



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Identificación de genes candidatos de tolerancia a estrés por salinidad en  
tomate de árbol (*Solanum betaceum*) mediante la técnica de despliegue  
diferencial de genes**

**PAULINA VIVIANA JARAMILLO ROMÁN**

Venancio Arahana, PhD, Director de Tesis

Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en

Procesos Biotecnológicos

Quito, Mayo 2013

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACION DE TESIS**

**Identificación de genes candidatos de tolerancia a estrés abiótico por  
salinidad en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) mediante la técnica de  
despliegue diferencial de genes**

**Paulina Viviana Jaramillo Román**

Venancio Arahana, Ph.D.

Director de la tesis y

---

Miembro de Comité de Tesis

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

---

Mario Caviedes, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

---

Stella de la Torre, Ph.D.

Decano del Colegio de Ciencias

---

Biologicas y Ambientales

Quito, mayo del 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

-----  
Nombre: Paulina Viviana Jaramillo Román

C. I.: 1722372404

Fecha: Mayo del 2013

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi hermana y mejor amiga, Pame. Gracias por la paciencia, los consejos, la confianza. Gracias por estar tan presente, por tu admiración, tu fortaleza y haber sido siempre un pilar en mi vida. El camino siempre ha sido más sencillo a tu lado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo es el resultado de mucho esfuerzo durante varios años que pasaron sin casi sentirlos gracias al apoyo y confianza de muchas personas.

Gracias a mis padres, que nunca dudaron y a lo largo de mi vida no me han dado jamás un no por respuesta.

A mis hermanos, Pame, Mayri, Gonza, Gaby y Jorge Luis, que bueno es saber que ninguna batalla se enfrenta sin compañía.

A mis amigos, Carlita, Carola, Marisa, Berni, Juanjo, Dani, Dianita, Andrés, Ale, Jenni, Gaby, Cami, Meche, Darío, Jo. No encuentro palabras para describir lo que han sido para mí durante todos estos años. Compañeros de vida, que aun siendo tan diferentes hemos podido entendernos, querernos y convertirnos en una familia. Que sea para siempre.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal, lugar donde aprendí realmente a estudiar, trabajar y entregar todo por un proyecto que a veces parecía no tener sentido alguno. Aprendí a vivir. Y gracias a todos quienes han pasado por el laboratorio, de quienes he aprendido y he contado con todo el apoyo necesario para siempre levantar la cabeza.

A mis profesores a lo largo de la carrera. Especialmente a Lourdes y Venancio. Por su apoyo constante a lo largo de todos los años que me acogieron en el laboratorio, por creer en mí y en el proyecto, por su espera y por compartir todo su conocimiento y su confianza. Pese a todas las fallas, espero haber cumplido sus expectativas.

A la Universidad San Francisco de Quito, que definitivamente es parte importante y querida de mi vida. Gracias por ser la mejor Universidad y por todos los momentos únicos que me permitieron vivir. Gracias especialmente a Diego Gabela, quien me abrió las puertas de este lugar del que me va a costar mucho salir.

A todos quienes han sido parte, simplemente, mil gracias.

## RESUMEN

La salinidad es uno de los principales tipos de estrés abiótico que causa serios problemas en la agricultura a nivel mundial. El tomate de árbol es un cultivo andino que se encuentra distribuido ampliamente en la Sierra ecuatoriana donde está expuesto a la salinidad de los suelos, tanto por la naturaleza volcánica de los mismos como por problemas de erosión y riego. Por esta razón puede ser un cultivo de interés para la identificación de mecanismos de respuesta a salinidad. Uno de los métodos más sencillos de análisis de expresión génica es el despliegue diferencial. Mediante este procedimiento se generan patrones de bandas que se comparan entre individuos expuestos a tratamientos diferentes, con el fin de aislar bandas diferenciales. Por último, la secuenciación de estas bandas lleva a identificar genes candidatos de respuesta frente al tratamiento aplicado. El presente estudio utilizó la técnica del despliegue diferencial en plantas de tomate de árbol con el fin de evaluar su respuesta a una salinidad de NaCl 100mM en distintos tiempos de exposición. Como resultado, se obtuvieron 171 bandas diferenciales, de las cuáles se aislaron 99 correspondientes a ADNc. Del análisis de estas secuencias se encontró que 42 bandas no presentaron homología con bases de datos. De las 57 restantes se pudo inferir que 19 corresponden a ADNc sin función identificada, 10 a genes ribosomales y 28 a genes que codifican para proteínas. Las proteínas potencialmente identificadas se pudieron clasificar de acuerdo a su función en resistencia a estrés, fotosíntesis, estructura de la pared celular secundaria, metabolismo y regulación de la expresión génica. Muchos de los genes potencialmente identificados han sido previamente reportados en otros estudios de tolerancia a estrés abiótico, por lo que mediante análisis más profundos podrían ser utilizados en programas de mejoramiento relacionados con tolerancia a salinidad en el tomate de árbol.

## ABSTRACT

Salinity is one of the main types of abiotic stress that causes serious problems in agriculture worldwide. The tamarillo is an Andean crop which is distributed widely along the Ecuadorian highlands. In this environment this crop is exposed to soil with high salinity because of its volcanic origin, or problems with erosion or irrigation. For this reason, it may be considered as a crop of interest for the identification of response mechanisms towards salinity. One method for genetic expression analysis is differential display. Through this procedure, band patterns are generated and compared between individuals exposed to different treatments, in order to isolate differential bands. Lastly, the sequencing of these bands leads to identifying candidate genes for response towards the treatment applied. The present study used the differential display technique in tamarillo plants to evaluate their response towards salinity of NaCl 100mM in different exposition times. As a result, 171 differential bands were obtained, of which, 99 were isolated and sequenced. From the analysis of these sequences, 42 of the bands found, did not show homology with the database. Of the other 57 bands, 19 correspond to cDNA with no identified function, 10 ribosomal genes and 28 genes that code for proteins. The potentially identified proteins could be classified according to their function in stress resistance, photosynthesis, structure of the secondary cell wall, metabolism and gene expression regulation. Many of the potentially identified genes have been previously reported in other tolerance to abiotic stress studies, thus, through deeper analysis could be used in improvement programs related to salinity tolerance in tamarillo.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	Introducción .....	16
1.1	Estrés abiótico .....	16
1.2	Estrés abiótico.....	17
1.2.1	Salinización de los suelos.....	17
1.2.2	Medida de la salinidad de los suelos .....	19
1.3	Efectos generados por la salinidad en las plantas .....	21
1.4	Tolerancia a estrés abiótico.....	22
1.4.1	Concepto de tolerancia a la salinidad .....	23
1.4.2	Vías fisiológicas de tolerancia a estrés por salinidad .....	24
1.4.3	Genes candidatos de tolerancia a estrés salino con potenciales usos en programas de mejoramiento .....	27
1.5	Análisis del Transcriptoma como una herramienta para identificar genes .....	28
1.5.1	Técnica molecular utilizada en este estudio para la identificación de genes: Despliegue Diferencial.....	30
1.6	Especie en estudio: tomate de árbol.....	32
2.	Objetivos .....	34
2.1	Objetivo general.....	34
2.2	Objetivos específicos .....	34
3.	Área de Estudio .....	34
4.	Justificación.....	35
5.	Materiales .....	37
5.1	Material vegetal .....	37
5.2	Cultivo in vitro.....	37
5.2.1	Esterilización de semillas de tomate de árbol.....	37
5.2.2	Medio utilizado para germinación de semillas y subcultivo de tomate de árbol .....	37
5.2.3	Medio utilizado para inducir estrés abiótico por salinidad a las plantas .....	37
5.2.4	Equipos utilizados para el cultivo in vitro de tomate de árbol .....	38
5.3	Extracción de ARN de hojas de tomate de árbol .....	38

5.4	Cuantificación de ácidos nucleicos .....	39
5.5	Retrotranscripción de ARN de tomate de árbol .....	39
5.6	Amplificación ADNc .....	39
5.7	Electroforesis en agarosa .....	40
5.8	Electroforesis en Poliacrilamida al 6% .....	41
5.9	Extracción de Bandas a partir de geles de Acrilamida .....	42
5.10	Reamplificación ADNc .....	42
5.11	Identificación de genes candidatos .....	42
6.	Métodos .....	43
6.1	Colección del material vegetal .....	43
6.2	Cultivo in vitro .....	43
6.2.1	Siembra de semillas .....	43
6.2.2	Subcultivo de plántulas de tomate de árbol .....	44
6.2.3	Evaluación de la tolerancia de las plantas a estrés por salinidad .....	44
6.3	Identificación molecular de genes candidatos relacionados con tolerancia a salinidad .....	45
6.3.1	Selección del material vegetal para evaluar molecularmente diferencias en la expresión génica relacionada con tolerancia a estrés salino .....	45
6.3.2	Extracción de ARN de hojas de tomate de árbol .....	45
6.3.3	Cuantificación de ARN total .....	46
6.3.4	Retrotranscripción de ARN mensajero de tomate de árbol .....	47
6.3.5	Amplificación de ADNc de tomate de árbol .....	47
6.3.6	Electroforesis en geles de Poliacrilamida .....	47
6.3.7	Aislamiento de bandas diferenciales a partir de geles de poliacrilamida .....	49
6.3.8	Reamplificación de ADNc .....	49
6.3.9	Identificación de genes candidatos de tolerancia al estrés salino .....	49
7.	Resultados .....	50
7.1	Cultivo in vitro .....	50
7.1.1	Siembra de semillas de tomate de árbol .....	50
7.1.2	Subcultivo de plántulas de tomate de árbol .....	51

7.1.3	Evaluación de la tolerancia de las plantas de tomate de árbol al estrés por salinidad	52
7.2	Identificación molecular de genes candidatos relacionados con tolerancia a salinidad	54
7.2.1	Selección del material vegetal a ser evaluado	54
7.2.2	Extracción de ARN de hojas de tomate de árbol	54
7.2.3	Cuantificación de ARN total de tomate de árbol	54
7.2.4	Amplificación de ADNc de tomate de árbol	54
7.2.5	Aislamiento de bandas diferenciales a partir de geles de poliacrilamida	55
7.2.6	Reamplificación de ADNc	56
7.2.7	Identificación de genes candidatos	56
8.	Discusión	57
9.	Conclusiones	72
10.	Recomendaciones	73
11.	Bibliografía	74
12.	Tablas	85
13.	Figuras	91
14.	Anexos	100

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Tasa de afectación en diversos cultivos causada por estrés tanto biótico como abiótico. ....	85
<b>Tabla 2.-</b> Resumen elaborado por la USDA que muestra el impacto que genera la salinidad de los suelos sobre los cultivos en general. ....	85
<b>Tabla 3.-</b> Clasificación de los suelos por su sodicidad en base al factor PSI (Porcentaje de Sodio Intercambiable).....	86
<b>Tabla 4.-</b> Clasificación de cultivos en función de su tolerancia frente a sal de acuerdo a los parámetros establecidos por la FAO.....	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.-** Curva de tolerancia frente a salinidad de un cultivo. La ecuación general se modela como  $y = 100 - s(ECs - EC)$  donde, Y= producción del cultivo, EC (t)= valor umbral de conductividad eléctrica de una muestra de extracto de suelo. Es decir, a partir de esta concentración los efectos de la salinidad sobre el cultivo empiezan a ser evidentes, S= pendiente que resulta del porcentaje de productividad esperado por unidad de salinidad añadido sobre el valor umbral de conductividad eléctrica. Con este modelo se puede predecir la disminución en la producción de cualquier cultivo en función de la concentración de sales presente en el suelo.....91

**Figura 2.-** Esquema fundamental del despliegue diferencial. Consiste en cuatro pasos sencillos: extracción de ARN, retrotranscripción utilizando primers de unión a la cola poli A, amplificación con oligonucleótidos cortos y electroforesis en geles de poliacrilamida donde se puede identificar las bandas diferenciales resultantes de algún tratamiento específico. .... 92

**Figura 3.-** Sintomatología observada en plantas de tomate de árbol como resultado de la exposición al estrés abiótico por salinidad. ....93

**Figura 4.-** Gel de agarosa al 2% para la visualización del ARN extraído de hojas de tomate de árbol.....95

**Figura 5.-** Gel de electroforesis en poliacrilamida al 6% que corresponde a las muestras sometidas a 24 horas de exposición al tratamiento con NaCl con 5 de las 10 combinaciones distintas de primers (HT11-A en combinación con HAP1, HAP2, HAP6, HAP7, HAP11). El marcador de peso molecular utilizado fue 10bp de Invitrogen. Cada set de 4 muestras señalado corresponde a una combinación distinta de primers siendo 1: Chaltura con exposición al

tratamiento de NaCl, Chaltura sin exposición al tratamiento de NaCl, Quero con exposición al tratamiento de NaCl, Quero sin exposición al tratamiento de NaCl. .... 96

**Figura 6.-** Tipos de bandas diferenciales encontradas y aisladas en el presente estudio.... 97

**Figura 7.-** Gel de electroforesis en agarosa al 1.5% para mostrar productos de reamplificación de bandas diferenciales extraídas en diferentes tiempos. Se observa diferentes tipos de productos de reamplificación. En los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, y 18 se observan bandas limpias y en el tamaño esperado que se pudo enviar a secuenciar. Los carriles restantes son muestras dañadas que no se pudo secuenciar. Doble banda: carriles 6 y 7; barrido: 20, 21, 22, y 23; múltiples bandas: 8, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 24, 25 y 26. .... 98

**Figura 8.-** Clasificación de las 99 bandas secuenciadas de acuerdo al tipo de complementariedad que presentaron en las bases de datos..... 99

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.-</b> Mezclas de reacción y condiciones para la retrotranscripción del ARN.....	100
<b>Anexo 2.-</b> Mezcla de reacción y condiciones de amplificación de ADNc mediante PCR.	101
<b>Anexo 3.-</b> Mezcla de reacción y condiciones para la reamplificación del ADNc.....	102
<b>Anexo 4.-</b> Fotografías de los ensayos realizados con plantas de tomate de árbol de diferentes accesiones de la Sierra ecuatoriana trasplantadas con raíces a medios con distintas concentraciones de sal. Se puede comparar el efecto del estrés abiótico en distintas accesiones a diferentes tiempos después de inducido el estrés.....	103
<b>Anexo 5.-</b> Secuencias obtenidas de las 99 bandas secuenciadas.....	112

## **1. Introducción**

### **1.1 Estrés abiótico**

El estrés abiótico, que incluye salinidad, temperaturas extremas, toxicidad química y estrés oxidativo representa una de las mayores amenazas para la agricultura y lleva a la destrucción del medio ambiente. El estrés abiótico constituye la causa primaria de pérdida de cultivos en todo el mundo, reduciendo el promedio de rendimiento hasta más de un 50% (Wang et al, 2003). En la Tabla 1 se indica con mayor precisión la afectación que varios cultivos sufren debido al estrés abiótico.

El estrés abiótico conlleva a una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan el crecimiento de las plantas y la productividad. La mayor parte del tiempo los 4 tipos principales de estrés mencionados están interconectados e inducen daño celular muy similar. Por ejemplo, la toxicidad química y la salinización se manifiestan primero como estrés osmótico que desencadena una disrupción de la homeostasis y de la distribución de iones en la célula. Los primeros síntomas que se manifiestan en las plantas afectadas por este tipo de estrés son inhibición del crecimiento, decoloración de hojas y pérdida en el peso seco (Taiz y Zeiger, 1998). El estrés oxidativo, que generalmente está acompañado por altas temperaturas, salinidad o toxicidad causa la denaturación de proteínas. Como consecuencia, este diverso rango de estrés ambiental generalmente activa similares vías de señalización celular y las mismas respuestas celulares como la producción de proteínas de estrés, incremento de anti oxidantes y la acumulación de distintos solutos (Wang et al, 2003). La duración, severidad e intensidad con la cual un tipo de estrés particular se presenta, determinará

la respuesta particular de la planta. Adicionalmente la respuesta de la planta también estará influenciada por características intrínsecas como el órgano que recibió directamente el estrés, edad de la planta y su genotipo particular (Buchanam, et al, 2000).

Durante los últimos años se ha incrementado considerablemente el interés, tanto científico como comercial, por comprender los mecanismos por medio de los cuáles las plantas responden al estrés abiótico. Ya sea por mejoramiento tradicional como por ingeniería genética, el objetivo es manipular estos mecanismos y así incrementar la productividad de los cultivos en áreas afectadas. Este aumento de la productividad busca constituirse una alternativa para evitar la ampliación de la frontera agrícola, frenada tanto por el crecimiento urbano, como por la protección de bosques y áreas protegidas (Buchanam, et al, 2000).

## **1.2 Estrés abiótico**

### **1.2.1 Salinización de los suelos**

Con excepción de la luz, la gran mayoría de componentes del estrés abiótico que afectan la productividad de un determinado cultivo dependen del suelo. Maltratos como inundaciones, compactación, erosión, desecamiento o envenenamiento por acumulación de sales conllevan a que el suelo se vea seriamente afectado y, en consecuencia, esta afectación se traslade en forma proporcional al cultivo que se encuentre en él (Padilla, 2007).

Un problema severo causante de salinización secundaria de los suelos es la irrigación, una buena parte del agua utilizada para irrigación tiene abundancia de sales. El 20% de los suelos agrícolas que son irrigados tienen problemas de afectación por sal; considerando que la tercera parte de la producción agrícola mundial se obtiene utilizando irrigación, es posible comprender porque la salinización constituye un grave problema actual. Los últimos datos publicados por la

FAO sobre salinidad corresponden al 2005, donde se señaló que el 6% del total del suelo cultivable a nivel mundial, es decir, 800 millones de hectáreas de tierra están afectadas por salinidad o sodicidad. La irrigación constituye una causa importante de esta afectación, aunque la mayor parte, conocida como salinidad primaria, se da por causas naturales (Munns, 2005).

La salinidad del suelo se refiere al contenido de sales solubles en el mismo. Las sales son comúnmente mezclas de cloruros, sulfatos, bicarbonatos, nitratos y boratos de sodio, magnesio y calcio. En cualquier caso un exceso en el contenido total de sales, sean individuales o combinación de las mismas en el suelo causa un retraso en el crecimiento de las plantas, daño en los tejidos y decrecimiento en el rendimiento (Padilla, 2007). Un suelo salino es aquel que contiene suficiente cantidad de sal soluble como para reducir su productividad y que no es alcalino, es decir, suelo cuyo pH no es igual ni mayor a 8.5 (Fassbender y Bornemisza, 1987). El pH normal en los suelos agrícolas varía, por lo general, entre 5.5 y 7.5 (Harter, 1983). Los suelos salinos son comunes en regiones semi-áridas o áridas, en regiones próximas a costas marinas por la intrusión del agua de mar y en condiciones continentales se producen principalmente por meteorización de rocas volcánicas, por ascenso capilar de agua freáticas con la consecuente acumulación de sales por evaporación o por la acumulación de sales que dejan las aguas de riego. Otras causas de salinización son, en pequeño grado, las lluvias y el cauce de los ríos (Fassbender y Bornemisza, 1987).

Es posible revertir el proceso de salinización de un suelo. En primer lugar se requiere detener el proceso causante de salinización, por ejemplo, mejorar el sistema de riego. Luego, es necesario un buen lavado asegurando un drenaje adecuado para la eliminación de sales disueltas. En seguida se deben corregir las deficiencias o excesos de nutrimentos que pueden producirse

por el lavado y entonces se puede introducir una especie vegetal con aceptable tolerancia a un cierto nivel de salinidad. Por ejemplo, una opción ampliamente utilizada es el arroz inundado que ha sido ampliamente utilizado para recuperar suelos tanto por la existencia de variedades tolerantes como por la elevada necesidad de agua que lo caracteriza. Después del proceso de recuperación, el suelo puede una vez más ser utilizado para especies un poco menos tolerantes (Fassbender y Bornemisza, 1987).

Otra alternativa para enfrentar el problema de la salinidad es el desarrollo de cultivares tolerantes que contribuirán a aminorar la expansión de salinidad secundaria, así como posibilitarán la utilización de suelos que sufren de salinidad primaria como terrenos agrícolas (Munns, 2005).

### **1.2.2 Medida de la salinidad de los suelos**

La concentración de sales en una solución de suelo es directamente proporcional a la cantidad de corriente eléctrica que puede ser transmitida a través de ella. Por eso la salinidad se mide por la conductividad del extracto acuoso saturado (ECe) en el cuál la relación entre suelo y agua debe ser menor a la proporción 1:1 (Fassbender y Bornemisza, 1987).

La resistencia al paso de la corriente eléctrica se mide usando un Ohmetro, que se basa en la ley de Ohm que puede ser expresada con la siguiente ecuación:

$$\textit{Intensidad de la corriente} = \frac{\textit{Diferencia de potencial}}{\textit{Resistencia}}$$

La conductancia es el recíproco de la resistencia, es decir, la mayor facilidad que pueda existir al paso de la corriente eléctrica y se la expresa en S/m (siems por metro) o en dS/m (decisiems por metro) (Padilla, 2007).

El conductímetro consiste en dos celdas de platino que se conectan entre sí por el agua que pasa entre ellas, de allí que mientras más concentradas están las sales en esa solución, mayor es el paso de la corriente. Los índices de clasificación de los suelos en cuanto a la salinidad y los niveles críticos considerados para evaluar la tolerancia de los cultivos al exceso de sales se basan en la conductividad eléctrica del extracto de saturación a 25°C (Padilla, 2007).

La conductividad eléctrica para el extracto de saturación (CEe) está directamente relacionada con el contenido de sales en la solución del suelo. En 1984 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos elaboró un resumen del impacto de la salinidad sobre la producción vegetal que se puede apreciar en la Tabla 2.

A partir de este concepto se generaliza que un suelo salino es aquel que posee una conductividad eléctrica mayor a 4dS/m (Fassbender y Bornemisza, 1987).

Las unidades de salinidad expresadas en dS/m, pueden ser convertidas a unidades de concentración cuando se conoce la naturaleza de la sal predominante de acuerdo a la siguiente conversión:

$$ppm \text{ a } \frac{dS}{m} = ppm \times 0.0017$$

$$\frac{dS}{m} \text{ a } ppm = \frac{dS}{m} + 0.0017 \text{ (Bagley, C. et al, 2004).}$$

Dentro del estudio de la salinidad de los suelos resulta de gran interés el porcentaje que el sodio representa respecto a los demás cationes adsorbidos. Este porcentaje, expresado en meq/100g se denomina porcentaje de sodio intercambiable. PSI, tal que:

$PSI = \frac{meqNa/100g}{CICE} \times 100$ , donde CICE es la capacidad de intercambio catiónico del suelo, parámetro que determina en forma experimental.

De acuerdo al PSI, los suelos se clasifican como se indica en la Tabla 3.

Finalmente, otro indicador importante de un suelo salino es la relación de adsorción de sodio que mide fundamentalmente la proporción que existe entre Na y Ca y Mg, ésta se define como:

$Ras = \frac{Na}{\sqrt{\frac{Ca+Mg}{2}}}$ , los cationes se expresan en meq/L (Padilla, 2007).

### 1.3 Efectos generados por la salinidad en las plantas

El incremento de sales en el suelo dificulta la capacidad de las raíces para absorber agua. A medida que los índices salinos se incrementan se produce un progresivo decrecimiento en el desarrollo y rendimiento. Los principales efectos causados por la salinidad son:

- Se reduce la disponibilidad del agua para la planta por el decrecimiento del potencial osmótico. La gradiente osmótica entre la solución del suelo y la interna deja de ser lo suficientemente grande como para mover agua hacia dentro de la planta.
- La concentración alta de sales puede generar efectos tóxicos para la planta.

- Se produce un desbalance nutricional, la alta concentración de sales altera la disponibilidad de otros nutrientes (Padilla, 2007).

El daño originado por la sal en la planta puede ser entendido en dos fases. En primer lugar, la reducción en la capacidad de la planta para absorber agua, que se denomina efecto osmótico o déficit de agua por salinidad y que se refleja en un crecimiento más lento. La segunda fase implica daño propiamente dicho a tejidos y células, que sería el efecto específico de la sal o efecto de exceso de iones. En esta fase además de la reducción de crecimiento se puede apreciar daño en las células (Munns, 2005).

Durante la primera fase, la afectación de la planta consiste exclusivamente en la reducción en la velocidad de crecimiento pero no se produce muerte celular. Esto se debe a que los tejidos meristemáticos están irrigados únicamente por floema en el cuál los iones están excluidos y las células de elongación rápida acomodan la sal que les llega en vacuolas de modo que no se ven afectadas. En la fase dos, por el contrario, el daño se debe al efecto de la sal dentro de las células. La sal absorbida se concentra primero en células viejas y después continúa su transporte a células jóvenes. Cuando la concentración de sal es muy alta la célula finalmente muere. Esta muerte se produce por la incapacidad de las células para compartamentalizar la sal en vacuolas, la inhibición de la actividad enzimática y la deshidratación (Munns, 2005).

#### **1.4 Tolerancia a estrés abiótico**

Los mecanismos de resistencia frente a estrés abiótico se agrupan en dos categorías: mecanismos de escape que previenen la exposición al estrés y mecanismos de tolerancia que permiten que la planta sobreviva resistiendo la presencia del estrés.

Una respuesta a un tipo de estrés inicia cuando en la planta se reconoce el estrés a nivel celular. Una vez que el estrés es reconocido se activan vías específicas de transducción de señales que transmiten información que finalmente se convierte en una respuesta integrada de toda la planta que modifica su crecimiento, desarrollo e incluso sus capacidades reproductivas. Se conoce poco acerca de la forma en que las plantas reconocen el estrés. En levaduras y bacterias se han identificado proteínas que inician una transducción de señales una vez que el estrés abiótico está presente. Se piensa que las plantas podrían tener algunas proteínas de naturaleza parecida. Se tiene bastante evidencia de que la respuesta al estrés está mediada por la intervención de hormonas, específicamente el ácido abscísico, ácido jasmónico, etileno y por mensajeros secundarios como el calcio (Buchanam, et al, 2000). Además, en respuesta al estrés algunos genes son sobreexpresados, mientras que otros son reprimidos. Los productos proteicos de los genes inducidos, por lo general, se acumulan mientras dura la presencia del estrés (Vij y Tyagi, 2007).

#### **1.4.1 Concepto de tolerancia a la salinidad**

La tolerancia de una planta a la salinidad se ha entendido como la capacidad inherente de una planta para sobrellevar los efectos de concentraciones elevadas de sal en la zona radicular o en la superficie sin presentar efectos adversos significativos. La tolerancia se puede medir en forma simplificada en base a la siguiente ecuación:

$$y = 100 - s(EC_s - EC) \text{ donde,}$$

Y= producción del cultivo

EC= valor umbral de conductividad eléctrica de una muestra de extracto de suelo, es decir a partir de esta concentración los efectos de la salinidad sobre el cultivo empiezan a ser evidentes.

S= pendiente que resulta del porcentaje de productividad esperado por unidad de salinidad añadido sobre el valor umbral de conductividad eléctrica (Brouwer et al, 1985).

Una curva básica de tolerancia frente a salinidad se puede observar en la Figura 1.

De acuerdo a la FAO, los cultivos altamente tolerantes resisten concentraciones de sal en el extracto de saturación mayores a 10g/L. Los moderadamente tolerantes mayores a 5g/L y las sensitivas menores a 2.5g/L. En base a estas concentraciones algunos ejemplos de cultivos en relación a su tolerancia frente a salinidad se presentan en la Tabla 4 (Brouwer et al, 1985).

#### **1.4.2 Vías fisiológicas de tolerancia a estrés por salinidad**

Los mecanismos de tolerancia a salinidad consisten en minimizar la cantidad de sal absorbida en las raíces, así como reducir el efecto osmótico y de exceso de iones que se mencionó anteriormente.

Los mecanismos relacionados al control del efecto osmótico en las plantas son inducidos no solo por salinidad sino por una forma más global de estrés abiótico: estrés hídrico. Estos mecanismos se producen principalmente por regulación hormonal. Uno de los reguladores hormonales es el ácido abscísico (ABA). Se ha encontrado un incremento en sus concentraciones en el xilema como resultado de estrés hídrico (Munns, 2005). Se desconoce las vías de señalización exactas que promueven la biosíntesis del ABA, pero se piensa que participa la vía de señalización por calcio y cascadas de fosforilación (Zhu, 2002). Otro regulador importante es el ácido jasmónico, las vías de regulación de este compuesto todavía no están bien

comprendidas pero actúa como regulador transcripcional de muchos genes que participan en la respuesta a salinidad en plantas (Sairam y Tyagi, 2004).

La vía más común de exclusión de iones ocurre al momento de la absorción desde las raíces. Las plantas transpiran alrededor de 50 veces más agua de la que retienen en las hojas. Esto implica que al reducir la transpiración, absorber 1/50 parte de agua sería suficiente para llevar a cabo todas las funciones metabólicas. De ser así, se estaría reduciendo el 98% del ingreso de sal a la planta, lo cual permitiría tolerar la presencia de sal por tiempos prolongados. Las plantas tolerantes a suelos salinos tienen capacidades de exclusión elevadas. Por ejemplo, algunas variedades de trigo presentan una exclusión cercana al 98%. Al ser sometidas a una concentración de 50mM de NaCl toleran esta concentración por tiempo indefinido y la concentración de sal en las hojas se mantiene siempre por debajo de 50mM. Por el contrario, la cebada excluye concentraciones muy inferiores al 98%. Después de cierto tiempo de exposición a estrés salino, se ha llegado a encontrar concentraciones de sal en los tejidos de 500mM (Zhu, 2002).

El control del efecto por exceso de iones causado por la salinidad se relaciona con la capacidad de la planta de mantener niveles de iones controlados en el citosol de las células. Para el ión  $\text{Na}^+$ , por ejemplo, se ha definido que una concentración tolerable está entre 10 y 30mM, para el  $\text{Cl}^-$ , las concentraciones toleradas no se han definido (Zhu, 2002).

El primer mecanismo identificado para mantener bajas las concentraciones de sal en el citosol se denomina SOS (salt overly sensitive genes). Esta respuesta se dispara por una señal que incluye al calcio como mensajero y factor transcripcional de varios genes que incluyen cinasas, ATPasas y proteínas antiportes. En conjunto, los reguladores SOS controlan el ingreso

de iones a las células y regulan a su vez la producción de osmolitos de los cuales se habla más adelante (Zhu, 2002).

Otra vía para mantener bajos los niveles de iones es la eliminación de iones de sal a través del floema. Se ha probado que las plantas no tolerantes a salinidad tienen problemas en la translocación de sal al floema, mientras que en plantas tolerantes los niveles de sal medidos en el floema llegan incluso a superar las concentraciones en el xilema (Munns, 2005).

La compartimentalización de la sal, también mantiene los niveles bajos en el citosol. Los lugares principales donde se almacenan sales son la base de las hojas, el tallo o vacuolas dentro de la célula (Sahi et al, 2006).

Otra vía de tolerancia ampliamente estudiada se denomina ajuste osmótico, que consiste en el aumento del número de partículas disueltas en las células vegetales como una medida para mantener el potencial hídrico dentro de la célula menor al del suelo. Los compuestos que participan en el ajuste osmótico se denominan osmolitos. Estos compuestos tienen la particularidad de ser altamente solubles y no interferir en el metabolismo vegetal ni siquiera en altas concentraciones. La síntesis y acumulación de osmolitos es una característica universal en las plantas, sin embargo, la distribución de osmolitos particulares varía entre diferentes especies. Algunos de los osmolitos más conocidos son: el aminoácido prolina, la  $\beta$ - alanina, glicina, azúcares monoméricos como glucosa y fructosa, etc. A diferencia de los iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  que interfieren con la estructura de las proteínas, los solutos compatibles (osmolitos) no causan ninguna interferencia (Sairam y Tyagi, 2004). La producción de osmolitos en las células es controlada por varios mecanismos como el SOS y cascadas de fosforilación mediante MAP cinasas (Zhu, 2002).

Además de su intervención en el ajuste osmótico, se ha comprobado que los osmolitos tienen una función osmoprotectiva. Por ejemplo, la glicina betaína previene la inactivación de RUBISCO inducida por salinidad, así como la desestabilización del complejo oxígeno-envolvente del fotosistema II (PSII). Adicionalmente, se ha encontrado funciones antioxidantes a osmolitos como prolina, sorbitol, mio-inositol y manitol (Buchanam, et al, 2000; Zhu, 2001). La acción antioxidante de los osmolitos es esencial debido a que la presencia de sal incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxil. Además de los osmolitos, la tolerancia a estrés salino involucra la sobreexpresión de genes codificantes de enzimas antioxidantes como glutathione- S- transferasa y glutathione peroxidasa (Sairam y Tyagi, 2004).

#### **1.4.3 Genes candidatos de tolerancia a estrés salino con potenciales usos en programas de mejoramiento**

La comprensión de los mecanismos de control para tolerancia a estrés abiótico que puede conducir al uso de herramientas moleculares para generar plantas más tolerantes se basa en la expresión de genes específicos relacionados al estrés, los principales se incluyen en las siguientes categorías:

- i) Genes involucrados en cascadas de señalización y control transcripcional como MyC, MAP cinasas, SOS cinasas, fosfolipasas y factores transcripcionales como HSF y las familias CBF/DREB y ABF/ABAE (Wang, 2003).
- ii) Genes que funcionan directamente en la protección de membranas y proteínas, como heat shock proteins (Hsps), chaperonas, late embryogenesis abundant proteins (LEA), y proteínas osmoprotectoras (Wang, 2003).

- iii) Genes cuyos productos están involucrados en la asimilación de agua e iones y su transporte como acuaporinas y transportadores de iones (Wang, 2003).
- iv) Genes que promueven la biosíntesis de osmolitos (Zhang et al, 2000).
- v) Genes que codifican para proteínas con función antioxidante (Zhang et al, 2000).

Los genes candidatos para aumentar la tolerancia de un cultivo frente a salinidad pueden ser categorizados en tres grupos: genes que controlan la asimilación y transporte de las sales, genes que tienen una función osmótica o protectora y genes que pueden hacer que una planta crezca más rápidamente en suelos salinos.

Al contrario de plantas modificadas para resistencia a plagas y herbicidas que suelen ser características monogénicas; las respuestas frente a estrés abióticos son complejas y mucho más difíciles de controlar y manipular (Sairam y Tyagi, 2004). La ingeniería genética desarrollada en este campo se basa en la transferencia de uno o más genes involucrados en la señalización y regulación de vías metabólicas que conllevan a la síntesis de protectores funcionales y estructurales como antioxidantes o proteínas de estrés metabólico. Los esfuerzos desarrollados para mejorar la tolerancia de las plantas mediante transformación genética han mostrado ciertos logros. Sin embargo, la complejidad e interacción de los mecanismos que todavía no terminan de dilucidarse vuelven a esta tarea extremadamente compleja (Wang, 2003).

### **1.5 Análisis del Transcriptoma como una herramienta para identificar genes**

Se considera que a partir de la década de 1990 inició la era de la genómica, las primeras especies vegetales cuyo genoma fue secuenciado fueron *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. Sin embargo, apenas empezaron a secuenciarse genomas completos, inició la necesidad de comprender como la plasticidad de la expresión génica era capaz de responder ante cualquier

estímulo. El análisis del transcriptoma y la proteómica surgieron como herramientas fundamentales de análisis para la comprensión de dicha plasticidad. Mediante el análisis del transcriptoma es posible identificar genes analizando el ADN complementario (ADNc), copia del ARNm. Este análisis descarta intrones y regiones intergénicas cuya función todavía no está completamente dilucidada. El ARNm cubre entre 1 y 3% del genoma de eucariotas (Dunwell et al, 2001). Se han desarrollado varias metodologías para analizar el transcriptoma de organismos eucariotas. El primero fue el despliegue diferencial, desarrollado en 1992 y que se describe más adelante. Otra técnica es el ADNc- AFLP que se fundamenta en la amplificación selectiva de moléculas de ADN de un pool completo. Esto se logra mediante la técnica AFLP (amplified fragment length polymorphism) adicionando adaptadores de doble cadena en los extremos de los fragmentos de restricción obtenidos que sirven como sitios de adaptación para los primers durante la amplificación (Dunwell et al, 2001). Finalmente, la técnica más popular hoy en día es la técnica de los microarrays. La popularidad de esta técnica se debe a que permite estudiar simultáneamente todos los ARNm`s expresados en un momento particular de la célula. Para esto se utiliza copias de ADNc, DNA, u ORFs fijos en un array o chip y mediante un robot se coloca en lugares específicos del array una solución de los ADNc de interés aislados. Mediante hibridación selectiva y revelación por fluorescencia es posible identificar los genes conocidos que se expresaron en un momento específico de la célula o bajo un estímulo particular (Thieman y Palladino, 2010).

### **1.5.1 Técnica molecular utilizada en este estudio para la identificación de genes: Despliegue Diferencial**

En 1992 los doctores Arthur Pardee y Peng Liang desarrollaron la técnica del despliegue diferencial. Este método se utiliza para amplificar transcritos expresados en una célula en un momento específico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. El fundamento de la técnica es usar primers que se unan al extremo 5' de la cola poli A de ARNm. Se realiza una retrotranscripción para generar subpoblaciones de transcritos que después se reducen todavía más al realizar una amplificación con primers de secuencias cortas arbitrarias (Liang, et al., 1994). Las subpoblaciones de transcritos generadas pueden ser visualizadas y comparadas en geles de poliacrilamida. Un esquema específico de cómo funciona la técnica se muestra en la Figura 2.

Como primer paso los ARNm celulares se retrotranscriben a ADNc de simple cadena utilizando tres primers oligo dT con la última T en el extremo 3' sustituida por otro nucleótido. Con esto se obtiene tres poblaciones de ADNc que después se amplifican con un segundo set de primers que son pequeños y de secuencia al azar. La longitud del primer está diseñada para por probabilidad reconocer entre 50 y 100 ARNm en una reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los amplificados se despliegan utilizando PAGE (electroforesis en poliacrilamida) y finalmente se comparan los patrones de ADNc obtenidos entre distintas muestras de ARN. Por último, las bandas identificadas pueden ser extraídas, clonadas y secuenciadas para posterior caracterización molecular (Liang, 2002).

Estadísticamente se ha demostrado que utilizando entre 80 a 120 combinaciones de primers se puede cubrir todo el transcriptoma de una célula en un determinado momento (Liang et al., 1994).

Las primeras ventajas del despliegue diferencial son:

- Simplicidad: Se basa en métodos simples, prácticamente PCR y electroforesis que no requieren información bioquímica sobre las proteínas ni información previa del genoma de una especie.
- Sensibilidad: Se requiere cantidades muy pequeñas de material de partida. Entre 5 a 100mg de ARN total son suficientes para cubrir la mayor parte de los ARNm presentes en un determinado momento.
- Reproducibilidad: Se ha demostrado que aproximadamente el 99% de las bandas expresadas se pueden reproducir.
- Versatilidad: Se puede comparar más de dos muestras simultáneamente, es posible identificar tanto genes sobreexpresados como subexpresados y por utilizar primers generados randómicamente es útil para cualquier especie eucariota.
- Capacidad de detección de genes nuevos: Permite identificar genes nuevos que no han sido previamente reportados ni secuenciados (Yamazaki y Saito, 2002).

Una de las principales desventajas del despliegue diferencial es la generación de falsos positivos. Sin embargo, este problema se ha resuelto de una manera satisfactoria mediante el perfeccionamiento de los primers: utilizando primers con una letra adicional en el extremo 5' para la retrotranscripción y oligonucleótidos de 13 pares de bases para la amplificación, no de menor tamaño (Liang, 2002).

El despliegue diferencial ha sido utilizado en estudios de biología del desarrollo, cáncer, neurociencia, patología, endocrinología, fisiología vegetal, entre otros campos. (Yamazaki y Saito, 2002). Mediante esta técnica también se han reportado algunos estudios para identificar genes relacionados con la respuesta a salinidad (Yamazaki y Saito, 2002).

### **1.6 Especie en estudio: tomate de árbol**

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es un cultivo andino cuyo centro de origen y diversidad se encuentra en Perú, Ecuador y Colombia. Es una baya aromática de forma ovoidal, cubierta por una cáscara gruesa, lisa y brillante de sabor amargo que puede ser de varios tonos: ladrillo, rojo, naranja y amarillo, según la variedad. En el interior, el color de la pulpa también varía entre tonos naranja, rojo y amarillo. Hasta el momento se conocen 6 variedades morfológicas reconocidas por los agricultores: amarillo puntón, amarillo gigante, amarillo bola, morado puntón, morado gigante y morado bola (SICA, 2004).

En el Ecuador, el tomate de árbol se cultiva prácticamente en toda la Sierra, siendo las principales zonas de cultivo Salinas, Ibarra, Ambuquí, San Gabriel, Bolívar, Pimampiro, Atuntaqui, Tumbaco, Puembo, Tambillo, Latacunga, Salcedo, Pelileo, Huachi, Patate, Baños, Biblián, Gualaceo, Paute, Girón, Santa Isabel y Loja. El cultivo presenta graves problemas como la inexistencia de plantas certificadas y la diseminación de nemátodos que ha causado considerables pérdidas en la producción, destrucción de poblaciones enteras y la imposibilidad de consolidar un programa de exportación de la fruta (SICA, 2004).

El cultivo no requiere condiciones agroecológicas muy exigentes. Crece en clima templado seco y sub cálido húmedo, temperatura entre 13 y 24°C, humedad entre 70 y 80%,

pluviosidad entre 600 y 1500mm, altitud entre 1800 y 2800 msnm en bosques húmedos montano bajo y secos montano bajo. En cuanto a los requerimientos edáficos, se lo encuentra en suelos francos, franco arenosos, con buen drenaje aireación y que sean ricos en materia orgánica (Morton, 1987).

El consumo de tomate de árbol ha tenido un incremento significativo en los últimos años principalmente en Colombia y Ecuador. Esto se debe a las cualidades físicas, nutritivas y organolépticas que presenta el fruto. Principalmente el alto contenido de vitamina A, vitamina C y antioxidantes (Feicán, C. et al, 1999). Actualmente, el tomate de árbol se encuentra entre los 25 cultivos de mayor producción en el país con 2308 ha anuales en el 2011 (MAGAP, 2013).

Las condiciones requeridas para el cultivo de tomate de árbol son muy amplias y muchas son zonas secas y afectadas por diversos tipos de estrés abiótico, a pesar de lo cuál el cultivo produce fruto todo el año (Feicán, C. et al, 1999; Barriga, S., 2003). Estas propiedades y el hecho de que se conoce muy poco acerca de la genética de cultivos andinos, vuelven al tomate de árbol un candidato interesante para estudiar su respuesta frente a diferentes tipos de estrés abiótico.

En el presente estudio se compara la tolerancia frente a estrés salino de diferentes accesiones de tomate de árbol recolectadas de diferentes localidades de la Sierra ecuatoriana. Además se utiliza despliegue diferencial para estudiar cambios en la expresión génica inducidos por salinidad en esta especie. Mediante el aislamiento de bandas diferenciales entre plantas sometidas y no sometidas a una concentración de 100mM de cloruro de sodio es posible identificar genes con potencial función en la tolerancia del tomate de árbol a salinidad.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

- Identificar genes expresados diferencialmente en respuesta a estrés abiótico por salinidad en tomate de árbol, utilizando la técnica de despliegue diferencial.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar las accesiones de tomate de árbol más y menos tolerantes frente a salinidad entre las comparadas de tres provincias de la Sierra ecuatoriana.
- Establecer la máxima concentración de cloruro de sodio (NaCl) que las plantas de tomate de árbol toleran.
- Estandarizar la técnica de despliegue diferencial en tomate de árbol.
- Identificar genes de respuesta a estrés salino en tomate de árbol.

## **3. Área de Estudio**

La recolección del material vegetal se realizó en tres provincias de la Sierra ecuatoriana. En la provincia de Imbabura se recolectó en 4 localidades: Santiago del Rey, Imbaya, Violeta, Chaltura. En la provincia de Tungurahua en 3: Quero, Ambato y Cevallos y de la provincia de Pichincha se tomó frutos de la Estación del INIAP en Tumbaco. El cultivo *in vitro* del tomate de árbol así como los análisis moleculares de identificación de genes se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. La

secuenciación de los ADNc diferenciales candidatos a respuesta a estrés se realizó en la empresa Functional Biosciences en Wisconsin, Estados Unidos.

#### **4. Justificación**

La salinidad es uno de los factores abióticos de mayor impacto en la agricultura, de acuerdo a la FAO afecta al 6% de los suelos cultivables en el mundo (Munns, 2005). El impacto de la salinidad varía de acuerdo al grado de afectación de la tierra y a la especie vegetal, pero se calcula que puede reducir hasta en un 50% la producción de biomasa de determinados cultivos (Zhu, 2002). La salinización de los suelos es un problema que se incrementa día a día, principalmente debido a la irrigación y la fertilización artificial. La salinización creciente, sumada al incremento de la población y la demanda cada vez mayor suelos cultivables tanto para alimentación como para biocombustibles, vuelve indispensable la investigación para desarrollar cultivos tolerantes a este grave problema de la agricultura.

Durante los últimos años, se ha investigado mucho respecto a las respuestas fisiológicas de las plantas a la salinidad y, sobre todo, a las diferencias en estos mecanismos que hacen que unas plantas toleren de mejor manera el estrés en comparación con otras. El desarrollo de técnicas de análisis del transcriptoma ha permitido obtener información respecto a estas respuestas, que hoy se conoce son multigénicas, complejas y multifactoriales (Vij y Taygi, 2007).

Una de las técnicas más sencillas de identificación de genes asociados a una respuesta particular es el despliegue diferencial, desarrollado en 1992 y que ha sido ampliamente utilizado debido a su simplicidad, sensibilidad y reproducibilidad. Por medio de esta técnica se han

llevado a cabo varios estudios de respuesta de plantas frente a salinidad (Yamazaki y Saito, 2002).

En busca de mecanismos de respuesta a sal que proporcionen elementos para el mejoramiento de los cultivos en relación a su tolerancia al estrés abiótico se han estudiado una amplia diversidad de especies, sobre todo aquellas que sobreviven en zonas muy afectadas por estrés así como las de mayor importancia para la industria agrícola. Dentro de las Solanaceas, los principales modelos biológicos de referencia han sido el tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Vij y Taygi, 2007). A partir de estos tres cultivos se ha logrado identificar una serie de mecanismos moleculares de respuesta a estrés salino. Sin embargo, no se ha estudiado, hasta el presente trabajo, ningún cultivo andino no tradicional.

El tomate de árbol es uno de los 25 cultivos de mayor producción en el país, en el 2011 la superficie cosechada fue de 2 308ha (MAGAP, 2013). El tomate de árbol tiene un elevado potencial de expansión en mercados nacionales e internacionales debido a su exótico sabor y elevado contenido de vitamina C. Adicionalmente, es una especie versátil que se adapta a un amplio rango de ambientes y suelos también afectados por salinización (Feicán et al, 1999).

En base a estos antecedentes, el presente proyecto busca utilizar la técnica del despliegue diferencial para comprender diferencias transcripcionales que permiten al tomate de árbol tolerar estrés abiótico por salinidad, constituyéndose el primer proyecto de análisis de expresión de genes de tolerancia a estrés abiótico en un cultivo andino.

## **5. Materiales**

### **5.1 Material vegetal**

- Semillas de tomate de árbol recolectadas de 3 provincias de la Sierra ecuatoriana
  - Pichincha: colección de la Estación Tumbaco del INIAP
  - Tungurahua: Ambato, Cevallos y Quero
  - Imbabura: Santiago del Rey, Imbaya, Violeta, Chaltura
- Plantas de tomate de árbol cultivadas *in vitro*

### **5.2 Cultivo in vitro**

#### **5.2.1 Esterilización de semillas de tomate de árbol**

- Solución de alcohol potable al 70%
- Solución de hipoclorito de sodio al 2.5%
- Tween 20
- Agua destilada estéril

#### **5.2.2 Medio utilizado para germinación de semillas y subcultivo de tomate de árbol**

- Medio MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30gL<sup>-1</sup>, Bacto Agar Difco™ 7gL<sup>-1</sup>, pH 5.8

#### **5.2.3 Medio utilizado para inducir estrés abiótico por salinidad a las plantas**

- Medio MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30gL<sup>-1</sup>, Bacto Agar Difco™ 7gL<sup>-1</sup>, pH 5.8, NaCl Fisher Scientific™ en concentraciones desde 50mM hasta 250mM

#### **5.2.4 Equipos utilizados para el cultivo in vitro de tomate de árbol**

- Potenciómetro Orion Star A111 Thermo Scientific™
- Autoclave Trident EA632
- Cámara de Flujo Laminar Labconco 37500-05

#### **5.3 Extracción de ARN de hojas de tomate de árbol**

- Plantas de tomate de árbol cultivadas in vitro en medio control (MS sin NaCl) y en medio tratamiento (MS + NaCl 100mM) en períodos de tiempo de 3, 9, 12, 24, 36 y 48 horas de exposición al estrés
- Dietil Pirocarbonato (DEPC) Sigma Aldrich™ al 0.1%
- Trizol Reagent Invitrogen™
- Cloroformo 37% Merck™
- Isopropanol Merck™
- Buffer citrato (0.8M citrato monosódico Merck™, 1.3M NaCl Fisher Scientific™, agua tratada con DEPC Invitrogen™)
- Solución de etanol absoluto J.T. Baker™ al 75%
- Agua tratada con DEPC Invitrogen™
- Tubos Eppendorf tratados con DEPC
- Morteros lavados con DEPC y autoclavados
- Pinza y bisturí lavados con DEPC y autoclavados
- Microcentrífuga 5415R Eppendorf™

#### 5.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

- Nanodrop 1000 Thermo Scientific™

#### 5.5 Retrotranscripción de ARN de tomate de árbol

- Agua tratada con DEPC Invitrogen™
- dNTP Mix 10µM Invitrogen™
- Primer H-T11C o H-T11A RNAimage ARNm Differential Display system GenHunter™ Corporation™
  - o Secuencia H-T11A 5'-AAGCTTTTTTTTTTTA-3'
  - o Secuencia H-T11C 5'-AAGCTTTTTTTTTTTC-3'
- SuperScript III Transcriptasa Reversa Invitrogen™ 200U
- Buffer 5X First Strand Invitrogen™
- DTT (Dithiothreitol) 0.1M Invitrogen™
- Muestras de ARN total de tomate de árbol diluidas a 100ng/UL
- Microcentrífuga 5415D Eppendorf™
- Termociclador T personal Biometra™

#### 5.6 Amplificación ADNc

- Agua tratada con DEPC Invitrogen™
- dNTP Mix 10µM Invitrogen™
- Primers H-AP1, H-AP2, H-AP3, H-AP4, H-AP6, H-AP7, H-AP11, H-AP12 RNAimage ARNm Differential Display system GenHunter™ Corporation™
  - o Secuencia H-AP1 5'- AAGCTTGATTGCC- 3'

- Secuencia H-AP2 5'- AAGCTTCGACTGT- 3'
- Secuencia H-AP3 5'- AAGCTTTGGTCAG- 3'
- Secuencia H-AP4 5'- AAGCTTCTCAACG- 3'
- Secuencia H-AP6 5'- AAGCTTGCACCAT- 3'
- Secuencia H-AP7 5'- AAGCTTAACGAGG- 3'
- Secuencia H-AP11 5'- AAGCTTCGGGTAA- 3'
- Secuencia H-AP12 5'- AAGCTTGAGTGCT- 3'
- Taq DNA Polimerasa Recombinante Invitrogen™ 5U/μL
- Buffer 10X para PCR Invitrogen™
- Cloruro de Magnesio 50mM Invitrogen™
- Microcentrífuga 5415D Eppendorf™
- Termociclador T personal Biometra™

### **5.7 Electroforesis en agarosa**

- Agarosa LE Axygen™
- Ladder 100bp Axygen™
- Tris Base Invitrogen™
- Ácido bórico Amp™
- EDTA Invitrogen™
- Cámara de electroforesis Enduro Gel XL Labnet™
- Fotodocumentador Gel Doc XR Bio-Rad™

## 5.8 Electroforesis en Poliacrilamida al 6%

- TBE 10x (Tris base Invitrogen™ 108g/L, Ácido bórico Amp™ 55g/L, EDTA Invitrogen™ 7.44g/L)
- Solución poliacrilamida 6% (Acrilamida Invitrogen™ 57g/L, Bisacrilamida Invitrogen™ 3g/L, TBE 1x, Urea Invitrogen™ 300g/L)
- Persulfato de amonio J.T. Baker™ 10%
- Temed Invitrogen™
- Alconox™
- Ladder 10bp (Ladder 10bp Invitrogen™ 20%, Bluejuice Invitrogen™ 10%)
- Loading Dye (0.01% azul bromofenol, 0.01% xilencianol, urea Invitrogen™ 5M, glycerol Fisher™)
- Blue juice Invitrogen™
- Solución Alcohol absoluto J.T. Baker™, ácido acético glacial Merck™ 0.5%
- Bind Silane (3- Methacryloxypropyltrimethoxysilane) Sigma Aldrich™
- Alcohol potable al 70%
- Cámara Vertical de electroforesis BioRad™ Sequi- Gen GT
- Fuente de poder BioRad PowerPac HV
- Solución Fijación/ Parada (Alcohol Absoluto J.T. Baker™ 10% v-v, Ácido Acético Glacial Merck™ 0.5% v-v)
- Solución Tinción (Nitrato de Plata Fisher Scientific™ 2g/L, Formaldehído J.T. Baker™ 37% 0.00015% v-v)

- Solución Revelado (Hidróxido de Sodio Merck™ 15g/L, Formaldehído J.T. Baker™ 37% 0.0002% v-v)
- Transiluminador
- Cámara de Fotos Canon EOS Rebel T1i™

### **5.9 Extracción de Bandas a partir de geles de Acrilamida**

- TE (Tris HCl Invitrogen™ 10mM, EDTA Invitrogen™ 0.1mM)
- Centrífuga con Agitación MaxQ 4000 Barnstead Lab Line™

### **5.10 Reamplificación ADNc**

- Agua tratada con DEPC Invitrogen™
- dNTP Mix 10μM Invitrogen™
- Primers H-T11A, H-T11C, H-AP1, H-AP2, H-AP3, H-AP4, H-AP6, H-AP7, H-AP11, H-AP12 RNAimage ARNm Differential Display system GenHunter™ Corporation™
- Taq DNA Polimerasa Recombinante Invitrogen™ 5U/μL
- Buffer 10X para PCR Invitrogen™
- Cloruro de Magnesio 50mM Invitrogen™
- Microcentrífuga 5415D Eppendorf™
- Termociclador T personal Biometra™

### **5.11 Identificación de genes candidatos**

- Muestras de ADNc secuenciadas en la empresa Functional Biosciences mediante la tecnología de microfluidos

- Software Staden Package Program (PreGAP y GAP)
- Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.05)
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de NCBI
- *A. thaliana* GB experimental ADNc/EST BLAST de Tair

## **6. Métodos**

### **6.1 Colección del material vegetal**

Se recolectó frutos de tomate de árbol en 8 localidades de 3 provincias de la Sierra ecuatoriana que se mencionan en la sección 5.1 (Material Vegetal). Las semillas fueron extraídas de los frutos y secadas por 48 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se las pudo sembrar *in vitro*.

### **6.2 Cultivo in vitro**

#### **6.2.1 Siembra de semillas**

Las semillas sembradas *in vitro* pasaron previamente por un proceso de desinfección que consistió en un lavado con alcohol al 70% por 3 minutos, seguido de una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 2.5% + tween 20 durante 15 minutos con agitación constante. Finalmente se hizo varios lavados con agua destilada estéril para eliminar todos los restos del desinfectante. Luego, las semillas fueron colocadas en el medio de cultivo MS con 30gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 7gL<sup>-1</sup> de Bacto Agar, pH 5.8. Se colocó 15 semillas por cada frasco. Se esperó que las semillas germinen para tener material vegetal para el resto de ensayos. Adicionalmente, se sembró las semillas en medio MS con distintas concentraciones de NaCl (50mM, 75mM,

100mM, 150mM y 200mM). Todos los frascos fueron almacenados en el cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz- 8 horas oscuridad a una temperatura promedio de 22°C.

### **6.2.2 Subcultivo de plántulas de tomate de árbol**

Una vez germinadas las semillas de tomate de árbol en medio MS basal, las plántulas fueron subcultivadas mediante la técnica del nudo simple en MS basal para propagar material vegetal.

Por otro lado, se utilizó también la técnica de nudo simple para realizar subcultivos en medio MS con distintas concentraciones de NaCl (50mM, 75mM, 100mM, 120mM, 150mM y 200mM) con el fin de evaluar el crecimiento de las plantas en presencia de sal.

Todos los frascos permanecieron en el cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz- 8 horas oscuridad a una temperatura promedio de 22°C.

### **6.2.3 Evaluación de la tolerancia de las plantas a estrés por salinidad**

Para evaluar la tolerancia de las plantas de tomate de árbol cultivadas in vitro a salinidad, plántulas de aproximadamente 3cm crecidas in vitro y con raíces se trasplantaron a medio MS con diferentes concentraciones de NaCl (75mM, 100mM, 120mM, 150mM, 175mM, 200mM y 250mM). Se trasplantó 3 plántulas por frasco y dos frascos por concentración de sal a partir de plantas de las 3 localidades de Tungurahua, 4 localidades de Imbabura y 1 localidad de Pichincha. Se tomó datos del crecimiento de las plantas cada 15 días durante 2 meses, considerando todos los cambios morfológicos observados como resultado del efecto de la sal en el medio de cultivo. Todos los frascos permanecieron en el cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz- 8 horas oscuridad a una temperatura promedio de 22°C.

### **6.3 Identificación molecular de genes candidatos relacionados con tolerancia a salinidad**

#### **6.3.1 Selección del material vegetal para evaluar molecularmente diferencias en la expresión génica relacionada con tolerancia a estrés salino**

Mediante los diversos ensayos realizados in vitro se determinó las accesiones de tomate de árbol más y menos tolerantes al estrés salino. Adicionalmente, se determinó la concentración máxima de sal a la cual crecían las plantas y que se seleccionó para realizar el despliegue diferencial. Considerando estos dos parámetros se estableció el siguiente diseño experimental para evaluar molecularmente diferencias en la expresión génica causadas por la salinidad. Se tomó plántulas con raíces de aproximadamente 4cm cultivadas in vitro en medio MS tanto de la accesión más tolerante a sal como de la menos tolerante. Dichas plántulas fueron transferidas a medio MS basal (usado como control) y a medio MS con NaCl 100mM (usado como tratamiento). Se extrajo ARN total a partir del material vegetal más y menos tolerante en presencia y en ausencia del tratamiento por salinidad en 6 tiempos distintos de exposición al estrés: 3, 9, 12, 24, 36 y 48 horas.

#### **6.3.2 Extracción de ARN de hojas de tomate de árbol**

De acuerdo al diseño experimental previamente expuesto en la sección 6.3.1 se extrajo ARN de hojas de tomate de árbol utilizando Trizol Reagent<sup>TM</sup> de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor con ciertas modificaciones.

Se tomó entre 4 y 5 hojas de las plántulas de tomate de árbol. Se las trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvillo blanco. Se tomó 50mg de este polvillo y se lo introdujo en un tubo eppendorf que contenía 1.2mL de Trizol. Se homogenizó las muestras por 15 segundos y se las incubó en hielo durante 20 minutos. A continuación se las centrifugó por 15 minutos a 12 000 rpm a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se colocó 240µL de cloroformo, se homogenizó las muestras 15 segundos, se las incubó en hielo por 3 minutos y nuevamente se las centrifugó por 15 minutos a 12 000 rpm a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se repitió el tratamiento con cloroformo. Una vez que se rescató el sobrenadante, se añadió a los tubos 300µL de buffer citrato, se homogenizó la mezcla por inversión y se agregó 500µL de isopropanol, nuevamente se homogenizó la mezcla, se la incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 12 000 rpm a 4°C. Se retiró todo el sobrenadante y se lavó el pellet formado con 1.2mL de etanol al 75%. Se centrifugó los tubos por 5 minutos a 7200 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó los pellets secarse en cámara de flujo laminar por 10 minutos. A continuación se resuspendió el pellet en 50µL de agua tratada con DEPC. Finalmente se realizó una última centrifugación por 30 minutos a 12 000 rpm a 4°C y se rescató el sobrenadante en nuevos tubos.

### **6.3.3 Cuantificación de ARN total**

La cuantificación de ARN se realizó mediante espectrofotometría ultravioleta utilizando el equipo Nanodrop 1000. Todas las muestras de ARN se diluyeron a una concentración final de 100ng/µL utilizando la fórmula:  $C_i V_i = C_f V_f$  (i= inicial, f= final).

### **6.3.4 Retrotranscripción de ARN mensajero de tomate de árbol**

La retrotranscripción del ARN se realizó utilizando Superscript III Reverse Transcriptase de Invitrogen™ de acuerdo a las condiciones sugeridas por el kit RNAimage de GenHunter Corporation™ que se indican en el Anexo 1 en un volumen final por reacción de 20µL. El primer utilizado para retrotranscripción fue uno de los H-T11M de GenHunter Corporation™ que se une a la cola poli A de los ARNm.

La selección de los primers de GenHunter Corporation™ utilizados tanto para la retrotranscripción como para la amplificación de ADNc que se menciona a continuación, se realizó mediante un screening de todas las combinaciones ofrecidas por el fabricante en el kit RNA Image™. Este screening se realizó en un gel de poliacrilamida y se seleccionó las parejas de primers (HT11M- HAPx) con las que se observaba mayor cantidad de bandas.

### **6.3.5 Amplificación de ADNc de tomate de árbol**

La amplificación del ADNc se realizó utilizando Taq DNA Polimerasa Recombinante Invitrogen™ con 10 diferentes combinaciones de primers: primer H-APx GenHunter™ como forward y primer H-T11M GenHunter™ como reverse. Las mezclas de reacción, así como las condiciones de la PCR fueron las sugeridas en el kit RNAimage de GenHunter Corporation™ en un volumen final de 20µL con algunas modificaciones y se indican en el Anexo 2.

### **6.3.6 Electroforesis en geles de Poliacrilamida**

Para la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida se utilizó la cámara Sequi- Gen Bio-Rad™. En primer lugar se lavó los vidrios cuidadosamente utilizando el detergente Alconox. Se

dio a cada vidrio un tratamiento especial, primero con alcohol al 70% seguido de Bind Silane (1mL ácido acético glacial+ 3μL Bind Silane™) al vidrio donde se pega el gel y de 3mL de RainX™ y 800μL de Sigmacote™ al vidrio de la cámara. Una vez tratados los vidrios se armó la cámara siguiendo las instrucciones del proveedor y se inyectó la solución de acrilamida al 6% previamente preparada junto con 545μL de persulfato de amonio 0.1% y 109μL de Temed™. Se dejó polimerizar la acrilamida con la cámara en sentido horizontal y con el peine colocado en sentido contrario a los dientes para formar el frente de corrida. La polimerización duró una hora. Transcurrido este tiempo, se ensambló la cámara en posición vertical, se agregó 1.4L de TBE 1X previamente calentado a 40°C y se conectó el sensor de temperatura y los electrodos a la fuente de poder. Se introdujo el peine en dirección normal para formar los pocillos. Se retiró la urea de cada pocillo con ayuda de una pipeta Pasteur y se cargó 3μL de buffer de corrida (loading dye) saltando un pocillo a través de todo el gel. Se realizó la precorrida a 80V y una temperatura máxima de 50°C durante 45 minutos. A continuación se cargó las muestras (10μL de ADN y 1μL Blue juice 10x) y se las corrió durante 3 horas a 80V y una temperatura máxima de 50°C. Transcurrido el tiempo de corrida se llevó a cabo la tinción del gel con nitrato de plata. En primer lugar se colocó el gel en la solución fijadora, previamente refrigerada, durante 5 minutos, acto seguido se lo colocó en la solución de tinción durante 7 minutos con agitación constante. Posteriormente se lavó el gel por 8 segundos con agua destilada para después colocarlo en la solución reveladora con agitación constante hasta el aparecimiento de las bandas (más o menos 7 minutos). Una vez que las bandas aparecieron se colocó al gel por 3 minutos en la solución de parada y finalmente se le dio un último lavado con agua destilada por 15 segundos.

### **6.3.7 Aislamiento de bandas diferenciales a partir de geles de poliacrilamida**

Una vez terminada la electroforesis en gel de poliacrilamida se dejó que el gel se seque y las bandas se definan mejor por una hora y media. A continuación se colocó el vidrio sobre el transiluminador y se realizó una comparación prolija entre los controles y los tratamientos con sal para cada tiempo y para cada accesión (sensible y tolerante). Mediante este análisis se identificó bandas diferenciales, ya sea sobreexpresadas o subexpresadas en los controles y los tratamientos. Con la ayuda de un bisturí se extrajo por separado cada una de estas bandas y se las colocó en tubos eppendorf de 1.5mL con 50 $\mu$ L de TE. Las bandas extraídas se colocaron en la incubadora a 37°C y con agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente se recuperó todo el líquido de cada muestra y se desechó los residuos de gel de acrilamida.

### **6.3.8 Reamplificación de ADNc**

La reamplificación de las bandas diferenciales extraídas del gel se realizó mediante el protocolo sugerido por el kit RNAimage de GenHunter Corporation<sup>TM</sup> con algunas modificaciones que se detallan en el Anexo 3. El volumen final de reacción fue de 20 $\mu$ L y los primers fueron los mismos utilizados para la amplificación de la muestra de la cual la banda diferencial fue extraída.

### **6.3.9 Identificación de genes candidatos de tolerancia al estrés salino**

Los productos de reamplificación del ADNc fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1%. De allí se identificó aquellos que presentaban una sola banda en el tamaño esperado (el mismo de la banda extraída del gel de poliacrilamida) y que por lo tanto eran útiles para ser secuenciados. Estos productos fueron secuenciados en Wisconsin en la empresa

Functional Biosciences. Posteriormente las secuencias fueron analizadas utilizando los softwares Staden Package Program (PreGAP y GAP) (Bonfield y Staden, 2004) y Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.05) (Tamura et al, 2008). Finalmente las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el BLAST del NCBI (Altschull et al., 1990) y la base de datos TAIR.

## **7. Resultados**

### **7.1 Cultivo in vitro**

#### **7.1.1 Siembra de semillas de tomate de árbol**

La germinación de semillas de tomate de árbol en medio MS sin NaCl fue exitosa para todas las accesiones ensayadas con un porcentaje promedio de germinación del 94% y el tiempo de germinación varió entre 16 y 21 días.

Con respecto a la germinación en medio MS con diferentes concentraciones de NaCl (50mM, 75mM, 100mM, 150mM y 200mM), los resultados fueron variables. En medio con concentración de NaCl de 50mM, el promedio de germinación fue 62% y el tiempo de germinación varió entre 22 y 31 días. El menor tiempo de germinación se obtuvo para las semillas de Chaltura (Imbabura) y el mayor para las de Ambato (Tungurahua). A una concentración de 75mM de NaCl, el promedio de germinación fue del 57%, el tiempo varió entre 22 y 33 días, siendo el menor tiempo para semillas de Chaltura (Imbabura) y el mayor para semillas de Quero (Tungurahua). No se obtuvo germinación en las concentraciones de 100mM, 150mM y 200mM de NaCl.

En general, y para todas las accesiones utilizadas, el crecimiento de las plántulas en medio MS con sal fue más lento en comparación con las sembradas en medio MS sin NaCl. Sin embargo, una vez que crecieron, pudieron ser aclimatadas de la misma forma que plantas cultivadas en medio sin NaCl.

### **7.1.2 Subcultivo de plántulas de tomate de árbol**

En base al poco éxito obtenido en la germinación de semillas de tomate de árbol en medio MS en presencia de sal, se optó por evaluar la tolerancia a la salinidad una vez que las plántulas ya habían crecido, utilizando el método de subcultivo por nudo simple.

Se realizó el subcultivo para las plántulas de las 3 accesiones de Tungurahua y 4 accesiones de Imbabura.

Todas las yemas subcultivadas en concentraciones de 150mM y 200mM de sal se oxidaron, no crecieron y no desarrollaron raíces aproximadamente 20 días después de realizado el subcultivo.

En general, para las 7 accesiones, el crecimiento de las yemas subcultivadas en medios con NaCl en concentraciones entre 50 y 120mM fue reducido en comparación con el crecimiento en el control sin sal. Sin embargo, comparando patrones de crecimiento, color de las plántulas y formación de nuevas hojas, fue posible identificar las accesiones más y menos tolerantes frente a la salinidad.

Las plantas más tolerantes correspondieron a la localidad Chaltura (provincia de Imbabura) y las menos tolerantes a Quero (provincia de Tungurahua).

El crecimiento de las plantas de Chaltura en medio MS sin sal alcanzó los 9cm en un promedio de 22 días. Mientras que, con NaCl 120mM, el crecimiento fue de 6cm en un período de 35 días.

Por otro lado, el crecimiento promedio para las plantas de Quero en medio MS sin sal fue de 6cm en 20 días, mientras que con NaCl 75mM los mismos 6cm se alcanzó a los 47 días. No se obtuvo crecimiento en concentraciones de sal de 120mM, 150mM y 200mM.

En la Tabla 5 se presenta un resumen comparativo del crecimiento de las plántulas en las diferentes concentraciones de sal para las 7 accesiones.

Otro resultado de este ensayo fue que la concentración máxima de NaCl a la que todavía crecieron las plantas en todas las accesiones fue de 100mM. Esta observación sumada a soporte bibliográfico (Umezawa, T., et al, 2008; Aoki, K., et al, 2010) justificó que para realizar el despliegue diferencial se escoja la concentración de 100mM de NaCl como factor de estrés a ser evaluado.

### **7.1.3 Evaluación de la tolerancia de las plantas de tomate de árbol al estrés por salinidad**

El ensayo de evaluación de la tolerancia de las plantas a la salinidad se realizó transfiriendo plántulas de tomate de árbol de aproximadamente 3cm y con raíz crecidas en medio MS sin sal a medio MS con diferentes concentraciones de NaCl. En la Tabla 6 se presenta un resumen de la concentración más elevada que resistió cada accesión, la concentración de sal a la cual los cambios producto de la salinidad empezaron a ser evidentes y el tiempo en el cual pudieron ser apreciados estos cambios.

Los principales cambios morfológicos identificados por efecto del estrés salino fueron: reducción en la velocidad de crecimiento de las plantas, pérdida de intensidad en el color verde, amarillamiento de las hojas, caída de hojas, yemas y raíces secas. En la Figura 3 se pueden observar estos síntomas.

De las 8 accesiones evaluadas (3 de Tungurahua, 4 de Imbabura y 1 de Pichincha), las plantas que presentaron mayor tolerancia frente a salinidad fueron las de Chaltura (provincia de Imbabura). Estas plantas crecieron hasta una concentración de NaCl de 175mM. A concentraciones elevadas de sal (200mM y 250mM) empezaron a morir 30 días después de iniciado el ensayo.

Por el contrario, la menor tolerancia frente a salinidad se observó en plantas de Quero (provincia de Tungurahua). En estas plantas se observaron los síntomas causados por la sal, necrosamiento y muerte de algunas plántulas a los 15 días de exposición al tratamiento. Las plantas crecieron (de manera reducida) hasta una concentración de 75mM de sal.

En cuanto a las 6 accesiones restantes (correspondientes a Cevallos, Ambato, Santiago del Rey, Imbaya, Violeta y Tumbaco), los tiempos a los cuáles la sintomatología provocada por la salinidad, así como la máxima concentración de NaCl tolerada fueron variables (Tabla 6).

En el Anexo 4 se puede encontrar fotografías comparativas entre las plantas al momento del inicio del ensayo, y transcurrido cierto tiempo después del mismo, para varias accesiones y en distintas concentraciones de NaCl.

## **7.2 Identificación molecular de genes candidatos relacionados con tolerancia a salinidad**

### **7.2.1 Selección del material vegetal a ser evaluado**

En base a la información obtenida a partir de los ensayos de cultivo in vitro, se eligió la accesión identificada como la más tolerante a la perteneciente a Chaltura, provincia de Imbabura. La accesión identificada como la menos tolerante correspondió a Quero, provincia de Tungurahua. La concentración de sal utilizada para realizar el despliegue diferencial fue de 100mM.

### **7.2.2 Extracción de ARN de hojas de tomate de árbol**

Se logró la estandarización del protocolo de extracción de ARN para hojas de tomate de árbol utilizando Trizol Reagent®. Se obtuvo ARN de buena calidad de plantas cultivadas in vitro en medio MS sin NaCl y de plantas sometidas a un estrés salino utilizando cloruro de sodio en concentración 100mM a las 3, 9, 12, 24, 36 y 48 horas de tratamiento (Figura 4).

### **7.2.3 Cuantificación de ARN total de tomate de árbol**

Se obtuvo elevadas concentraciones de ARN total que oscilaron entre 300 y 900ng/μL. El material genético obtenido fue de buena calidad con un índice 260/280 entre 1.8 y 2.3 y un índice 260/230 entre 0.3 y 1 (de menor calidad). A pesar de ello, todas las muestras de ARN fueron retrotranscritas y amplificadas con éxito.

### **7.2.4 Amplificación de ADNc de tomate de árbol**

La amplificación del ADNc se realizó utilizando las combinaciones de primers de los kits RNA Imagen I y II de GenHunter Corporation. Utilizando los dos kits se tenía 64 posibles

combinaciones de primers. Se realizó una prueba con estas 64 combinaciones con una muestra de tomate de árbol. Se seleccionó las 10 combinaciones de primers que mostraron mayor despliegue de bandas. Las combinaciones seleccionadas fueron: HAP1-HT11A, HAP2-HT11A, HAP6-HT11A, HAP7-HT11A, HAP11-HT11A, HAP3-HT11G, HAP4-HT11G, HAP7-HT11G, HAP11-HT11G, HAP12-HT11G. Las 10 combinaciones seleccionadas dieron buena amplificación y buen despliegue de bandas en todos los tiempos de exposición al tratamiento con NaCl. En la Figura 5 se puede observar algunos de los productos de amplificación obtenidos.

Considerando que la región variable en los primers randómicos consta de 7 nucleótidos, se puede obtener un promedio de 16000 primers randómicos ( $4^7=16308$ ). Si se asume como premisa que el tamaño promedio de un ARNm es de 600pb, y que en un momento particular una célula contiene 10 000ARNm transcritos, la probabilidad de que uno de los primers randómicos se hibride con un ARNm es de  $600/16000=4\%$ . En base a esto se establece la fórmula de cobertura del genoma como  $P=1-(0.96)^n$ , donde n es el número de primers randómicos que se utilizan (Liang et al., 1994). A partir de estas estimaciones el porcentaje de cobertura del genoma logrado en el presente estudio fue del 18%.

### **7.2.5 Aislamiento de bandas diferenciales a partir de geles de poliacrilamida**

La identificación de las bandas diferenciales se realizó comparando las amplificaciones del ADNc de las cuatro muestras seleccionadas (Chaltura con y sin exposición al estrés salino y Quero con y sin exposición al estrés salino) en cada uno de los tiempos evaluados. Se extrajo toda banda que podía ser informativa para el presente análisis lo que incluye: bandas sobreexpresadas en presencia de NaCl en la muestra tolerante, no tolerante o ambas, como indicadores de activación génica en presencia del estrés; bandas más intensas en ausencia de sal

en la muestra tolerante o en ambas, como indicadoras de represión génica en presencia del estrés. En la Figura 6 se muestran ejemplos de los distintos tipos de bandas diferenciales encontradas y extraídas como parte de estudio. En los 6 tiempos de tratamiento evaluados se pudo identificar 171 bandas diferenciales: 19 a las 3 horas de exposición a NaCl, 25 a las 9 horas de exposición a NaCl, 41 a las 12 horas de exposición a NaCl, 32 a las 24 horas de exposición a NaCl, 33 a las 36 horas de exposición a NaCl y 21 a las 48 horas de exposición a NaCl.

### **7.2.6 Reamplificación de ADNc**

Las 171 bandas diferenciales extraídas a partir de geles de poliacrilamida fueron reamplificadas para enviarlas a secuenciar. La reamplificación solo fue exitosa para 99 bandas, (58%). Es decir, solo en 99 de las 171 bandas se obtuvo como producto de amplificación una sola banda en el tamaño correspondiente a la extracción previamente realizada en acrilamida. En las 72 bandas restantes (42%), el producto de la reamplificación no fue satisfactorio, en 24 se obtuvo barrido, en 21 múltiples bandas, en 8 doble banda y en 19 no se obtuvo producto de reamplificación. En la Figura 7 se muestra los diferentes resultados obtenidos.

### **7.2.7 Identificación de genes candidatos**

A partir de las 99 bandas enviadas a secuenciar, 42 presentaron mucho ruido, su análisis fue complicado y al realizar un Blast tanto en el NCBI como en TAIR no presentaron ninguna homología. De las 57 restantes, de acuerdo a la homología encontrada, se puede inferir que 10 corresponden a genes ribosomales, 19 a ADNc de *Solanum lycopersicum* sin función identificada y 28 a genes que codifican para proteínas (Figura 8, Anexo 5). De estos 28 genes potenciales, 21 son genes únicos. 14 correspondieron a sobreexpresión en presencia de NaCl y

7 a subexpresión en presencia del estrés. Adicionalmente, éstos pueden ser clasificados en cuatro grupos de acuerdo a la función de las proteínas para las que codifican: proteínas estructurales o de modificación de la pared secundaria (4), proteínas directamente vinculadas con respuesta a estrés (3), proteínas involucradas en el metabolismo en general (2), proteínas relacionadas con fotosíntesis (8), proteínas que regulan la expresión génica (4). Información detallada sobre cada uno de estos 21 genes se presenta en la Tabla 7.

## 8. Discusión

A partir del cultivo in vitro de tomate de árbol en presencia de NaCl, se pudo conocer algunos datos de interés de esta planta en cuanto a su comportamiento frente al estrés salino. En primer lugar se identificó que la sintomatología observada en el tomate como producto del estrés es típica de plantas relativamente tolerantes a este factor (Munns, 2005). La concentración máxima de sal a la cual se obtuvo crecimiento de plantas al realizar un subcultivo fue 100mM. Esta concentración de sal en el medio de cultivo equivaldría a una conductividad eléctrica en el suelo de 9.5948dS/m, lo cual reforzaría la clasificación del tomate de árbol como una planta medianamente tolerante a NaCl de acuerdo a parámetros establecidos por la FAO (Brower et al, 1985). A su vez se encontró que al pasar las plántulas crecidas en MS sin NaCl y con raíces funcionales a MS con NaCl, ciertas plantas toleran concentraciones de NaCl de hasta 175mM. A pesar de ello, el crecimiento a esta concentración de sal es bastante lento y, en realidad, a esta concentración de NaCl probablemente las plantas no podrían desarrollarse ni dar fruto.

Adicionalmente, el cultivo in vitro realizado en este estudio permitió identificar diferencias entre la tolerancia frente a salinidad en plantas recolectadas de diferentes partes de

la Sierra ecuatoriana. Se conoce que muchas áreas en la Sierra enfrentan problemas de salinización de suelos. Sin embargo, se conoce muy poco respecto a estos problemas y es necesario realizar más estudios para conocer el estado real de estos suelos y el impacto que tienen sobre la productividad de los cultivos (Dirección Nacional de Áreas Protegidas, 2004; Zebrowski, 1996). A pesar de que la accesión más tolerante se obtuvo de la provincia de Imbabura y la menos tolerante de la provincia de Tungurahua, es importante mencionar que estos resultados no permiten afirmar que en efecto en la provincia de Imbabura se encuentren las accesiones más tolerantes y en Tungurahua las menos tolerantes debido al escaso número de accesiones que se analizaron en este estudio.

En cuanto al despliegue diferencial se pudo secuenciar 99 bandas diferenciales de las cuáles 42 no presentaron ninguna homología con secuencias de genes depositadas en el GenBank utilizando la herramienta Blast. De las 57 restantes, 10 presentaron homología con genes ribosomales, 19 con ADNc de *Solanum lycopersicum* sin función identificada y 28 con genes con función ya identificada (21 únicos). En estudios de despliegue diferencial, es normal obtener muchas secuencias diferenciales pero identificar un número limitado de genes. Por ejemplo, en el estudio de Xiong et al. (2001) se identificaron 96 bandas diferenciales inducidas por estrés, a partir de las cuáles se identificaron únicamente 21 genes de función conocida en el NCBI. También existen estudios en los que el número de ADNc identificados es más bajo, como de 17 (Liu y Baird, 2003); 27 (Hayama et al, 2002); 19 (Zegzouti et al, 1999), etc. El alto número de bandas que se obtuvieron en este estudio, pese al bajo porcentaje de genoma analizado, puede deberse a varios factores. Uno de ellos es que se extrajo todas las bandas diferenciales observadas, es decir, subexpresión o sobreexpresión tanto en la variedad tolerante, como en la sensible. Otro factor es que en este estudio se analizan dos tratamientos y dos controles

(variedad sensible y tolerante) en 6 diferentes tiempos de exposición a sal lo que aumenta considerablemente el número de bandas detectadas. En otros estudios se realiza una comparación únicamente entre el control y tratamiento y en un solo tiempo de exposición (por ejemplo, estrés por salinidad a las 9 horas de exposición a sal) (Liu y Baird, 2003; Hayama et al., 2002; Zegzouti et al., 1999).

Otro punto de análisis es el tiempo de inducción de estrés utilizado en este estudio. Se conoce que en la respuesta frente a estrés intervienen mecanismos de respuesta inmediata y otros de respuesta retardada y que son más estables en el tiempo (Sahi et al, 2006). Hay estudios donde la respuesta frente al estrés abiótico se ha identificado incluso una hora después de inducido el tratamiento (Jayaraman et al., 2008). En un estudio realizado con girasol (Liu y Baird, 2003) se encontró que a las 9 horas de exposición al estrés se puede encontrar un buen perfil de expresión de genes. Al ser este el primer estudio de respuesta a estrés en tomate de árbol, se desconocía por completo la expresión genética en función del tiempo. Por esta razón se realizó el ensayo a distintas horas de exposición a sal. De las 171 bandas diferenciales que se identificó, 19 se aislaron del tratamiento a las 3 horas de exposición, 25 a las 9 horas, 41 a las 12 horas, 32 a las 24 horas, 33 a las 36 horas y 21 a las 48 horas. Aunque a las 12 horas se identificó el mayor número de bandas, únicamente un análisis en tiempo real que permita rastrear la expresión de determinados genes en un período específico de tiempo, podrá dar una idea certera de la expresión génica inducida por salinidad en esta especie. También es importante mencionar que entre los 21 genes identificados con función conocida, 2 de ellos se detectaron en diferentes tiempos de exposición al estrés salino. Solo en estos genes es posible afirmar que su expresión se mantuvo durante varias horas después de inducido el estrés.

La respuesta y tolerancia de las plantas frente a salinidad es un fenómeno complejo, implica múltiples componentes e involucra simultáneamente la sobreexpresión y subexpresión de un gran número de genes (Sahi et al., 2006). En cuanto a la relación entre genes subexpresados y sobreexpresados, el número identificado en estudios de estrés es variable. En el estudio de Xiong et al (2001) por ejemplo, de los 22 genes encontrados, 20 correspondieron a sobreexpresión y únicamente 2 a subexpresión. En el presente estudio, de los 21 genes únicos identificados 14 corresponden a sobreexpresión y 7 a subexpresión.

En referencia a las 42 secuencias que no tuvieron ninguna homología con secuencias en el GenBank, es importante mencionar que este tipo de resultado es común en estudios que utilizan métodos de análisis del transcriptoma como despliegue diferencial o ADNc-AFLPs (Gupta et al, 2012; Xiong et al, 2001; Jayaraman et al., 2008; Liu y Baird, 2003). Una opción es que estas secuencias no presenten homología con otras previamente ingresadas en el GenBank debido a la todavía incompleta información que existe en las bases de datos en referencia al ADNc de plantas. Otra opción, que resulta muy válida considerando el ruido que presentaron estas secuencias, es que se trate simplemente de artefactos producto de la técnica. Es decir, que no se haya podido aislar un solo ADNc en cada banda diferencial y, por lo tanto, el producto obtenido del análisis de esta banda no es real y no corresponde realmente a un gen.

Otro conjunto de ADNc identificados (19) tuvieron homología con ADNc de *Solanum lycopersicum* reportados en una biblioteca de ADNc (Aoki et al, 2010). Dicha biblioteca se realizó analizando diferentes tejidos de tomate riñón y exponiendo los tejidos a diferentes tratamientos, entre ellos, estrés por salinidad. Adicionalmente se realizó ensayos para conocer la función potencial de muchos ADNc y se comparó su homología tanto en pares de bases como

en aminoácidos con otras 6 especies vegetales. A pesar de todo este esfuerzo se reportó un gran número de clones de ADNc de los cuáles no se pudo identificar una función. En este estudio se reporta que estos clones pueden corresponder a ARN no codificante, ARN no traducido o ADNc de los cuáles todavía no se conoce ninguna función (Aoki et al, 2010). De este modo, los 19 ADNc identificados en el presente trabajo corresponderían a alguna de estas categorías. Otra opción es que, al igual que las secuencias sin homología, sean artefactos de la técnica del despliegue diferencial, es decir, no correspondan a ADNc realmente inducidos por el tratamiento.

El tercer grupo de genes encontrados en este estudio (10) corresponde a ARN ribosomales. La regulación a nivel traduccional ha sido reportada como un componente importante dentro de la respuesta celular frente a estrés (Bailey-Serres 1999 cit en Sahi et al, 2006). El estrés abiótico induce cambios en los ribosomas. Por ejemplo, la formación de RNPM (ribonucleoproteínas mensajeras) y la sobreexpresión de transcritos ribosomales como el RPS14, RPS16 y RPL23 ya se han reportado en la respuesta a estrés hídrico en *Tortula rurales* (Wood and Oliver 1999 cit en Sahi et al 2006). Sin embargo, el estudio de la expresión génica a nivel ribosomal resulta complejo de analizar puesto que la función de muchos genes todavía no ha llegado a dilucidarse por completo.

Finalmente, del cuarto grupo de ADNc encontrados se pudo inferir una función de acuerdo al resultado de la homología encontrada en el Blast del NCBI. De los 28 ADNc se identificó 21 ADNc con función única. Estos 21 genes potencialmente identificados pueden ser clasificados en 5 categorías de acuerdo a la función para la que codifican: respuesta a estrés (3),

regulación de la expresión génica (4), fotosíntesis (8), metabolismo en general (2) y estructura y modificación de la pared celular (4).

Los 3 genes potencialmente identificados y clasificados en la categoría de respuesta a estrés son uno codificante para proteína TSI-1 (tomato stress induced-1) identificado en sobreexpresión en el tratamiento en la variedad tolerante a NaCl a las 9 horas de exposición. Otro codificante para la enzima epoxidasa de zeaxantina indentificado en sobreexpresión en el tratamiento en la variedad tolerante a NaCl a las 12 horas de exposición. Finalmente, el gen codificante para la proteína de unión al GTP TypA/ BipA indentificado en subexpresión en plantas expuestas al tratamiento con NaCl a las 9, 12 y 24 horas de exposición.

La proteína TSI-1 pertenece al grupo de proteínas IPR (proteínas de respuesta a patogenicidad y su expresión es inducida por ácido salicílico y ataque por hongos (Vidya et al, 1999). El presente estudio, constituiría el primer reporte de inducción del gen que codifica para esta proteína por estrés salino. Sin embargo, si se ha reportado la inducción de muchas IPRs por estrés abiótico causado por diferentes hormonas, elicitores, drogas, sales, metales pesados, heridas, estrés oxidativo y luz UV (Van Kan et al 1995 cit en. Vidya et al, 1999). La función de la proteína TSI-1 no se conoce claramente, pero se piensa que está relacionada con la vía metabólica de síntesis del ABA y que tiene una función RNAsa (Vidya et al., 1999). En varios estudios la expresión de esta proteína se ha reportado transcurridas 24 horas después del estrés. Además, se conoce que esta proteína no se transcribe normalmente en la célula sino únicamente cuando es inducida por estrés (Xiong et al, 2001).

La enzima epoxidasa de zeaxantina (ZEP) es clave en la biosíntesis de ABA, una hormona esencial en la regulación de la respuesta de plantas frente a estrés abiótico (Thompson

et al., 2000). En el estudio de Hee-Yeon et al. (2008) se generó una variedad transgénica de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresando ZEP. Esta variedad presentó un crecimiento más vigoroso en presencia de estrés salino en comparación con los fenotipos silvestres. Adicionalmente, se conoce que ZEP también juega un rol muy importante en la protección de fotosistemas frente a estrés oxidativo (Thompson et al, 2000). Se ha encontrado que la enzima ZEP no se expresa de manera inmediata frente al estrés (Seo y Koxhiba, 2002). En el presente estudio la potencial sobreexpresión del gen codificante para ZEP se identificó a las 12 horas de exposición a NaCl.

La GTP- binding protein TypA/BipA (proteína tirosina fosforilada A/Bip A) corresponde al grupo de GTPasas traduccionales. Están involucradas en diferentes aspectos de la síntesis de proteínas y se las encuentra tanto en bacterias como en plantas de manera muy conservada. Los detalles del funcionamiento de esta proteína no están completamente claros, interactúa con el ribosoma de manera GTP- dependiente y de alguna manera regula la expresión de proteínas target (Pandit y Srinivasan, 2003). Esta proteína fue identificada por primera vez en *Salmonella typhimurium* inducida por la proteína de defensa BPI, en bacterias se la ha identificado como una proteína de defensa frente a varios tipos de estrés (Wang et al, 2008). En bacterias se ha identificado que las GTPasas en general tienen la capacidad de unirse a las alarmonas ppGpp y ppGppp. Esta unión reversible inhibe su funcionamiento y de esta manera contribuye a un control transcripcional y traduccional de determinados productos génicos, a esto se conoce como “stringent response” (Kanjee et al, 2012). Se han realizado varios estudios que demuestran que las plantas poseen toda la maquinaria requerida para este tipo de respuesta y que este proceso también estaría involucrado en la respuesta frente a estrés (Tozawa et al, 2007). Al estudiar la especie *Suaeda salsa*, planta halófila, se encontró cambios en la expresión de esta

proteína frente a varios tipos de estrés abiótico (incluyendo salinidad). Se determinó que la función GTPasa de la proteína es estimulada por ARNr cloroplásticos específicos. La proteína tiene un rol muy importante en regular la traducción de ARNm de genes involucrados en el control de especies reactivas de oxígeno en el cloroplasto (Wang et al, 2008).

La regulación de la maquinaria transcripcional y traduccional, es un mecanismo complejo de estudiar puesto que no implica productos directamente relacionados con una función particular en presencia del estrés. Sin embargo, se conoce que la inducción o represión de distintos factores transcripcionales, RNA-binding proteins, genes ribosomales y factores de iniciación y elongación de la traducción está muy relacionada con la respuesta frente a salinidad (Sahi et al, 2006). En el presente estudio se pudo identificar 4 genes potenciales con estas funciones. El gen que codifica para el factor de ribosilación del ADP fue identificado en sobreexpresión en la accesión tolerante expuesta al tratamiento con NaCl a las 36 horas de exposición. El gen que codifica para la proteína del complejo proteosoma 26S se sobreexpresó en la accesión tolerante en presencia de NaCl a las 36 horas de exposición. El gen que codifica para la proteína CONSTANS con motivo de unión al ADN de dedos de zinc, identificado a las 24 de exposición sobreexpresada en presencia del tratamiento en ambas accesiones. Finalmente, el gen que codifica para la proteína matorasa K identificado a las 12 horas de exposición sobreexpresada en presencia del tratamiento en la accesión tolerante.

El factor de ADP- ribosilación tiene una acción GTPasa que ha sido reportada en varias funciones como el transporte de proteínas desde el aparato de Golgi hacia el retículo endoplasmático, la modificación lipídica de proteínas y la regulación del tráfico de proteínas hacia la vacuola (Matheson et al, 2007). De esta manera, el rol de esta enzima en la respuesta de

las plantas a estrés sería llevar a cabo modificaciones postraduccionales de proteínas, el transporte de las mismas dentro de las células y la posible compartimentalización de compuestos a nivel de vacuola. La sobreexpresión de este factor en presencia de estrés abiótico ha sido reportado en el musgo *Physocmitrella patens*. En dicho estudio se concluyó que este factor está involucrado en la cascada de transducción de señales mediada por ABA (Machuka et al., 1999).

El complejo 26S del proteosoma es una de las vías proteolíticas más importantes en eucariotas mediante la cual se destruyen proteínas anormales y se controla la concentración de enzimas y factores transcripcionales que intervienen en diferentes vías. En plantas este mecanismo es particularmente importante. En el genoma de *Arabidopsis*, por ejemplo, el 5% del proteoma codifica para proteínas del core de esta estructura. Es un mecanismo clave del control de vías metabólicas de crecimiento, desarrollo y defensa (Vierstra, 2003). Entre las muchas funciones que se han estudiado acerca de complejo 26S del proteosoma está la regulación de fitohormonas. Se ha reportado que la destrucción de proteínas relacionadas con las vías metabólicas del ABA y ácido jasmónico (específicamente factores de transcripción inducidos por estas fitohormonas) ocurre en este complejo (Sullivan et al, 2003).

Los genes *CONSTANS* codifican para activadores transcripcionales de genes involucrados en muchos procesos metabólicos. Sin embargo, el proceso más estudiado en el que *CONSTANS* juega un papel esencial es en la floración inducida por cambio en el fotoperíodo (Lagercrantz, U. y Axelsson, T., 2000; Griffiths et al, 2003). A pesar de que la regulación génica mediada por *CONSTANS* podría estar relacionada con control a nivel transcripcional de genes involucrados con respuesta a estrés, este mecanismo todavía no ha sido reportado.

La maturasa K (MATK) está involucrado en el splicing de exones tipo II. Algunos de los principales genes cloroplásticos en los cuáles maturasa K media la remoción de intrones son: trnK, trnA, trnI, rps12, rpl2 t atpF, todos involucrados en fotosíntesis. Esta evidencia sugiere que MATK tiene una función esencial como factor post-transcripcional en el cloroplasto (Barthet, M., y Hilu, K., 2007). No se ha reportado antes la sobreexpresión de este factor inducida por ningún tipo de estrés.

La tercera categoría de genes potenciales con función conocida identificada en este estudio corresponde a los relacionados con estructura y modificación de la pared celular. Este proceso también resulta clave en la respuesta de las plantas frente a sal puesto que el estrés osmótico destruye las paredes celulares promoviendo la muerte celular, a la vez que altera el transporte de sustancias (especialmente iones) hacia dentro y fuera de la célula (Sahi et al, 2006). Dentro de esta categoría se identificaron 4 genes potenciales. El gen que codifica para la proteína arabinogalactan, identificado en sobreexpresión en plantas tolerantes en presencia del tratamiento de sal a las 3, 9 y 24 horas de exposición al tratamiento. El gen que codifica para la proteína dehidrogenasa-4 de cinamato (C4H), sobreexpresado en la accesión tolerante a las tres horas de exposición a sal. El gen que codifica para la proteína de lignificación de la pared celular secundaria, sobreexpresado también a las tres horas de exposición a sal en la accesión tolerante. Finalmente, el gen que codifica para la enzima metilesterasa de pectina, encontrado en subexpresión únicamente en la accesión tolerante a las 3 horas de exposición a sal.

Las proteínas arabinogalactan cumplen una amplia gama de funciones en las plantas relacionadas con crecimiento, desarrollo, muerte celular programada, interacción celular, señalización a nivel de membrana, etc. Están distribuidas en todas las plantas analizadas hasta

el momento y en casi todos los tejidos: hojas, tallos, raíces, flores, semillas, etc (Showalter, A., 2001). El gen que codifica para la proteína arabinogalactan con el que se obtuvo homología en el presente estudio fue identificado de *Solanum lycopersicum* sobreexpresado durante el ataque de una planta parásita. Su función era facilitar la adhesión del parásito al tejido del tomate (Albert et al, 2006). Otros estudios han demostrado que el calcio y fitohormonas como ABA y auxinas actúan como elicitores y reguladores de la transcripción de este gen (Albert et al, 2006). A pesar de lo poco que se conoce sobre las diversas funciones de las proteínas arabinogalactán, se ha comprobado su función como proteínas estructurales de la pared celular. Hasta el momento, únicamente se ha reportado un estudio en el cual la expresión de estas proteínas se ve incrementada por estrés ambiental (mecánico), en pino (Zhang et al, 1999).

La dehidrogenasa-4 de cinamato (C4H) forma parte del grupo de enzimas conocidas como citocromos P450. Estas catalizan la síntesis de varios compuestos, entre ellos lignina, algunos pigmentos y varias moléculas de defensa, como ácido salicílico (Schoch et al, 2002). La lignina es el nombre genérico de un conjunto de polímeros aromáticos que se depositan predominantemente en las paredes celulares secundarias de las células, volviéndolas rígidas e impenetrables. La pared celular secundaria se forma en ciertos momentos del desarrollo natural de las células. Su formación también es inducida por diversos tipos de estrés tanto biótico como abiótico, como formación de heridas, infección por patógenos, estrés metabólico y perturbaciones en la pared celular primaria. En varios estudios se ha demostrado aumentos en la expresión de la enzima C4H en respuesta a algunos factores tanto bióticos como abióticos (Bell- Lelong et al, 1997).

La proteína de lignificación de la pared celular secundaria fue aislada y caracterizada en tomate (*Solanum lycopersicum*). Es una proteína pequeña que se localiza en la pared celular de células de hojas, tallos y raíces. Su función es, junto con otras proteínas estructurales, reforzar la pared celular para aumentar su resistencia frente a estrés mecánico. Se ha comprobado que la síntesis de muchas proteínas estructurales de la pared celular se ha visto estimulada por varios factores como heridas, tratamiento con elicitores y estrés biótico (Domingo et al., 1994). El presente estudio constituye la primera evidencia de una potencial sobreexpresión de este gen como consecuencia de estrés abiótico.

La pared celular primaria de las plantas está principalmente conformada por celulosa, hemicelulosa y pectinas. Las pectinas se sintetizan y modifican en el aparato de Golgi pero a su vez sufren modificaciones una vez que conforman la pared celular, estas modificaciones se producen por metilesterasas de pectina (PME). La principal acción de las PME es volver la pared celular más rígida. La acción de estas enzimas está determinada por varios factores como cambios en el pH, acción de cationes y regulación por hormonas, especialmente auxinas y ABA. Mediado por ABA, por ejemplo, se ha reportado una actividad incrementada en algunos tejidos y disminuida en otros (Micheli, 2001). A pesar de estas funciones todavía no se ha involucrado este tipo de modificaciones a nivel de membrana con ningún tipo de estrés abiótico.

El cuarto grupo de genes potenciales identificados en este estudio corresponde a los relacionados con el proceso de fotosíntesis. Se conoce que la fotosíntesis es fuertemente inhibida por varios tipos de estrés abiótico, causa fundamental de la reducción del crecimiento de plantas en presencia del mismo (Yan et al, 2006). En este estudio se pudo observar como principales síntomas de estrés salino, una pérdida de color en las hojas y un reducido crecimiento

de las plantas. Es decir, sintomatología claramente relacionada con una disminución de la clorofila y de la tasa de fotosíntesis en las células vegetales. La disminución en la tasa de fotosíntesis a causa del estrés salino se debe tanto al cierre de los estomas como a alteraciones bioquímicas en la maquinaria de fotosíntesis, las cuáles todavía no se comprenden (Seeman y Sharkey, 1986). Por un lado, el estrés destruye ciertas estructuras y proteínas relacionadas con la fotosíntesis. Adicionalmente, bajo condiciones de estrés, en los cloroplastos se genera una gran cantidad de ROS (especies reactivas de oxígeno) que destruyen componentes celulares y son una importante causa de muerte celular (Wang et al, 2008). En este estudio se pudo identificar 8 genes potenciales con función conocida dentro del proceso de fotosíntesis. De estos 8, 3 se encontraron en subexpresión en presencia de sal: gen que codifica para NADH plastoquinona (a las 12 horas de exposición) para *ndhH* (a las 24 horas), y para *psbO* 33kDa (a las 24 horas). Los 5 restantes se encontraron en estado de sobreexpresión en presencia de sal: gen que codifica para *trnH-psbA* (a las 9 horas de exposición), para 1.5- bifosfato ribulosa carboxilasa/ oxigenasa (a las 48 horas), para la proteína *PSI-K* (a las 24 horas), para la ATP sintasa de cloroplasto (a las 36 horas) y para la proteína *PSI-E* (a las 36 horas). La fotosíntesis es un mecanismo complejo por lo que es difícil comprender la razón por la cuál algunos de estos genes se subexpresan y otros se sobreexpresan.

En cuanto a los genes potencialmente encontrados en subexpresión, *ndhH* y *ndhK* son dos de los ocho productos proteicos del operón cloroplástico del fotosistema (del Campo, E. et al., 2002). *ndhK* codifica para una NADH plastoquinona (Elortza, F., et al., 1999) y *ndhH* tiene una función NADH deshidrogenasa (Hirose y Sugiura, 1997). En conjunto, los productos expresados por este operón catalizan la transferencia de electrones desde el NADH hasta una ubiquinona, proceso ligado a la traslocación de electrones a través de la membrana de los

tilacoides (Elortza, F., et al., 1999). psbO codifica para una de las proteínas extrínsecas del fotosistema 2 cuya función es mantener la estabilidad y la unión funcional del complejo de manganeso que cataliza la ruptura del agua (Tohri et al, 2002). A pesar de que no se ha dilucidado por completo, se sabe que la síntesis de la proteína 33kDa está controlada por un estricto y complejo control transcripcional y traduccional (Ko, K., et al., 1990).

En cuanto a los genes potencialmente encontrados en sobreexpresión, PSI-K y PSI-E codifican para dos polipéptidos del core del fotosistema I (Chitnis, P., 1996). En varias especies, especialmente *Arabidopsis* se han aislado mutantes para cada uno de estos polipéptidos y como resultado se produce una disminución en la tasa de fijación de luz y en la concentración de clorofila. A pesar de ello la función individual de cada uno permanece desconocido (Jensen, P. et al., 2000). La ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/ oxigenasa es una enzima bifuncional que cataliza dos reacciones competitivas en el estroma de cloroplastos: la fijación de CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis y la oxidación del carbono durante la fotorespiración (Mehta, R. et al., 1992). Una de las causas de la reducción de la tasa de fotosíntesis como consecuencia de la salinidad es el daño de la 1.5- bifosfato de ribulosa por una disminución en la eficiencia de acción que se debe a una incapacidad de regeneración de la enzima (Seeman y Sharkey, 1986). Finalmente, otra enzima relacionada con fotosíntesis y cuyo gen fue potencialmente identificado en sobreexpresión en este estudio fue la ATP sintasa de cloroplasto. Esta es la enzima responsable de la formación de ATP dentro del cloroplasto (Daum et al., 2010). Se ha reportado la sobreexpresión de esta enzima en arroz en condiciones de estrés abiótico por temperatura (frío) (Yan et al, 2006). Adicionalmente, se ha probado que esta enzima es muy sensible en presencia de estrés abiótico, y se degrada muy rápidamente en presencia de ROS. Esta es la razón por la

que se ha reportado previamente su sobreexpresión en diversos tipos de estrés para poder abastecer las necesidades metabólicas de las células (Yan et al, 2006).

Por último, el quinto grupo de genes potenciales con función conocida identificados codifican para proteínas involucradas en procesos metabólicos. Dentro de este grupo se infiere la subexpresión de genes que codifican para dos enzimas: NADH dehidrogenasa codificada por el gen nad4 mitocondrial (a las 36 horas de tratamiento) y la subunidad 1 de la ATPasa (a las 12 horas). La NADH4 es una enzima involucrada en el transporte de electrones en la mitocondria. Se ha reportado una subexpresión de los genes involucrados en la codificación de las distintas subunidades de esta enzima como producto de un exceso de dióxido de carbono, es decir, una de las consecuencias de la limitación de la fotosíntesis debido al estrés abiótico (Braun y Zabaleta, 2007). En cuanto a las ATPasas, tanto la subexpresión como la sobreexpresión de estas enzimas ha sido previamente reportada como consecuencia del estrés abiótico, incluyendo la salinidad. Las principales implicaciones de estas enzimas en la respuesta a sal serían la intervención en la homeostasis de iones durante el estrés, el transporte de sustancias, y la compartimentalización de osmolitos (Sahi, et al., 2005).

Como se puede apreciar después del análisis de los ADNc diferenciales identificados en este estudio, se comprueba que la respuesta frente a estrés por salinidad es compleja e involucra muchos componentes de la célula vegetal. Entre ellos los potencialmente identificados en este estudio: metabolismo, fotosíntesis, modificación de la pared celular, regulación de la expresión génica, etc. Muchos de los genes identificados en este estudio proporcionan simplemente una idea de algunos cambios en la expresión génica que se producen como consecuencia de la presencia de sal. Sin embargo, otros, si constituyen alternativas interesantes que podrían

utilizarse para llevar a cabo mejoramiento genético relacionado con tolerancia a estrés salino. Entre estos genes de mayor interés estarían, por ejemplo, el gen para la proteína TSI-1, la epoxidasa de zeaxantina, factor de ADP- ribosilación, proteína arabinogalactan, deshidrogenasa-4 de cinamato, proteína de lignificación de la pared celular secundaria, metilesterasa de pectina, 1-5 bifosfato de ribulosa y ATP sintasa de cloroplasto. El interés enfocado en este grupo de genes radica en que previamente ya se ha reportado su relación con tolerancia frente a estrés abiótico en otras especies (Vydia et al., 1999; Hee- Yeo et al., 2008; Machuka et al., 1999; Zhang, et al., 1999; Bell- Lelong et al., 1997; Domingo et al., 1994; Micheli et al., 2001; Seeman y Sharkey, 1986 y Yan et al., 2006). El paso a seguir con este conjunto de genes es, en primer lugar, evaluar mediante PCR en tiempo real si los cambios en la expresión de estos genes están realmente influidos por la salinidad. Una vez comprobado esto se deberá comprobar si estos genes candidatos pueden realmente participar en la tolerancia frente a sal en tomate, u otra especie elegida.

## **9. Conclusiones**

La accesión identificada como la más tolerante a estrés salino correspondió a Chaltura, provincia de Imbabura. La menos tolerante correspondió a Quero, provincia de Tungurahua.

La concentración de NaCl elegida para causar suficiente estrés en plantas de tomate de árbol como para obtener una expresión génica relacionada con respuesta a dicho estrés pero en la cual todavía se obtenía crecimiento de las plantas fue de 100mM.

Los principales síntomas morfológicos observados por efecto del cloruro de sodio en las plantas de tomate de árbol fueron crecimiento retardado, pérdida de la intensidad del color verde, amarillamiento de hojas, caída de hojas y yemas, y raíces secas.

Se pudo aislar 171 bandas diferenciales de las cuáles se recuperó 99 secuencias de ADNc. De estas 99, 42 no presentaron homología en Blast, 19 correspondieron a ADNc de *Solanum lycopersicum* de las cuales no se ha podido determinar una función, 10 correspondieron a genes ribosomales y 28 a ADNc de distintas especies vegetales de las cuáles se conoce una función.

De los 28 ADNc de los cuáles se identificó una función, 21 fueron ADNc únicos. Estos pueden clasificarse en algunas categorías. 4 codifican para proteínas estructurales o de modificación de la pared secundaria, 3 para son proteínas directamente vinculadas con respuesta a estrés, 2 para proteínas involucradas en el metabolismo en general, 8 para proteínas relacionadas con fotosíntesis, y 4 para proteínas que regulan la expresión génica.

## **10.Recomendaciones**

- Ampliar el número de combinaciones de primers utilizados en el despliegue diferencial con el fin de aumentar la cobertura analizada del genoma.
- Ampliar el estudio a otros tejidos de la planta, pues se conoce que la respuesta a salinidad varía en diferentes órganos de la planta.
- A partir del conjunto de genes identificados seleccionar, en base a estudios previos, los que ya se han reportado en la respuesta de las plantas frente a salinidad para rastrear su expresión en tiempo real y ver si realmente está influida por el estrés salino.

- Con los genes, cuya expresión se demuestre si está influida por estrés salino generar plantas genéticamente modificadas induciendo o silenciando su expresión. De esta manera se podrá garantizar que dichos genes realmente son candidatos para mejorar la tolerancia de la especie a la sal.

## 11. Bibliografía

Agarose Gel Electrophoresis of RNA. (2013). Life Technologies Protocols. <  
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/agarose-protocol.html>>

Albert, M., Belastegui- Macadam, X., y Kaldenhoff, R. (2006). *An attack of the plant parasite Cuscuta reflexa induces the expression of attAGP, an attachment protein of the host tomato*. The Plant Journal. Vol. 48: 548-556.

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. BLAST Software. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Aoki, K., Yano K., Suzuki A., Kawamura S., Sakurai N., Suda K., Kurabayashi A., Suzuki T., Tsugane T., Watanabe M., Ooga K., Torii M., Narita T., Shin-I T., Kohara Y., Yamamoto N., Takahashi H., Watanabe Y., Egusa M., Kodama M., Ichinose Y., Kikuche M, Fukushima S., Okabe A., Arie T., Sato Y., Yazawa K., Satoh S., Omura T., Ezura H., y Shibata, D. (2010). *Large-scale analysis of full-length ADNc from the tomato (Solanum lycopersicum) cultivar Micro- Tom, a reference system for the Solanaceae genomics*. BMC Genomics, 11: 210

Bagley, C., Kotuby- Amacher J., Farrell-Poe K. (2004). *Análisis de la Calidad del Agua para el Ganado*. Estern Beef Resource Committee. Edición Español.

Barthet, M., y Hilu, K. (2007). *Expression of MATK: Functional and Evolutionary Implications*. American Journal of Botany. Vol. 94. No. 8: 1402-1412.

Barriga, Sandra. (2003). *Diagnóstico de la Salinidad de los Suelos Cultivados en las Principales Áreas Bajo Riego en el Ecuador*. Universidad Central del Ecuador. Tesis de Pregado. Quito.

Bell-Lelong, D., Cusimano, C., Meyer, K. y Chapple, C. (1997). *Cinnamate- 4-Hydroxylase Expression in Arabidopsis*. Plant Physiology. Vol 113: 729-738.

Bonfield, J. y Staden, R. (2004). Staden Package Software. <http://staden.sourceforge.net/>

Braun, H., y Zabaleta, E. (2007). *Carbonic anhydrase subunits of the mitochondrial NADH dehydrogenase complex (comple I) in plants*. Physiologia Plantarum. Vol. 129: 114-122.

Brouwer, C., Goffeau A. y Heibloem M. (1985). *Irrigation water management: Training Manual No. 1- Introduction to Irrigation*. FAO Corporate Document Repository <<http://www.fao.org/docrep/R4082E/r4082e00.htm#Contents>>

Buchanam, B., Gruissem, W. y Russele, J. (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists.

Chitnis, P. (1996). *Update on Photosynthetic Electron Transport Phorosystem I*. Plant Physiol. Vol. 111: 661-669.

Daum, B., Nicastró, D., Austin J., McIntosh, R. y Kuhlbrandt, W. (2010). *Arrangement of Photosystem II and ATP Synthase in Chloroplast Membranes of Spinach and Pea*. The Plant Cell. Vol. 22: 1299-1312.

Del Campo, E., Sabater, B. y Martín, M. (2002). *Post-transcriptional Control of Chloroplast Gene Expression*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 277. No. 39: 36457-36464.

Dirección Nacional de Biodiversidad y Áreas Protegidas/ Minsiterio del Ambiente de la República del Ecuador. (2004). *Programa de acción nacional de lucha contra la desertificación y mitigación de la sequía*.

< <http://www.unccd.int/ActionProgrammes/ecuador-spa2004.pdf> >

Domingo, C., Gómez, M., Cañas, L., Hernández- Yago, J., Conejero, V. y Vera, P. (1994). *A Novel Extracellular Matrix Protein from Tomato Associated with Lignified Secondary Cell Walls*. The Plant Cell. Vol. 6: 1035-1047.

Dunwell, J., Moya- León, M. y Herrera, R. (2001). *Trascriptome analysis and crop improvement (A review)*. Biological Research. Vol. 34. No. 3.

Elortza, F., Asturias, J., y Arizmendi, J. (1999). *Chloroplast NADH Dehydrogenase from Psidium sativum: Characterization of its Activity and Cloning of ndhK Gene*. Plant Cell Physiol. Vol. 40. No. 2: 149-154.

Fassbender, HW. y Bornemisza E. (1987) *Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina*. 2da Edición. San José, C.R.: IICA, 1994.

Feicán, C., Encalada, C. y Larriva, W. (1999). *El Cultivo del Tomate de Árbol*. Estación Chuquipata Granja Experimental Bullcay. INIAP. Cuenca.

Griffiths, S., Dunford, R., Coupland, G. y Laurie, D. (2003). *The Evolution of CONSTANS- Like Gene Families in Barley, Rice, and Arabidopsis*. *Plant Physiology*. Vol. 131: 1855-1867.

Gupta, S., Bharalee, R., Bhorali, P., Das, S., Bhagawati, P., Bandyopadhyay, T., Gohain, B., Agarwal, N., Ahmed, P., Borchetia, S., Kalita, M., Handique, A., y Das, S. (2012). *Molecular Analysis of Drought Tolerance in Tea by ADNC-AFLP Based Transcript Profiling*. *Molecular Biotechnology*. First Published Online. DOI 10.1007/s12033-012-9517-8.

Harter, R. (1983). *Effect of soil pH on adsorption of lead, copper, zinc and nickel*. *Soil Science Society of America Journal*. Vol. 47. No. 1: 47-51.

Hayama, R., Izawa, T., y Shimamoto, K. (2002). *Isolation of Rice Genes Possibly Involved in the Photoperiodic Control of Flowering by a Fluorescent Differential Display Method*. *Plant Cell Physiology*. Vol. 43. No. 5: 494-504.

Hee-Yeon, P., Hye-Yeon, S., Bo-Kyung, P., Sun- Ho, K., Chang-Hyo, G., Byeong-ha, L., Choon-Hwan, L. y Yong-Hwan, M. (2008). *Overexpression of Arabidopsis ZEP enhances tolerance to osmotic stress*. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. Vol. 375. No. 1: 80-85.

Hirose, T. y Sugiura, M. (1997). *Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast ndhD ARNm: a possible regulatory mechanism for the*

*expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes.* The EMBO Journal. Vol. 16. No. 22: 6804-6811.

Jayaraman, A., Puranik, S., Kumar Rai, N., Vidapu, S., Pakaj Sahu, P., Lata, C., y Prasad, M. (2008). *ADNc-AFLP Analysis Reveals Differential Gene Expression in Response to Salt Stress in Foxtail Millet (Setaria itálica L.)* Molecular Biotechnology. Vol. 40: 241-251.

Jensen, P., Gilpin, M., Knoetzel, J., y Vibe Scheller, H. (2000). *The PSI-K Subunit of Photosystem I is Involved in the Interaction between Light- harvesting Complex I and the Photosystem I Reaction Center Core.* The Journal of Biological Chemistry. Vol. 275. No. 32: 24701-24708.

Kanjee, U., Ogata, K., y Houry, W. (2012). *Direct binding targets of the stringent response alarmon (p)ppGpp.* Molecular Microbiology. Vol. 85. No. 6: 1029-1043.

Ko, K., Granell, A., Bennett, J., y Cashmore, A. (1990). *Isolation and characterization of ADNc from Lycopersicum esculentum and Arabidopsis thaliana encoding the 33kDa protein of the photosystem II-associated oxygen- evolving complex.* Plant Molecular Biology. Vol. 14: 217-227.

Lagercrantz, U., y Axelsson, T. (2000). *Rapid Evolution of the Family of CONSTANS like genes in Plants.* Mol. Biol. Evol. Vol. 17. No. 10: 1499-1507.

Liang, P. y Pardee, A. (1992). *Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.* Science. Vol. 257:967-971.

Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R., Averboukh, L., Wang, F. y Pardee, A. (1994). *Differential display using one- base anchored oligo-dT primers*. Nucleic Acids Research. Vol. 22. No. 25: 5763-5764.

Liang, Peng (2002) *A Decade of Differential Display* BioTecniques 33: 338-346

Liu, X., y Baird, V. (2003). *Differential Expression of Genes Regulated in Response to Drought or Salinity Stress in Sunflower*. Crop Science. Vol. 43: 678-687.

Machuka, J., Bashiardes, S., Ruben E., Spooner, K., Cuming, A., Knight, C., y Cove, D. (1999). *Sequence analysis of Expressed Sequence Tags from and ABA- Treated ADNc Library Identifies Stress Response Genes in the Moss Physcomitrella patens*. Plant Cell Physiology. Vol. 40. No. 4: 378-387.

MAGAP Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2013). *Principales Cultivos del Ecuador: Total Superficie Cosechada Serie Histórica 2000-2011*. <<http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/site-map/2-produccion/Cacao?view=application>>

Matheson, L., Hanton, S., Rossi, M., Latijnhouwers, M., Stefano, G., Renna, L. y Brandizzi, F. (2007). *Multiple Roles of ADP-Ribosylation Factor 1 in Plant Cells Include Spatially Regulated Recruitment of Coatomer and Elementos of the Golgi Matrix*. Plant Physiology. Vol. 143: 1615-1627.

Mehta, R., Fawcett, T., Porath, D. y Mattoo, A. (1992). *Oxidative Stress Causes Rapid Membrane Translocation and in Vivo Degradation of Ribulose- 1,5- biphosphate Carboxylase/ Oxygenase*. (1992). The Jorunal of Biological Chemistry. Vol. 267. No. 5: 2810-2816.

Micheli, F. (2001). *Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology*. Trends in Plant Science. Vol. 6. No. 9.

Morton, J. (1987). *Tree Tomato*. Fruits of warm climates. p. 437–440 <  
[http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/tree\\_tomato.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/tree_tomato.html)>

Munns, R. (2005). *Genes and salt tolerance: bringing them together*. New Phytologist.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). *A revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. Physiologia Plantarum. Vol. 15. No 3: 473-497.

Padilla, W. (2007) *El suelo componente importante del ecosistema*. Grupo Clínica Agrícola. Quito- Ecuador.

Pandit, S. y Srinivasan, N. (2003). *Survey for G- proteins in the Prokaryotic Genomes: Prediction of Functional Roles Based on Classification*. Proteins: Structure, Function and Genetics. Vol. 52: 585-597.

Sahi, C., Singh, A., Blumwald, E., y Grover, A. (2006). *Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt- stress tolerance- related genes from transcriptional profiling data*. Physiologia Plantarum 127: 1-9.

Sairam, R. y Tyagi, A. (2004). *Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants*. Current Science, Vol. 86. No 3.

Schoch, Guillaume, Georgi Nikov, William Alworth y Daniéle Werck-Reichhart. (2002). *Chemical Inactivation of the Cinnamate 4- Hydroxylase Allows for the Accumulation of Salicylic Acid in Elicited Cells*. Plant Physiology: Vol. 130, pp. 1022-1031.

Seeman, J. y Sharkey, T. (1986). *Salinity and Nitrogen Effects on Photosynthesis, Ribulose- 1,5- Biphosphate Carboxylase and Metabolite Pool Sizes in Phaseolus vulgaris L.* Plant Physiol. Vol. 82: 555-560.

Seo, M. y Koxhiba, T. (2002). *Complex regulation of ABA biosynthesis in plants.* Trends in Plant Science. Vol. 7. No. 1: 1360-1385.

Showalter, A. (2001). *Arabinogalactan- proteins: structure, expression and function.* CMLS Cellular and Molecular Life Sciences. Vol. 58: 1399-1417.

SICA. Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, Servicio de Información Agropecuaria. *Tomate de árbol.* (2004). <http://www.sica.gov.ec/agronegocios>

Sullivan, J., Shirasu, K., y Wang Deng, X. (2003). *The Diverse Roles of Ubiquitin and the 26S Proteasome in the Life of Plants.* Nature Reviews Genetic. Vol. 4

Taiz, L. y Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology.* Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers: Sunderland, Massachusetts.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Kumar, S., Nei, M. (2008). Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA 5.05 Software <http://www.megasoftware.net/mega.php>

Thieman, W. y Palladino, M. (2010). *Introducción a la Biotecnología.* Madrid: Pearson Educación.

Thompson, A., Jackson, A., Parker, R., Morpeth, D., Burbidge, A. y Taylor, I. (2000). *Absciscic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-*

*epoxycarotenoid dioxygenase ARNm by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. Plant Molecular Biology. Vol. 42: 833-845.*

Tohri, A., Suzuki, T., Okuyama, S., Kamino, K., Motoki, A., Hirano, M., Ohta, H., Shen, J., Yamamoto, Y. y Enami, I. (2002). *Comparison of the Structure of the Extrinsic 33kDa Protein from Different Organisms. Plant Cell Physiol. Vol. 43. No. 4: 429-439.*

Tozawa, Y., Nozawa, A., Kanno, T., Narisawa, T., Masuda, S., Kasai, K., y Nanamiya, H. (2007) *Calcium-activated (p)ppGpp Synthetase in Chloroplasts of Land Plants. The Journal of Biological Chemistry Vol. 282 No. 49: 35536-35545.*

Umezawa, T., Sakurai T., Totoki Y., Toyoda A., Seki M., Ishiwata A., Akiyama K., Kurotani A., Yoshida T., Mochida K., Kasuga M., Todaka D., Maruyama K., Nakashima K., Enju A., Mizukado S., Ahmed S., Yoshiwara K., Harada K., Tsubokura Y., Hayashi M., Sato S., Anai T., Ishimoto M., Funatusuki H., Teraishi M., Osaki M., Shinano T., Akashi R., Sakaki Y., Yamaguchi-Shinozaki K., y Shinozaki K. (2008). *Sequencing and Analysis of Aproximately 40 000 soybean ADNc clones from a full-length-enriched ADNc Library. DNA Research 15, 333-346.*

Vidya, C., Manoharan, M., y Sita, L. (1999). *Cloning and characterization of salicylic acid- induced, intracelular pathogenesis- related gene from tomato (Lycopersicum esculentum). J Biosci., Vol. 24. No. 3: 287-293.*

Vierstra, R. (2003). *The ubiquitin/ 26S proteasome pathway, the complex last chaptr in the life of many life protein. Trends in Plant Science. Vol. 8. No. 3.*

Vij, Shubba y Taygi, Akhilesk (2007). *Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. Plant Biotechnology Journal 5.*

Wang, W., Vinocur B., Altman A. (2003). *Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance*. *Planta*. Vol. 18: 1-14.

Wang, F., Zhong, N., Gao, P., Wang, G., Wang, H. y Xia, G. (2008). *SsTypA1, a chloroplast specific TypA/BipA- type GTPase from the halophytic plant Suaeda salsa, plays a role in oxidative stress tolerance*. *Plant, Cell and Environment*. Vol. 31: 982-994.

Xiong, L. y Zhu, J. (2000). *Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives*. *Physiologia Plantarum* 112: 152-166.

Xiong, L., Lee, M., Qi, M. y Yang, Y. (2001). *Identification of Defense- Related Rice Genes by Suppression Subtractive Hybridization and Differential Screening*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 14. No. 5: 685-692.

Yamazaki M. y K. Saito (2002) *Differential display analysis of gene expression in plants*. *Cell. Mol. Life Sci*. 59: 1246-1255

Yan, S., Zhang, Q., Tang, Z., Su, W. y Sun, W. (2006). *Comparative Proteomic Analysis Provides New Insights into Chilling Stress Responses in Rice*. *Molecular & Cellular Proteomics* 5.3.

Zebrowski, C. (1996). *Los suelos con cangahua en el Ecuador*. *Memorias del III Simposio Internacional sobre Suelos Volcánicos endurecidos*. No. 128: 128-137.

Zegzouti, H., Jones, B., Frasse, P., Marty, C., Maitre, B., Latché, A., Pech, J., y Bouzayen, M. (1999). *Ethylene- regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene- responsive and ripening related genes isolated by differential display*. *The Plant Journal*. Vol. 18. No. 6: 589-600.

Zhang, J., Klueva, N., Wang, Z., Wu, R., Ho, T. y Nguyen, H. (2000). *Genetic Engineering for Abiotic Stress Resistance in Crop Plants*. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Plant, Vol. 36. No. 2: 108-114.

Zhang, Y., Sederoff, R. y Allona, I. (1999). *Differential expression of genes encoding cell Wall proteins in vascular tissues from vertical and bent loblolly pine trees*. *Tree Physiology*. Vol. 20: 457-466.

Zhu, Jian- Kang (2001). *Plant salt tolerance*. *Trends in Plant Science*. Vol. 6 No. 2

Zhu, Jian- Kang (2002). *Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants*. *Annu Rev Plant Biol*. 53: 247-273.

## 12.Tablas

**Tabla 1.** Tasa de afectación en diversos cultivos causada por estrés tanto biótico como abiótico.

Cultivo	Producción esperada (biomasa kg/hectárea)	Producción real (biomasa kg/hectárea)	Promedio de pérdidas (biomasa kg/hectárea)		Pérdida de cultivos expresada como porcentaje de reducción causada por estrés abiótico
			Estrés biótico	Estrés abiótico	
Maíz	19,300	4,600	1,952	12,700	65,8%
Trigo	14,500	1,880	726	11,900	82,1%
Soya	7,390	1,610	666	5,120	69,3%
Sorgo	20,100	2,830	1,051	16,200	80,6%
Avena	10,600	1,720	924	7,960	75,1%
Cebada	11,400	2,050	765	8,590	75,4%
Papa	94,100	28,300	17,775	50,900	54,1%
Remolacha azucarera	121,000	42,600	17,100	61,300	50,7%

Tomado de Buchanam, et al, 2000.

**Tabla 2.** Resumen elaborado por la USDA que muestra el impacto que genera la salinidad de los suelos sobre los cultivos en general.

CEe a 25°C (dS/m)	Efecto sobre la cosecha	Clasificación del suelo
0-2	Comúnmente despreciable	No salino
2-4	Cultivos muy sensibles afectados	Poco salino
4-8	Muchos cultivos afectados	Medianamente salino
8-16	Solamente cultivos tolerantes crecen bien	Muy salino
>16	Solamente crecen cultivos muy tolerantes	Extremadamente salino

Tomado de Fassbender, 1987.

**Tabla 3.-** Clasificación de los suelos por su sodicidad en base al factor PSI (Porcentaje de Sodio Intercambiable)

<b>Clase</b>	<b>PSI</b>
No sódicos	<7
Ligeramente sódicos	7-10
Medianamente sódicos	15-20
Fuertemente sódicos	20-30
Muy fuertemente sódicos	>30

Tomado de Padilla, 2007.

**Tabla 4.-** Clasificación de cultivos en función de su tolerancia frente a sal de acuerdo a los parámetros establecidos por la FAO.

<b>Fuertemente tolerantes</b>	<b>Moderadamente tolerantes</b>	<b>Sensibles</b>
Palmera datilera	Trigo	Trébol rojo
Cebada	Tomate	Arveja
Remolacha	Avena	Fréjol
Algodón	Alfalfa	Caña de Azúcar
Espárrago	Arroz	Pera
Espinaca	Maíz	Manzana
	Lino	Naranja
	Papa	Almendra
	Zanahoria	Durazno
	Cebolla	Ciruela
	Pepino	Albaricoque
	Higo	
	Oliva	
	Uva	

Fuente: (Brouwer et al, 1985).

**Tabla 5.-** Resumen del crecimiento de plantas de tomate de árbol al realizar subcultivos en MS con diferentes concentraciones de NaCl para las accesiones identificadas como la más y menos tolerantes frente a salinidad.

<b>Concentración NaCl (mM)</b>	<b>Tiempo necesario para obtener un crecimiento de los segmentos nodales mayor a 6cm en días en la acesión de Chaltura</b>	<b>Tiempo necesario para obtener un crecimiento de los segmentos nodales mayor a 6cm en días en la acesión de Quero</b>
0	20	20
50	22	20
75	28	35
100	30	47
120	35	Muerte
200	Muerte	Muerte
250	Muerte	Muerte

**Tabla 6.-** Resumen de los parámetros de crecimiento de las plantas de tomate de árbol transferidas a MS con NaCl de todas las localidades ensayadas.

<b>Provincia</b>	<b>Localidad</b>	<b>Concentración de sal a la cual empezaron a notarse problemas de crecimiento en las plantas</b>	<b>Concentración de sal a la cual se detuvo el crecimiento en las plantas</b>	<b>Tiempo en el cual los cambios morfológicos en las plantas fueron observables</b>
Tungurahua	Ambato	100mM	175mM	30 días
	Quero	75mM	150mM	15 días
Imbabura	Cevallos	150mM	175mM	15 días
	Santiago del Rey	100mM	120mM	45 días
	Imbaya	150mM	175mM	30 días
	Violeta	150mM	175mM	45 días
	Chaltura	175mM	200mM	30 días
Pichincha	Iniap (IZQ I)	150mM	175mM	30 días
	Iniap (IZQ III)	120mM	150mM	30 días
	Iniap (IZQ IV)	150mM	175mM	45 días
	Iniap (DER III)	150mM	175mM	30 días

**Tabla 7.-** Clasificación de los 21 ADNc con función conocida identificados en el estudio.

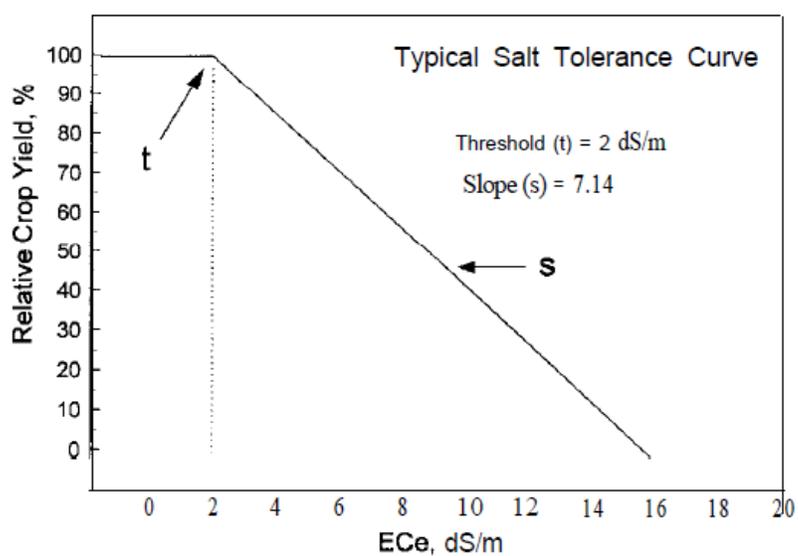
<b>ADNc identificado</b>	<b>No. Accesoión en GenBank</b>	<b>Homología más elevada</b>	<b>e-value<sup>a</sup></b>	<b>Porcentaje de homología</b>	<b>Sobreexpresión/ subexpresión</b>	<b>Función resumida</b>
3A5 9G4 24A3	NM 001247216.1 NM 001247216.1 NM 001247216.1	Proteína Arabinogalactan rica en metionina, <i>Solanum lycopersicum</i>	6e-34 3e-44 1e-23	86% 83% 82%	Sobreexpresión Sobreexpresión Sobreexpresión	Estructura de la pared celular
3G1	AF212318.1	Hidroxilasa 4 de ácido cinámico (CH4), <i>Capsicum annuum</i>	5e-23	78%	Sobreexpresión	Lignificación de la pared celular secundaria
3G4	AF152172.1	Metil esterasa de pectina (Pest2), <i>Solanum tuberosum</i>	4e-24	76%	Subexpresión	Modificación en la estructura de la pared celular secundaria
9G6	NM001247259.1	Proteína de lignificación de la pared celular secundaria, <i>Solanum lycopersicum</i>	3e-33	80%	Sobreexpresión	Lignificación de la pared celular secundaria
9G11	NM001247423.1	Proteína de estrés inducido en tomate (TSI-1), <i>Solanum lycopersicum</i>	5e-20	90%	Sobreexpresión	Respuesta a estrés
12G3	HM013964.1		1e-38	79%	Sobreexpresión	Respuesta a estrés

		Epoxidasa de zeaxantina (ZEP), <i>Solanum tuberosum</i>				
24G2	XM003529020.1	Proteína de unión a	2e-17	80%	Subexpresión	Respuesta a estrés
12G10	XM003529020.1	GTP TypA/BipA,	9e-29	78%	Subexpresión	
9G5	XM003529020.1	<i>Glycine max</i>	6e-41	82%	Subexpresión	
9G8	XM003529020.1		6e-41	82%	Subexpresión	
9G12	00075597.1	trnH-psbA (Fotosistema II), <i>Oenothera magellanica</i>	3e-8	85%	Sobreexpresión	Maquinaria de fotosíntesis
24A7	AY899937.1	Subunidad PSI-K del fotosistema I, <i>Nicotiana benthamiana</i>	2e-67	91%	Sobreexpresión	Maquinaria de fotosíntesis
24G4	JN559757.1	ndhK dentro del fotosistema II, <i>Nicotiana tometonsiformis</i>	7e-93	93%	Subexpresión	Maquinaria de fotosíntesis
24G14	AJ318074.1	ndhD dentro del fotosistema II, <i>Cucumis sativus</i>	3e-26	76%	Subexpresión	Maquinaria de fotosíntesis
36G3	S72358.1	Subunidad PSI-E fotosistema I, <i>Nicotiana sylvestris</i>	8e-22	89%	Sobreexpresión	Maquinaria de fotosíntesis
24G15	Z11999.1	Proteína 33kDa complejo oxígeno	2e-62	90%	Subexpresión	Fotosíntesis

		envolvente, <i>Nicotiana tabacum</i>				
36A14	GO997632.1	ATP sintasa, <i>Nerium oleander</i>	0.015	81%	Sobreexpresión	Fotosíntesis
48A1	XOS982.1	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/ oxigenasa, <i>Solanum lycopersicum</i>	5e-8	70%	Sobreexpresión	Fotosíntesis
12A2	D61392.1	Subunidad atpA-1 de ATPasa, <i>Petunia axillaris</i>	0	99%	Subexpresión	Metabolismo
36A7	GO449677.1	NADH dehidrogenasa	1e-23	99%	Subexpresión	Metabolismo, mitocondria
36A8	GO449677.1	subunidad 4, <i>Carica</i>	2e-19	92%	Subexpresión	
36A9	GO449677.1	<i>papaya</i>	1e-40	93%	Subexpresión	Regulación de la expresión génica
12G9	EF438866.1	Maturasa K, <i>Nolana paradoxa</i>	7e-55	84%	Sobreexpresión	
24A14	DO882684.1	Proteína CONSTANS, <i>Solanum tuberosum</i>	3e-64	90%	Sobreexpresión	Regulación de la expresión génica
36A2	DO228333.1	Factor de ribosilación del ADP, <i>Solanum tuberosum</i>	3e-12	90%	Sobreexpresión	Regulación de la expresión génica fase post-traducciona
36G1	DO226996.1	Subunidad alpha 4 proteosoma 26S, <i>Nicotiana benthamiana</i>	5e-14	77%	Sobreexpresión	Regulación de la expresión génica, fase post traducciona

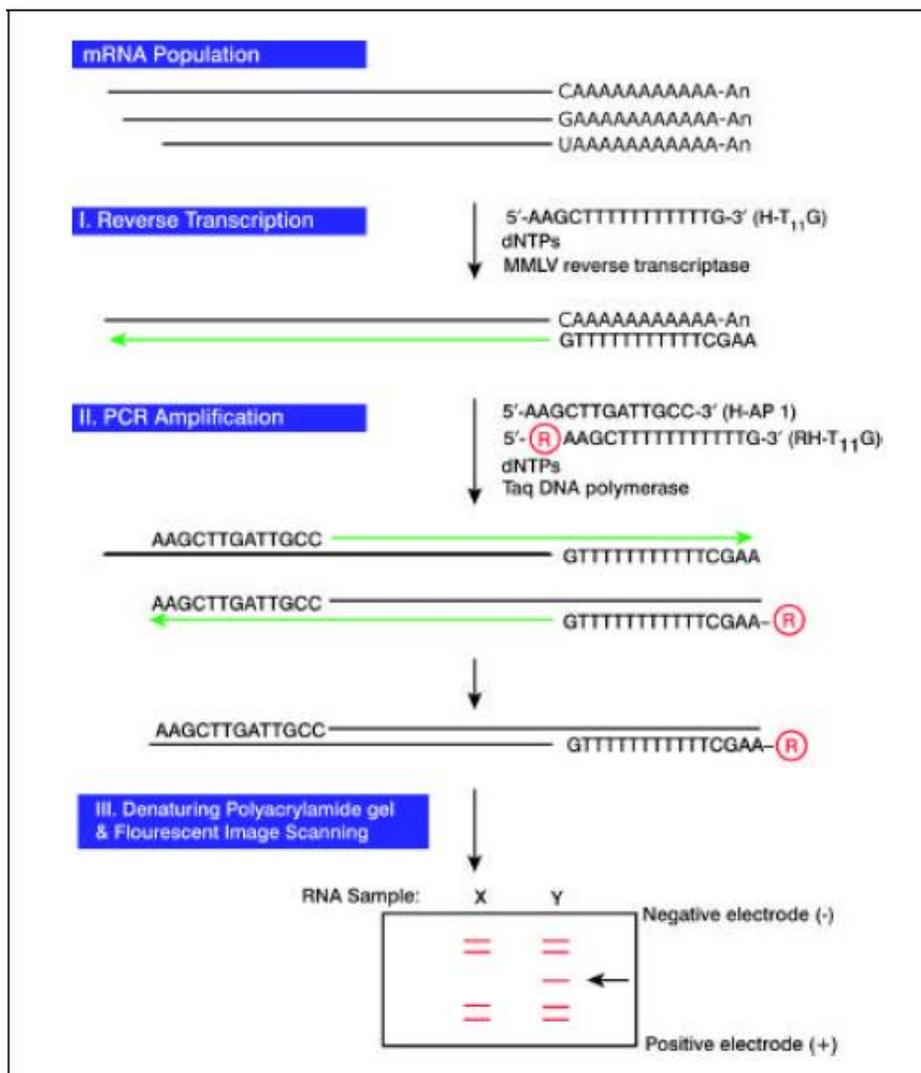
### 13.Figuras

**Figura 1.-** Curva de tolerancia frente a salinidad de un cultivo. La ecuación general se modela como  $y = 100 - s(EC_s - EC)$  donde, Y= producción del cultivo, EC (t)= valor umbral de conductividad eléctrica de una muestra de extracto de suelo. Es decir, a partir de esta concentración los efectos de la salinidad sobre el cultivo empiezan a ser evidentes, S= pendiente que resulta del porcentaje de productividad esperado por unidad de salinidad añadido sobre el valor umbral de conductividad eléctrica. Con este modelo se puede predecir la disminución en la producción de cualquier cultivo en función de la concentración de sales presente en el suelo.



Tomado de Brouwer et al, 1985.

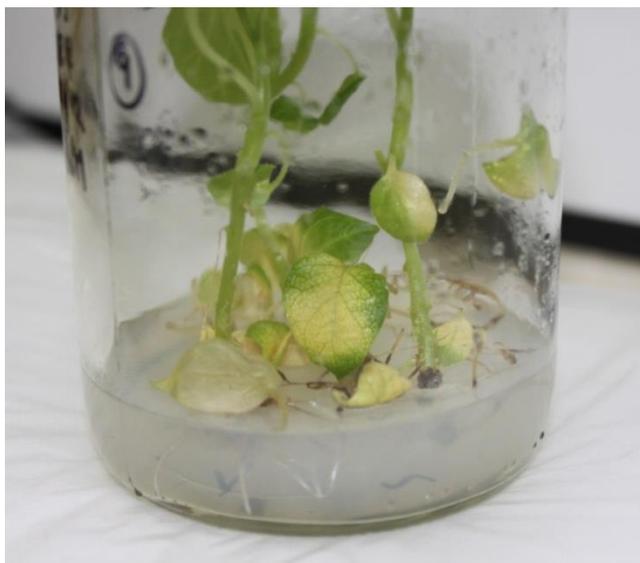
**Figura 2.-** Esquema fundamental del despliegue diferencial. Consiste en cuatro pasos sencillos: extracción de ARN, retrotranscripción utilizando primers de unión a la cola poli A, amplificación con oligonucleótidos cortos y electroforesis en geles de poliacrilamida donde se puede identificar las bandas diferenciales resultantes de algún tratamiento específico.



Tomado de Liang, 2002.

**Figura 3.-** Sintomatología observada en plantas de tomate de árbol como resultado de la exposición al estrés abiótico por salinidad.

- A. Planta de Pichincha, colección INIAP (IZQ I), foto tomada 1 mes después de su exposición a una concentración de 150mM de NaCl. Se puede observar algunos de los síntomas más evidentes del estrés salino en tomate de árbol: color más pálido, amarillamiento de hojas, caída de hojas, raíces secas



- B. Planta de Pichincha, colección INIAP (IZQ I), 1 mes de exposición a una concentración de 175mM de NaCl. También se pueden apreciar síntomas importantes causados por la salinidad: raíces secas, hojas caídas, color pálido y disminución del crecimiento.



- C. Planta de Pichincha Pichincha, colección INIAP Der III, 1 mes de exposición a concentración 150mM NaCl. Otros síntomas causados por la salinidad: poco crecimiento, pérdida de color, caída de hojas, yemas secas, raíces secas.



**Figura 4.-** Gel de agarosa al 2% para la visualización del ARN extraído de hojas de tomate de árbol.

Nomenclatura de muestras: L: Ladder 100bp (Invitrogen).

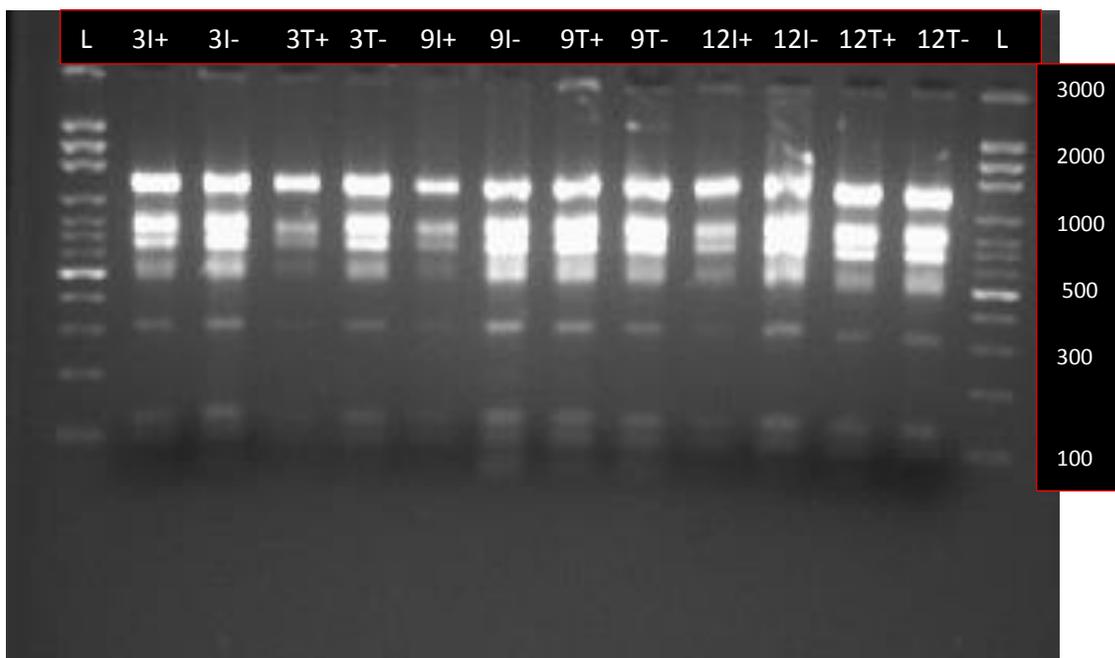
Número: tiempo (en horas) de exposición al tratamiento

I: Accesoión de Chaltura, provincia de Imbabura

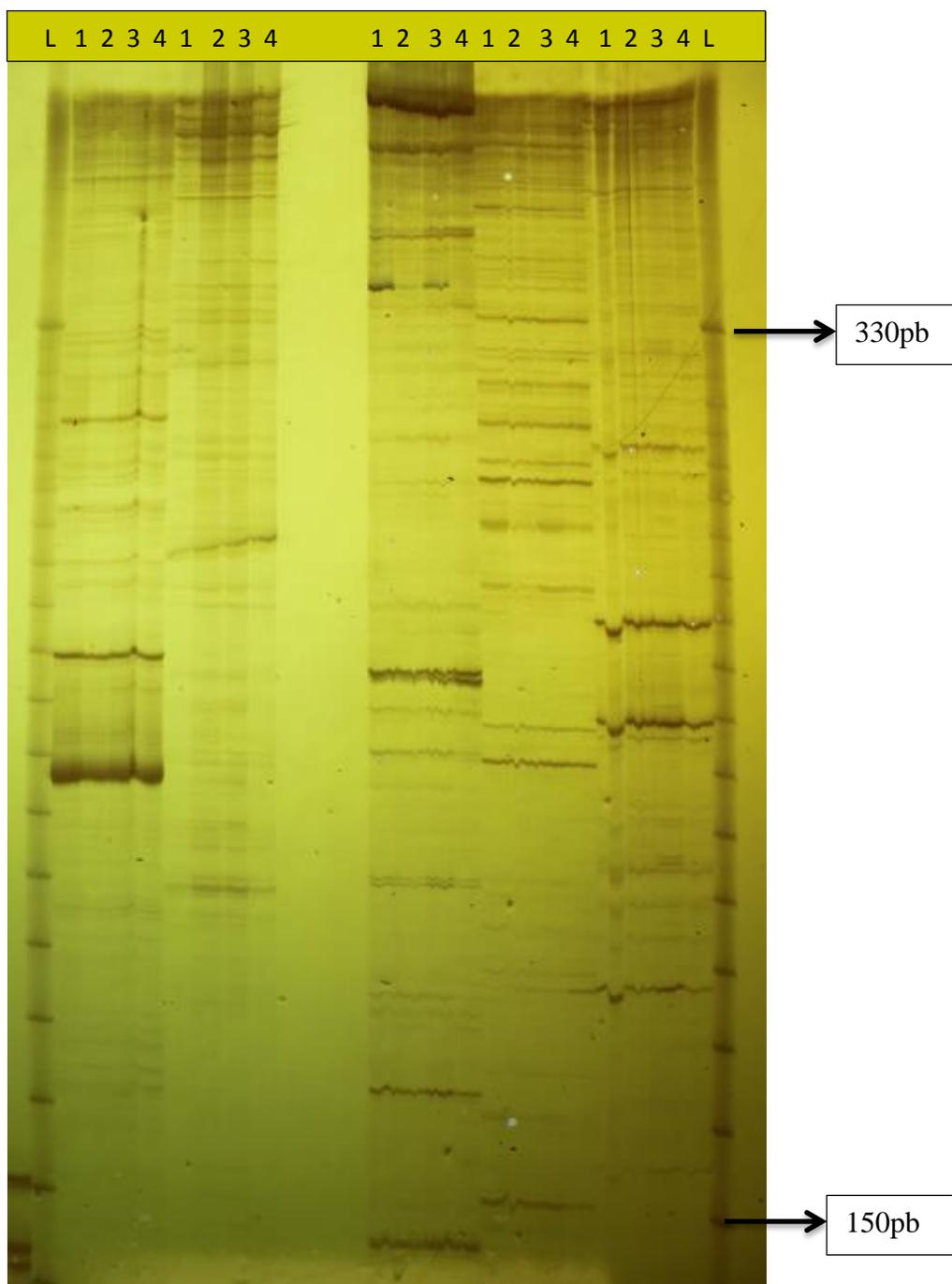
T: Accesoión de Quero, provincia de Tunguragua

+: exposición al tratamiento NaCl 100mM

-: control sin sal



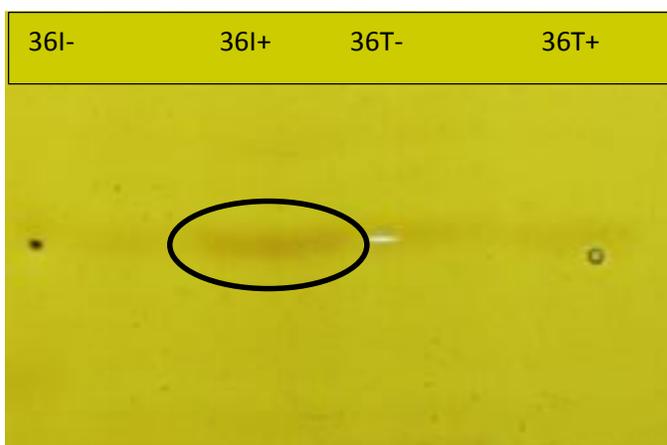
**Figura 5.-** Gel de electroforesis en poliacrilamida al 6% que corresponde a las muestras sometidas a 24 horas de exposición al tratamiento con NaCl con 5 de las 10 combinaciones distintas de primers (HT11-A en combinación con HAP1, HAP2, HAP6, HAP7, HAP11). El marcador de peso molecular utilizado fue 10bp de Invitrogen. Cada set de 4 muestras señalado corresponde a una combinación distinta de primers siendo 1: Chaltura con exposición al tratamiento de NaCl, Chaltura sin exposición al tratamiento de NaCl, Quero con exposición al tratamiento de NaCl, Quero sin exposición al tratamiento de NaCl.



**Figura 6.-** Ejemplos de bandas diferenciales encontradas y aisladas en el presente estudio.

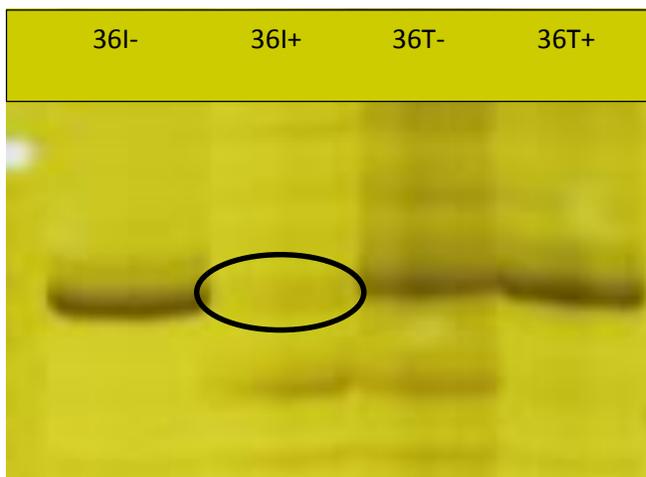
- A. Gel de acrilamida al 6% donde se observa una banda que indica sobreexpresión a las 36 horas de tratamiento con NaCl 100mM en accesión tolerante.

Nomenclatura de muestras: Número: tiempo (en horas) de exposición al tratamiento  
 I: Accesión de Chaltura, provincia de Imbabura  
 T: Accesión de Quero, provincia de Tunguragua  
 +: exposición al tratamiento NaCl 100mM  
 -: control sin sal

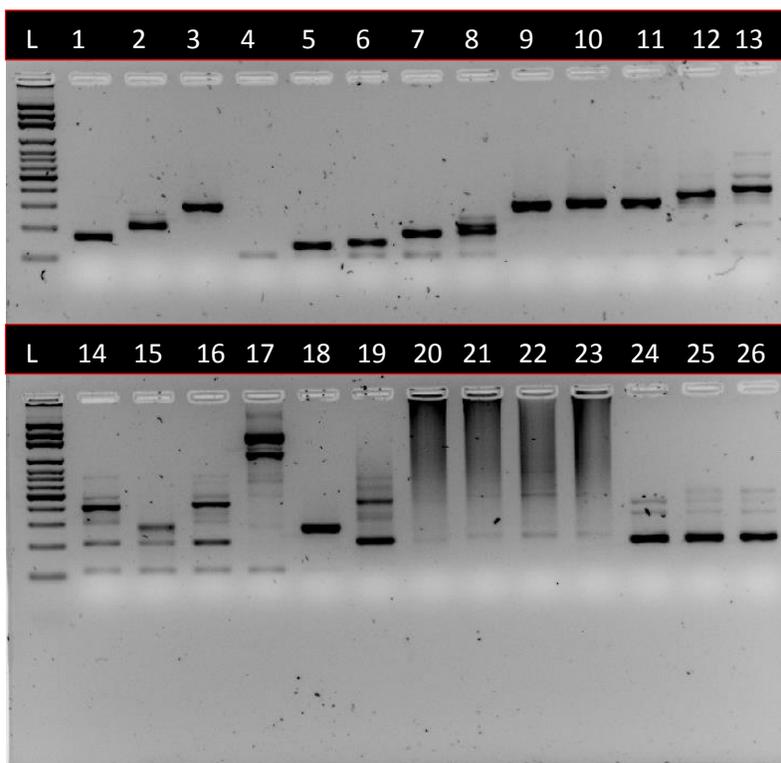


- A. Gel de acrilamida al 6% donde se observan bandas que indican subexpresión a las 36 horas de tratamiento en presencia de NaCl 100mM.

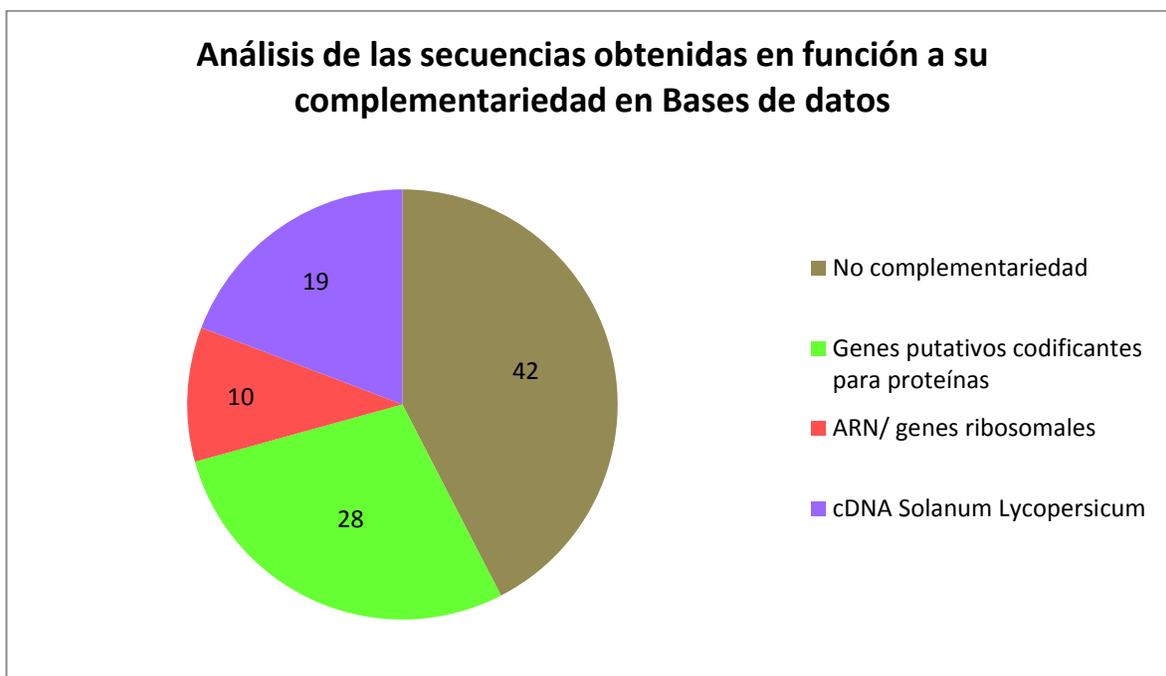
Nomenclatura de muestras: Número: tiempo (en horas) de exposición al tratamiento  
 I: Accesión de Chaltura, provincia de Imbabura  
 T: Accesión de Quero, provincia de Tunguragua  
 +: exposición al tratamiento NaCl 100mM  
 -: control sin sal



**Figura 7.-** Gel de electroforesis en agarosa al 1.5% que muestra productos de reamplificación de bandas diferenciales extraídas en diferentes tiempos. Se observa diferentes tipos de productos de reamplificación. En los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, y 18 se observan bandas únicas y en el tamaño esperado. Los carriles restantes muestran bandas de mala calidad que no pueden ser usadas para secuenciamiento.



**Figura 8.-** Clasificación de las 99 bandas secuenciadas de acuerdo al tipo de complementariedad que presentaron en las bases de datos.



## 14. Anexos

**Anexo 1.-** Mezclas de reacción y condiciones para la retrotranscripción del ARN.

En primer lugar se realizó un master mix inicial que contenía:

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración de partida para la reacción</b>	<b>Concentración final por reacción en un volumen final de 14<math>\mu</math>L por reacción</b>
Agua tratada con DEPC		
dNTPs Mix	10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
Primer HT <sub>11</sub> M	2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
ARN	100ng/ $\mu$ L	5ng/ $\mu$ L

Esta mezcla se sometió a un proceso de desnaturalización que consistió en calentamiento por 5 minutos a 65°C e incubación en hielo por 5 minutos.

Simultáneamente se preparó una segunda mezcla de reacción que se incorporó a la primera, transcurridos los 10 minutos de incubación previamente mencionados:

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración de partida para la reacción</b>	<b>Concentración final por reacción en un volumen final de 6<math>\mu</math>L por reacción</b>
First Strand Buffer	5x	1x
DTT	0.1M	5 $\mu$ M
Superscript III RT	200U/ $\mu$ L	10U

Las mezclas de reacción se llevaron al termociclador a 37°C por 1 hora para la síntesis de la primera hebra de ADNc y después a 70°C por 15 minutos para detener la reacción.

**Anexo 2.-** Mezcla de reacción y condiciones de amplificación de ADNc mediante PCR.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración de partida para la reacción</b>	<b>Concentración final por reacción en un volumen final de 20µL por reacción</b>
Agua tratada con DEPC		11µL
dNTPs Mix	10µM	0.5µM
Cloruro de Magnesio	50mM	1.5µM
PCR Buffer minus Mg	10x	1x
H-APx primer	2µM	0.2µM
H-T11M primer	2µM	0.2µM
RT- mix obtenido tal como se indica en el anexo I (con el mismo primer H-T11M utilizado para la PCR)		1µL
Taq DNA Polimerasa	5U/µL	5U

Programa utilizado en el termociclador:

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
Denaturación inicial	94°C	5 minutos	1
Denaturación	94°C	30 segundos	40
Annealing	40°C	2 minutos	40
Extensión	72°C	30 segundos	40
Extensión final	72°C	5 minutos	1

**Anexo 3.-** Mezcla de reacción y condiciones para la reamplificación del ADNc.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración de partida para la reacción</b>	<b>Concentración final por reacción en un volumen final de 14µL por reacción</b>
Agua tratada con DEPC		7µL
dNTPs Mix	10µM	0.5µM
Cloruro de Magnesio	50mM	1.5µM
PCR Buffer minus Mg	10x	1x
H-APx primer	2µM	0.2µM
H-T11M primer	2µM	0.2µM
Muestra extraída de banda diferencial		5µL
Taq DNA Polimerasa	5U/µL	5U

Programa utilizado en el termociclador:

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
Denaturación inicial	94°C	5 minutos	1
Denaturación	94°C	30 segundos	40
Annealing	40°C	2 minutos	40
Extensión	72°C	30 segundos	40
Extensión final	72°C	5 minutos	1

**Anexo 4.-** Fotografías de los ensayos realizados con plantas de tomate de árbol de diferentes accesiones de la Sierra ecuatoriana trasplantadas con raíces a medios con distintas concentraciones de sal. Se puede comparar el efecto del estrés abiótico en distintas accesiones a diferentes tiempos después de inducido el estrés.

A.



B.



Tungurahua, población Ambato Mercado, ensayo 100mM NaCl. A. Foto tomada el día de inicio del experimento. B. Observación a los 15 días de tratamiento. Se puede observar buen crecimiento (4cm) en comparación a muestras sin NaCl. La sintomatología principal que se observó en esta concentración de sal es la pérdida de hojas, y un color ligeramente más amarillo en hojas y tallo.

A.



B.



Tungurahua, población Ambato Mercado, ensayo 250mM NaCl. A. Foto tomada el día de inicio del experimento. B. Observación a los 15 días de tratamiento, se observa ambas plántulas muertas, ninguna accesión de tomate sobrevivió a esta concentración de sal.

A.



B.



Tungurahua, población Cevallos, ensayo control sin sal. A. Foto tomada el día de inicio del experimento. B. Observación a los 15 días de tratamiento, se observa crecimiento abundante de hojas y de tamaño (4.5cm).

A.



B.



Tungurahua, población Cevallos, ensayo 150mM NaCl. A. Foto tomada el día de inicio del experimento. B: 1 mes después de la exposición. Se puede observar que hubo crecimiento de las plantas. Se observan algunos síntomas resultantes del estrés salino como: pocas hojas, hojas caídas, raíces secas, color pálido. A pesar de esto se puede apreciar crecimiento (4 cm).

A.



B.



Tungurahua, población Cevallos, ensayo 175mM NaCl. A. Foto tomada el día de inicio del experimento. B. Observación al mes de tratamiento. El crecimiento se detuvo por completo, se puede ver los síntomas generados por salinidad: cambio en la coloración de tejidos, raíces secas, hojas caídas.

A.



B.



Tungurahua, población Quero, ensayo control sin sal. A: 0 días de exposición a sal. B: 15 días de exposición a sal. Se observa un buen crecimiento de las plantas (5cm).

A.



B.



Tunguragua, población Quero. Ensayo 75mM de NaCl. A: 0 días de exposición a sal. B: 15 días de exposición a sal. Se puede observar que a pesar de que las plántulas mantienen su coloración, el crecimiento está completamente estancado. Se observan raíces secas, hojas caídas y una de las plántulas muertas.

A.



B.



Pichincha, población IZQ III INIAP, ensayo sin sal. A. Día de inicio del experimento. B. 1 mes después de iniciado el experimento. Se observa un crecimiento abundante (mayor a 10cm) con abundantes hojas, grandes, de color verde intenso.

A.



B.

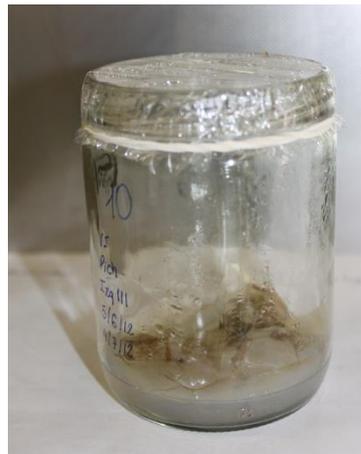


Pichincha, población IZQ III INIAP, ensayo 120mM NaCl. A. Día de inicio del experimento. B. 1 mes después de iniciado el experimento. Se puede comparar la diferencia de este tratamiento con el tratamiento sin sal. Hubo crecimiento (4cm) pero mucho menor y se observan algunos cambios causados por la sal: color menos intenso, crecimiento reducido, pocas hojas, hojas caídas y secas, raíces secas.

A.



B.



Pichincha, población IZQ III INIAP, ensayo 150mM NaCl. A. Día de inicio del experimento. B. 1 mes después de iniciado el experimento. Se puede observar como en esta concentración de sal, el crecimiento se detiene por completo y las tres plántulas mueren.

A.



B.



Imbabura, población Santiago del Rey, ensayo 100mM NaCl. A. Día de inicio del experimento. B. Foto tomada 1 mes y medio después de iniciado el tratamiento. Se puede apreciar un crecimiento claramente afectado por la sal. Hubo crecimiento (2.5cm) pero mucho menor en comparación con el control sin sal y se observan algunos cambios causados por la sal: color menos intenso, crecimiento reducido, pocas hojas, hojas caídas y secas, raíces secas.

A.



B.



Imbabura, población Santiago del Rey, ensayo 120mM NaCl. A. Foto tomada el día de inicio del experimento. B. Foto tomada 1 mes y medio después de iniciado el experimento. Se puede observar como en esta concentración de sal, el crecimiento se detiene por completo y las tres plántulas mueren.

A.



B.



Imbabura, población Chaltura, ensayo control sin sal, A. Foto tomada el día de inicio del experimento. B. Foto tomada 1 mes después de iniciado el tratamiento. Se puede apreciar crecimiento abundante de las plántulas (8cm).

A.



B.



Imbabura, población Chaltura, ensayo 100mM, A. Foto tomada día de inicio del experimento. B. Foto tomada 1 mes después de iniciado el tratamiento. Se puede observar buen crecimiento de las plántulas (5cm). A pesar de que se observan algunas diferencias en comparación con el control sin sal, se puede apreciar buena coloración de las plántulas y pocas hojas caídas, en comparación con otras poblaciones en esta concentración.

A.



B.



Imbabura, población Chaltura, ensayo 175mM. A. Foto tomada día de inicio del experimento. B. Foto tomada 1 mes después de iniciado el tratamiento. Se puede observar todavía crecimiento de las plántulas (2cm). Algunas respuestas producto de la sal ya son más claras: 1 plántula con crecimiento detenido, color menos intenso, hojas secas. A pesar de ello se observa todavía crecimiento en comparación con otras poblaciones en esta concentración de sal.

A.



B.



Imbabura, población Chaltura, ensayo 200mM, A. Foto tomada día de inicio del experimento. B. Foto tomada 1 mes después de iniciado el tratamiento. Recién en esta concentración se puede observar que no hubo crecimiento debido a la sal, las plántulas están pálidas, conservan pocas hojas, no crecieron en comparación con la foto A.

A.



B.



Imbabura, población Chaltura, ensayo 250mM. A. Foto tomada día de inicio del experimento. B. Foto tomada 1 mes después de iniciado el tratamiento. Se puede apreciar todas las plántulas muertas.

**Anexo 5.-** Secuencias obtenidas de las 99 bandas secuenciadas

---

3A1

No se pudo obtener secuencia consenso

F:

GGGAACTATCCTTTCCCTTGTTTATATCCAATGGCCAAGATTGGTGAATGGTGA  
ATTTTCCTAAAAAAAAAAAAAGCCTTAA

R:

TTTAAGGCTTGATTGCCCTTTTTAAATTTCTCTTGTTGGGAGACTCGGGGGAAG  
CTATACTTTCACCTTGTTTTTACATGCAAGATA

---

3A2

GCAGGTTGCGCTGGGGGGACCTATCCTTTCCTTGTTTATATCAAGTGCAAGTAT  
TGGTGAATGGTGAATTTTCCTAAAAAAAAAAAAAGCCTTCGACTGCCCGTGGAGG  
GCCAGCTCTAAGTGGATGTTGAAGCTTGATTGCCCTTTTTAAATTTCTCTTGT  
GGGAGACTCGGGAECTATACTTTCCTGTTAATCAAGCAGATGA

---

3A3

AAGCTTGATTGCCAATGGTTTGTCTACAAAAGCGACTTGTTGAGCGTTAAAGTT  
AATGTTTCCCATCAAGTATCCCCCTAGAAGTGAACAATAACTGATTTTCGAAA  
ATTAGTTCAGAAAGATCACTTTGGTAAAAAAAAAAAAAGATTA

---

3A4

CTAAGCTTGATTGCCAATGGTTTGTCTACAAAAGCGATCTTGTTGAGCGTTAAA  
GTTAATGTTTCCCATCAAGTATCCCCCTAGAAGTGAACAATAACTGGATTTTCG  
AAAATTAATTCAGAAAGATCACTTGGTAAAAAAAAAAAAAGCTTA

Nada

---

3A5

AAGCTTCGACGTGTTCTTTTTCTTTCTTATTTTGGTCTCATTGTACTGTTGATT  
TGTGTGGAAGGATGAGGAAATTGAAGAGGTTTGGTTGGAGATTTATAAAATGTT  
ACGTGCTCAACATGTAACATTTTGACATTTTAGCTTAATAAGACAATATTCTCAG  
CTTCCTTTCCATT

---

3A6

TAGATTNCACGTCGNGTTAGATACATTGCAATATCACTTGTANATTATGATGTAT  
ATTNTTGCAAGAAATAANNATATGTAAGCAAACNCAGTAAGCGTAGGAATCAT  
TCAATGCGCGNGAACTCCAATCCCTCGTTGTCCCTCGTTAAGCTAAAANNNGNA  
ACGTTGGGTGTGGGCTAACACCTTTGATGTTCCAGTTTTNTTTCTTGGCAATTC  
NATATTTCTGCTGAAGGGCTATTGCAATTGTTGCTTCCTCACGCTGGTAAACTT  
NTGACATAGATACAGATTACTCGATTCCCATTAGCGCC

---

3A10

---

---

TTAAGCTTCGGGTAATAGGTCTTTCAACAATGCTTTTGGGAATTCTTAGAATTGC  
 TGCAATGTCCCTCCCATTTCCTTGTATATGATATATAGGAGGTTAAGGGTTCCAA  
 ATGAAGAACCATTCTTTGTAAAAAAAAAAAAAGCCTT

---

3G1

TTAACGAAGCTTGCACCCATTGTGAGGAAACCAAGATCTTTCTAAACTTTGTAA  
 TACCATCAATTAATGGGGTTCTGAAGAAATTTGATAATTATGCATTGTCTGTTTG  
 TTGATTGTGCTAAACTGCTGGCCTTCCAAGTTGACAGAAAACATTCTTCTTTTAT  
 TATGTCCAAAAAAAAAAGCTTAAATT

---

3G2

No se pudo obtener consenso

F:

CCCGCCGCACTTTCGCAGGGTCTCGCGAACTAGTTTATATGTCGGATGTCTTTCC  
 ACCGGCACGTTGTAGAAAGCCCGAGTGGTTACTTGAGGGAGAAGCATTGCGGT  
 TTGCCTCTTCCAAAAAAAAAAGCTCAAGTGTCAAAAAAAAAAAGCTT

R:

TAAGCTTGCACCATTGTGTTGAGGCTTGCACCATGTCAGTGAGTAGTATTTTCT  
 GATTTGAGAAGTATTCTGCAGATCTTGCAGAAAATTTATTGTGGTATCTTACCCC  
 GTACCGGAGAAGCGCAAGGTATAGAAGTGT

---

3G3

No se pudo obtener consenso

F:

GAGTTAGATGCGCTACGTCCTCCGTTTCTCGTTTTGACCTGTAGGCGGTTAAGGG  
 TCCAAACGTTGCATCCTTTCAGTTGTAAAGTTACCGATGCTTCATTGCTGCTTTG  
 GACTGAACATCCTGCCTCATATTGGCCAAAAAAAAAAGCCTAATATTAAGTTAT  
 TACTCGCGCCCGGCGGGTAGTCTGCAGACCCACTGTGGAGTCTACAGGGGCCTG  
 ACTCTTCAGGACCCAAACAGAATATCTGGAGTGCAGCTTCAGTTTTGCCAGGAA  
 TACGCGACATCGGCGTGAGGCTCGCCATGAAACCTGTCCCAAGGAAAAAAAAAG  
 CTT

R:

TAAGGGATGAGCCTCGGGGGATTGTTCTAGATAGATGACACGTCCTCTGGCCCC  
 GGCCCTAGCCGGTATCCCTATCCTTTAGTAATGCATTCGCCCCCCCCCTCGATT  
 CAGGAGGAGGATCCCGGTCCTAATACCACCGCGCTTAGGCTATTATTAGGCTCG  
 GGGAAAAGGTCCCTCAGCAGTGCTATATGGGGATTCGTAGAATTGCTCAATCTC  
 CTCCAGTTTCTCGTAATATGACCCATACGGAGGTCAAGGGGAAGCAAAAGAC  
 AGAACCCGTTCTCTCAAAGCTACCGTGCTCGCTTCTTGGGGCCC

---

3G4

TTTAGCTTCGGGTAACGGCATTGTTGCTGACGGCAAATACCAAGACTTTGGGGT  
 TGGAATTGTGTTTTATGAACTACTATTCGTGCTGAGGAACTTTGCAACTGTGATG  
 TCAGATGTCACATACTAACTATTGTGTGTAATGTTTTATCTCAAGTGAAAAGCC  
 GGAGAATATAGAAATAAAGCAAGAGGATTTCCAAAAAAAAAAAAAGCTTAAAG

---

3G5

---

No se pudo obtener consenso

F:

GGGCGTTCGAGTATAGGGGATGTAAGTGATGATTCTATGTGACTACTATATCGT  
TGCATGACGAATATGCTGTGACTGCAAGAGTGTCTCTACTCATGTGCTGCGATG  
TAATGTTGTA CTCTGCAGGGGATAGCCGATTATATGTATATGTACCGAGATGC  
TCCCCAAAAAAAAAAACGCTATAA

R:

TTGAAGCTTCGGGTAACGTCATCTCCACTGTCCGGTAGATACCCAGATTAGGAG  
TCGGAAAGGTGTTTTAAGAACTGTCTATTCGAGCTGCTGGAGACAATGCAAGT  
GATTCAGATGGGCTGGTACTACACTGGCGTGTCCAATAATTGTGCTCTATGTA  
AAGAGCATGTGAATAGAATATC

---

3G6

No se pudo obtener consenso

F:

GGCCGCGGATAGCCTTTTCTCACTTGACCTGAGTGCGACAACCTCTTCGTTGCAT  
GGACGCGATATTCTGGTGGATGCTCGGACTGTCACGTA CTACGGTGGTGGATG  
TTGTTAAGCGTTCCTGATCTGCGGTGGACGGAGCCCGTATTATCTAGAGATGT  
ACCCCGATGCCCCCAAAAAAAAAAATAGCTTATTTTTCT

R:

ATTAAGACTTCGGGGATAAGGCATACTCAGCTGTCACCCTATATTGCCCGACGA  
AGTCAAGACGTTTGGATCACAGTCTGTTTTTCAGAACTATAAAGTTTCATGGCA  
TGACGGAGACAATGCACATGATGTCAGACTGGGCACGTA CTAACACTGTTGGTG  
TCTCAATTCATTGTGGCCTACCTAAGTGACAACATAAA

---

9A5

No se pudo obtener consenso

F:

GCCCGCCCCGCTACCGCTGTGGTCAATTGCTGGTGCATGAGGCGTTTTAGGCC  
AGGCGCGTGCTGCCTATGCACTTGGGCGGATCCGCTTAGCCTCTATAGAGGGCT  
GCATTTCTCGGCACGGCTTACGGCACGTCGCTGCTTGCATCC-  
GAGCGTCAATTCCAGCTTGTTATGGAAAATTGAAGTGGCATTGATGTTGCTTAA  
AAAAAAAAAAGCTTAATACTTACCGGGCAGTGTGATGCTGCAGTTCCTTAGCTA  
TCTATTACCATCACCTGGGCTCTCTAGCCGCTGTCTGCCCCACTTCTGCTACCCT  
TTGGCCTTCGCTCGCTCTTAG

R:

TAAGCTTCGGGTAACGGCGGGCGTAACTATGACTCTCTTAAGGTAGCCAAATG  
CCTCGTCATGTAATCAGTGACGGGCATGAACGGCTTAACGTGATTCCCCTGCTGTC  
CCTGTCTACTATCCAGCGATAACCTCAGCCTAGGAACGGGCCTTACAGTTCGGC  
TCTGGTATTTATGCTTCGGGTAATGAGGTACACAGAGAAGCGGAAGAATAGAAT  
CTTAGCGAAGTGGATCCGATACGCTTCTAGAAAGGCTTATGCTGCGACTCGACC  
CTGAGTCTTAAGGGAGATTCTCTAAGCGCAATGCGATTGAAATGGGATTCACTT  
CGACGCCTCACGCTGCGTCTATACGAAAATCGTGCC

---

9G3

---

---

CGTTATAAGCTTTGGTCAGAGGGGATAAAAAAAGTGGAAATTCTCAAATCAACT  
 TGAGATGAGGATATGAGTTTTTCTTCATTTTGTAAGATGGATTCTGAAAGGGAG  
 AAAACTAGAGATGGCTCCTTATGATCATCACATATACATATTCATTCACTTGTAC  
 ATTGTATGTGCCTCCGGAGGTGGAACTTTTTCTTTGTTGGCCAAAAAAG  
 CTAA

---

9G4

TTTTAGCTTTGGTCAGGGGGTCCTCATTGGATCTGCTTAGAGATTTGGCCACAT  
 TGGCTCCCTTTTATATTCTTTCGTGGAGTGTAAGGGTAGAGATTTGTACTAGTC  
 TTCACTACTTTACTCCTTTTGGACTTGCGCTTTCCTCTATTATATAGATTTCAATT  
 GTTTATTTGTCCAAAAAAGC

---

9G5

ACTATTTGACCTTTATAAACATCAACTCCGGGGCCAATAAACAACTGTCCTCTGT  
 CCTGAGAACTCATAAGTGCGTAGGATGTAAGTTCCATCCTCAAATGCAATCA  
 GTGAACCATAGATCACGAGTAGAATTATCACCAGCCATGGTCCATAGCTATCA  
 AATATTGCGTTGAGAAGCTT

---

9G6

TATTAGCTTTTTTTTTTTGAAGTCTAAGCTTCTCAACCGCGGTGAAATTGGATAA  
 CGAGAATGAAGTAGCCGTTGGCGATCATTATTATGGTGGCGGCTACAAAAGG  
 GCTACGGCAAACCTAAAAATGTTATAAGTGCTGCAAAAAAGCAAATATGGA  
 TGCAAATATTACTGCTGCTCCTATGAACAATATGTGGCCATGGCAAAAAA  
 AGCT

---

9G7

No se pudo obtener consenso

F:

AGGGTATGTTGCTGGCCTTTTGCATGGACTGCATGCACCGCAAGTAAAGTCTGC  
 ACGCCGTAATGTATTTAAACATCCCCCAAAAAAAAAAAGCTACAATCCTGGGCC  
 GGCAAGAGACAACCTGGCGAACTGAAACATCTTAGTAGCCAAAAAAAAAAGC  
 TT

R:

TAAGCTTAACGAGGAAAGTCTTACGGTGGATACCTAGTCACCCAGAGGGCAGG  
 AAGGGTTTGAAGCTTAACCGAGGGAATCCATACATCATGTAGGATTCTTTCAGC  
 AGAAACCGCAAAAAGGCAAGGTTGGTGCTTTTTGAACGGATTCTGCGCACGCA  
 AGCAGTCATCA

---

9G8

ACTATTTGACCTTTATAAACATCAACTCCGGGGCCAATAAACAACTGTCCTCTGT  
 CCTGAGAACTCATAAGTGCGTAGGATGTAAGTTCCATCCTCAAATGCAATCA  
 GTGAACCATAGATCACGAGTAGAATTATCACCAGCCATGGTCCATAGCTATCA  
 AATATTGCGTTGAGAAGCTT

---

9G11

---

TTACCACGCATAGGGTTGATTATGATTGATTTCCTGAAGAAGTAACACAACCTGCT  
 AGCGCAAAAAAAAAAAGCTTTAGGGGTAAGCCTTCGGGATAATGTAGGTTGTT  
 GTTTGCAAGACACCACCTGAGGTATCACCCAAGGGGTGATTATGTTGTTACTGA  
 AGAAGAACCCAATGTAGGCACAAAAGAAAACCCTTAGGGTAACCTTCGGGTAAT  
 GTTAACAACCTGAGTATCACACAAAGGGTGATTATGTTGTTACTGAAGAAGAACA  
 CAATGTAGGCACAAAAAAAAAAGCTTAGGGTAAGCCTTCGGGTAATGGAGGTTGT  
 GTTTGCAGACGACGACTGAGTTCACCGAAGGGTGCTTTTCCCC

---

9G12

No se pudo obtener consenso

F:

TTGGATCGGGGCAACCCCCAGTAAAATGGAATCCTGGCCTAATGGAAGGGTTAC  
 CCGGATCTCCGGGTCCAAAAAAAAAAAAAGCCTTACGTATTT

R:

AAATTCGGAAGCTTGAAGTGGCTATGACATGGTTCCTTGGTAATCTTGCTAGGT  
 TTGATCAGGGAAACCCCGCAAGAAAATAATCTGAT

---

9G13

No se pudo obtener consenso

F:

CTTGACTACTGGCACTGTGTTGTCTGCGGGGTGAATTTTACTGTGCGCTTTTCC  
 TCAAAAAAAAAAGCGCCAAAAATT

R:

ATGTTAGCCTTGAGGTGCTGACTGTAAACGGTGTGCCGTTTGCCTAGTGTCAA  
 AATGGCTCCCAGCTTGACTAACGGCCAGATAATTA

---

9G14

No se pudo obtener consenso

F:

CGCGGGCGCTACACGGCGGATGCTCACTTTCAATTTTCGTGAGGGAACATCTTTA  
 TCGGTTTCGTTTCTCTTCAAAAAAAAAAAAAAGTCAA

R:

TTTATTGCCTGAAGTGCCCAACTTTACAGTTACCGTTTGCCTGTCTAAGAATGC  
 ATAAACTAGCGACCCACCAATAACCGAAGCTGT

---

**12A1**

No se pudo obtener consenso

F:

CCAGATACGCTACCCAAGGATTGGCCTCGCTGGTAGCCACATGACAGATAAGGT  
 TGCGCTGTAGCATGATCCCCACCTGCTTGGGATGCCACCTGACACTTGTGTTGTC  
 GCACCGCGCATAACCGTGTCTGTCGGAGGTGCAGGCCGATGATACACTCGTTAATC  
 GAATAGGACCGCTTGGCGGGTAAAAAAAAAAAAAGCTTATAA

R:

TTTAAGCTTTCGACTCTGTAAGATAGGCAAATGCATACTTTCTGACTCAATGTA  
 TCATCAAGTATGTCTACTAGGTACGAGTGAGGCCCTAATATTGGACGCACA

---

---

CCATGTTTCATGTAATGGAAATGCATCATTAAGGTATACTCCTCTCACACCTTGCC  
TTGGCGACTGGAATGCCATATGAGACGGTTCGTGTGTTTCGTATCATGTGTATAC  
AGCACGCTATCTTGTGATACCCAAGGACCACGATGACATCCTATAAA

---

**12A2**

TGCTTTGGAATATTCTATTCTTGTAGCAGCCACCGCTTCGGATCCTGCTCCTCTA  
CAATTTTTGGCCCCATATTCTGGGTGTGCCATGGGGGAATATTTCCGCGATAATG  
GAATGCACGCATTAATAATCTATGATGATCTTAGTAAACAGGGCGGTAGCATATC  
GACAAATGTCATTATTGTTACGCCGACCACCAGGTCGTGAGGCTTTCCAGGGG  
ATGTTTTCTATTTACATTCCCGTCTCTTAGAAAGAGCGGCTAAACGATCGGACCA  
GACAGGCGCAGGTAGCTTGACCGCCTTACCCGTCATTGAAACACAAGCTGGAG  
ACGTATCGGCCTATATCCCACCAATGTGATCTCCATTACTGATGGACAAATCTG  
TTTGGAAACAGAGCTCTTTATCGCGGAATTAGACCTGCTATTAACGTCGGCTTA  
TCTGTCAGTCGCGTCGGGTCTGCCGCTCAGTTGAAAACATGAAACAAGTCTGC  
GGTAGTTTAAACTGGAATTGGCACAATATCGCGAAGTGGCCGCCTTTGCTCAA  
TTTGGCTCAGACCTTGATGCTGCGACTCAGGCATTACTCAATAGAGGTGCAAGG  
CTGACAGAAGTACTGAAACAACCACAATATGCACCACTGCCAATTGAAAAACA  
AATTCTAGTCATTTATGCAGCTGTCAATGGATTCTGTGATCGAATGCCACTAGAC  
AGAATTTCTCAATATGAGAGAGCCATTCTAAATAGTGTCAAACCAGAATTACTA  
CAATCCTTTTTAGAAAAAGGTGGCTTAACTAACGAAAGAAAGATGGAAGTAGA  
TACATTCTTAAAAGAAAGTGCTTTAGCTTTTATTCAATTTAATAACAATACAAGG  
AAAG

---

**12A4**

No se pudo obtener consenso

F:

CATCACGGCTTCTTCTCGAGGGGGATTTTGTGCTCGCCTCAACGCTGGCCTTAT  
GTGCTTTGCATTTGGCCGGTAGCCTACCGCACCGCGTTGGTTGCGTTAGCCTCTA  
TCCTGATTTATTGAGGATGTGCAAGACTACTTTTCTCTGCCTAAAAGAAAAAAA  
GCTTCAAT

R:

CTAAGCTTCGATTGTTTAAGTTGCCGTGTGTGACAAACCCAAGAGTATGACTGT  
TGCGATTCTCAAACAAGCAATCTATCACGGAGAGGATATCCTGCTTAGTTGCT  
TCCTGGTTGTCCCTAAAGAGACTTAAAGTGGAGGAA-  
CATGTAATCATCGAGTTACTTGCCTAGAAACCCATG

---

**12A9**

GTACGTTCCCGACCAGGGTATTGGACGTTAAACATCGTTAAGGCATACCGCAAG  
GTAGGGATAATCGTCCAGGCTCTTATTGTAAAAAAGCTTAAAAAACCC  
GTAGGTACCAATTTTAAAACAATTCCTGCCAAGATGACGGATCCTGCCGTAGG  
TGCTCTACATAACTTCGGGTAACGGCTATCAAGGGAGAAATCGAAAGGAAAT  
CTGTACCCGACCCAGGGATGG

---

**12G1**

No se pudo obtener consenso

---

---

F:

ACTTGCGGCACTCCAGAAGGAGGATTTCAACTCAACTCAACTTCATTTTGATGT  
GAGTACATTTAAAAATCTCGCATATATTGCACGGAGCTTCGAGAAGGGGTGGCA  
TCTAGCATATTCAAGCGGATGGCAAAAAAAAAAACCTTAA

R:

TCTATAGCTTTGGTCCCGAGTGC GGCTAAAATCACGCTAGCGTGGCACGGAGCT  
CGAGAAGGAGAATTTCAAACCTCAATACTTACTTTTGATTGTGACACATTA AAAA  
TGCTGCGCTATCTAGCAGCGGAGTTCGTGAAAGGGTATCT

---

### 12G2

Staden, si se pudo tener consenso:

TAAGCTTTGGTCAGGAATAATCTTTCTGGTAAGCGTTGGTCAGGGAGAAGCATT  
AAGCTTTGGTCAG-TCC-  
GGAGTTTCAAATTTCAATTGAAGATTCGTTGTTTGATTTCGAAGTGGGTTGCTACA  
AATAATTATTTCTGGCATTAGCTGTTATTTAGCTGATTACATAAAAATTCGATC  
TTAAACAAGTTATTTATTTACTTGTGGGATGATAATTGTATTATGACATTCAAAA  
AAATGAAGTATAGTTGC

---

### 12G3

Staden:

ATAAGCTTTGGGTCAGTCAAATAGGNCNNTCTTCCGCTCTAGTCCCTAATTGAT  
NGTCCATCGCCAAAATCCTATGTTGGGTGGAAATATTTTCACTTGGGAATAACCTT  
GAACATCCTTAAAAAGGACTCTATCAACCTTCCATAGGAGTAAGTAATCAATCT  
GAGGTCTTAGCTGACATACTACGAAAGGTAAGCCAAGTGTTTTTCCCCTTCAA  
AAAATATGAGTTAGCAATAACCAACTCAAAGGATTTAGCAAANNCCCAGAGAG  
ACACCACATATCCTTCTTATCCCC

---

### 12G4

No se pudo obtener consenso

F:

GGGGAGGGTCATGGTTGGATAATTTTCTGGCTTCCATAAATCATTGGATTTTTT  
CCGCAAAAAAAAAAAGGCTTAGA

R:

TTAATTAGCTTCCCCCGCTACTATGATATCTACGACCACACACCCTGTTCCA  
TATCCAACGCCTTACACAAAATTCCTTAATAACACCTAAGGGCTGCTTAAGCCT  
TCACTACTACAACATAGTCAAAAATCATTGTAGCTTTGGTCCAGTAGAACCATTC  
CTAGGTAGTTGGACCCTATGGGGAAATGTACAATAGGTTGGATAATTTTCTGTT  
CCCCAATC

---

### 12G5

No se pudo obtener consenso

F:

ATCAACGCACTAGGTTTGAAATTGCTTGCCTCATTTTATTCAAACGACTACTTCG  
TAACTTGAACCTTCCCTCTTTGGCGGGTCTCCAAAAAAAAAAAAAGCTAAAA

R:

---

---

TAAGTCGGTAAGCTTTCTTCAAACGCAGCAATATGTAATGGAAATTACCAATGATTACTAGCATATCGCAACCTAAACGGTTTTACGAAATTCAGCTTCAATTTACTGCAAACCAATTATCTTCCGTACCTGACCGCCCCG

---

**12G9**

No se pudo obtener consenso

F:

ACGAGCATAACAGTTTCGATCCCATGCTGCGATCATTTCGTCTCCCGTTTACAGGACACATTTTTACATCTGAAGATTCCTGTATTAGATATACTCCATACCTTTACCCCGCTTCATCTGGAAATCTTGGTTCAAACCTTTCGGTGGCGGGCAAAGACGCCTCTCTTAACATTTATCACGATTCTTCCCCACGAATATCGTAAATTGCATAGCCACA T TACTTCACAGAAGCCCGAGT TACTCTATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTAAA

R:

GTATAACCTTCTTCCAACGATTTAAGTCTTTTCTTATGGGTCTTTCGAAGGCAAACGGTGTCCGAGCCATAACTTTGTTCGGTCAATTCATTCAAGCATATCCTTTTTAGAGGACAATTTTTCACACCTAAACCTATGTATTAGATAGAGTAATACCATAACCCGTTTCATCAGGAAGATCTTGGGTCAAACCTCTGCGCTACTGGGTAAAGTGAAGCCTGGTCACCACATTTACTTACGATTCTTTCTCCACGCATTTTGTAAGTGAATAGGCTCACTAAAAGGCCG

---

**12G10**

No se pudo obtener consenso

TAAGCTTCT-

CCACGACCCAAGAATAGAGCCAAGCTCGTTCAACGTACCCTCAATCTGATAAGT CCTGGGGCGTGGCTTTGTGATTTGTTCGTTGGAGCGATATGAAGTTAGAGAGAAA AAAGTTTCCAAGAAGAGACCAAGAGGACTCAAAGCTATGGGAAACATGGAATC TGACTCGGAGTGAACCTACTGCTGACTTCTGTGTGGAAAGGTTTCATGAGTGAG AATATGAGCTCTTTGGTATTCTCCTCAGCATCAAATGTAAGTCTTTTCTCCCTGCCATC AATTAAGATA-AAATATGT

---

**12G11**

No se pudo obtener consenso

TTTAAGCTTTCTCCACGACCCAAGAATAGAGCCAAGCTCGTTCAA-

GTACCCTCAATCTGATAAGTCTGGGGCGTGGCTTTGTGATTCGTCGTTGGAGC GACTATGAAGTTAGAGAGAAAAATGTTTCCAAGAAGAGACCAAGAGGACTCAT AGCTATGGGAAACATGGAATCTGACTCGGAGTGAACCTACTGCTGACCTTCTGT GTGGATAAGGTTTCATGAGTGAGAGTATGAGCTCTTTGGTATTCTCCTCAGCATCA CAATGTAAGTCTTTCTCCCTGCCATCAATTAAGATAATAAATATGTC

---

**12G18**

No se pudo obtener consenso

F:

CGCGGGAGCGTTCAAGGGTGTGCGCTATGGCTGGTATAGTGGACAACCTCGTACG GGTTCCTATTGCGTCCATTTTCCCTACCGAATCGCGCGTTCGACATCGTGAAAA CCTTTCTTTGTGAGATATAGCTGTTTTCTGTCAGCGCTCAATCATCCAGTAATATG

---

---

TGTGATGGACCATAGATTACCGATTCCGATTATAAAATTTAGAGTCCACATCAT  
CGGGACAAGAAAACCCGGTTTACTCTTTTACAAAAAAAAAAAAAGCTTATA

R:

GTAAGCTTCGGGTAAGTTCCGACCCGCACGAAAGGCGTAACGATCTGGG  
CACTGTCTCGGAGAGAGGCTCTAAGATATGGGCAAGTGGGCGAGGAAGAGGAC  
AGCACGCACTTGGCCTGTTTCGTCCCCGGGAGGGCAATCTTTTCTAGGGCCTGC  
ACCCGCCCCCGCATGTGGAGAAACAAACCAAAGCCTATAATAAGCTTCGGGT  
AAACCGGGTAGTGTATGAGGGAGCATAATGACATCTGATTAGGAATACGGTAC  
AAGATGTGTCCCATCATTGATATGCCCAACTATAGTGTGGCCAAGGGGTACTAG  
TGTGAGTGAACCATGAAAAATGCAACCTTCGTGTGCAATCGGCTCCTTTGAGCC  
ATGATGGGC

---

### 12G24

No se pudo obtener consenso

F:

GGCGGCGCGACGGGATGCGTATTGGCGTGTGCATCCGTTATTAGCTCATCTATG  
TAGGCACAAGGGGACAATGGTTGGTGCCCTTTACCAAAGTGGGTCAATTCGTT  
GTTCAACGCTCCCTTGTAGGCTGGATGGACTGATAAGTGGCATATCAAGTCGCA  
CATTACCTTTCCGCAAAAAAAAAAAGCTTCTAGGCCCTGCCCTTCCTGCGATA  
CCCCTCCGCAAGGGCTCCACTTCTGACCCCGACTCATGACCCACGGGCCCTG-  
TACAGTCCCAGGTCGACCCCCCTTCGGGCGCAGGCCTCCCAAACCTTAAACGG  
AGGCGTGCAAAGGTTTCCTCGGGCCGGACGGAGATTGGCCCTCGAGTGCAAAA  
AAAAAAGCTT

R:

TAAGGGTAAGCTTCGGGTAAGTTCCGACCCGCACGAAAGGCGTAACGATCTGG  
GCACTGTCTCGGAGAGAGGCTCTAAGATATGGGCAAGTGGGCGAGGAAGAGGA  
CAGCACGCACTTGGCCTTTCGTCCCCGGGAGGGCAATCTTTTCTAGGGCCTG  
CACCCGCCCCCGCATGTGGAGAAACAAACCAAAGCCTATAATAAGCTTCGGGT  
AAACCGGGTAGTGTATGAGGGAGCATAATGACATCTGATTAGGAATACGGTAC  
AAGATGTGTCCCATCATTGATATGCCCAACTATAGTGTGGCCAAGGGGTACTAG  
TGTGAGTGAACCATGAAAAATGCAACCTTCGTGTGCAATCGGCTCCTTTGAGCC  
AGCATGGGCTTATGTGCACAAA

---

### 12G25

No se pudo obtener consenso

F:

CGGGGAGGGTTTATTCTTTTGGTTGGGGACTAAAATAGCCCAAAAAAAAAAAAA  
AGGGGACATGTTGCCCTTGTTCCTTTATTGCACTTCAAAGTAAGGGCTTGGGC  
TAGCGGTCTTTATTGGCAACACCAAGTGGAAAGTTTGTCCACTTTTGGAAATTGTT  
CGCAAAAAAAAAAAGCTTAAGGGAAGCCTTCGGGAAAGGTTAAGCTGGGATCCC  
TTTGGGTCGGACCGGGTTTTTTTTTTCCTTCGGGGGGGGGACAATCCCCGAAAA  
AAAAACAATGGCGCGCTGGCCTCCCTTTTTGTAACGCTCCCGAGCAGAGGCGG  
CCGCGGGCCGTTTTTGGAGTGGGACCTCTTGGCGCAATTCTCCCAACTTTTTTA  
TCTGCTCCAAAAAAAAAAGGTTTTTGGGCGCCCCCTTTGGG

R:

---

---

AAAAAAAAAAACCTTGGGGTTAACCTTGGGGTAAACAGAAATTCCGGATCATCT  
GGCCCCGAAACGGAGTTCGTATTTTTTCAGTCGGGGCGGAAATTGGCCCAAAA  
ATAAAAAAAGAGCAAGTTAAACCAGATTTTCTTTATTTGTACTCAAATTTAACG  
GCTTTGGTCATGTAATTATAGGAA

---

**12G28**

ACGAGATAGGCCTTTTTCTGCTTTTGCTGACTTCTTGGTCATTCAGTGAGTATTC  
CCTTGGTAGCTTTCAAAGTTTTGTGAGAACATTAATGGCTAGCACACAATTTTTC  
TGTGTCCTATCAAAAAAAAAAAGCTTAAGCGCGGGAAAAAAAAAAGCTTTAA  
GGCTGGAGGGGCTCTCTATTTTAATGTTTAAACATCTAGGAATGATGAACAAGGC  
TTTTCTGCTTTTGCTGAATTCTTGTACATACATTGATATTCCTTTGAGCTTCAAATT  
TG

---

**12G29**

F:  
GCATAGGAGATAGGCCTTTTTCTGCGTTCTTGCCGCACTTGCTTGGGCGTTCCGGG  
AGTAATTCCTTTGGTAGCTTTACATTCTCTGTTGATGCATTAATGCGAGGCCAC  
ATTGTGTTTCTTGTCCCTCGCAAAAAAAAAAAGCTTAAGTGCTGCCAAAAAAAAA  
AAAGCTTAAG

R:  
TATTAAGCTTGAGGGCCTCTATTCTAATGTCTACACCTAGGAATGATGACAAGG  
CTTTACTGCTCTCGCCTGAATTCCTGGTCAGACATCAGACATAACCCTTTGAGC  
CTTACAACCTTTTATTAACCTTC

---

**24A3**

CGACTGTAAGCTTCGACCGTTCTTTGTCCTTTCTTATTTTGGTCCCATTGAATTGT  
TGATTTTGTGTGGAAGGATGAGGAAATTGAAGCAGGTTTGGCTTGGAGATTTAT  
AAAATGTTACGTGCTCAACATGTAACATTGTTGACATTCTTGGCTTAGTAAGAC  
AATATTCTCAGCTTCCTTTCCTTTTAAAAAAAAAAGCTTAA

---

**24A5**

No se pudo obtener consenso

F:  
TATGGGTGGAGACTCGGCTGTCTGGAAGAATTGCAGAGTGGCCTACATGTCCTT  
GTGATGATCTGCCCTCCGCGTGGTTGTGCGAATACATGCGGCACGTGTTCAAGT  
CTCCACAAATCCTCCTATCTGTTCCATTGCTTCTCGTCCTTACCATGGATTGTCT  
GGCGTAGATCATATGCTCGGCGGCATGAATTATGAGCACGTCTCATTCTATAA  
AAAAAAAAAAGCTTATAAAT

R:  
CTTTATAAGTTGACGTGTGGTTTAGGTATTTTCACGGTTCAACGATTGTGGAAAC  
CATCCTCCTCTCCAGATCACACCATTAAGATTGTAGGCTGCAATGCAACAATCA  
GAGTATCTGAAGAGTGATGAGATGTATGTCCAACCTTGTATTTTCTTCAAGGCC  
CGCTGTGTAGGATATTGGGGAGCTTTGCAGTGGGCAACCATGTATTCCAGGTTG  
TAAGATACTATCTATTCTTACGCTGAGCGATGCTGGAATAAACCG

---

---

24A7

TAAAAAAAAAAGTTTTAGCTTGCCCCATCAGCAAACAGGAAGGCAACTGCA  
GGGCTAAACTTGAAGTGAGGGACTCTGGCTTACAGACTGGGGACCCTGCTGG  
ATTTACACTTGCTGATACTTTGGCTTGTGGTACTGTTGGTCACATTATTGGTGT  
GGTGTGTTCTTGGACTCAAAAACATTGGTGCTCTCTAAAATGTGTACTATTTCT  
TTTATGTTGATAAACCAAATCATCTTTTGTGAATTATTCATCTTTCTAGTAAAA  
AAAAAA

---

24A12

No se pudo obtener consenso

F:

TGCATTCTGTAGGTTGTAGTTCCTTAAACCTTGGTCATGACGTACTCTATCTAT  
GGGAGCGCCTACAAGGAGTCACAACGGTGTAAACGCTGTACAAAATATAAGGA  
GCTTTAGACGACGTTGGTCGCATCAGATGCAACCACTATCTTTGTTCACTTCTGG  
TCCTTAAAAAAAAAAGCCTCACTTA

R:

TAAGCTTTTAGCTTCGGGTAAAATAGTTGATCCAACCCGTTTATAAATTTATTTG  
TCGGATTGGGACATTAAGGCCTCAGCAGTTACGCGCTAACACTGTTTGTGTTG  
CTTGCGACAGGGTATCTCCAACCGCGTGACCGCGATGACGTC

---

24A13

No se pudo obtener consenso

F:

GCGCCGCGCTCCGATGGTCATTTTGATCTCTGCATAATGTTCTGCATTGTTGGTC  
ATGCAGACATCGAATTCCGGACCTTTCGACTGCTAACATGCTTTTCATTAACGAC  
GTGATTCTTGTTCTAATCTCCCCGGTTTTTTTTGAAAACTATCTTAACAGAATG  
TTTTGTGCTGGATAAAAAAAAAAAGCTTA

R:

TAAGCTTTGGGTAAACCTGCTAAGAAGTGGACATTACTGGGGCCGCAAGTACAG  
ATGATACATCTCGTGATCTCGGGTAGTTGTTGTTGCATGATTGGGTGATCTTGAA  
ATTGACTTCCACGAACATCTCCAAGCTGTATACCGTCAGGTTACTTAAAGAGCT  
GACGCCTGTTCAATTCCCCGGT

---

24A14

TATTATGCTTCGGGTAATGAGGTACAGAGAGAAGAGGAAGAATAGAAAGTTTCG  
AGAAGATCGATTTCGATATGCTTCTAGAAAGGCTTATGCTGAGACTCGACCCAGA  
ATCATAAGGGAGATTCGCTAAGCGTATAGAGATTGAAATCGATTCACTCATCGC  
CGCCGATGCTTCATACGGCGTCGTTCCGTCGTTTTAATTTTTATTGATGTGTATT  
ATTTAAGTTAAAAAAAAAAGCTTA

---

24A15

TTATTGGGATATAACCGGATTAATACTTTGGTGTGCTTCGTTACCTTACC  
GAAATATTCTTATTCAGCTTTAGAGCATACCTACAAGAATTTGATGTTCTGTCTG  
CTATCACTACGTAGAAAAAAAAATCTTTTATGTGAAAATGACTTTATAAGTTGAG  
CTGGTCACTAAAAAAAAAAGCTTAAGCTTCGGGTAAAAAAAAAAGCTTAAG

---

---

CTTCGGGTAAAAAAAAGCTTAAGCTTCGGGTAAGGTAAAGTTGAAGGTCCC  
AAAGGTATGTATGATATCTGCTTTTAAGCTTGGAGTATATCCGTATCCACAATCA  
AGCTCTTAGGTGTTACTGTCGTCATCTGATCGAGAACCCACTCATTGCAGTCTGT  
TAGATCTGTGCCTGCCAGAATGCAA

---

24G2

CCGCGGGTTTTTTTTGGACCGCCAGGCTGGCTGGCACTATGTATATCCCCCAGCAT  
GTGCAACCCTTTTCGAGTCGCTTCGGTGTTACACGTCATGCAGTCTTACTTGTTT  
TTGGAAGCTCACGTCACCTGGACTGTGTTTCGTCGTCGGGGTATCTAACCCAACC  
CAACTCTGGCCTGAGGGACATCTTGCTCGCGATGCAAGGAGTGTCTTTCCTCGA  
TGTACGTGTGCGTGCAAAAAAAAAAAAAACCTAAATTA

---

24G3

No se pudo obtener consenso

F

GGCAGCGGGCATTTCACGTCGAGGATCATATGGTCCACGGAATAGCAGTTTGG  
AGGCACGGTTACAGTGACACATCCATACTCCACTT-  
ATGAAGATTTCGACGACATGAGGTACAGATTGATTCTAGTGCGCCCCGGCAGC  
TTGAATGCTTTGACTAAGGGTTGGTATTTACCAAGCGGGTCAGGGTGGACCCT  
TGCCCCTGTTATGTCTGCAAAAAAAAAAAAAAGCTTAATA

R

CGATGGAGAATCCAACCTTTTGACCTTTCTTGACATCAACTCCGGGGCCCATGC  
AGCACTGATCCTCTGTCCTGAGGACTCTCTGAGTGCGTAGGATGTACTTGTTCCA  
TCCTCTGAGTGCGTAGGATGTACTTGTTCATCCTCAAATGCAATCAATGAACCT  
AGATCACGAGGCGAAAGATCACCTGCCATGGTCCATAGCTATCAAATATTGCG  
TGTGAGAACCTAA

---

24G4

TAAGCTTCTCCAA-

TAGGGTATTTCGGTGTTTTACTACCAACCACAAGTTTCATGTTTCGACGCAGTATTC  
ATACGGGAAATTATGATCAAAGAGTTCTTTATCAACCACCATCGTACTTCATGA  
GACTTCCTACGAAATCTTTTTCAAATACAAAAAATTCAGTATCTTCCGCCGAAT  
TAGTGAATTAGACAGGATTCCTTTGTCCAGAACAAGAAGTGGTGGGTCAATTTT  
CATAAATTTAATCGTAAATGGGAAATACTTATACTTA

---

24G11

No se pudo obtener consenso

F

CCTGCCCCACTAATCTAATCTGTTTGTGAGAGATTCAGCTCATTGATGATATC  
CTGGTAACGACATGCATGATCTATGATACGAACTTGACTGTCACTATTGCACCG  
TAGATGTGTGATAGAAGAAATATATCTCTCCAAAAAAAAAAAAATA

R

---

---

CCTGAGTTATATGTCTCAGGCACCCCAATAATAATTGTGTTATTCGAAGAAGAT  
GTTACCCGTCACATTTGAGTGATCACTGTAATCGTTTGCAACGTCATGGACCATT  
CTTGTGCCTCCTGGGCCCGAA

---

24G12

No se pudo obtener consenso

F

GGCCCCGCACACTAATTCTGTTGTTAGAAGATTCGCACATATTGAAGGTATCCT  
GGTAACGAATGCATGATCTAGAGACGAACTTGCTGTCCTATGTGCACCGTAGA  
TGTGGTGATAGAAAACATAATATATTCCTCACCCAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCT  
TCAATA

R

TTATGTAGGCTGGAGGGGCTGTTGTACCCAGGTTAATGTCTCAGGCCCTAAAT  
AATCTTATCGAGTGAGTTCCCGCCTTTGTGTGATCATGAATCGATTCAAGTCATG  
GACATCTGTGCTCTGGCCGAGG

---

24G14

No se pudo obtener consenso

F

CCGGTAAGCTGGGACGACTTTAAGCGAGAGGGTGTGTGATACCCGTTGACCGG  
ATGCAGAGATGGGATGGGTTGAAGTATACCTAGGGGCCCCGGGACATCTCTCTTT  
AATGAACTCAGGTAATCCTCCCCGTATCTTCAGAAGAAAGGGTGCCCCCTCGC  
AATGGGGGTGGCTGTGTTTCATGCCCGGGCGACTGTTTCCTACAAAAAAAAAACT  
TAAAGCTTA

R

TAATAAACTTGAGTGCGGATGTACCCAGTCCACAGTCCCAGGAAAAGCTCGAT  
GGGCATTAGCCAGGGGGTCTTGTACCCGAAACGGGCAACAGCCGTGTGGGTA  
GAGAATCCCTGAGGGCCCCGACCCCCCTGTCTCTAAGGACAGCTCGGCATTCTA  
GCCCCGTAAGCTATCGGCCCGAAGGGGTGCCTACATCCAACGGGGGACTATG  
CTCGACAG

---

24G15

TAAGCTTGAG-G--GC-

ATTAAGCTTGAGGTGCTGCCAAGAGCAAGCCAGAGACTGGTGAGGTCTTTGGA  
GTATTTGAGAGCATCCAGCCATTTGATCCTGATATGGGAGCAACGGTCCCCAAG  
GATGTAAAAATCCTAGGGTATCATGTGTATGCCCAACTTGAAGTATGGAGAGG  
TTCTAGAATATGTGTATCATTCTTGGTC-  
GAATTTTGTGTACACGCTTACTAAGGTTAAACCTTGCTGACCCCTTTTGATAGA  
TGTATTGAAACATCTTTTCGTT

---

24G16

TAAGCTTGAGGCGCATTAAAGCTTGAGGTGCTGCCAAGAGCAAGCCAGAGGCTG  
GTGAGGTCTGGAGTATTTGAGAGCATCCAGCCATCTGATCCCTGATATGGGAGC  
AACGGTCCCCAAGGATGTAAAAATCCAGGGTATCATGGTATGCCCAACTTGAAT  
GATGGAGAGTTCTAGAATATGTGTATCATTCTTGGTTCGACTTTTGTGACAGTA

---

---

CCAGGTTAAACCTTGCTGTGACCCCTTTTGATAGATGTATTGTAACATCTTTTC  
GTTGCCAAAAAAAAAAGCTTAAT

---

24G17

No se pudo obtener consenso

En Staden, F

GGCGGCTCCATTCTCGACATCTGTGGCTTATGGGGGCACACTTAAGTGTTGCGA  
CCAATCTCGACCTGATGTCTGCGATACTGATCCTTGATTGCTTACCCCTTTCCC  
ACCTACGGATGGCGCGGGCCAGAACACTCTATGCGTCCCTTCGCTAGTGCCTGT  
TGTTTGCCCCGCGGTATGTGTACACCCGTTTCAATTACTTTGGATGGTCGGACGT  
CTGCTGCTTTACTTTCCCAAAAAAAAAAACCTAA

En Staden, R

TAAGCTTGAGGTGCCTTTTTTTAACTCGAAAGGGGGGAGAACATTTACACCAG  
CCGGTCACTAGACAAGCGATGGGGTGCACCTAGGGAGCGCCAATACAGTGTTG  
GCCGCCACACAAGAGAAGCTATCATTTCGCGATGAGTTGTTACCCCTTGTTTA  
AGGTGGCCCAGATCCAACCCATCTTGACTAGCCGTAGCGGAAGACATCTCGCGT  
CTACTCCAGCCAGAGCGTTATTGGGCCCGTTGCAGTTACCTATACATG

---

36A1

No se pudo obtener consenso F:

GCCCACTTTGGCTATTGTTCGCGTCCCAATTAGGACGAATCGCCTCAGTGTTGGC  
GTGATGGAAGTTAGAATTGGGCCCGCGGCTTACCAGGTTATTGTTTGGTCTAAT  
GATCCTTCTTTTTAGAGGATGGGATGACTCCGTTGCCAGTTTAAAAAAAAAAAG  
CTCCA

R:

TTGACCCTGTGTGAGATCTCAAAGGCTTGACTTATGGTGATCATTCAAACCGGT  
ATAGCTGTAGCTGCAGTCCAATTGAGGCAACTCGTTTCACGTGTTGCCTTAATG  
AGTCTATAAATATGGAGACCGTGTCATACCGAGTACTCGCCTCGATACATATAT  
AATT

---

36A2

GTGTCTTCGCACGACGGATTATTTGGGAAAGCATTGGCAGCTTTGGGAGCAGTA  
AAAAAAAAAAGCTTACACCATAGCTTGCACCATAAGCTTGCACCATTTTGTGT  
CCCTGTGTGTGATGTTGGAAGTGGGTGTACAAAATGCAAGACCGAATATTGG

---

36A3

GCACTGCTCAGTGTCTCCATTTCTTGTATATGATATATAGGAGGTTAAGGGTTC  
AAATGAAGAACCATTCTTTGTAAAAAAAAAAGCTTAAGCTTCGGGTAATAGGT  
CTTTCAACAATGCTTTTGAATTACTTAGAATTGCTCAATGTCCTCCATTTACTT  
GTATACTGATATAT

---

36A4

No se pudo obtener consenso

F:

---

---

TCTTACATGCTCATGATCCTCCATTTCTTGTATGTGACTATATAGGAGGTTAAGG  
GTTCAAATAAAGAACCACTTCTTTGTAAAAATAAAAGCTTCAGAGCTTCGGGT  
AAAAG

R:

TTAAGTTTGGGGTAAAGGTTTTTAAACCAAGGCTTTGGGATTTTTAGGAATGCC  
CCAAGTCCTCCCATTTCCGGACATGGCAAATAGGGGGGTAAGGGTTCAAATGG  
AGAATCACTTCCGGTAAAAAAAAAAAAAGCTTAAGCTTTGGGTAATAGGTCTTTC  
AAGCAATGCTTGTGGAATTCTTAGAATTGCTCCAATGTCCTCCATTTCTTGTATA  
CTGATAATAGGAGGTAAGGG

---

36A5

No se pudo obtener consenso

F:

TGGCGCCGGCCCTGTACCCGTCGGTTTTATAGTGGTTTTCTCGTAATGCGACCAC  
ATTGATGGGTATTATCTGTACGAGTGTCTTTCTGTGACTTAAAAAAAAAAAAACGC  
TATACGTAGCTCTCGGGGTCACGTTACCTCGGAGTGGGAGCTCACATTTGCTCT  
TATTGTGCCCGACCCTAGTCTGTTGTGCCTAAACACAAAAAGCGCCATACTTGT  
GTTGTGGATAATCGTCGCGGTCTTGTCTAAAAAAAAAAAAAGCTTATATA

R:

TTTAAGTTTTCGGGTAACGGATTCTAGGGGTTGGCATAGTGGCAACTTAGCTTAG  
GCCTGGGTTTGTAGTACATCGGAAGGCGTGCTTTGTTTAGCATAATGCCCTGTT  
TTTATAATAAAAAATAAAGTCGAAGCTTCGGGTAACCGGCTATCATAGGGAG  
AAGATCGTAATGAAAAGTGTAGCCCGTGCCATGGGATGGATCGTAAGCTCGAAT  
GCAGCGAATGTTGGATGT

---

36A7

GCTTCGTACCAGGCTATGAGTACGTTAAACCTCGCTAAGGCGTACCGCAAGGGA  
TAGGGTATAAATCGTTCCAGGGGTCCTGTATGTGTTTAAAAAAAAAAAAAGCTTAA  
GCTTCGGGTAACGGCTACAAGGGAGAAATCGAAAGGAAACTGTACCCGACCAG  
GGATGGACGTAACCTCGTAGCTCCAAGGTGAAATCCC

---

36A8

GGGGCCCCCGGTACGGTTTTCCCGTTCCAGGGGTTATGGGTACGGTTAAACCTCG  
GCTAAGGCGTACCCGCAAGGGATAGGGGTATAAATCGTTCCAGGGCTCCTTATT  
GTGATATAAAAAAAAAAAGCGTTATAGCGCTCTCGGGTAACGGCGCCAGGGGGTA  
GACCTAGAGGCGTACTTTGTCCCGGCCTTGTATAGGAGCTGTACACTCAAGGCT  
TCCGATTGATTTGGATAATATTCCTGCTTCTTGTCTAAAAAAAAAAAAAGCTTAAAG  
CTTCGGGTAACGGCTATCAAGGGAGAAATCGAAAGGAAAAGTGTACCCGAGCC  
AGGGATGGACGTAAGCTCGTAGCTCCCAAGGTGGAATCCC

---

36A9

CTCTATTCTTCGGGTAACGGCTATCAAGGGAGAAATCGAAAGGAAATCTGTACC  
CGATCCCAGGGTATGGACGTAAACTCGTAAGCTACCGAAGGTAGGGATAATCG  
TCCAGGGTCTTATTGTAAAAAAAAAAAAAGCTAAAAGCTTCGCTT

---

---

36A10

No se pudo obtener consenso

F:

TGTGTTTATCCCTGACTTATGAAAGCCCCTTGATCTTTGCTAAAAAAAAAAAGCT  
TTATAGGCTTATGGCCGTGTCGCTGGTGGTTGCGAACGTTGGGGCCGGCGCCCG  
CCGCTAGTCCTCCTGGCCCCGGAGTGGTCCTCGCGTTGCCGAGGCTTTTAGCCTC  
TTCTGCCCGCGGTGCTCTCCG

R:

TATGATGCCTGAAGTGCCTGATACAAATTCATTATCGTTGTCGGAATGTATACA  
ACCCCCAAAACCTTGACCGT

---

36A11

No se pudo obtener consenso F:

GGCCAAGGGCCTGTATGCGTACACATCGTCTACCTTCTGTACTACGTGAGCA  
GACGGTCGGTGCCTTCGCTTCTTGTAAAAAAGCCTTACTA

R:

TTCGAAGCTTGAGGTGCTCCATTATCAGTTCCGTTTCTCTGCCAATGATTGCATA  
AAAGTACGACCGTCGTAATCAGCGCGAACGTCC

---

36A12

No se pudo obtener consenso F:

TCGGCATCCTCTTGAGAGACCACTTACGGGGCAAATTATGCCGTCATGCACGGC  
TAGGAATAGCTTGGACCTGATAAAAAAAAAAAGCTCCAG

R:

TATGTTAGTCTTGAAGTGCCTGACTCAGCTTGAGTGACCCACTCCATCGAGTGA  
CCGTTAATGATGTGATTGAACGTTGATGTGACCAATCGCCCGAACGTTTGAACC  
ATATCCCTACGCTTCCGCC

---

36A13

No se pudo obtener consenso

F:

GGCCGCCCCGCGCAACACCTCTGTCTGAGGGCGCATGATGTGTTTCTCTACTGA  
TCTTACGTCGGCGTAACGCGCAGTTCAACTGTCCTCGTGTGAGATAGTACTAT  
GGTGTGCTGTAAATGCGCTCTGTTTCTTTCGCGTAAAAAAAAAAAAAAGC  
TCCCA

R:

TTGGTAGCTTGGGGGCTGTAAAGGCGGAGAATCGCAATCTGCTTCGTATGTATC  
AACATATCGCTGTACAGTAGTAAACATGTGTTTCTCTGTGTGTGCACTGTGTGAA  
GGCTAGAGTGCACCTACCCTGTTGGTTGTTAGTAGTCGGT

---

36A14

No se pudo obtener consenso

F:

GGCCGGCGCGGCTGTCGCGGTCATTAGTGTCGGATCTCGTGCGGTCTTTTGAAG  
AAGCAGTTTCGCACATGTTTCATTTGATGATTGTGAGAAGCAGTCCTACTACTGC  
GGGTTTTGGGGTCTCCTCGCAAAAAAAGCTCCCACTTA

---

---

R:

TAAGTATGTGAGCTGTGAAGTGCCGCTTTATACTGAGATTAACCGAGCCGACC  
GAGCTAGCGGACATCTATTATGAATCTCGATCATCTTGGAAACAACATACGCGA  
TCATATTCAGTTCATTATTGTGCGAATGCAGCCGACAACGCG

---

36G1

No se pudo obtener consenso

F:

TGGCCGGCACGCTGGAAGTCATTTGGATCGACTGGAAGAAGATCGGATCTTGGT  
GGTGTGTCGCAAGGGAGCTTGGCGCTTAAGCAGCTCGCAGCGCAAGCTTGGGGT  
TGATGCTGCTCTGTTGCTGAGCTTGCACGCAGACAACGCTGCTGCTGAAGCCTC  
AGAAAAGGCTCCTCTAAAGGGAACCGAGTTTTGCGGAAGTGTATCCTATCCGAA  
AGTCCCCTGTATGATCACTTCTATGCTGTATTAGAGATCTACCGTTTGATCTGAA  
ATTCAGGCTAGACCTATATTGTGCTAAATCTCCTCTACACTGAATAGCTTATCGA  
AATGTGGTGTAAACGCTTGCTCTGTTGCCAAAAAA

R:

TATAATTTTTTGGGCTGGCTTGGAAAACTCGATACGTGCTTCTGTAGAAGTGG  
CGAGAGCGGCCGTCAGAATATCAGCAGTTGCTGTAATGACAAAAGGGCATGGG  
CTTCGGCAAGTGGTGGCAGATGAGGTTGGTGCACGAGATGTTGAGTGTGTGGCA  
GATCACCTGCTGCTGGAGCAGCATGATCGGCTCCTCCATAATAGGCCGGGCTT  
CAATTACTTGTATCTTCACCGAATGTCCCCTGACTGTACACTTGATGTACGATCG  
TAGACATATAACCATCTGCTCAGTGTTATCAGCCGAGACCGTATATCTGTGCGTA  
ATTCTCCTCTCGCCAGAATAAGTTGCGGTATTGCGC

---

36G2

No se pudo obtener consenso

F:

CGGCCACGGCCCCGAGGCCGTCCAGATGACTCGACTGGGCAGCGGCGTCCAT  
GCCCCAAGACGGTTACCTTTACCGGCTGGACAGGGGTTGCCAAGGCCAGTTTA  
CTGCCTGGAGTGCAGTCAGTTCAAGGTAGCCGTACGGGAATGTGCGGCCGGATC  
ACCTCTTTTTTCAGGGAGAGCTATAGCTTGCGGGGTATTTTGGATAGACCTTGTTT  
CTTACCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAATTATAACCTGCGTCTACCGCCTTAGAGTTAAC  
TTTTGTGCAAAAAAAAAAAAAAGCTT

R:

TAAGCTTTGGTCAGGAAACAAGAAACCGATGATGAGCATTAGCAGCACCATTA  
GATTTGGTTCAGGCAAATCCCAGACAGTTTGTTCCTGGGCTTGCCTCAGCAC  
CAGACACATGTAGGTAGCGGGCCATGCCGAAGACAGTCTCCTTAATCACTCAA  
CGGAGGGGTGTTCCGTACGGGCACGGCGCTTGTGACCGGGATGGGAACGTCGC  
AAGCAACGGTACGCTTGCAAGCTGGAGAGGTGCGGGATAGATTCACCCTTCCT  
CTCCGTGGAGCGGACAAGGCCTTATGGGTGATTGGGGCCCCGT

---

36G3

No se pudo obtener consenso

F:

---

---

GCGGGACCACAGGGA ACTATGCTCACGGTATGCGCACTCAAGCGAACTAGC  
 CGGCACTTGTGAACTG-  
 ACAGATTGGAAGCAAGCTGAAACATGCAAGTGTAGGTTGTGAAGCTAATCTAC  
 GGTTC AAGGGTTTTTCATATTTGCTAATAGTGTCCAGCGTCTGCGCTTTCCATGC  
 TTTAATCTCTAGTTATCTACTGGCTTTGAATGTGAATGTGTCTCATAATTTTCTGG  
 CAAAAAAAAAAGCTACCAT

R:

TAATTAAGCTTTGGGTCAGGATCCAAAAACACGCTACCCAGTTGTAGTGAGGTT  
 CAACAAAGTGA ACTATGCTAATGTATCCACCAACA ACTAGCGCATTGGACGAA  
 GTTGAAGA ACCGAAATGAAGGACGTGGAAGTAATTAGTTCAAGGTTTTTCATAT  
 GTGTAATATGTCCAGCTCTGCGCTTTCCATGTCAATCTCTAGGATCGAACTGGCT  
 TGAAAGTAAAGC

---

36G11

GGCGGGCATAAGGCGGGCTTTTAACTTTGTCCGGGCGGTATTGCCTCGAGACGG  
 CTGTCAGATGCGGATTAATGAACCTGGGTTGCAAGCCCGAAGGAACCCATGTTG  
 CTTTGCGAATGGTGGTGGCATCCTGCCGGCTGGCTCCGGTCTATTTTCGCACAGT  
 AATCATATGACAGTGTCTGGGGATCAATTTTCTCCCAACTCTGAGCCAGCAGCT  
 GTGCTTTCTAGAGCCTGTATGATGTATCCGGAATGAAGCAGCTCATAGTCTTTC  
 ATGGTGGAATCTTAAGCCCGCCATCGTTGCCCCCAAAAAAAAAAGTGTTATAAAC  
 GGTGGAAACCACCAAGCTGGAGCACAGAGGGGGCTCAGGGAATTTCCGGTGGA  
 GCGGTGAAATGCGTACAGATCGCAAAGAACA CACTCGGCGAAAGCACTCCTGC  
 TGGGTACGACACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAG  
 ATACCCAGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGCTGTGCGTATCGA  
 CCCGTGCAGTGCTGTAGCTAACCGCTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGTTCCG  
 CAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG  
 TGGTTTAATTCGATGCAAAGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCCGCGAA  
 TCCTCTTGAAAGAGAGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGACACAGGTGGTGCATGG  
 CTGTCGTCAGCTCGTGCCGTAAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  
 CCTCGTGTTTAGTTGCCATCGTTGAGTTTGGAAACCCTGAACAGTCTGCCGGTGAT  
 AAACCGGAGAAGGTGAGGATGACTCCAGTCATCATGCCCTTATGCCCTGGGCG  
 ACACCCTGCTACAATGGCCCAGGACAAAGGGCCGCATCCTCTTTATTATTTTTTC  
 TGCAGGGTAATCTGTCTGAGTGCTGATTGCAGCCAAGATATGAGTTGACTTAT  
 TGTAAGTCACTCAACGTAGAAATGGTCAGGGTGATCTTCCGTCCGGTGCTGTGAT  
 AGATTTTCCCAACGTTGATGTACGGAAAAGGAATCGGAGTGTCTACCGCAGTCG  
 TGGCAGACGGAAATTCTCCACGTGGCCCATCTCCAATGAGTGAGGTGTCAGAAA  
 GGATCGCCTCAGTATTGTTTTGTACCGGGCGCAGCTATCTCAGTGACGTGTATCT  
 CCAACAGTAGCACCCCGTGCATGTGCTCTGACAAGGCAGAAGCTCATCTTACCT  
 GTAG

---

36G12

AGGGAATTTCCGGTGGAGCGGTGAAATGCGTACAGTTCGGAAAGAACACCTAC  
 GCGAAAGCACTCTGCTGGGTAGACACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGG  
 AGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAG  
 GCGCTGTGCGTATCGACCCGTGACGTGCTGTAGCTAACCGCTTAAGTATCCCGC  
 CTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA

---

---

CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAAAGCGAAGAACCCTTACCAGG  
 GCTTGACATGCCGCGAATCCTCCTTGAAGAGAGGGGTGCCTTCGGGAACGCGG  
 ACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTAAGGTGTTGGGTAAAGT  
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTGTTAGTTGCCATCGTTGAGTTTGGAAACCCT  
 GAACAGTATGCCGGTGATAAGCCC

---

36G13

GACACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCC  
 AGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGCTGTGCGTATCGACCCGTGC  
 AGTGCTGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGTTGCAAGAAT  
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  
 ATTCGATGCAAAGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATGCCGCGAATCCTCCT  
 GAAAGAGAGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT  
 CAGCTCGTGCCGTAAGGTGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTG  
 TTTAGTTGCCATCGTTGAGTTTGGAAACCCTGAACAGTATGCCGGTGATAAGCCG  
 GAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCATCA

---

36G14

No se pudo obtener consenso

F:

GGGCGCGGCCGAGCGTCTGGATAGTGCAATATCACATCCTCGCGATATGGTCAC  
 GCAGCTACCTAGTGATACGAGCGGCTTCATGGTGGACTAGGGTAGTTGGCCG  
 GGTAGGATCCTCTGCTTGTGGGCGATTTGTGGGAGGCTCTCGCATAGGGGGGCG  
 TTAGTGTCCAGGTCCTAATAGGCCTGGTTCGAGACTCTTTCTGATGTGCTTCGCGA  
 CAAATTAGAATGCTTTTATGAACCCTTCGATTTGTGTACGTTATCACGGCGATAA  
 CATTGAAGCTTTTCGAGCCTGAAGCGCTGGGCCATTCACGAATGGGACGGATGT  
 GTTCTCTGTGGCACCCCTAAGAAAAAATTACTTAATTTCTTAGGCTTAGGTGA-  
 ATTCTTGGATTTATGAGAGACGAACAACACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTT  
 TCATTAATCAAAAAAAAAAAGCTT

R:

AAAAAAAAAGCTTAAAGAGGGTGAAAATAAGCTTAAACGAGGATCCATTGGAG  
 GGCAAGTCTGGTTCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTA  
 ATATGTTGCAGTTTAATTTATTTTTAGGGGGGTTGGAGCTGGAGAAGCCTCTCCG  
 CCAGAAGTGTGCGACGGTGGTGTGTCCTTCTGTGCGGCGATACGCCCCAAC  
 TGATAATAGGCCGCATAGTGCCTTCGACATGGTTAATTGGAAGACCTGTGGGT  
 AGCTCATATGCCATGCAGGCGTTTGGTAAACCATTGCCCTCAAATACGCACTAT  
 ATAGGAGCTCGTATCAGTGATCTCGTTGTGCCAATGGGGAGTGCAGACAGACAAG  
 GTGATGCACGTGAACACTGAATGGAGCACATCAGGAATTTCGTATCCTGGAGAG  
 AGAACTCATTGTACTTTAGCAAATCCCGAACGA

---

36G15

AGCTTAAGCTTCGGGGTAAACGGCGGGAGTAACTATGACTCTCTTAAGGTAGCC  
 AAATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCCCA  
 CTGTCCCTGTCTACTATCCAGCGAAACCACAGCCAAGGGAACGGGCTTGGCAGA  
 ATCAGCGGGGAAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGACTCTAGTCACTCTAGTCCGAC

---

---

TTTGTGAAATGACTTGAGAGGTGTAGTATAAATGGGAGCCGAAAGGCCGAAAGT  
 GAAATACCACTACTTTTAAACGTTATTTTACTTATTCCGTGAATCGGAAGCGGGGC  
 ACTGCCCTCTTTTTGGACCCAAGGCCCGCCTCGCGGGCCGATCCGGGCGGAAG  
 ACATTGTCAGGTGGGGAGTTTGGCTGGGGCGGCACATCTGTAAAAGATAACGC  
 AGGTGTCCTAAGATGAGCTCAACGAGAACAGAAATCTCGTGTGGAACAAAAA  
 AAAAAAGCTTAAGCT

---

36G16

ACTCTAGTCCGACTTTGTGAAATGACTTGAGAGGTGTAGTATAAATGGGAGCCG  
 AAAGGCCGAAAGTGAATACCACTACTTTTAAACGTTATTTTACTTATTCCGTGAAT  
 CGGAAGCGGGGCACTGCCCTCTTTTTGGACCCAAGGCCCGCCTCGCGGGCCGA  
 TCCGGGCGGAAGACATTGTCAGGTGGGGAGTTTGGCTGGGGCGGCACATCTGTT  
 AAAAGATAACGCAGGTGTCCTAAGATGAGCTCAACGAGAACAGAAATCTCGTG  
 TGGAACAAAAAAGCTTAAGCT

---

36G17

TCACAAAAGAAGAGGAAGAAAAGAGTGTGATAATTTTGACAACAGACAAAAA  
 AATTACAAAAAATACCAGAAGTTTACCAAATGATACCAAGAAGCTTTCTTTTT  
 GGATGGTTTCGCGATGACGGAGCGTTCGACTTGAGTCCGCGAGAGGAGAGCCT  
 GTCACGTGTGTGGCTCCCTCCCAAAAAAAAAAAGGCTTCAGGGGAAAGACCTCG  
 GGTTTAGCCTTCGGGGAAATACATGGGACCTTGTCGTGAAGTCAATCCACGGA  
 GTAGGACCTGTAGGTACACGCTCCTGCTCCCGGTGCGT

---

36G18

No se pudo obtener consenso

F:

GCGACCGCGTGATCTTGTCTCTGTGAGGAGTCTAAGGAGGGGTCTCGTGCCTTC  
 CAATGCAATCAGCTGTAGTTCTGCTTTTACTTTTGTGTTTACCTCTTATGATAAA  
 GGCCGCATGCTA-  
 GATGTTTCGCGCCCGTACAGTACGAGAAATATGTTTTGTTTATTAGCTCAACCCTA  
 TAGGGTGGCGTGACACAAACGCCCCCCCCCAAACCCTCTGTGCTATGGTTGTT  
 CTACTTGGGTCCACCCTTGACCTCCCTTCCATCCCATCTTGTGTCGCTTCTCTCT  
 TTTCCCTGATCTTCGCCTAACCAAGGAATTAATCCTTACTCACAACACTAAATT  
 TAT

R:

TAAGCTTCGGGTAAACGGCGGGAGTAACTATGACTCTCTTAAGGTAGCCAAATG  
 CCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCCCACTGTC  
 CCTGTCTACTATCCAGCGAAACCACAGCCAAGGGAACGGGCTTGGCAGAATCA  
 GCGGGGAAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGACTCTAGTCCGACTTTGTGAAATGAC  
 TTGAGAGGTGTAGTATAAGTGGGAGCCGAAAGGCCGAAAGTGAATACCACTAT  
 AAGCTTCGGGTATTGGTGATAATAAGTAAGGGTCGGAGCAAAGGTCTTTCCC  
 AATAGCTTATGGAACCTCATGAGAGCTTGAAGTACAGTCCGTCCAAATCCTGGA

---

---

ATAAGGTGTCGAGGACGGGCATGGGGCACAAATGCCGAACCCGTTGCTCTGTA  
AAGCAAACGTGTGGC

---

48A1

ACACCCTAAAAACGCGGATGTACAGTACATGTCGCGTCCAGGTACCTGGTGTGTC  
GTTCCCTCAGTCATTCCCGTGGTACATTACGTCCGTGTCGTTGCGTTTTGCTATGC  
AAGATGATGCTTTACCCTGGTGCTACCATGCCGATGTTTCGTGAGTTACATATCA  
AGTGCTGTGTGAAAAAAAAAAGATTGAGAGTACTTGAATGGGGTTGATTGCC  
AAGTTGATGGCTAAGCTTGATTGCTTACAAGCCAGAAGGCTACTGAATTTCAAC  
ATATAATTACCCTATCCACGTGTTTCTTTTCAATTTGGACCGAGTCTTTTCTGTTCT  
TCTGTCTTTTAATGACCCCGGGTTCCTTGTGTAACCGGTGTATTTTCTAGATTC  
CAAACCTG

---

48A3

No se pudo obtener consenso

F:

GCTGGGTATGCATAGCTTCCTTGGCAATTGTATCCGGATTGTGGTTCATGTGAA  
GTCACGTTATAGCGGTACATTGTGCCGTAGCTTTTGGTGTGCTTTGGCTCACCTA  
TCTATCCGCGCAAGAATGGTCCTTGAACATATGGACTGGATAGATCTTGTTAAA  
AAAAAACTCTTCAT

R:

TATAAGCTTCGACTGTAGCGAGGTATAATGTACCGAATGATGTAACAGGTAATA  
GGATAAGCATCTTGGAAGTAGATCTCGTTTTGTTTCAGTAAGTAACTTATAGGTA  
TATTCGAGAACGATATTGGCAGCAATGGCACCCCTACATCTGAAAGAAAGAACC  
TAATT

---

48A4

No se pudo obtener consenso

F:

GCCGGGTCTTCTAGCTTTTGCTATGCGCGCAGGTCGTTTATATGTAGCGTTTAGT  
TCCTCCATGTGACGTTGTGCGCTGACATTCCTTAGAACGTGATTCTAAGAAGCTA  
TGAAGTAGAGAGCCATCTCCGTGTTTAATGTATTGTAAACTATGTGTACGATG  
GTGTGAGACCCGATTTTCCCTAAAAAAAAAAGCTTATA

R:

TTTTATGGCTTGAAGGTGGCGGACGAACCGGGTAGTCTTACAGGGAGTGTTGCG  
AGCAGACTGCACTGACTAAGCCGATGTTGTACACTCAGGCACAAGTCTGTATAG  
TATGTTACCTGACTTACATATCTCCTTGTATACCTTTGTCAGCTGCACATCCTACT  
ATGCATCGATGTCATTCTTGACCTCAAGAGAATAGATAAAGCCCCATCCACTGG  
TATTTAAATATCTAATTAGCCTACACTAACAGTGT

---

48A5

CAAAGGTAAAGGATTCTACTGCCTTATCGTACTTAGTTGCATCCCGACTGAGA  
ATATTACACATGTAACATGTATACTCCTGTCCGTTGTGGAGTATCTTGGGTGG  
TTTACTCTATATGTGACTGCTTGAGTCGTTTGTATCGTATGGCATATCATCACGA  
TTTTTGAGTGCATCGTTGCAAAGTGGTGTACTGATATATCTACTTTATGTTTCAC

---

---

ATATTTAAATCATTATTTAAGTAACTTTTTTTTTTCCTTAAAAAAAAAAAAAACTTAC  
ACCCAGACTTGCCCCTATAACTTGCACCATAATTTAAGAAGGCTCCTCCAGCAA  
CATGGAAGTATCATGGGTAACATTATACATAGTTGCTTGTGTCGGTCGCAAGTA  
ACAGAAGCTTGCACCTACCCTAATTGCAATGATGGGGCAGCTTTATTGTCATTG  
GTGCTGTCTTATCGGTGAAGTGTTTCTATTGTTGGAGGACAGCACTAGGCGAGA  
ACGGAAAGAATG

---

48A6

No se pudo obtener consenso

F:

GCGCCGGGCGTACTCCTGCTTGGGCATGCCGGTCGCCCCCCCATTGTCCTCCGA  
CCCGTGATCTCCCTTGCTTGGGCCTGATTGTCCCATGTCAGTCATGTCTGATGTG  
CGCCAACGAATCTCATAACCCAACCAGGTTCAATGACATGTGCAATGTATGGAC  
GCACACTGACGGGGACTGTTTCCCCGTGTCTAAAAAAAAAAAGCTTATATTA

R:

TATAAGCTTCGAGCTGTTAGCAGCATCTTCTTCGAGCGTACGATCTCGTGGGCGT  
CATTCTTCACGAGAGGTAATCAGGAAGCAACCAAAGTTTTCTCCTCAGAGTGAA  
ACAAGGGAATTTTCGAGTTACAGCACAGATGAAAAACAAGTTATAGCGTAGTAA  
AAACAAAATTTATTCTTTCATGTGGCAATCACCAGGTCATAATGGACTAACGG

---

48A7

CGCCAAATTTATTAACACCTTGGTCACACCGTTTACGCCTCAGGCTCAGAGAG  
GCGGCGTTGCCACTTTAATTTCGTTCCATAAACCTTACCCCAGGTATCATGTAT  
TGCAGGGCCCATAGTGATCCTTCATCTCCGGTGCTAGGACAGCGTACAAATTGA  
GAACTGTAAGAGAGCTGCGTTCAATATAACCACTGAGTAAAAAAAAAAAGCTT  
AATTGGCCAATTTTTAGGGAACTTTATTGCCCCGTTTGTTTAAACGTGATTTGC  
CTTGATGGTTAAGCTTGATTGCCACAAGGCCGTGGAGTGCAATGTTTTTCGATTT  
GTTGGTAACACAGGTGGTTATATAACCACTCACACCTACAGCATTCTGTGTGCAG  
TAGGGGCAGGAACTGGATTTCAGATTCATGCATACTATACTCCACGAGCTAATAC  
ATGTTCCAGAGGGGTCCTAGAAATGATGCCTATGTCCTGGTGTACTGCGATTA  
AGGCG

---

48G1

No se pudo obtener consenso

F:

CAGCGCCCCGAATACGCGCATGATCTATTAGTGACTGCGACGGCTAACTACGCC  
TGGGCTTGCGCTGCTAACATGCGTTGCCCGCGAGATGTCAACGTTATCTTAACT  
ATGTGATATGTTAACTTTGGGCGATGTATAATGCGTGTTTTAGTGCCCGACAAA  
AACAAACAACCTCTATAGCCAGCTT

R:

TAAGCTTTGGTAAGCGTTATTAAGCTTTGGTCAGAACGTTAAAGGTTTCAGGATC  
CCAATGAGAGCCTCTGCTGTTTGATATGTAGAAGGCGGCGGTACATAAGAGTCA  
CCTGGGCCGACACGCCACCAATTGGGTTCCCGGCACATGAAGTAAGATACATCAC  
AGTGATAGTGCCACTTGGGAATGA

---

---

46G2

CTAAGCTTTGGTCAGGTTGGGTATTAATTTGAACAATTTTGAATTCACTGCTTGT  
 ATGTGTTTGTACTGTGAAGTTACCTTATAAAGAGTTTCGTGATTTAAAATGCAA  
 TCATTGTGTTCTTCTATTATTTAGTTGATTACCTCTTATGTTAAATGCCTCAGTTT  
 CATGTTTATCATCCGTTTCAGCTCATGCAAAAAAAA  
 CAGTTTCAGAATCC

---

48G3

F

GTCTGTAATTGAGGATAGACGGACACGGGTTCCCGCCTGGTATGGCTTGACCTT  
 TGGCAGAGCAGTTTGGCGTTGAGAAGCTTTAT

R

GTCTGTAATTGAGGATAGACGGACACGGGTTCCCGCCTGGTATGGCTTGACCTT  
 TGGCAGAGCAGTTTGGCGTTGAGAAGCTTTAT

---

48G4

No se pudo obtener consenso

F:

AGCAGGCATCGAGGCGACCTCGGCTCCATTCTCACCGTCCAAGTGTCCCGGGCG  
 TGTCTTTGAGCTGCACAAAAAAAAGCTTCGAA

R:

TATGCGTTTTTTTTTTGCGTTATGAGAGCTTCTCAACGCGCGAATGCTTTGCCAA  
 AGGACAAGCCATCCAGGCCGATGCCCGTGTCTACTGTCTCCGATTCCGGGAT

---

48G6

No se pudo obtener consenso

F:

GTTTCAGCCGTTCTCGCGTGGTCCTATGCTCCCTGGATCAGAGGCTCATCGGGTAT  
 GGTGGTCCCTCCCGTTCCGAAGCTGAACACAGTGCCGTACATCTACTGCTCATGTT  
 TGAAACACTGGTTCCAAATACGGTGACTCCTTTCCCTGCAAAAAAAAAGCTT

A

R:

TAAGCTTCTCAACGCACATCGCAACATGTGCTTCTGAACATGTAAGAATGCGCT  
 TCCTCTCAATGTTTATCATGACCTCTGAAAGGAGGTATTGTTATACCGGTCCTC  
 ACGTCCACACAGAGGCGCAAATGCCATCTCCATGCTGTCTGTAACCATGAAGG

---

48G7

No se pudo obtener consenso

F:

GCGGGCCACGAGCCGTTCCCGACGTCCATTCGACCCGCACAGAGGCCTCCGGAC  
 GGGGTCGTCCTTCCAAGCCGGCCAGTCTGTCCTGCTGGATGTCCTGTGGCGA  
 TAACATGGGAGGAACTACCCTGAGTTCCCTCCGACACAAAAAAAAGCTTCTA

R:

TATAATGATTCTCAACCGCAGCCCGCTATTTGACGATCAACATCGAATGAACGC  
 CTTCCCTCAAGCCTTCTAAGAACGCGAAAGGGGGTATTGCGATACGGTCTGTC

---

---

AGCCACACAGAGCCGAAATGCCGTGCGACGTGTCACTGCAGCAAATGAACGGG  
CG

---

48G8

No se pudo obtener consenso

F:

GCGGACAACACTAGCCGTACCGCGATGTCCCATTCGCCCCGTCCAGAAGCTCCCGG  
ATGGTGTCTCCCTTTCCAAGGTGAGCCAGTGCTTTAGATCTTGGGTCTTTTTGG  
AAACATGGGCAAGAGTACTTGACATCCTTCCCTCTCAAAAAAAAAAGCTTAT

R:

TTAAGCTTCTCAACGCAATCGCTACTCGGTTCTCAACACTAGGAAGCCTTCCCTC  
AATGTTTATAAGACTCGCAGCAGCTCTTGCTTTGCCGTCTCAAGCCATCAGAG  
CCGAAACCAGTCTCCGTGCATCCTCCAATGA

---

48G9

No se pudo obtener consenso

F:

CAGCCGACGGCAGGAGGCATTGTCCACGCCATACTACATTGATGCCGTGAATAG  
CTTGGAGGTAAGAACGTGCTTTGCGCACTATTGCCCGCCCCGTTATGAAGATTC  
GGAGAGCAATGATGTGAGAGCAGCAGTGGCCCACTGCATCGGAATGCTCTGCTT  
TGCGCCTGCTACTGTTTGTATTCTCCATGAGGTACGGGACCCTTGCAGCTATTTG  
TCTTCAAAAAAAAAAAGCTTAATACCTAATATATCAGTTCAACTAATTTTCTCCT  
CAAAAAAAAAAAGCTT

R:

TAAGCTTCTCAACGGGAAATTATTGCAACTCACAGAGACCGGGGCCCTAAGTTT  
TAAGCTTTCTCACACGTATGAAAAAGATACTCTGGGTCCGTCCGGGCCATTGAAA  
TTCATGTGACCTCCGAGATATAAATTGACGGTCGTAAATCACTTGAGGGAGAC  
GAGTTGCATTGCAGCATACTTACCGCACCTCATGACAGTTCACTTCGGGTGCATT  
GAGTTCATGATGGCATCCCTGTGCACTCCGCAGACTCTGAAGGTCAATACTAGA  
GTCCACTGTAGCACGGTATTTACCCCGCGCGGAGGATAGG

---

48G11

No se pudo obtener consenso

F:

GGCAGGTGCGCGGTGCGCCGCATTTGCAGCTGGCGCGTCACGTTGGTCGCATCA  
TTGTGGCACGCGCTGGGAAATAGTTGGTGGATGCAATTTAGAAGAATGGTCATT  
CTTTCAAAAAAAAAAAGCTTAAA

R:

TAATCGAAGCTTCGGGTAAACCTGTAGTGTAATGGAAGACAATCTTCGATAGCC  
TTCGTATTCGAGAGACGCATCACTCGTAGCTCGATACTACCAAGCAATCGCGC  
GGAAGGCCG

---

48G12

No se pudo obtener consenso

F:

---

---

AGGCGCCCCACGGACGCGCACGTCTGTCAGAGTCGCAGTCACTTATAGCTCAT  
ATAGTGCAAGCGCTTGGCAGAATAGTGGTGGGGAATATAGTTAGATTGGTCTTT  
CTCTTTCTTCAAAAAAAAAAAAAAGCTCCAT

R:

TTTTAGGGTTGGGGTAACGTCTAGTGCATGGGGGATACAGATCGTACGTAAGCT  
CAGCATACTGTGAGAATACCATCACTAGAGTTGCTCCATAGGTACATGCATGAT  
GACACGTCTGCGGATAGGTGCC

---

48G13

No se pudo obtener consenso

F:

GGGGGGGGGATAAGTTTTAGAAAGCGTTAAAGTCTTTCGCATGCTTGCAGTCAC  
GTATAGCTTCATATAGTGCATGCGCTAGCACGACAGTGTTGGAGGCCGCTTATT  
AAGATCTGGCGCTTTCTTTTCTTCAAAAAAAAAAGAAGCTTACTTGCTCCCCCGCCT  
TAAAAGACCAGGCTAGATTGTTGTCTCTCCTGCGTCATTGCGCACCTGCCTTGA  
GAGGCGTCCCTGCTAAAGAAAGTTATTATAAGAGCGGCGAAAAAATTATGGCT  
CTTTGTCCCTATTTTACTCTTCGCGGGGCCGCTCCGAGCCGATTGCACCGCCCCCTC  
ACTTTTGGGCCCTAAGCCCCCTCGCGAGCTCGATCAAGGACTCATTTATCCCTG  
CCGCCGTGACGTGGATTTGGCTTCGTCTCGGCTCTTCTCCCGGAACAACCTCACGG  
TCGAGCTCTCCGATGTCTGTGAGTTCGCATTTACCCACCGGGTCTTCTCGGGGGT  
TAAGCCGGAGACTCGATGGGTTAGTCCGGGGCGGCTGCGGCGCGCTAGGTGACTT  
CTGCGCGGGCTGTGCGCCTTTTGTGTGTCGATGGCCCGTCGGCGTTTTCGGTCTC  
CGGC

R:

TTATTTAAGCCTTGGAAGGTCGCTCCAATGTATTTTCAGATCTATAGCTCCAGACT  
GGAAAGCAGGAGACGATGACTCGATTTATACATAGTCATGCTGCGTACATAACT  
GCGGACTGGTAATATTGTGATAAGTTGCGATACGCGGCGTCACTCGGCGTTCGG  
GTGAGAGCACTTATGTGAAATAAACGGACTGCTGACGCGTAACCTTATGAGTCA  
AGTAGAAAGTGGACTCCATGCGAGTGTATGAAGGACTACCGTCCTGACTGAATG  
ATCGAGGCAAGTGTGTTGCTATTACGAAATGCTGCGGTGCCCC

---