no tan grandes que dificulten su discriminación cuando se realice el mapa con las enzimas de restricción (Glover y Hames, 1996).

La caracterización de los fagos recombinantes *cof-ubi1* y *cof-ubi2*, permite suponer que contamos con una biblioteca genómica a partir de la cual se pueden aislar secuencias de interés que faciliten la saturación del mapa físico del café.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología Francisco José de Caldas COLCIENCIAS. Código 2251-12-620-96 contrato 165-97. Los autores agradecen a la Pontificia Universidad Javeriana.

LITERATURA CITADA

- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. y WATSON J.D. *Molecular biology of the cell*, tercera edición. Garland Publishing, Inc. Nueva York, 1994, 432.
- ALMARIO M.F. 1992. Estudio de la actividad de la fenilalanina amonio liasa en presencia del patógeno en variedades de *Coffea* resistentes y susceptibles a *Hemileia vastatrix* Ber & Br, trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- ÁLVAREZ, E.L., ACUÑA, J.R., MONTAÑA, J.S., GAITÁN, A. y DE PENA, M. Búsqueda de secuencias homólogas a genes de resistencia a insectos en el genoma de *Coffea arabica* L., cv. Colombia. *Revista de Cenicafé*, 2003, 53(4): 273-280.
- ARUMUGANATHAN K. y EARLE D. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 1991, 9(4): 208-218.
- BERNATSKY R. y TANKSLEY S. Toward saturated linkage map in tomato based on isoenzymes and random cDNA sequences. *Genetics* 1986, 112: 887-898.
- BROWN T.A. *Gene Cloning An Introduction*, segunda edición. Chapman & Hall editores. Londres, New York, 1990, 286.
- CHAPARRO K. Contribución al estudio del genoma del cafeto, construcción de una biblioteca genómica de *Coffea arabica* variedad caturra, tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 1993.
- CHAPARRO P. Determinación de la variabilidad genética de introducciones de etiopía de *Coffea arabica* L. empleando marcadores moleculares RAPDs, trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia, 2000.
- CLARKE L. y CARBÓN J. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid

- plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 1976, 91-99.
- DARLING D.C. y BRICKELL P.M. *Nucleic Acid Blotting: The Basics*. IRL Press, Nueva York. 1994, 111.
- DELLAPORTA S.L., WOOD J. y HICKS J.B. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1982, 1(4):19-21
- GLICK B.R. y PASTERNAK J.J. *Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press. Washington, 1994, 500.
- GLOVER D.M. y HAMES D. *DNA Cloning I. A practical approach. Core techniques*. segunda edición. Oxford University Press. Nueva York, 1996, 269.
- HELDT H. *Plant biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, Nueva York, 1997, 522.
- KUNG S.D. y WU R. *Transgenic plants: engineering and utilization*, vol. 1. Academic Press, San Diego, California, 1993, 383.
- LASHERMES P., COMBES M.C., HERRERA J.C., NOIR S., PRAKASH N.S., TOPART P., ANTHONY F. (2001) - Analyse moléculaire du génome de caféier Arabica. Relation avec la valorisation des ressources génétiques. In: HAMON S. (ed), *Des Modèles biologiques à l'Amélioration des plantes*, 95-110, IRD-Editions, Paris, France.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F. y MANIATIS T. *Molecular cloning. A laboratory manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.
- STRATAGENE. *Lambda FIX II/Xho I Partial Fill-in Vector Kit Instruction Manual*, 1999.
- VROH I., HARVENGT A., CHANDELIER G., MERGEAI G. y DU JARDIN P. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* 1996, 115: 205-206.
- ZILSEL J., MA P.H. y BEATTY J.T. Derivation of a mathematical expression useful for the construction of complete genomic libraries. *Gene* 1992, 120(1): 89-92.

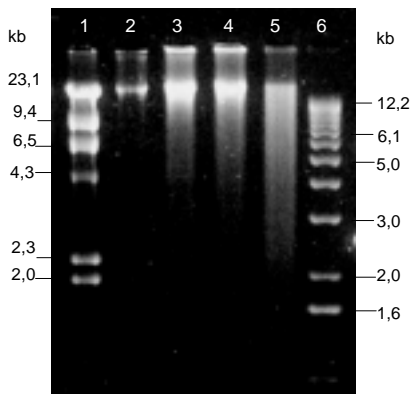


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 0.6% del DNA de café de alto peso molecular. Carril 1. Marcador de peso molecular Lambda/HindIII Carril 2. DNA purificado de acuerdo con el método propuesto por Bernastki y Tanksley (1986) Carril 3. DNA purificado de acuerdo con el método propuesto Dellaporta (1983) Carril 4. DNA purificado de acuerdo con el método propuesto por Vroh et al. (1996) Carril 5. DNA purificado mediante el kit DNAzol de Gibco Carril 6. Marcador de peso molecular escalera de 1 kb (Gibco).

