



**“ANÁLISIS FENOTÍPICO Y FISIOLÓGICO DEL MUSGO *Bryum billarderi*
Schwägr EN RESPUESTA A GLUCOSA Y ÁCIDO ABSCÍSICO”**

POR:

ALEJANDRA CHAMORRO FLORES

DIRECTOR:

DR. MIGUEL ANGEL VILLALOBOS LÓPEZ

CO-DIRECTOR

DRA. ANALILIA ARROYO BECERRA

Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala a Enero de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala siendo las 10:00am horas del día 25 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-TLAXCALA para examinar la tesis titulada:

“ANÁLISIS FENOTÍPICO Y FISIOLÓGICO DEL MUSGO *Bryum billarderi* Schwägr EN RESPUESTA A GLUCOSA Y ÁCIDO ABSCÍSICO”

Presentada por el alumno:

Chamorro

Apellido paterno

Flores

Apellido materno

Alejandra

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	3	2	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestra en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron *APROBAR LA TESIS*, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Miguel Ángel Villalobos López

Dra. Analilia Arroyo Becerra

Dr. Ángel Arturo Guevara García

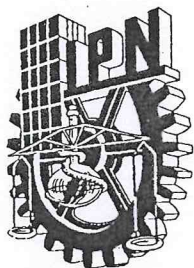
Dr. Juan Manuel Estévez Palmas

Dr. Raúl Delgado Macuil

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de ____Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala____el día 11 del mes de Enero del año 2011, el (la) que suscribe Alejandra Chamorro Flores alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B091326, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de DIRECTOR: DR. MIGUEL ANGEL VILLALOBOS LÓPEZ CO-DIRECTOR: DRA. ANALILIA ARROYO BECERRA y cede los derechos del trabajo intitulado **“ANÁLISIS FENOTÍPICO Y FISIOLÓGICO DEL MUSGO *Bryum billarderi* Schwägr EN RESPUESTA A GLUCOSA Y ÁCIDO ABSCÍSICO”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: mvallalobosl@ipn.mx, alarroyo@ipn.mx, joalbema@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Alejandra Chamorro Flores

Nombre y firma

RESUMEN

Azúcares como la glucosa (Glc) pueden actuar como moléculas señalizadoras durante el desarrollo de la planta. El conocimiento actual sobre las funciones y los componentes clave de las redes de señalización derivadas de la Glc y el ácido abscísico (ABA) en plantas superiores, se ha obtenido de estudios realizados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, el efecto de estas señales ha sido poco estudiado en plantas inferiores como las briofitas. Con el fin de determinar el efecto de Glc y ABA en el musgo *Bryum billarderi* Schwägr, dos etapas de desarrollo de este musgo fueron evaluadas (esporas y protonemas), en medios suplementados con distintas concentraciones de Glc y ABA. Los datos obtenidos de la actividad fotosintética y los fenotipos de los protonemas, así como la cinética de germinación de las esporas, fueron registrados para su posterior análisis. Durante los 15 días de exposición de los protonemas a Glc y Sorbitol, las diferencias fenotípicas se observaron sólo a concentraciones de 100 y 300 mM, mostrando una mayor densidad y un color verde más intenso en los tejidos expuestos a estas concentraciones, en comparación con el iso-osmótico. En las concentraciones más altas no se observaron diferencias fenotípicas entre protonemas expuestos a Glc y Stl lo que indica que los fenotipos observados en estas concentraciones son causados por el efecto osmótico de Glc, el cual que se acompaña de una inhibición total del desarrollo y por la apariencia clorótica de los protonemas. En cuanto a la eficiencia fotosintética, se observó una disminución conforme incrementaba la concentración de Glc o Stl; sin embargo, la eficiencia fotosintética en el control de iso-osmótica, se observó ligeramente superior comparación con la eficiencia medida en los protonemas expuestos a Glc.

Respecto a los tratamientos con ABA, no se observaron diferencias fenotípicas en los protonemas expuestos durante 15 días a las diferentes concentraciones de ABA. Respecto a la eficiencia fotosintética, en los protonemas expuestos a Glc se observó una menor eficiencia fotosintética en comparación con protonemas expuestos a Stl, lo que indica un claro efecto de la glucosa sobre la eficiencia fotosintética de este musgo.

En cuanto a las cinéticas de germinación de las esporas del musgo *B. billarderi* Schwägr, se observó que Glc 300 mM, retrasa la germinación y a una concentración de 500 mM la inhibe completamente, lo que no ocurre con el control iso-osmótico donde la germinación

alcanza el 50% de germinación. Cabe resaltar que los fenotipos observados en la etapa posterior a la germinación (dos meses y 20 días), mostraron un claro efecto de la Glc y el ABA, ya que se inhibió la formación gametóforos. También se observó una reducción significativa en el desarrollo de los protonemas en medios con Glc, mientras que esto no se observó en el control iso-osmótico.

Con todo esto podemos concluir que la Glc actúa como una molécula señalizadora sobre el desarrollo de los protonemas y esporas del musgo *B. billarderi* Schwägr, promoviendo la formación de tejidos y la germinación de las esporas (concentraciones bajas y altas respectivamente), descartando el efecto osmótico de la Glc, por las diferencias encontradas con el control iso-osmótico. Y que existe una interacción a nivel post-germinativo entre la Glc y el ABA, inhibiendo la formación de gametóforos.

ABSTRACT

Sugars like glucose (Glc) can act as signaling molecules during plant development. Current knowledge about sugar and abscisic acid (ABA) roles on physiology and key components of involved signaling networks in higher plants has been obtained from studies mainly on *Arabidopsis thaliana* plant model. However, the effect of these signals has been poorly studied in lower plants like bryophytes. In order to determine the effect of Glc and ABA, two developmental stages of the moss *B. billarderi* Schwägr was evaluated (spores and protonemata) in mediums supplemented with different concentration of Glc and ABA. Phenotypic and photosynthetic activity was scored in protonemata tissues and possible effects on spores germination.

During 15 days of exposure of protonemata to Glc and Stl, phenotypic differences were observed only at concentrations of 100 and 300 mM, showing a deeper green and greater density in tissues exposed to these concentrations, compared to iso-osmotic control and even control. At the highest concentrations we not observed protonemata phenotypic differences between Glc and Stl, indicating that the phenotypes observed under these higher concentrations are caused by the osmotic effect of Glc, which is accompanied by a total inhibition of development and chlorotic appearance of the protonemata. Regarding photosynthetic efficiency decrease in Glc at 500 mM in comparassion with sorbitol, we observer that the photosynthetic efficiency decreases according the concentration of Glc or Stl increases, however the photosynthetic efficiency in the iso-osmotic control shows a slightly higher photosynthetic efficiency compared to glucose, suggesting that the osmotic effect of Glc can be ruled out.

No phenotypic differences were observed in protonemata exposed during 15 days to different concentrations of ABA, but in the photosynthetic efficiency it is possible to see some differences. The protonemata exposed to Glc show lower photosynthetic efficiency compared to protonemata exposed to iso-osmotic agent sorbitol, which indicates a clear effect of glucose on the photosynthetic efficiency in this moss.

Spores germination in the moss *B. billarderi* Schwägr under Glc, Glc + ABA, Stl and ABA+Stl conditions showed the effect of Glc on germination of spores, delaying

germination from 300 mM, inhibiting germination in 500 mM, which does not occur with iso-osmotic control, where germination still reaches 50% of germination. Phenotypes at the post-germinating stage (two months 20 days), showing a clear effect of Glc and ABA on the inhibition in the gametophores formation and a significant reduction in protonemata development in medium with Glc, whereas this is not observed in iso-osmotic control sorbitol.

Glucose acts as a signaling molecule on the development of protonemata and spores germination of the moss *P. cuspidatum*, promoting tissue density and inhibiting spore germination, (low and high Glc concentrations, respectively), ruling out the osmotic effect concentrations generated by the differences found with iso-osmotic control.

INDICE GENERAL

	Pág
INTRODUCCIÓN	5
I.1 Los azúcares como moléculas señalizadoras	5
I.2 Vías de señalización donde participan los azúcares en plantas superiores	7
II LA FITOHORMONA ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA)	10
II.1 Generalidades sobre el ABA	10
II.2 El ABA y las briofitas	11
III BIOLOGÍA DE LOS MUSGOS	11
III.1 Generalidades sobre las briofitas	11
III.2 Diversidad de las briofitas	12
11I.3 Morfología de los Musgos	13
11I.4 Ciclo de vida de los Musgos	14
11I.5 Reproducción sexual en los Musgos	15
11I.6 Reproducción asexual en los Musgos	16
111I.7 Patrones de crecimiento del cloronema y caulonema	16
IV ANTECEDENTES	18
IV.1 Efecto del ABA sobre el desarrollo de los musgos	18
IV.2 El estudio de los azúcares en briofitas	20
IV.3 La intercomunicación entre Glc y ABA en <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
IV.5 Efecto de diferentes reguladores de crecimiento en las briofitas	22
IV.6 Estudios preliminares sobre el efecto de la glucosa en el musgo <i>B. billarderi</i> Schwägr	22
IV. 7 Estudios realizados en el musgo <i>B. billarderi</i> Schwägr	24
IV.8 El uso de la 2 Deoxi-glucosa (2 D-G) como herramienta para el estudio de la señalización por azúcares.	25
V JUSTIFICACIÓN	27
VI OBJETIVOS	28
VI.1 OBJETIVO GENERAL	26
VI.2 OBJETIVOS PARTICULARES	26
VII MATERIALES Y MÉTODO	29
VII. 1 Material Biológico	29

VII. 2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de los tejidos	30
VII.3 Propagación de los protonemas de <i>B. billarderi</i> Schwägr	30
VII.4 Transferencia a medios adicionados con Glucosa y Sorbitol	30
VII.5 Transferencia a medios con Glucosa y Sorbitol más ABA	31
VII.6 Pruebas de germinación de las esporas de <i>B. billarderi</i> Schwägr bajo condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	32
VII.7 Pruebas de germinación en medios adicionados con 2 Deoxi-glucosa	33
VII.8 Evaluación fenotípica y eficiencia fotosintética de los protonemas de <i>B. billarderi</i> Schwägr	34
VII. 9 Evaluación del efecto de la 2 Deoxi-Glucosa sobre el fenotipo y la eficiencia fotosintética en protonemas de <i>B. billarderi</i> Schwägr	35
VII.10 Identificación y análisis de posibles genes homólogos implicados en la señalización de azúcares entre plantas superiores y briofitas.	35
VII.11 Extracción de RNA de los protonemas expuestos a los diferentes tratamientos en el musgo <i>B. billarderi</i> Schwägr	36
VII.12 Síntesis de cDNAs a partir de los RNAs obtenidos en los diferentes tratamientos	37
VII.13 Extracción de DNA de protonemas de <i>B. billarderi</i> Schwägr y <i>P. patens</i>	39
VIII RESULTADOS	40
VIII.1 Fenotipos de los protonemas de la clona PcA de <i>B. billarderi</i> Schwägr expuestos en medios con Glucosa y Sorbitol.	41
VIII.2 Eficiencia fotosintética de los protonemas expuestos a Glucosa y Sorbitol	41
VIII.3 Fenotipos de los protonemas de <i>B. billarderi</i> Schwägr expuestos en medios con Glucosa más ABA.	35
VIII.4 Eficiencia fotosintética de los protonemas expuestos a medios con Glc más ABA	35
VIII.5 Cinética de germinación de <i>Arabidopsis</i> en medio con sacarosa y ABA	47
VIII.6 Cinéticas de germinación de las esporas de <i>B. billarderi</i> Schwägr en medios con Glucosa y Sorbitol en presencia y ausencia de ABA.	48
VIII.7 Fenotipos post-germinativos de las esporas del musgo <i>B. billarderi</i> Schwägr bajo condiciones de Glucosa y Sorbitol en presencia de ABA	50
VIII.8 Cinéticas de germinación de esporas en medios adicionados con diferentes concentraciones de ABA.	51
VIII.9 Cinética de germinación de esporas de <i>B. billarderi</i> Schwägr en medios adicionados con	

diferentes concentraciones de 2-Deoxi-Glucosa en presencia y ausencia de ABA	54
VIII.10 Caracterización fenotípica y fisiológica de la Línea 4 de <i>B. billarderi</i> Schwägr en respuesta a Glucosa	56
VIII.11 Caracterización fenotípica y fisiológica de la línea 4 en respuesta a Glucosa y Acido abscísico	60
VIII.12 Efecto de la 2 Deoxi-glucosa sobre el fenotipo y la eficiencia fotosintética de la Línea 4 del musgo <i>B. billarderi</i> Schwägr	64
VIII.13 Efecto de la Glc y el ABA sobre los protonemas después de estar expuestos por un mayor tiempo a los tratamientos evaluados	65
VIII.14 Extracciones de los RNA de protonemas de <i>B. billarderi</i> bajo los diferentes tratamientos	67
VIII.15 Extracciones de DNA de los musgos <i>B. billarderi</i> Schwägr y <i>P. patens</i>	68
IX DISCUSIÓN	70
X CONCLUSIONES	73
XI PERSPECTIVAS	74
XI I LITERATURA CITADA	75
XIII ANEXOS	81

I INTRODUCCIÓN

I.1 Los azúcares como moléculas señalizadoras

Los azúcares juegan un rol central como moléculas que modulan el metabolismo, desarrollo y fisiología de las plantas (Koch, 1996; Sheen, *et al.*, 1999; Smeekeens, 2000; Coruzzi y Zhou, 2001; Rolland *et al.*, 2001). La disponibilidad de azúcares solubles tales como la glucosa (Glc), fructosa y sacarosa, tienen funciones esenciales en el metabolismo de las plantas (Hassid y Putman *et al.*, 2005). Además se ha demostrado que los azúcares son importantes moléculas señalizadoras durante el desarrollo de la planta y en respuestas a estrés abiótico (Smeekeens 2000, Loreti *et al.*, 2001.)

En plantas superiores las señales derivadas por los azúcares, modulan procesos importantes tales como la germinación, el desarrollo de la semilla, la morfogénesis de las hojas y las raíces, la floración, la embriogénesis, las respuestas a heridas por patógenos y la senescencia, además de la expresión génica (Koch 1996; Moore y Sheen 1999; Sheen *et al.* 1999; Wobus y Weber 1999) (Fig. 1).

La sacarosa y la glucosa ayudan a regular la transición del crecimiento por división celular al crecimiento por expansión celular y a acumular reservas en el desarrollo del embrión en las plantas (Wobus y Weber, 1999; Borisjuk *et al.*, 2003). Se ha visto que durante el desarrollo de los cotiledones de haba, los tejidos mitóticamente activos e indiferenciados contienen altos niveles de glucosa, mientras que los altamente diferenciados contienen bajos niveles de glucosa; esto reveló una estrecha relación entre el gradiente de glucosa durante el desarrollo de los cotiledones, sugiriendo que el gradiente de glucosa puede tener funciones formogénicas (Borisjuk *et al.*, 2003).

Durante la germinación en plantas superiores, las reservas de la semilla se movilizan para ser utilizadas como fuente de energía por el embrión. En las semillas que almacenan almidón, las α -amilasas lo degradan y la glucosa generada es transportada al embrión para

su desarrollo y crecimiento, cuando los niveles de glucosa exceden, se reprime la expresión de los genes de las α -amilasas (Smeekens, 2000). Mientras que, durante la germinación en semillas que almacenan lípidos, estos son convertidos a sacarosa en un proceso que involucra al ciclo del glioxilato, el exceso de los azúcares generados reprime la movilización de nutrientes y retrasa la germinación (Smeekens y Rook, 1997; Price et al., 2003; Arroyo A., 2004;)

Bajo condiciones *in vitro*, durante el proceso post-germinativo de la planta *Arabidopsis*, las cantidades bajas de azúcares promueven el desarrollo, mientras que la ausencia total de azúcares minimiza su desarrollo general. Sin embargo, una concentración alta de azúcares reprime la movilización de nutrientes, la elongación del hipocótilo, el enverdecimiento y la expansión de los cotiledones; lo cual resulta en una interrupción del desarrollo temprano de la planta (Jang *et al.*, 1997)

En *Arabidopsis* el proceso de floración requiere un aumento en la exportación de los carbohidratos desde las hojas, así como la movilización de almidón, lo cual sugiere que los carbohidratos del floema tienen una función crítica durante la transición floral (Corbesier *et al.*, 1998). La senescencia también es regulada por azúcares, proceso que coincide con la disminución en el contenido de clorofila y de la actividad fotosintética y con el aumento en la actividad de las Invertasas durante el envejecimiento (Quirino et al., 2000; Wingler et al., 1998).

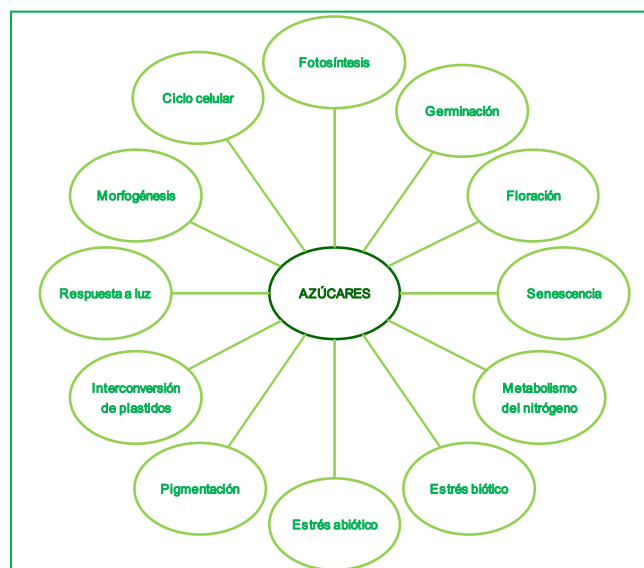


Fig. 1. Procesos fisiológicos y de desarrollo donde participan señales por azúcares en plantas superiores.

I.2 Vías de señalización donde participan los azúcares en plantas superiores

Las plantas limitadas por su entorno, necesitan integrar una amplia variedad de estímulos con su actividad metabólica, crecimiento y desarrollo. Los azúcares generados por la fijación fotosintética del carbono, son el centro de coordinación de flujos metabólicos en respuesta a los cambios ambientales y en proveer a las células con la energía necesaria para continuar con su crecimiento y supervivencia. De esta forma una compleja red de rutas de señalización metabólica y hormonal, están íntimamente relacionadas a diversas respuestas a azúcares (Ramon. *et al.*, 2008). Así, los azúcares pueden complementar e interactuar con una variedad de hormonas, factores de crecimiento y mecanismos señalizadores para modular el metabolismo y crecimiento en sistemas complejos (Rolland *et al.*, 2006).

El conocimiento que se tiene en la actualidad sobre el papel de los azúcares en el crecimiento de las plantas y los componentes claves en la red de señalización por azúcar se ha obtenido de la planta modelo *Arabidopsis*. Es importante mencionar que los azúcares regulan el desarrollo temprano de las plántulas de *Arabidopsis*, utilizando mecanismos señalizadores que involucran a la fitohormona ácido abscísico (Arenas-Huertero *et al.*, 2000).

Se ha establecido que la abundancia de azúcares en el medio disminuye la asimilación del carbono durante la fotosíntesis, como resultado de la disminución de la demanda de fuentes carbonadas o por la limitación de nitrógeno así como por la represión de genes fotosintéticos. Por el contrario, se sabe que el agotamiento de la poza de azúcares resulta en la activación de la expresión de genes fotosintéticos y en un incremento en la capacidad fotosintética (Ramon. *et al.*, 2008). Por otro lado, la conversión de sacarosa a glucosa y fructosa por medio de invertasas y su distribución en distintos compartimentos sub-celulares, es también un proceso controlado diferencialmente por la señalización activada por azúcares (Rolland *et al.*, 2006).

En la figura 2 se pueden resumir los modelos que describen la percepción y señalización de azúcares en *Arabidopsis*. La glucosa y la fructosa pueden ser transportadas dentro de la

Fig.2. Esquema que resume los modelos para la percepción y señalización de energía y azúcares en *Arabidopsis*. Tomado de Ramon, *et al*, 2008.

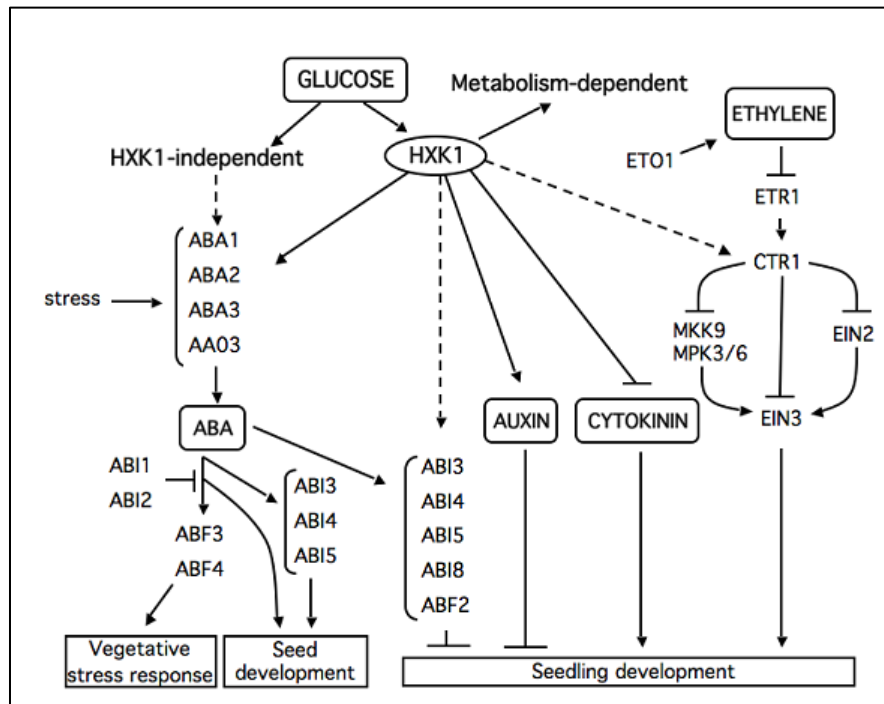


Fig. 3. Esquema general sobre las interacciones genéticas entre la glucosa y hormonas señalizadoras en *Arabidopsis thaliana*, Tomado de Ramon M., 2008.

En el esquema de la figura 3 se puede observar que la señalización de la glucosa mediada por la HXK dirige a un incremento en los niveles de ABA, la síntesis de ABA y la señalización para controlar el desarrollo de las plantulas. Por otra parte mutantes señalizadoras insensibles a ABA, no exhiben en fenotipo insensible a glucosa, sugiriendo una ruta de señalización de ABA distinta para la señalización de glucosa y para las respuestas vegetativas al estrés.

En tanto, las briofitas son los ejemplos vivientes de las primeras plantas terrestres, y como tales tuvieron que adaptarse a los nuevos retos ambientales que representó la colonización del ambiente terrestre. Como consecuencia de ello, estas plantas desarrollaron mecanismos para contender con la sequía y otros estreses que podrían representar las primeras formas de señalización específica a estrés abiótico en plantas y quizá las primeras formas de

regulación del desarrollo de las plantas terrestres mediada por fuentes esenciales de energía como la glucosa.

La detección de azúcares en organismos procariontes, permite ajustarlos metabólicamente a cambios en la disponibilidad de nutrientes; en organismos eucariontes el sistema de detección de azúcares es mucho más complejo, debido a que el estado energético de las células individuales debe ser integrado a las vías de señalización que regulan el crecimiento y desarrollo del organismo completo (Arroyo *et al.*, 2003). (Ramon. *et al.*, 2008).

II LA FITOHORMONA ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA)

II.1 Generalidades sobre el ABA

La fitohormona ácido abscísico (ABA) regula muchos aspectos del crecimiento y el desarrollo de las plantas, incluyendo la maduración de los embriones, la dormancia de las semillas, la senescencia, las respuestas celulares a estrés abiótico y el cierre estomático (Xiong L y Zhu J.K, 2003). El ABA ha sido llamado la hormona del estrés, ya que esta aumenta la adaptación a varios tipos de estrés, tales como temperaturas bajas, radiación por UV, patógenos, salinidad y durante la respuesta de la planta al déficit hídrico (Giraudat *et al.*, 1994; Giraudat, 1995; Leung y Giraudat, 1998; Finkelstein *et al.*, 2002). El modo de acción del ABA es muy complejo, y por ello es un tema muy dinámico de la investigación. Si bien se ha hecho un progreso sustancial para entender los procesos de señalización en varios sistemas de plantas, muchas preguntas en relación con las respuestas pleiotrópicas del ABA, permanecen para ser contestadas (Zhou *et al.*, 2004).

La biosíntesis del ABA es conocida como la ruta carotenoide, la cual involucra un rompimiento oxidativo de un cis-epoxicarotenoide para dar origen a xantocina seguida por dos pasos de conversión a ABA. Se piensa que la regulación del rompimiento del cis-epoxicarotenoide por estreses ambientales es uno de los mecanismos control importantes que poseen las plantas para controlar las respuestas a estrés en una forma dependiente de ABA. Por otra parte las respuestas al ABA involucran su percepción por medio de receptores celulares y señales de transducción reguladas por proteínas cinasas y segundos

mensajeros, dirigiendo la regulación de canales de iones y la activación de factores de transcripción que controlan a los genes inducibles por ABA (Takezawa, 2011).

II.2 El ABA y las briofitas

La mayoría de los estudios sobre el papel del ABA en briofitas se han concentrado en la adquisición de la tolerancia a estrés ambiental (Cove, *et al.*, 2006). Entre los musgos, el ABA ha sido detectado en protonemas de *Funaria hygrometrica*, después de un secado lento hay un aumento en el ABA endógeno y los protonemas sobreviven a la desecación (Werner *et al.*, 1991; Bopp y Atzorn, 1992b en Johri, 2008). Se han reportado claras evidencias de la presencia de una vía de señalización específica para esta hormona (Cove, *et al.*, 2006), aunque su función en estas plantas no ha sido apropiadamente clarificada.

En 2003 Minami y colaboradores, determinaron que el ABA exógeno en protonemas de *Physcomitrella patens*, incremento significativamente la tolerancia de los protonemas al congelamiento y la expresión de 14 genes en respuesta a ABA, sugiriendo así una participación del ABA en las respuestas de *P. patens* ante estrés por frío. Manabu y colaboradores en 2005, observaron que el ABA exógeno incrementa la concentración osmótica en las células en relación con la acumulación de azúcares solubles, sugiriendo que el ABA induce la acumulación de azúcares solubles asociados con cambios morfológicos en organelos, un aumento en la cantidad de azúcares solubles se asocia con la disminución en la cantidad de almidón en los cloroplastos de los protonemas, mitigando el daño estructural inducido por el congelamiento, dirigiendo eventualmente la tolerancia al congelamiento en los protonemas.

III BIOLOGÍA DE LOS MUSGOS

III.1 Generalidades sobre las briofitas

Las briofitas son plantas no vasculares; es decir, plantas que no cuentan con un sistema especializado para el transporte de agua y nutrimentos (como el xilema y floema en las

plantas vasculares). Generalmente son pequeñas y habitan ambientes muy variados; cerca del nivel del mar, montañas, selvas y/o en los desiertos. Su ciclo de vida incluye dos fases: el gametofito y el esporofito, cada fase posee atributos morfológicos y biológicos que señalan a las briofitas como un grupo excepcional e importante en la evolución del reino vegetal, ya que los musgos y las plantas con flores divergen por más de 400 millones de años. Las briofitas comparten un ciclo de vida haploide-diploide (Goffinet y Shaw, 2009) siendo dominante el ciclo de vida haploide, mientras que las plantas con flores (angiospermas) tienen un ciclo de vida diploide dominante (Nishiyama *et al.*, 2003). Las briofitas son las únicas plantas terrestres en las que la generación dominante es el gametofito, el cual es responsable del crecimiento exploratorio y de la proliferación de una nueva generación a través de un proceso sexual o asexual. El gametóforo es fotosintético mientras que el esporofito realiza tan poca fotosíntesis que tiene que tomar los nutrientes del gametofito, al cual vive ligado toda su corta vida.

III.2 Diversidad de las briofitas

Desde el punto de vista de biodiversidad, las briofitas son el segundo grupo más importante de plantas; tradicionalmente se les divide en tres categorías: Musgos, Antocerotes y Hepáticas (Fig. 4). Se conocen aproximadamente 18000 especies de briofitas, de las cuales: 100 especies son antocerotes, 5 000 especies son hepáticas y 13 000 especies son musgos (Goffinet y Shaw, 2009; Wood, 2007). En México se conocen 650 especies de hepáticas, un número desconocido de antocerotes y 980 especies de musgos (Comunicación personal Dr. Claudio Delgadillo Mora Jefe del Departamento de Botánica, Instituto de Biología, U.N.A.M).

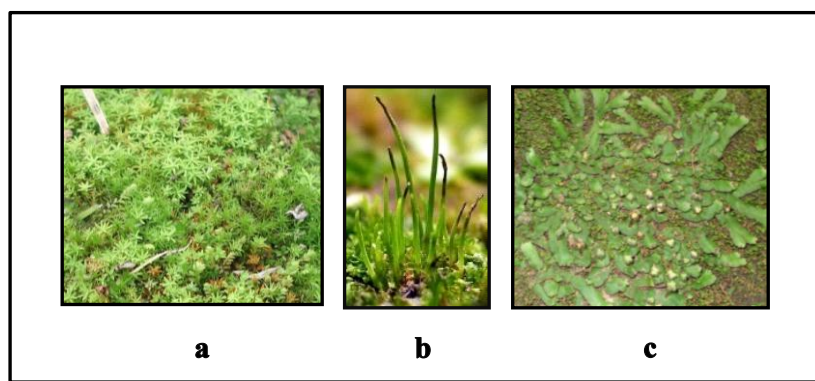


Fig. 4 Briofitas: imágenes representativas de: **a)** Musgo *Ceratodon stenocarpus*, **b)** Antocero *Anthocerophyta sp.* y **c)** Hepática *Marchantia polymorpha*. **a** y **c** Fotografías tomadas por Cervantes-Díaz F. **b** Fotografía tomada por De Luna E.

11I.3 Morfología de los Musgos

Un musgo es una planta no vascular que está formada por un gametóforo, un esporofito y rizoides (Fig.5). Los esporofitos constan de un pie, un eje alargado (seta) y un esporofito terminal (cápsula). Las cápsulas de las briofitas (Fig. 6), son complejas estructuralmente, y en algunos casos exhiben mecanismos complicados para la producción y dispersión de las esporas (Shaw y Renzaglia, 2004).

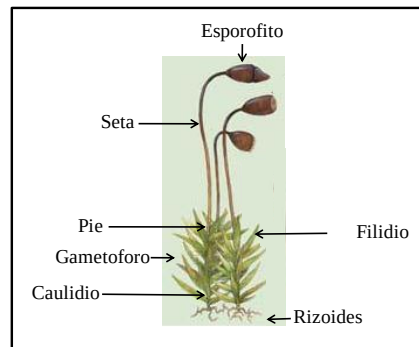


Fig.5. Estructura del gametofito de un musgo y sus componentes. Tomado y adaptado de http://baynature.org/articles/jan-mar-2007/forest-lowlife/captionimage_mainarticle

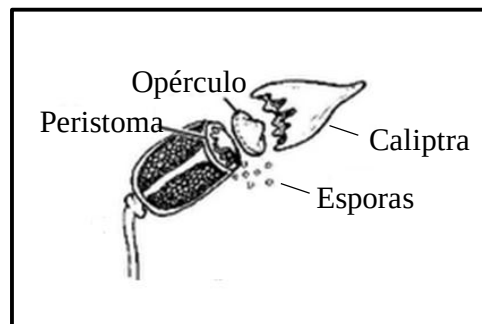


Fig. 6. Estructura de un esporofito. Tomado y modificado de <http://biofritos.blogspot.com/>

Los *gametóforos* no poseen sistemas activos de captación de agua, ni de almacenamiento de la misma, los rizoides sirven para sujetarse al sustrato. Los *filidios* (equivalentes a las

hojas en las plantas vasculares) tienen una cutícula fina e incompleta en la cara superior, si están expuestos al aire seco durante algunas horas, pueden deshidratarse. Los *caulidios* son los ejes principales, carecen de tejido vascular y son incapaces de transportar líquidos de una parte a otra del gametofito. Sólo algunas briofitas complejas, por ejemplo *Polytrichum*, presentan células especializadas que cumplen un papel primitivo de conducción estas células son llamadas *hidroides* y *leptoides* (www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Briofitos/). Las hepáticas, musgos y antoceros muestran atributos estructurales y reproductivos que son exclusivos de estos grupos, diferentes especies muestran una diversa morfología sexual debido a que algunas especies producen gametos masculinos y femeninos sobre el mismo gametóforo, otros sobre diferentes gametóforos pero sobre la misma planta, y otros tienen plantas separadas es decir plantas masculinas y femeninas (Shaw y Renzaglia, 2004).

11I.4 Ciclo de vida de los Musgos

Los musgos como muchas plantas, muestran alternancia de generaciones gametofito y esporofito, el estado dominante es el *gametofito*, el cual es haploide y constituye la mayor parte de su ciclo de vida, mientras que el esporofito; el estado diploide, es efímero y por lo tanto de vida corta. Las briofitas presentan *gamentangios* masculinos y femeninos, *anteridios* y *arquegonios*, respectivamente (Fig. 7). La fecundación ocurre por *oogamia* y el cigoto y el embrión se desarrollan protegidos dentro del gametangio femenino, cada arquegonio alberga a un único embrión.

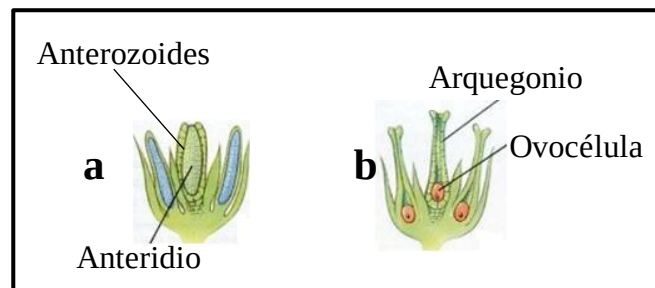


Fig. 7. Gamentangios de un musgo: **a**) Anteridio (Masculino), **b**) Arquegonio (Femenino). Tomado y modificado de <http://universe-review.ca/I10-22a-lifecycle2.jpg>.

11I.5 Reproducción sexual en los Musgos

La reproducción sexual en las briofitas se realiza en presencia de agua, debido a que los anterozoides (gametos masculinos contenidos en el anteridio) son móviles y biflagelados y nadan hasta el gametangio femenino (arquegonio) llevando a cabo la fecundación de la ovocélula; posterior a la fecundación se forma un cigoto el cual se desarrolla por divisiones mitóticas para generar un esporofito diploide, el cual es dependiente nutricionalmente del gametofito materno (Haig y Wilczek, 2006). El esporofito produce un esporangio en el cual tiene lugar la meiosis, para producir un gran número de esporas haploides, que en muchos casos son dispersadas por el viento o también por el agua en época de lluvias, si se presentan las condiciones óptimas de humedad y luz, las esporas germinan para formar nuevos gametofitos (Haig y Wilczek, 2006). Cuando una espora germina se origina un estado de desarrollo llamado *protonema*, el cual posee tres componentes: cloronema, caulonema y rizoides (Goffinet y Shaw, 2009). El *protonema* está formado por células filamentosas que se extienden por una serie de divisiones de sus células apicales, el *cloronema* siempre es filamentososo y está compuesto de células con un gran número de cloroplastos y se caracteriza por tener un crecimiento intercalar, en tanto el *caulonema* posee células filamentosas pigmentadas en un tono más oscuro, separadas por paredes intermedias oblicuas con numerosos plasmodesmos que emanan del cloronema. Los *rizoides* son filamentos que anclan a los musgos al sustrato y pueden estar involucrados en la conducción de agua. El *protonema* da paso a la formación de yemas apicales, las cuales se dividen por mitosis para formar a los nuevos gametóforos, que al madurar formarán a los nuevos gametos, comenzando así el nuevo ciclo de vida (Goffinet y Shaw, 2009) (Fig. 8).

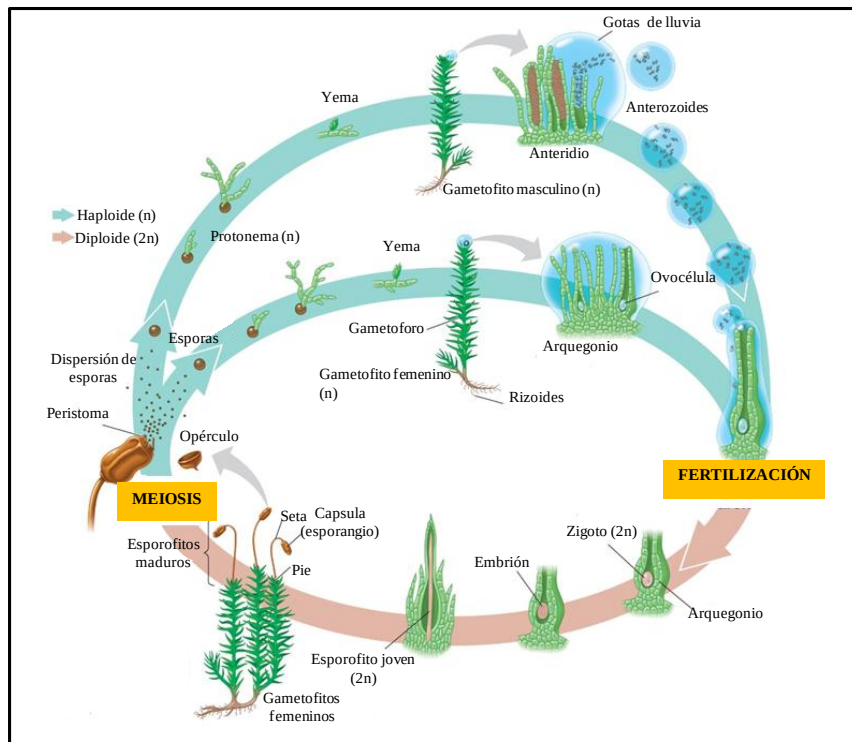


Fig. 8. Ciclo de vida general de un musgo. Las flechas indican el estado haploide y diploide del ciclo. Tomado y modificado de http://apbiosemonefinalreview.pbworks.com/f/29_08-MossLifeCycle_3-L.jpg

11I.6 Reproducción asexual en los Musgos

Algunos gametofitos de una minoría de briofitas (entre ellas los musgos) producen *gemas*, las cuales son estructuras especializadas para la dispersión de estas plantas de forma asexual, sin embargo también experimentan la dispersión asexual por fragmentación (Haig y Wilczek, 2006). Se ha sugerido que los propágulos (en cultivos de tejidos y en poblaciones naturales) funcionan como órganos perenes producidos como mecanismos de supervivencia en condiciones desfavorables (Rowntree, 2006).

11I.7 Patrones de crecimiento del cloronema y caulonema

Las células apicales de los dos tipos de filamentos cloronema y caulonema Fig. 9. tienen diferentes patrones de crecimiento, las células apicales del cloronema se extienden lentamente y tienen un ciclo celular más largo que las células del caulonema (Cove, 2005). En el musgo *Physcomitrella patens* el desarrollo inicial de las ramas laterales del

caulonema en gametóforos, se caracteriza por la primera división celular la cual ocurre de manera diagonal, produciendo más células apicales con muchos cloroplastos; y una célula basal con pocos cloroplastos, posteriormente las células apicales se dividen para producir el eje del gametóforo y la división de la célula basal produce muchos de los rizoides (Russell, 1993).

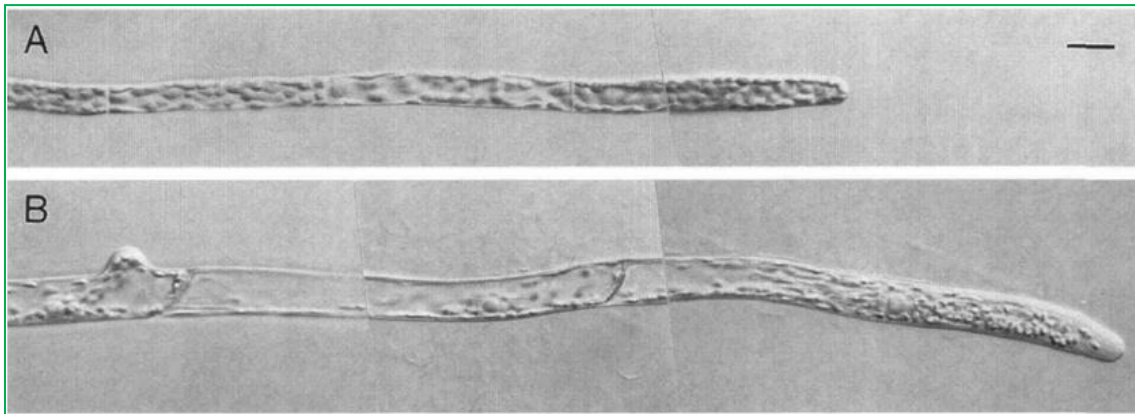


Fig.9. Micrografía de luz de los tipos celulares del protonema en un musgo. **A)** Cloronema y **B)** Caulonema, la barra representa 25 μ m. Tomado y modificado de Schumakerl y Dietrich., 1997

IV ANTECEDENTES

Los musgos poseen destacadas características que los convierten en excelentes candidatos para ser modelos de estudio, entre las cuales destacan: capacidad de crecer en medios de cultivo ya sea sólido o líquido, son sensibles a fitohormonas, poseen un patrón simple de desarrollo con pocos tipos de células y la fase dominante de su ciclo de vida es el estado haploide, por destacar algunas. Los estudios realizados en especies como *Funaria hygrometrica*, *Tortula ruralis*, *Atrichum undulatum*, *Bryum Argenteum* y *Physcomitrella patens*, se han enfocado al estudio de las respuestas de estos musgos bajo condiciones de estrés abiótico y a la participación del ABA en tales condiciones, respecto al estudio de los azúcares se ha abordado su participación, solo como osmolitos (Allsopp1959; Chopra y Kumra,1988; Minami, 2003; Manabu; 2005).

IV.1 Efecto del ABA en el desarrollo de los musgos

Estudios realizados con cultivos axénicos de tallos y yemas de la hepática *Marchantia polymorpha* mostraron que cuando se utilizaban tallos con 3 semanas de edad para ser transferidos a medios con concentraciones de 10 μM de ABA no se observaban diferencias en el desarrollo de estos tejidos en comparación con los que no estuvieron en medios adicionados con ABA; sin embargo, cuando la yemas eran sembradas directamente en medios que contenían ABA a concentraciones más bajas (1 μM ABA) el crecimiento fue notablemente inhibido. El efecto inhibitorio fue corroborado por la medición del peso fresco y peso seco. Estos resultados indican que los gametofitos de *M. polymorpha* son sensibles al ABA, lo que sugiere fuertemente esta hepática posee mecanismos para la señalización de ABA (Fig. 10) (Tougane *et al.*, 2010).

Thelander *et al.* en 2005 mostraron que la mutante *hxx1* de *P. patens* es hipersensible a ABA, ya que esta redujo su crecimiento en un 37% comparado con el musgo silvestre en la presencia de 1 μM de ABA, también observaron que el efecto inhibitorio del ABA sobre el tamaño de la colonia es dependiente de la concentración de ABA observando un menor efecto a concentraciones de 0.1 μM de ABA y la inhibición total del crecimiento a 10 μM de ABA (Fig.11).

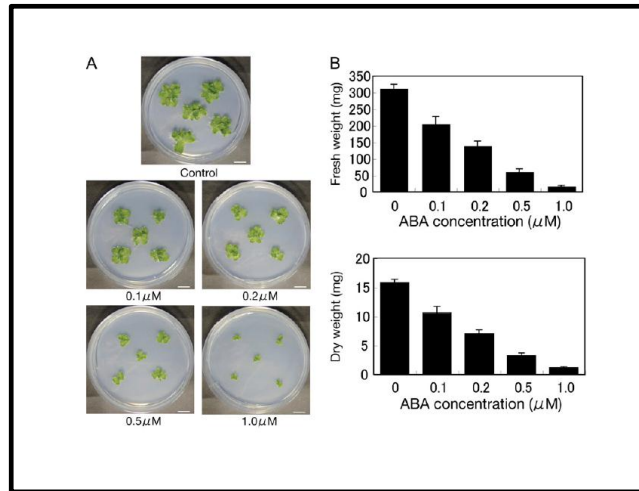


Fig. 10. A) Efecto de las diferentes concentraciones del ABA sobre el crecimiento en la hepática *M. polymorpha* y B) Peso fresco y seco de yemas de *M. polymorpha* expuestas a diferentes concentraciones de ABA. Tomado de Tougane *et al.*, 2010.

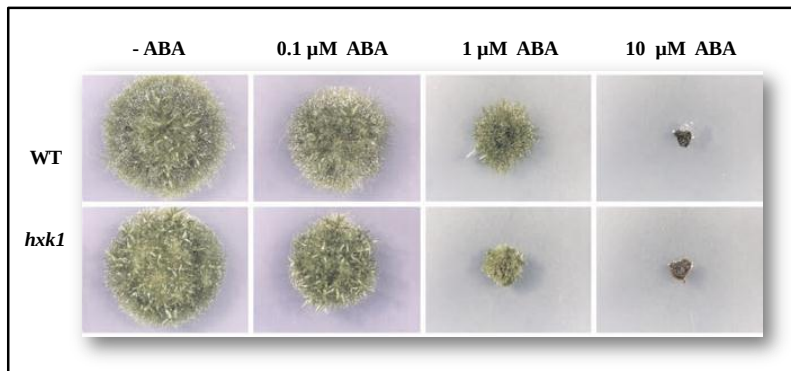


Fig. 11. Hipersensibilidad de la mutante *hxx1* de *P. patens* a la inhibición del crecimiento por ABA. Modificado de Thelander *et al.*, 2005.

También es conocido que el ABA induce un aumento en la concentración osmótica en las células protonemales mediante la acumulación de azúcares solubles libres, los cuales podrían ser parte de los responsables de mitigar los daños provocados por el estrés generado por frío. (Cove, *et al.*, 2006).

IV.2 El estudio de los azúcares en briofitas

Aunque existen estudios muy importantes relacionados al estrés abiótico en musgos, poco se sabe sobre la participación de azúcares como la glucosa y su interacción con el ABA para modular el desarrollo en estas plantas, el estudio sobre azúcares se ha enfocado a la participación de estos, como osmolitos durante la respuesta a estrés (Manabu *et al.*, 2005). De acuerdo a los escasos datos publicados referentes a morfogénesis en musgos y a la participación de los azúcares en este proceso, Mitra y Allsopp (1959) indican que existe un efecto positivo en el proceso de inducción de yemas en cultivo *in vitro* de algunas especies de musgos (*Barbula gregaria*, *Funaria hygrometrica*, *Leptobryum pyriforme*, *Pohlianus*). También se ha demostrado que en cultivo *in vitro* *P. nutans* y *F. hygrometrica*, incrementan la inducción de yemas y el desarrollo de brotes en medio enriquecido con sacarosa o glucosa (Mitra y Allsopp, 1959; Chopra y Kumra, 1988).

Por otro lado, existe un reporte donde se comparó el efecto de la fructosa, la glucosa y la sacarosa sobre la morfogénesis de dos especies de musgos (*Bryum argenteum* Hedw. (Bryaceae) y *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. (Polytrichaceae)). El desarrollo del musgo *A. undulatum* se ve inhibido en presencia de fructosa 0.05 M, glucosa 0.10 M o sacarosa 0.10 M en comparación con *B. argenteum* donde el efecto inhibitorio es observado en fructosa, glucosa o sacarosa 0.30 M. En este estudio llegaron a la conclusión que la respuesta ante los diferentes azúcares es dependiente de la especie y que conforme incrementa la concentración del azúcar, existe un desarrollo decreciente, siendo 0.3 M la concentración en la cual el crecimiento es totalmente inhibido (Sabovljevic *et al.*, 2005).

En 2005 Thelander M. y colaboradores; monitorearon la formación del caulonema y la ramificación del cloronema en condiciones de baja y alta luz, pero también en presencia de glucosa, auxinas y citocininas en el musgo *Physcomitrella patens* y en la mutante PpHkx1. Los resultados mostraron que la formación del caulonema es inducida por glucosa, alta luz y auxinas, pero inhibida por citocininas también en la mutante, en tanto la ramificación del cloronema es reducido en la presencia de alta luz glucosa y auxinas pero es incrementada en la presencia de citocininas, esto sugiere que existe un balance para regular la formación

de los dos tipos de filamentos y que las condiciones en las cuales aumentan la formación de un filamento generalmente inhibe la formación del otro (Fig. 12).

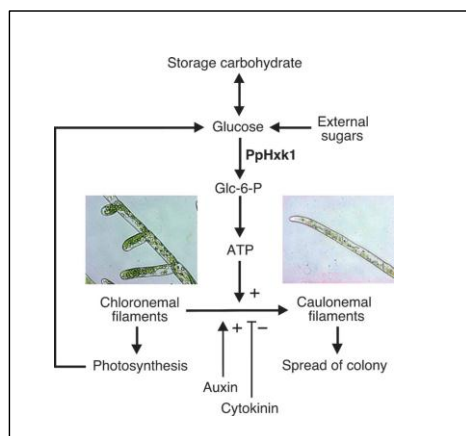


Fig. 12. Modelo para la regulación homeostática de la formación del cloronema y caulonema en *P. patens*. Thelander *et al.*, 2005.

IV.3 La intercomunicación entre Glc y ABA en *Arabidopsis thaliana*

En briofitas no existen estudios enfocados específicamente a la interacción entre glucosa y ABA sobre el desarrollo de estas plantas, sin embargo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, Arenas-Huertero y colaboradores en 2003 descifraron una vía de intercomunicación entre la glucosa y el ABA, dicha vía modula el desarrollo de la planta.

Experimentos realizados con semillas de *Arabidopsis* mostraron, que cuando estas eran sembradas en medios adicionados con bajas concentraciones de glucosa (4 y 5%) se promovía la germinación y el desarrollo de la plántula además de mostrar un color verde en los cotiledones, sin embargo a partir de concentraciones altas (6 y 7% de glucosa) se observaba un fenotipo clorótico y una inhibición del crecimiento. Más aun cuando se adicionaba ABA una concentración de 100 nM, el desarrollo de las plántulas se volvió hipersensible ante la glucosa presentándose fenotipos cloróticos y una inhibición en el desarrollo y enverdecimiento de los cotiledones en las concentraciones donde se promovía el desarrollo (4 y 5% de glucosa). Estos resultados vislumbraron una vía de señalización regulada por glucosa y ABA la cual modula el desarrollo de la planta Fig. 13.

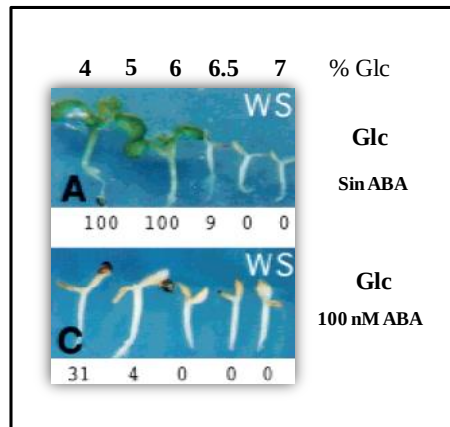


Fig.13. Fenotipos de *Arabidopsis* en medio con glucosa, en presencia y ausencia de ABA. Tomado y modificado de Arenas-Huertero *et al.* 2000.

IV.4 Efecto de diferentes reguladores de crecimiento de las briofitas

Algunos estudios realizados en briofitas para evaluar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento, su función y en qué grupo son localizados se presentan en la Tabla 1.

IV.5 Estudios preliminares sobre el efecto de la glucosa en el musgo *B. billarderi* Schwägr

En un experimento exploratorio realizado por Chamorro-Flores A. y colaboradores (Tesis de Licenciatura, 2010), se evaluó el efecto de la glucosa (Glc) sobre el crecimiento del musgo *B. billarderi* Schwägr, las observaciones preliminares sugieren que *B. billarderi* Schwägr es capaz de percibir a la glucosa, pero la respuesta ante ABA es diferente respecto a las plantas vasculares (Fig. 14).

Clase	Regulador específico	Presente en	Función
Auxinas	IAA	Musgos, hepáticas	Transporte de membrana (esp. de Ca), elongación celular, diferenciación de protonema, formación de rizoides, elongación de la seta, tropismo, dominancia apical.
Citocininas	Zeatina	Musgos	División celular, envejecimiento, formación de yemas y arquegonio, producción de gametoforos.
	Isopentenil adenina	Musgos	
	Factor H?	Musgos	Inhibición del crecimiento en caulonema, formación de yemas.
	Análogos	Musgos hepáticas	Promueve el crecimiento del talo, envejecimiento lento, aumento de Ca en la célula.
Giberelinas	Probablemente la giberelina	?	Desarrollo, promueve el crecimiento, incrementa el desarrollo del anteridio, disminuye la producción de arquegonios
Hormonas de dormancia	Ácido lunularico (LA)	Hepáticas	Regulador de crecimiento, dormancia, tolerancia a la sequía, antiherbivoría
	Ácido abscísico (ABA)	Musgos, antoceros	Tolerancia a la sequía, forma del crecimiento, cierre de estomas en la cápsula, inhibición de las yemas del gametoforo, controla las respuestas a citocininas.
Etileno	Etileno	Musgos hepáticas	Desarrollo, morfología de las hojas, epinastia, elongación celular, cambios en el color, senescencia, aumento en el número de anteridios, transición de cloronema a caulonema, puede controlar el desarrollo del gametoforo.
acetilcolina		Musgos Hepáticas?	Respuesta a luz?, antiherbivoría?, regulación celular?.
criptocromos		Musgos Hepáticas?	Ramificación del protonema, inducción de gametoforos, desarrollo, control de auxinas, respuestas a fotoperíodo.

Tabla. 1. Reguladores de crecimiento que afectan el desarrollo de las briofitas, en negritas se resalta el efecto del ABA en estas plantas. Modificado de Glime M. J., 2006.

IV.6 Estudios realizados en el musgo *B. billarderi* Schwägr

Un antecedente importante que ya se tiene sobre *B. billarderi* Schwägr es el establecimiento del cultivo *in vitro* (Cervantes-Díaz F., 2009), lo que permitió realizar estudios bajo condiciones de déficit hídrico, mostrando alta tolerancia a estrés salino (NaCl 300 mM) y a estrés osmótico (Manitol y sorbitol 600 mM) a nivel de germinación de las esporas (Cervantes-Díaz F., 2009).

Por otra parte los protonemas de *B. billarderi* Schwägr son capaz de recuperarse después haber sido expuestos por periodos prolongados (17 días) en altas concentraciones (400 y 500 mM NaCl) de estrés salino, cuando recibieron un pre-tratamiento con ABA a una concentración de 10µM por 24 hrs. La exposición de los protonemas a condiciones de estrés osmótico evidencio que *B. billarderi* Schwägr puede recuperarse después de estar expuesto por 34 días a altas concentraciones de Manitol y Sorbitol (1000 mM) cuando recibe un pre-tratamiento con ABA 10 µM por 24 hrs lo que sugiere fuertemente que es altamente tolerante a estrés osmótico y que ABA ayuda a que el musgo tolere tales condiciones (Chamorro-Flores A., 2010)

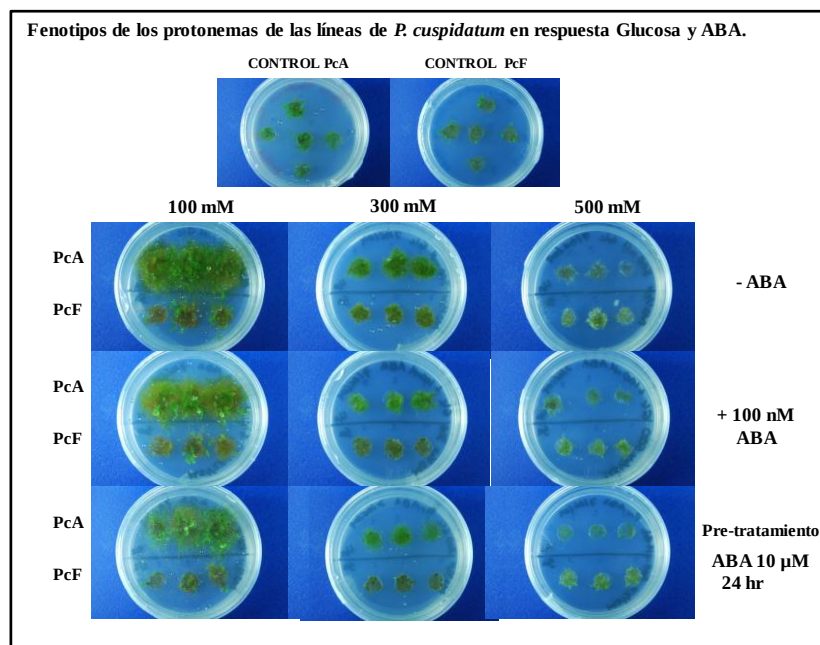


Fig. 14. Fenotipos sobre los estudios preliminares para evaluar el efecto de la Glucosa y el ABA sobre el desarrollo de 2 líneas mono-esporicas del musgo *B. billarderi* Schwägr. Tomado de Chamorro-Flores A. 2010.

IV.7 El uso de la 2 Deoxi-glucosa como herramienta para el estudio de la señalización por azúcares.

La 2-Deoxiglucosa (2 D-G) es un azúcar análogo de la glucosa, el cual actúa como sustrato para transportadores de hexosas y para la hexoquinasa, este análogo no es convertido a fructosa-6-fosfato y por lo tanto no es metabolizado en la glucólisis debido a que carece de un grupo alcohol en el carbono 2. Como resultado la 2 D-G ha sido utilizada en un amplio rango de aplicaciones como un análogo de la glucosa (Caspari *et al*, 1994, Guy y Reinhold, 1974).

Específicamente la 2 D-G ha sido utilizada para investigar la especificidad y la función estructural relacionada a los transportadores de hexosas, también se ha utilizado para monitorear el suministro y la toma de glucosa en diferentes regiones y células del cerebro y otros tejidos de mamíferos o para secuestrar fosfatos e investigar los cambios resultantes en el metabolismo secundario. La 2 D-G también ha sido utilizada para estudiar los mecanismos de percepción de azúcares en mamíferos, levaduras y plantas. Se sabe que la adición de glucosa desencadena largos y amplios cambios en la expresión génica en mamíferos, levaduras y plantas y dichos cambios pueden ser imitados por la adición de 2 D-G.

En plantas por ejemplo, se sabe que la adición de glucosa o la inhibición del exporte de sacarosa en las hojas, dirigen a una disminución del transcrito *rbcS*, el gen que codifica para la subunidad pequeña de la Rubisco, *cab* y otros genes involucrados en la fotosíntesis, tal efecto puede ser imitado por la adición de 2 D-G a bajas concentraciones. También es sabido que la glucosa reprime genes que codifican enzimas para el ciclo del glioxilato durante la germinación de semillas de pepino y que este efecto también puede ser imitado por el uso de bajas concentraciones de 2 D-G (0.2 mM).

La acción de la 2 D-G es interesante por dos razones: la primera es que los cambios en la expresión de un gen después de la adición de un azúcar no metabolizable no provee evidencia confiable para la regulación por azúcar de este gen. Puesto que el metabolismo de los azúcares dirige grandes cambios en el metabolismo y fisiología de una célula o de un organismo y muchos de los cambios pueden ser indirectos. Por lo tanto, el uso de azúcares

no metabolizables provee una herramienta para comprobar si los cambios en la expresión génica son debidos a las señales generadas por los azúcares o a las consecuencias inmediatas de su fosforilación. La segunda razón es que los resultados de los estudios realizados con 2 D-G han sido interpretados como una evidencia de que la hexoquinasa puede actuar con un sensor de azúcares. Esta propuesta ha recibido posterior soporte debido a estudios realizados en células animales, levaduras y en Arabidopsis.

Sin embargo la interpretación de los experimentos que son realizados con 2 D-G es complicada por los posibles efectos secundarios que se desprenden. Por ejemplo el uso la 2 D-G dirige a una acumulación de 2 D-G-6 fosfato lo que resulta en una disminución de fosfato y de muchos intermediarios y nucleótidos fosforilados y eventualmente en la inhibición del metabolismo una forma de contrarrestar este efecto es adicionar fosfato para intentar minimizar las complicaciones generadas por esta causa. Otra desventaja es que la 2 D-G puede actuar como un análogo de otros metabolitos fosforilados. También la 2 D-G puede ser metabolizada a otros componentes en adición a 2 D-G-6-fosfato, por ejemplo en levaduras la 2 D-G es convertida a UDP-2DG y a UDP-2-deoxigalactosa. En hojas de tabaco y raíces de maíz se ha reportado que la 2 D-G es convertida a 2-deoximaltosa, 2,2-deoxi-glucobiosa y a deoxi-sacarosa. Como se puede observar se debe tener cuidado en la interpretación de los datos puesto que los productos metabólicos pueden actuar como una fuente de señales o dirigir cambios inesperados.

V JUSTIFICACIÓN

Los azúcares, en particular la Glucosa (Glc), actúan como moléculas señalizadoras, las cuales modulan el desarrollo en las plantas superiores. Actualmente ya se conocen muchos componentes de las redes de señalización activadas por Glc y ABA en este grupo de plantas. Sin embargo en plantas inferiores; específicamente en las briofitas, son escasos los estudios realizados en este sentido y los resultados se han enfatizado a rol metabólico de la glucosa y a las respuestas a estrés por parte del ABA. También se desconoce si existe una interacción entre la glucosa y el ácido abscísico que pudiera modular el desarrollo de las briofitas, o si solo algunos de los componentes que participan en la vía de señalización en plantas superiores, son los involucrados en la vía de señalización en las plantas inferiores.

Por ello es importante conocer el efecto de los azúcares en los procesos de desarrollo de los briofitos, para poder generar el conocimiento sobre las funciones de los azúcares en este grupo de plantas y sobre los aspectos evolutivos de las respuestas a estas señales para así concluir acerca de su posible participación en la modulación del desarrollo y poder evidenciar posibles aplicaciones biotecnológicas.

VI OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de la Glucosa y el ABA en el fenotipo y en la respuesta fisiológica, en dos etapas de desarrollo (espora y protonema) del musgo *B. billarderi* Schwägr.

VI.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si *B. billarderi* Schwägr es capaz de percibir Glc y el grado de tolerancia.
- Determinar si el ABA participa en la señalización de la Glc en *B. billarderi* Schwägr.
- Identificar y analizar posibles genes homólogos implicados en la señalización de azúcares entre plantas superiores y briofitas.

VII MATERIALES Y MÉTODO

VII. 1 Material Biológico

El tejido protonemal utilizado para los experimentos requeridos en el objetivo 1 y 2 fue originado de la línea mono-esporica PcA obtenida en el grupo de investigación y propagada a partir de 2009. Para los experimentos realizados con esporas, los esporofitos de *B. billarderi* Schwägr fueron recolectados el 22 de Febrero de 2009 y conservados a 4°C hasta su uso.

Debido a problemas de contaminación con la línea mono-esporica PcA, para posteriores experimentos se aislaron 11 nuevas líneas mono-espóricas de las cuales una fue elegida al azar para continuar con los experimentos. A continuación se describe como fueron aisladas estas líneas. En una campana de flujo laminar vertical (VECO), se desinfectó un esporófito con 1 ml de Dicloroisocianurato de sodio (NADCC) al 0.1% por 30 minutos en agitación constante (Cervantes, 2009). Posterior a la desinfección la cápsula fue enjuagada de 3 a 5 veces con agua destilada estéril, al término del enjuague se adiciono 1ml de agua y con la ayuda de unas pinzas metálicas se liberaron las esporas contenidas en la cápsula. Con la suspensión obtenida se realizó una dilución a una razón de 1:25 en un volumen total de 2.5 ml de agua. Se tomaron alícuotas de 1µl de la dilución de esporas con la ayuda de una micro-pipeta (0.5µl -10µl), las cuales fueron colocadas en una caja de Petri estéril donde se adiciono un volumen de 30µl de agua para poder disgregar las esporas contenidas en el micro-litro de la suspensión. Después se introdujo un estereoscopio previamente desinfectado a la campana de flujo laminar para observar y tomar solamente una espora de la suspensión contenida en la caja de Petri, la espora tomada fue sembrada en medio de cultivo y crecida en el cuarto crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y una temperatura de 22 °C ± 2.

VII. 2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de los tejidos

El medio de cultivo utilizado consiste de una mezcla de sales Murashige y Skoog (1962) al 0.5X (MS 0.5X), 2.2g L⁻¹, adicionado con vitaminas (mioinositol, tiamina, ácido nicotínico y piridoxina), MES 0.5 g L⁻¹, agar 8g L⁻¹ y pH 5.7 (ajustado con KOH 1 M), esterilizado en autoclave por 20 minutos a 15 libras de presión y 121°C. Las cajas con el medio para los diferentes tratamientos fueron selladas con micropore y colocadas en un cuarto de crecimiento a un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y una temperatura de 22 °C ± 2. Toda la manipulación de los tejidos tanto para propagación como para los distintos tratamientos, se llevó a cabo bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar vertical (VECO).

VII.3 Propagación de los protonemas de *B. billarderi* Schwägr

Los protonemas *B. billarderi* Schwägr desarrollados a partir de cultivo mono-espórico fueron propagados por medio de la homogenización del protonema, con ayuda de un Homogenizador POWERGEN 125,115V. Con este instrumento es posible obtener una suspensión de tejido de tamaños semejantes y debido a la capacidad de los musgos para regenerarse, representa una gran ventaja para su propagación. De esta forma tejidos de *B. billarderi* Schwägr se colocaron en un tubo falcón, al cual se adicionaron 4 ml de una solución estéril de Agar al 0.01% con el objetivo de tener una mezcla uniforme después de la molienda, posteriormente el tejido fue homogenizado por 30 segundos tomando un descanso de 5 segundos por cada 5 segundos de homogenización. Un volumen de 4 µl de la solución obtenida fue distribuida en micro-membranas de celofán (0.6 cm de diámetro) en medio sólido MS 0.5X. Las cajas fueron selladas y llevadas a una cámara de crecimiento por el tiempo requerido (10 días).

VII.4 Transferencia a medios adicionados con Glucosa y Sorbitol

En campana de flujo laminar protonemas con 10 días de desarrollo crecidos sobre MS 0.5X sólido fueron transferidos (con ayuda de pinzas metálicas estériles), a medios MS 0.5X adicionados con diferentes concentraciones de Glucosa y con su respectivo control iso-osmotico en las mismas concentraciones (100, 300, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mM). El tratamiento se esquematiza a mayor detalle en la fig. 15. Una vez que los protonemas

fueron transferidos a los diferentes medios, las cajas fueron selladas con micro-pore y se colocaron en el cuarto de cultivo bajo el régimen descrito anteriormente.

VII.5 Transferencia a medios con Glucosa y Sorbitol más ABA

Con el objetivo de evaluar el efecto del ABA sobre el desarrollo de los protonemas de *B. billarderi* Schwägr y ver si existía una posible interacción con la Glucosa, la cual pudiera modular el desarrollo o tener un efecto sobre el fenotipo del musgo objeto de estudio, protonemas con 10 días de edad fueron transferidos bajo condiciones asépticas a medios adicionados con diferentes concentraciones de glucosa más concentraciones nanomolares de ABA (100, 200 y 500 mM) manejando también al control iso-osmótico bajo las mismas concentraciones y condiciones. El experimento fue monitoreado por 15 días por medio de un registro fotográfico y para evaluar el estado fisiológico de los protonemas se realizaron mediciones de la eficiencia fotosintética. Los tratamientos se muestran con mayor detalle en la figura 16.

Control	100 mM	300 mM	500 mM	600 mM	700 mM	800 mM	900 mM	1000 mM	Glc
Control iso-osmótico	100 mM	300 mM	500 mM	600 mM	700 mM	800 mM	900 mM	1000 mM	Stl

Fig. 15 .Tratamientos a los que fueron expuestos los protonemas de *B. billarderi* Schwägr para evaluar el efecto de la Glucosa (Glc) y el control iso-osmótico Sorbitol (Stl).

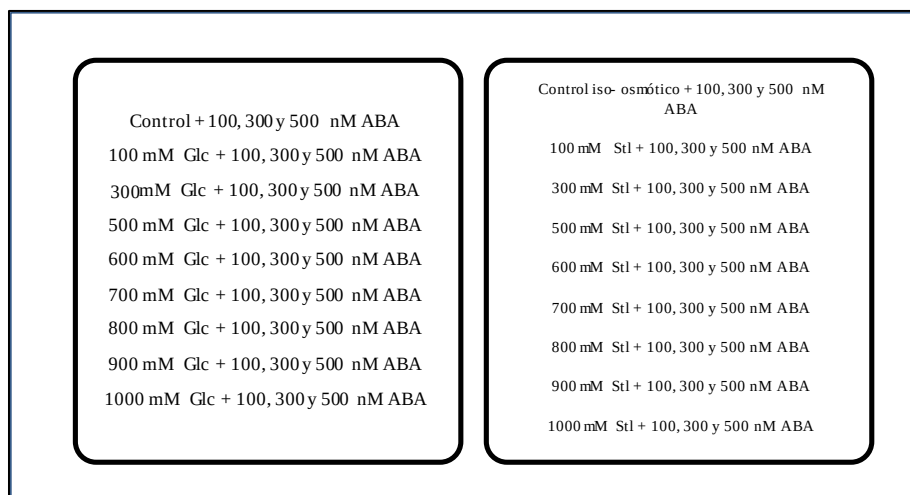


Fig. 16. Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto del ABA a diferentes concentraciones sobre el desarrollo de los protonemas de *B. billarderi* Schwägr.

VII.6 Pruebas de germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr bajo condiciones de cultivo *in vitro*

Con el objetivo de conocer el papel de la Glucosa y la Glucosa más ABA, sobre la germinación de las esporas del musgo *B. billarderi* Schwägr se realizaron cinéticas de germinación bajo en medios adicionados con diferentes concentraciones de Glc y de Stl (Control, 100, 300 y 500 mM). Para el caso de Glc y Stl más ABA (Control, 100, 300 500 y 900 mM, y cada concentración adicionada con 100 nM de ABA) Fig. 16. Para realizar este experimento, esporofitos de *B. billarderi* Schwägr fueron desinfectados como a continuación se describe: un esporofito fue colocado en un tubo eppendorf, donde fue desinfectado con una solución de NaDCC al 0.1% por 30 minutos en agitación constante, posteriormente el esporofito fue enjuagado con agua destilada de 3 a 5 veces, al finalizar los enjuagues se agregó 1 ml de agua destilada estéril y se abrió la cápsula por medio de unas pinzas, con el propósito de liberar las esporas. De la solución con esporas se tomaron 200 μ l y se llevaron a 9.8 ml de agua para tener una dilución 1:50. Posteriormente las esporas fueron sembradas en cajas de petri cuadrículadas en 16 sectores, esto con el objetivo de facilitar la cuenta de las esporas. En cada sector se colocó 1 μ l de la suspensión de esporas (el cual contenía aproximadamente de 4 a 15 esporas) las cajas fueron selladas y colocadas en el cuarto de crecimiento a un fotoperiodo de 16/8 hrs luz/oscuridad a 22°C $\pm$

2°C. Las cinéticas de germinación de las esporas fueron monitoreadas por 8 días. Para realizar el conteo de las esporas se hizo uso de un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ1500) a una resolución de 115X. La germinación de las esporas fue considerada cuando el protonema observado alcanzaba la mitad del tamaño de la espora, los datos obtenidos fueron registrados en una hoja de Excel para su posterior análisis.

VII.7 Pruebas de germinación bajo en medios adicionados con 2 Deoxi-glucosa

Con el objetivo de evaluar el efecto de la glucosa como molécula señal durante la germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr una análogo de esta molécula (2 Deoxi-Glucosa) fue utilizado para imitar el efecto señalizador de la glucosa, y debido a que esta molécula emite una gran señal a bajas concentraciones fue utilizada en las siguientes concentraciones: Control, 0.5, 0.8 y 2 mM. La estrategia utilizada para realizar este experimento, fue la misma que se abordó para evaluar el efecto de la Glucosa y su control iso-osmótico en la germinación de las esporas, la diferencia radica en el agente utilizado y las concentraciones evaluadas Fig. 17.

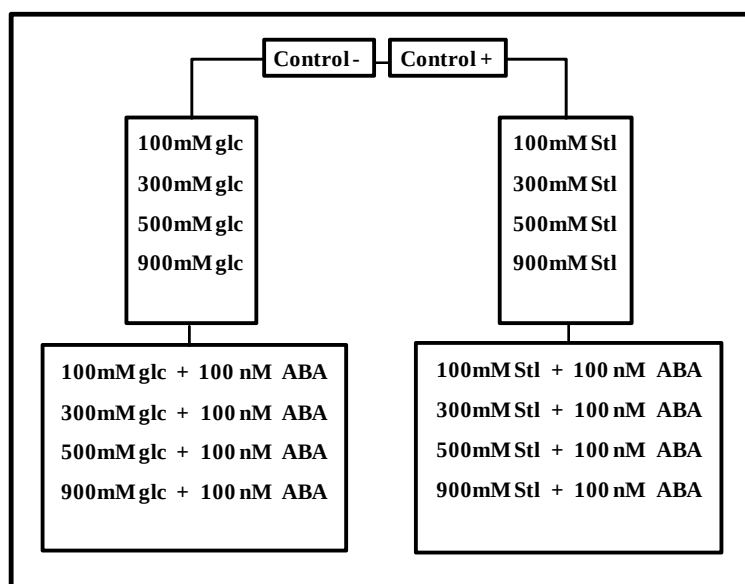


Fig. 16. Esquema que muestra los diferentes tratamientos a los que las esporas de *B. billarderi* Schwägr estuvieron expuestas por 8 días.

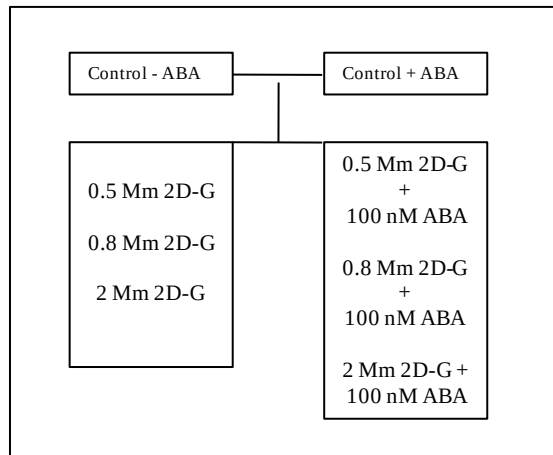


Fig. 17. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de la 2 D-G en la germinación de las esporas del musgo *B. billarderi* Schwägr.

VII. 8 Evaluación fenotípica y eficiencia fotosintética de los protonemas de *B. billarderi* Schwägr

Una vez que los protonemas fueron colocados en los medios adicionados con Glc y Stl, estos estuvieron expuestos por 15 días bajo los diferentes tratamientos, durante este tiempo se realizó un seguimiento fotográfico para evaluar los cambios fenotípicos generados por los tratamientos cada 5 días, haciendo uso de un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ1500) y una cámara digital Nikon D80 acoplada al microscopio (Fig. 18 b y c). Con la finalidad de conocer el estatus fotosintético de los protonemas se realizaron mediciones de la eficiencia fotosintética por medio de un fluorómetro (FluorPen FP 100) Fig. 18 a. Finalmente el análisis fenotípico fue realizado mediante un análisis de imagen con ayuda del programa ImagenJ.



Fig.18. Equipo para realizar el análisis fenotípico y fisiológico a los protonemas de *B. billarderi* Schwägr. a) Fluorómetro, b) Microscopio estereoscópico, c) Cámara digital Nikon D80.

VII. 9 Evaluación del efecto de la 2 Deoxi-Glucosa sobre el fenotipo y la eficiencia fotosintética en protonemas de *B. billarderi* Schwägr

Con el objetivo de conocer si la glucosa actúa como molécula señalizadora un análogo no metabolizable fue utilizado. De esta forma, se evaluó el efecto de la 2 D-G sobre el fenotipo de los protonemas de *B. billarderi* Schwägr, para tal fin protonemas con 10 días de edad fueron transferidos a medios adicionados con diferentes concentraciones de 2 D-G (Control, 0.5 mM, 0.8 mM y 2 mM). Las cajas fueron colocadas a un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Durante el experimento se realizó un registro fotográfico y mediciones de la eficiencia fotosintética de la misma forma en que fue medida en los tratamientos con Glc y Stl.

VII. 10 Identificación y análisis de posibles genes homólogos implicados en la señalización por azúcares entre plantas superiores y briofitas.

Con el objetivo de buscar secuencias homologas de genes que forman parte de la vía de señalización desencadenada por Glucosa, misma que interactúa con el ABA o secuencias de genes que se activen o repriman por estas señales, se buscaron los números de acceso de los genes reportados para la planta modelo *Arabidopsis*, posteriormente se realizó un BLASTN para cada gen y solo las secuencias con el máximo score en el musgo modelo *P. patens* fueron seleccionadas (Los Blastn fueron realizados en la página de NCBI). Una vez elegidas las secuencias se realizó un alineamiento con la ayuda del Programa Bioedit Sequence Alignment Editor (Con la versión disponible en la red). Posterior al alineamiento, se buscaron regiones conservadas entre las secuencias de los genes para diseñar los oligonucleótidos. Las secuencias elegidas para el diseño de los oligonucleótidos fueron analizadas por medio del programa OligoAnalyzer 3.1 disponible en la red (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Finalmente el juego de oligonucleótidos con las características más convenientes a nuestros objetivos fue elegido y analizado.

Los genes candidatos se enlistan a continuación:

- Gen sensor de Glucosa: **Hxk1, GPA1**
- Gen de biosíntesis de ABA: **NCED3**.

- Gen señalizador de ABA: **ABI4**
- Receptor de ABA: **PYR 1**
- Gen transportador: **STP 1**
- Regulador maestro: **SnRKs**

Los alineamientos para cada uno de los genes se pueden consultar en el anexo 1. Las características que se tomaron en cuenta para realizar el análisis de los oligonucleótidos a utilizar fueron:

- 1.- TMs
- 2.- Formación de estructuras secundarias
- 3.- Número de degeneraciones
- 4.- Tamaño del fragmento a amplificar.

VII.11 Extracción de RNA de los protonemas expuestos a los diferentes tratamientos en el musgo *B. billarderi* Schwägr

La extracción del RNA de los protonemas fue realizada como se describe a continuación.

Extracción de RNA por el método de trizol

1. El tejido fue molido con nitrógeno líquido en un mortero estéril, almacenado brevemente en nitrógeno líquido y casi de inmediato fue procesado (se evitó en la medida de lo posible que es tejido se descongelara)
2. Posteriormente se agregó 1 ml de Trizol
3. Se homogenizo con ayuda de un vortex
4. Después de centrifugo a 12000 x g por 10 minutos a 2-8°C
5. Se incubo 5 minutos a 12-30°C
6. Posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo
7. La solución fue agitada vigorosamente por 15 segundos
8. Después se dejó reposar de 2 a 3 minutos a 15-30°C
9. Se centrifugo una vez más a 12000 x g por 15 minutos a 2-8°C
10. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo (se evitó llevar el contenido de la interface)
11. El RNA fue precipitado con 250 µl de isopropanol y 250 µl de una solución de altas sales (NaCl 1.2 M y citrato de sodio 0.8 M).
12. Se mezcló suavemente
13. Después se incubo por 10 minutos a 15-30°C
14. Se centrifugo a 12000 x g por 10 minutos a 2-8°C
15. El sobrenadante fue descartado

16. Se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70 %
17. Después se vortexeo por aproximadamente 2 segundos
18. Fue centrifugado por ultima vez a 7500 x g por 5 minutos a 2-8°C
19. El sobrenadante fue descartado
20. La pastilla se seco a temperatura ambiente por 5-10 minutos
21. Después se re suspendió en agua inyectable estéril.
22. Un microlitro de la muestra fue tomada más 99 microlitros de agua para tomar lecturas en el espectrofotómetro.
23. Los datos fueron registrados en una bitácora y las muestras almacenadas a -70 °C.
24. Las muestras fueron cargadas en gel de agarosa y corridas a 60 volts por 60 minutos.
25. Posteriormente fueron tomadas las fotos y homogenizadas las concentraciones a 1µg de RNA.
26. Las fotografías se muestran en la fig.50

Las extracciones de RNA fueron realizadas a tiempos cortos y tiempos largos. Para los tiempos cortos se recolectaron muestras a los 15, 30, 45 y 60 minutos, para el caso de los tiempos largos, también se realizaron extracciones de las muestras a los 15 días de exposición a los diferentes tratamientos.

VII.12 Síntesis de cDNAs a partir de los RNAs obtenidos en los diferentes tratamientos.

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA a partir de los RNA obtenidos bajo las condiciones evaluadas, fue utilizado el Kit RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1632. Para tal efecto se utilizaron 5 microgramos de RNA para cada una de las muestras. A continuación se describe el procedimiento.

Para remover el DNA de las muestras de RNA se adiciono a un tubo nuevo estéril:

RNA	5 µg (el volumen dependió de la concentración de RNA de las muestras)
10X búfer de reacción con MgCl ₂	1µl
DNasa libre de RNAsa	1µl
Agua libre de nucleasas	a un volumen final de 10µ

Las muestras fueron incubadas a 37°C por 15 minutos y posteriormente se adiciono 1 µl de EDTA y se incubo nuevamente a 75 °C por 10 minutos. Una vez que se removió el DNA de todas las muestras se procedió a sintetizar la primera cadena de cDNA cada una de las muestras, para tal efecto se procedió de la siguiente manera.

En un tubo nuevo y estéril se colocó:

RNA	RNA total	5 µg
Primer	Oligo (dT)18 primer	1µl
Agua libre de nucleasas		a 12 µl
	Volumen total	12 µl

Posteriormente las muestras fueron incubadas a 65°C por 5 minutos después fueron centrifugadas y colocadas en hielo, para posteriormente adicionar lo que a continuación se muestra.

Búfer de reacción 5X	4 µl
Inhibidor de RNAsa Ribolock (20 u/ µl)	1 µl
Mezcla de dNTP 10 mM	2 µl
Transcriptasa reversa RevertAid H minus M-MuLV (200u/ µl)	1
Volumen total	20 µl

Las muestras fueron perfectamente mezcladas y centrifugadas, posteriormente se colocaron a 42 °C por 60 minutos y la reacción fue terminada a 70 °C por 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron almacenadas en Revco hasta su uso.

VII.13 Extracción de DNA de protonemas de *B. billarderi* Schwägr y *P. patens*

Para las extracciones de DNA de los protonemas de *B. billarderi* Schwägr y *P. patens*, se utilizó el protocolo CTAB y a continuación se describe el procedimiento.

Protonemas, ya sea de *B. billarderi* Schwägr o *P. patens*, fueron congelados con nitrógeno líquido y posteriormente pulverizados con ayuda de pistilo de teflón dentro de un tubo eppendorf, a dicho tubo se adicionaron 300 µl de buffer de lisis, CTAB 2x (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Las muestras fueron mezcladas por inmersión y posteriormente incubadas a 65°C por 30 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 5,000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y transportado a un tubo nuevo a cual se adicionaron 300 µl (1 volumen) de una solución de Cloroformo: Alcohol Isoamílico Frío (24:1). Posteriormente se mezcló por inversión durante 5 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 11, 000 rpm a temperatura ambiente. En un nuevo tubo se recuperó la fase acuosa y se agregó 0.7 volumen de isopropanol y se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 7,500 rpm durante 15 min a temperatura ambiente y el sobrenadante fue decantado, después la pastilla fue re suspendida en 50 µl de TE (TRIS-EDTA), 1 µl de RNAsa (10 µg/µl) fue adicionada a cada una de las muestras y se procedió a incubar por una hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron cuantificadas por espectrometría y su calidad fue verificada en un gel de agarosa al 0.8 %.

VIII RESULTADOS

VIII.1 Fenotipos de los protonemas de la clona PcA de *B. billarderi* Schwägr expuestos en medios con Glucosa y Sorbitol.

Con el objetivo de evaluar si el musgo *B. billarderi* Schwägr era capaz de percibir Glucosa (Glc) y el grado de tolerancia a esta señal, protonemas de este musgo con 10 días de edad fueron expuestos a diferentes concentraciones de Glucosa en medio MS 0.5X , para tener un control iso-osmotico y descartar que el fenotipo observado pudiera ser generado por el efecto osmótico que la glucosa pudiera ejercer sobre los protonemas del musgo, se utilizó el sorbitol como agente iso-osmótico en las mismas concentraciones que los medios con Glc.

Así los protonemas estuvieron expuestos por 15 días a estas agentes y durante la exposición se tomaron fotografías para evaluar los cambios fenotípicos en los protonemas. Al final del experimento se observó que en los protonemas expuestos a 100 mM de Glc hubo una inhibición en la expansión de la colonia y una mayor densidad de los tejidos y este fenotipo no se observa en 100 mM Stl, lo que no indica un posible efecto de la Glc sobre el desarrollo de los protonemas. En concentraciones más altas no se observaron diferencias destacables entre los protonemas expuestos a las diferentes concentraciones de glucosa y los protonemas expuestos al agente osmótico Sorbitol. Cabe mencionar que a partir de 300 mM el crecimiento fue arrestado tanto para Glc como para Stl. También es importante destacar que los protonemas expuestos a glucosa mostraron una pigmentación más intensa que los tejidos que estuvieron en Stl. Respecto a las concentraciones desde 500 hasta 1000 mM, no se observaron diferencias significativas en los fenotipos de los protonemas expuestos a Glc y Stl. Fig. 19.

VIII.2 Eficiencia fotosintética de los protonemas expuestos a Glucosa y Sorbitol

Al final del experimento se realizó la medición de la eficiencia fotosintética de los protonemas de la línea **PcA** expuestos a las diferentes concentraciones de Glc y del control iso-osmótico Stl. Los resultados mostraron que los valores obtenidos para los protonemas expuestos a Glc y Stl son muy semejantes en todas las concentraciones fig. 20 y 21, lo que sugiere que la glucosa está ejerciendo un efecto osmótico más que un efecto señalizador, bajo estas condiciones evaluadas; es decir, en el estado protonemal no se observa un efecto

señalizador de la Glc sobre los protonemas de este musgo debido a que el control iso-osmótico presenta el mismo patrón fenotípico y fisiológico que los protonemas expuestos a condiciones de Glc.

VIII.3 Fenotipos de los protonemas de *B. billarderi* Schwägr expuestos en medios con Glucosa más ABA.

Para evaluar si el ABA participa en la señalización de Glc en *B. billarderi* Schwägr, protonemas de este musgo fueron expuestos en medio MS 0.5X adicionado con diferentes concentraciones de Glc (100, 300, 500 y 900 mM) y diferentes concentraciones de ABA (100, 300 y 500 nM). Los fenotipos observados después de estar expuestos por 15 días son muy semejantes a los observados en las condiciones que solo tienen Glc y Stl. Teniendo que 100 mM es la concentración en donde existe una mayor densidad de tejido acompañado de un verde más intenso en comparación con los protonemas expuestos a sorbitol. También se observa que en los protonemas expuestos a 300 mM de Glc, se observa una mayor densidad de tejidos en comparación con los tejidos expuestos a Stl. De igual forma es a partir de esta concentración donde comienza a observarse una inhibición del desarrollo de los protonemas. Cabe mencionar que no se observaron diferencias entre los protonemas expuestos a las diferentes concentraciones de ABA. Lo que sugiere que el ABA no tiene efecto sobre este estado de desarrollo del musgo *B. billarderi* Schwägr. Por otra parte, en 500 y 900 mM de Glc y Stl, la mayor parte de los tejidos se observaron cloróticos Fig. 22.

VIII.4 Eficiencia fotosintética de los protonemas expuestos a medios con Glc más ABA

Los resultados obtenidos de las mediciones hechas a los protonemas de *B. billarderi* Schwägr para evaluar el estatus fotosintético después de estar expuestos por 15 días en medios enriquecidos con Glc mas ABA y Stl más ABA, mostraron que la adición de diferentes concentraciones de ABA no tuvo efecto sobre la eficiencia fotosintética obtenida, ya que los valores son muy semejantes en las concentraciones de ABA evaluadas. Al igual que el bloque de experimento en condiciones donde solo se utilizó glucosa en el medio, la eficiencia fotosintética es muy semejante entre el control, 100 y 300 mM Glc y lo mismo ocurre en la condición del control iso-osmotico Stl. Dado que los valores obtenidos son semejantes entre los protonemas expuestos a Glc y a Stl en este bloque de

experimentos, podemos corroborar que hasta el momento observamos un efecto osmótico por parte de la Glc y que el ABA no tiene efecto para sensibilizar a los protonemas ante la Glc. Fig. 23 y 24.

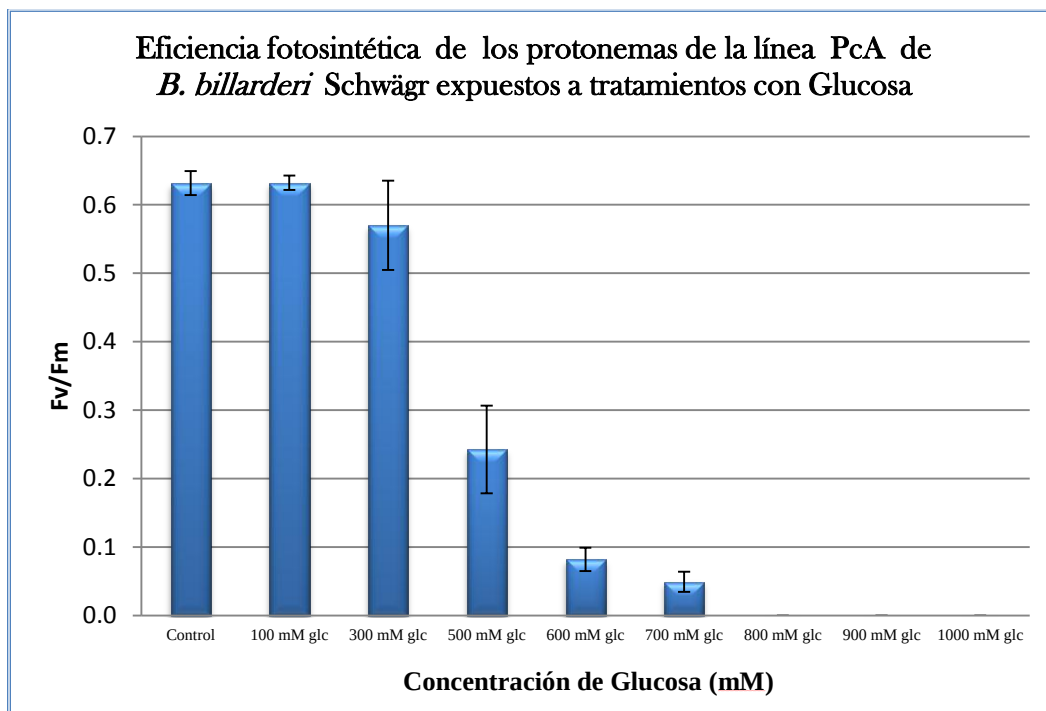


Fig.20. Representación gráfica de la eficiencia fotosintética de los protonemas de la línea mono-esporica PcA de *B. billarderi* Schwägr expuestos a medios con diferentes concentraciones de Glucosa. La gráfica representa una n=4.

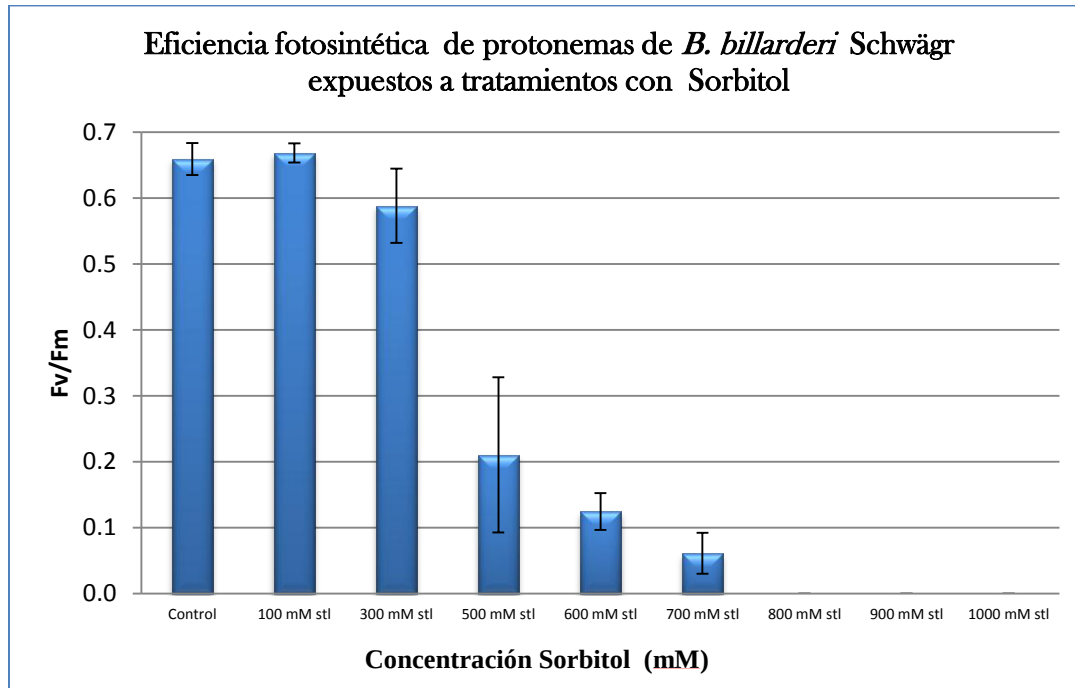


Fig.21. Eficiencia fotosintética de los protonemas de la línea mono-esporica PcA de *B. billarderi* Schwägr expuestos a medios con diferentes concentraciones de Sorbitol. La gráfica representa una n=4.

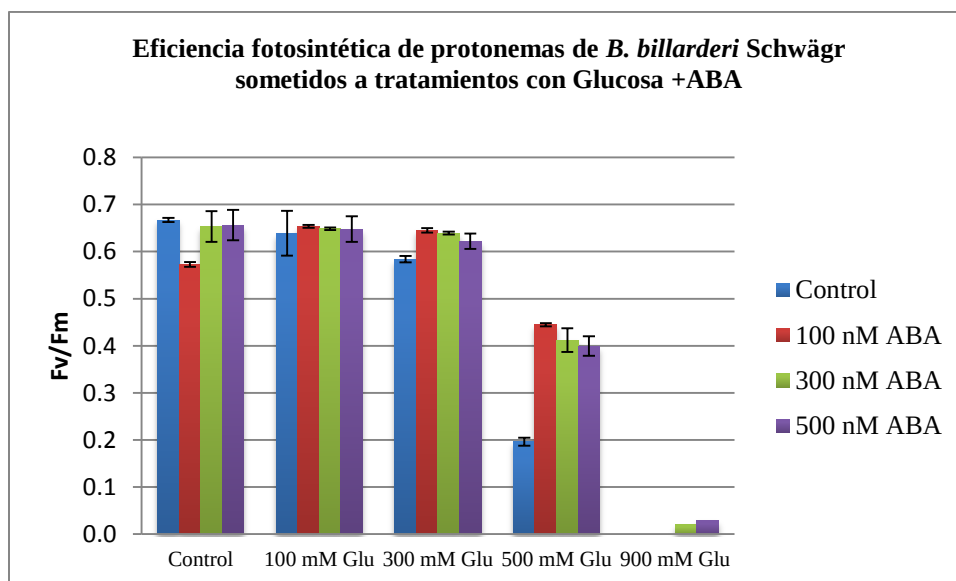


Fig.23. Representación gráfica de la eficiencia fotosintética de los protonemas de la línea mono-esporica PcA de *B. billarderi* Schwägr expuestos en medios con diferentes concentraciones de Glucosa + ABA. La gráfica representa una n=6.

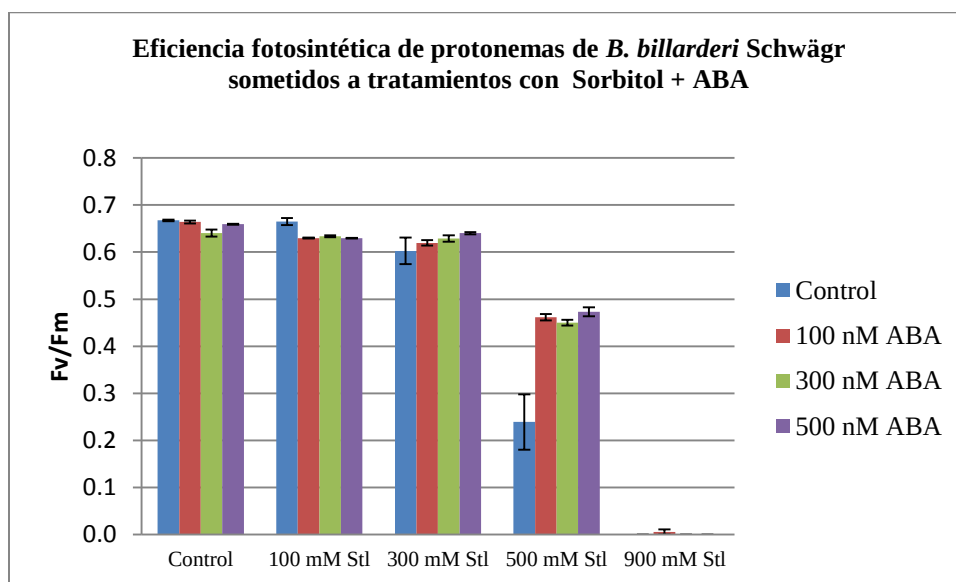


Fig.24. Eficiencia fotosintética de los protonemas de la línea mono-esporica PcA de *B. billarderi* Schwägr expuestos a medios con diferentes concentraciones de Sorbitol + ABA. La gráfica representa una n=6.

VIII.5 Cinética de germinación de Arabidopsis en medio con sacarosa y ABA

El objetivo de realizar cinéticas de germinación con semillas de Arabidopsis fue para descartar la posibilidad de que el ABA utilizado en el experimento anterior no estuviera funcionando, dado que no se observaron diferencias entre las concentraciones utilizadas. El experimento consistió en germinar semillas de Arabidopsis en medio con sacarosa y 100 nM de ABA. Se sabe que en Arabidopsis esta condición retrasa la germinación, por lo que nos serviría como un control de la calidad del ABA que utilizamos para el experimento con los protonemas de la línea PcA, de esta forma se podía descartar la posibilidad que el ABA pudiera estar foto-oxidado o no viable, también se utilizó un ABA preparado el día del experimento y una ABA almacenado por más de dos años pero que no había sido expuesto a la luz y se encontraba en condiciones de refrigeración. De esta forma semillas de Arabidopsis fueron desinfectas y sembradas en cajas de petri conteniendo Medio MS0.5X con 2% de sacarosa y 100 nM de ABA (80 semillas por caja y una caja por cada solución de ABA más el control). La cinética de germinación evidencio que el ABA que fue utilizado para el experimento con el que se cubre el objetivo 2, se encuentra en condiciones óptimas para realizar experimentos con él, debido a que las semillas que fueron colocadas para la germinación mostraron cotiledones cortos y blancos como los reportados en la literatura al germinar semillas en medio con azúcar y ABA. Por otro lado el ABA del año 2000 parece no ser viable debido a que las semillas fueron capaces de germinar en las mismas condiciones que las semillas que no lo hicieron. Las semillas que se sembraron en el medio que tenía ABA nuevo mostraron el mismo comportamiento que las semillas que germinaron con el ABA que parecía foto-oxidado.

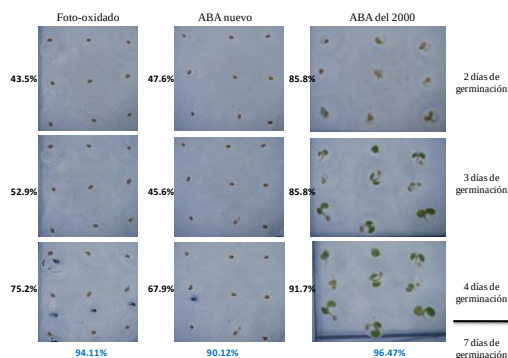


Fig. 25. Fotografías que muestran los fenotipos y el porcentaje de germinación de semillas de Arabidopsis en medio MS 0.5X adicionado con 2% de sacarosa y 100 nM de ABA de diferentes procedencias.

VIII.6 Cinéticas de germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr en medios con Glucosa y Sorbitol en presencia y ausencia de ABA.

Con el objetivo de conocer el efecto de la glucosa y el ABA sobre la germinación de las esporas del musgo *B. billarderi* Schwägr y evaluar si existe una posible interacción entre estas moléculas, capsulas del musgo fueron desinfectadas y las esporas obtenidas fueron sembradas en medio MS 0.5X adicionado con diferentes concentraciones de Glucosa (Glc) y Sorbitol (Stl) como control iso-osmótico en presencia o ausencia de ABA 100 nM, las cinéticas de germinación fueron monitoreadas por 8 días y los resultados obtenidos fueron obtenidos de los experimentos realizados con 3 diferentes esporofitos.

Los resultados de las cinéticas muestran que no existen diferencias entre la germinación en los controles y 100 mM de Glc, puesto que bajo estas condiciones se logra un porcentaje de germinación del 98% en ambos casos; sin embargo, bajo condiciones de 300 mM de Glc la germinación se observa retrasada alcanzando un 88% de germinación. Es notable resaltar que en la concentración de Glc 500 mM la germinación es inhibida completamente Fig. 26. Por otra parte bajo condiciones de Stl el cual fue utilizado como control iso-osmótico, se puede observar que tanto en los controles como en las concentraciones de 100 y 300 mM de Stl la germinación alcanza un 98, 99 y 97 % respectivamente, y en la concentración de 500 mM se logra un 53 % de germinación caso contrario a lo que ocurre con la Glc donde no hay germinación Fig. 27.

Los resultados obtenidos en la cinética de germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr bajo condiciones de Glc más 100 nM de ABA mostraron que la adición de ABA en el medio no tuvo efecto sobre la germinación, puesto que los controles y 100 mM de Glc mostraron prácticamente el mismo comportamiento que el bloque de esporas en los medios que solo contenían Glc en el medio. Bajo condiciones de Glc más ABA los porcentajes de germinación fueron 98% para los controles y 99% para 100 mM Glc, mientras que 300 mM alcanzo un 91% de germinación y al igual que en condiciones de solo Glc, en 500 mM Glc más ABA no se evidencio germinación de las esporas Fig. 28.

Por otra parte, la germinación de las esporas en el control iso-osmótico fue muy parecida al bloque sin ABA, así bajo condiciones de Stl más 100 nM de ABA, los controles alcanzaron

un 98% de germinación, 100 y 300 mM de Stl más ABA un 97%, y en la concentración de 500 mM el 40 % de la germinación. Fig. 29.

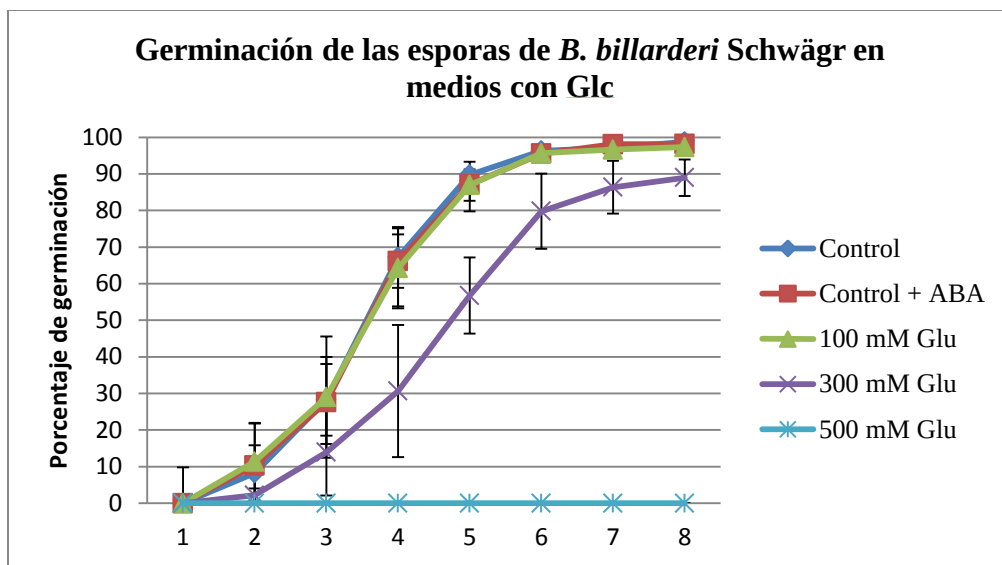


Fig. 26. Grafica que ilustra la cinética de germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr en medio MS 0.5X adicionado con glucosa.

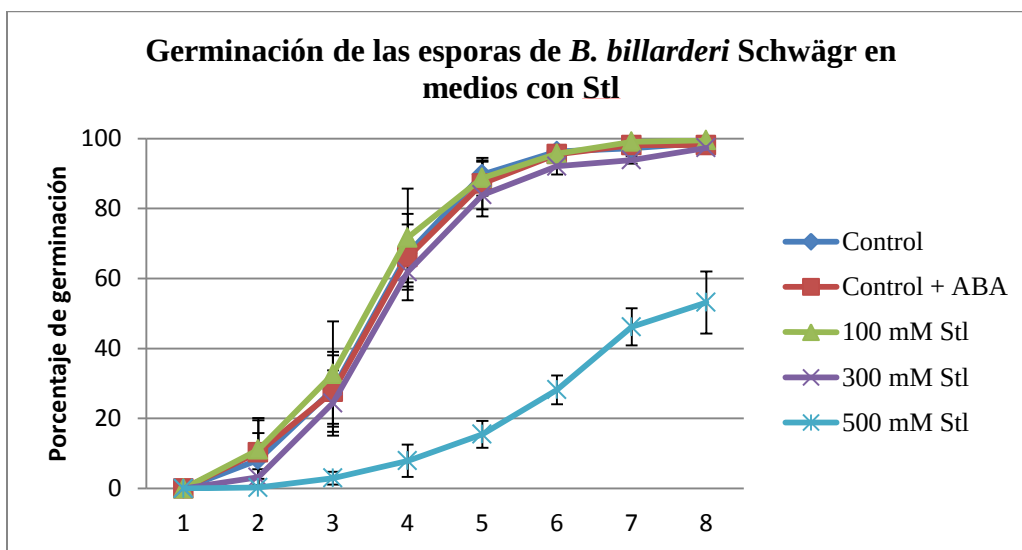


Fig. 27. Cinética de la germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr en medio MS 0.5X adicionado con el control iso-osmótico sorbitol.

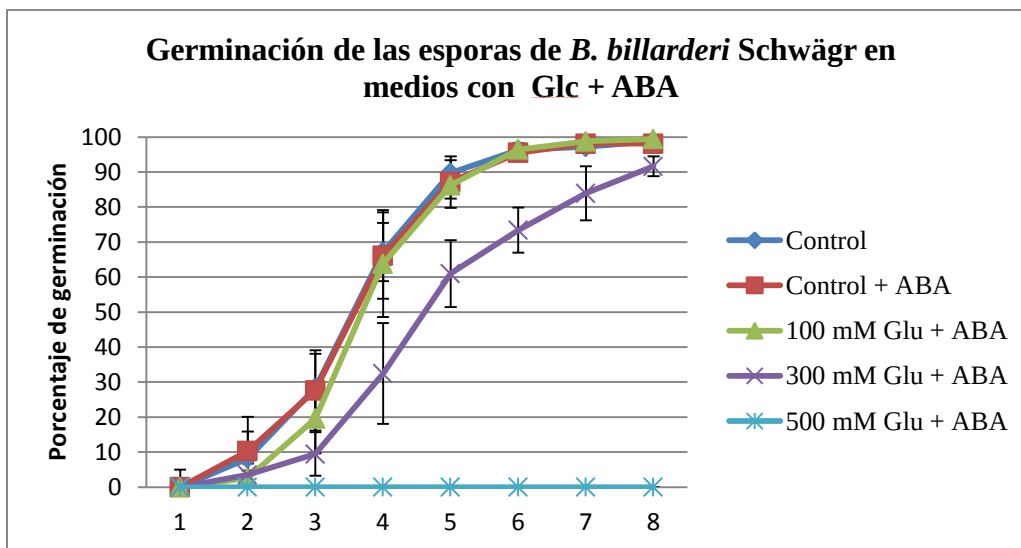


Fig. 28. Cinética de la germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr en medio MS 0.5X en condiciones de Glc más 100 nM de ABA.

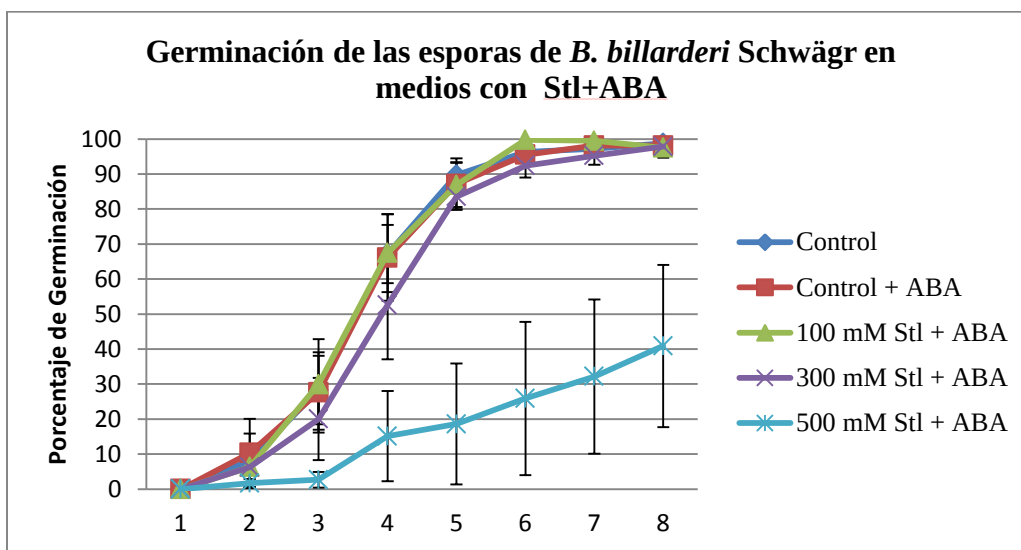


Fig. 29. Cinética de la germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr en medio MS 0.5X en presencia del control iso-osmótico más 100 nM de ABA en el medio.

VIII.7 Fenotipos post-germinativos de las esporas del musgo *B. billarderi* Schwägr bajo condiciones de Glucosa y Sorbitol en presencia de ABA

Los fenotipos post-germinativos de las esporas de *B. billarderi* Schwägr en medios con glucosa más 100 nM de ABA, mostraron un efecto conjunto de la Glc y el ABA sobre el

desarrollo post-germinativo debido a que no se observó la formación de gametóforos en esta condición. Mientras que en la condición que contenía únicamente glucosa, si hubo formación y desarrollo de gametóforos. También es notable destacar que los protonemas que están en las condiciones de Glucosa y Glucosa más ABA son más densos y de menor expansión radial en comparación con los protonemas que se encuentran en el control y el control iso-osmótico, es notable destacar que en el control iso-osmótico no hubo formación de gametóforos. Fig. 30.

VIII.8 Cinéticas de germinación de esporas en medio con diferentes concentraciones de ABA.

Para conocer la concentración a la cual el ABA inhibe la germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr, esporas de este musgo fueron sembradas en medio PpNH_4 bajo diferentes concentraciones de ABA, la cinética de germinación fue cuantificada por 8 días y los resultados mostraron un patrón muy semejante de germinación entre el control y todas las concentraciones de ABA evaluadas como puede observarse en la Fig. 33. Tales resultados muestran que las concentraciones evaluadas no tienen ningún efecto sobre la germinación de las esporas, esto es muy interesante debido a que en las semillas de *Arabidopsis* una planta superior la germinación comienza a inhibirse a partir de ABA 5 μM , figura 31, 32, 33 y 34.

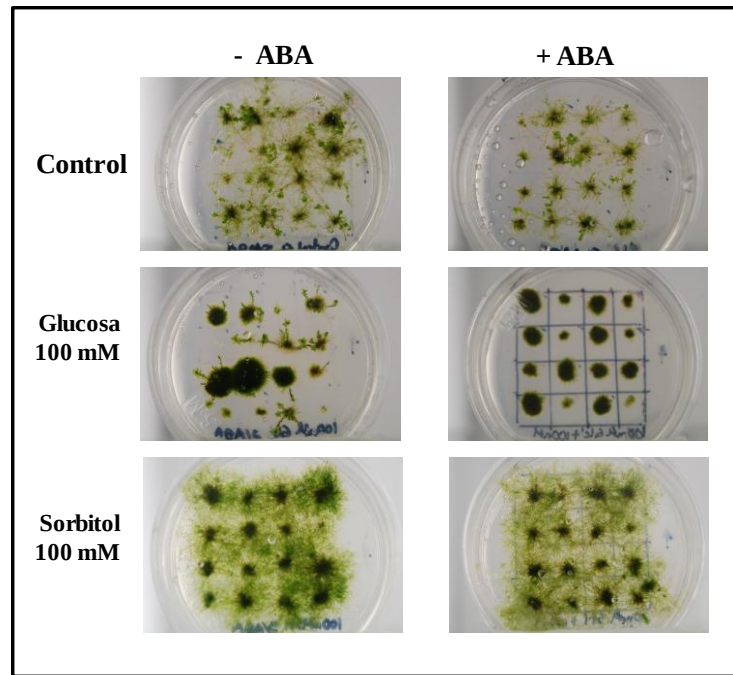


Fig. 30. Fenotipos post-germinativos de las esporas de *B. billarderi* Schwärz en medios con Glc y Stl en presencia de 100 nM de ABA. Los controles se muestran en la parte superior y los tratamientos debajo de los controles, las fotografías fueron tomadas 2 meses 20 días después del inicio del experimento, las imágenes son representativas de una $n=3$.

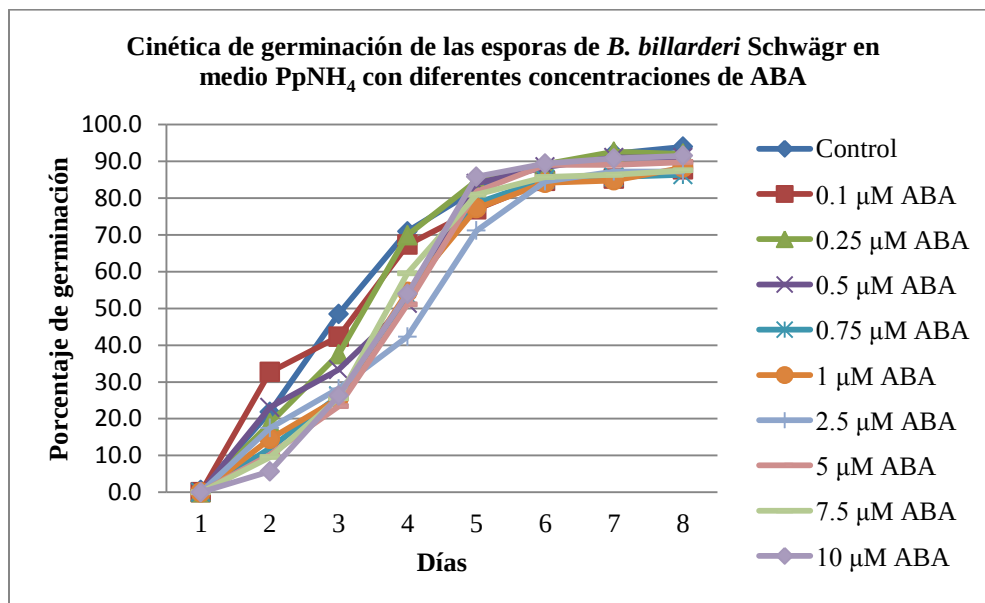


Fig. 31. Cinética que muestra la germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwärz por 8 días en medios con diferentes concentraciones de ABA.

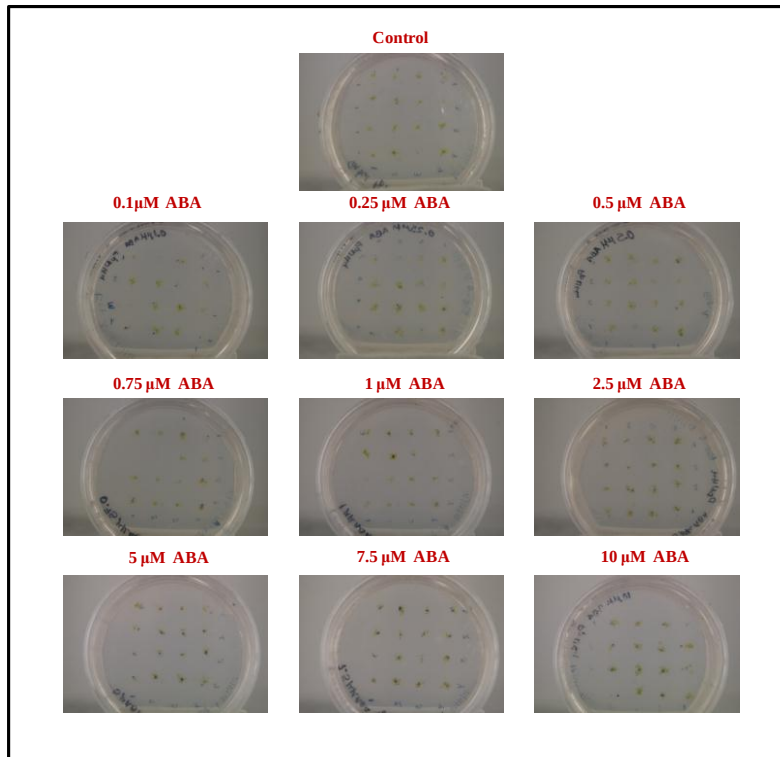


Fig. 32. Fenotipos post-germinativos de las esporas de *B. billarderi* Schwägr sembradas en medio con diferentes concentraciones de ABA. Las fotografías fueron tomadas a los 22 días de haber sido sembradas en las condiciones evaluadas, en la parte superior se muestra el control y en la parte inferior los diferentes tratamientos.

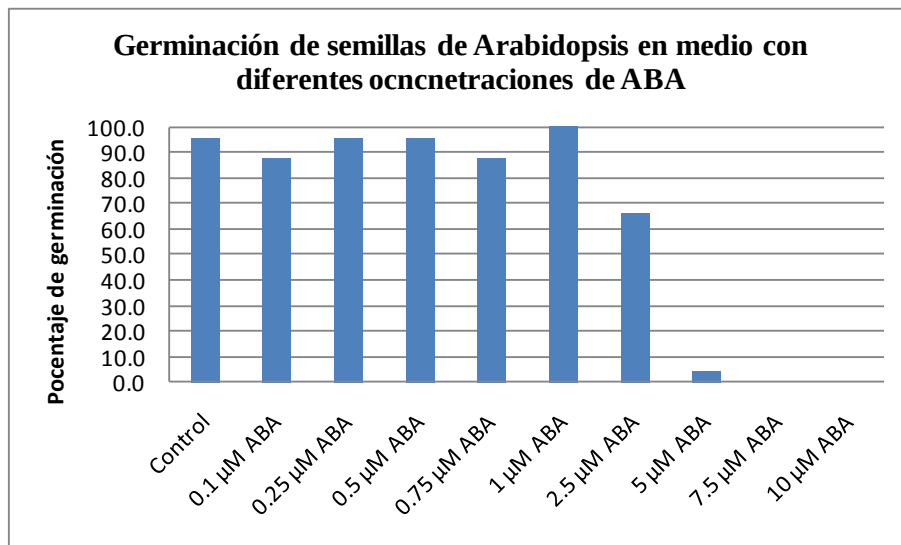


Fig. 33. Cinética de germinación de las semillas de *Arabidopsis* a los 5 días, en medio con diferentes concentraciones de ABA.

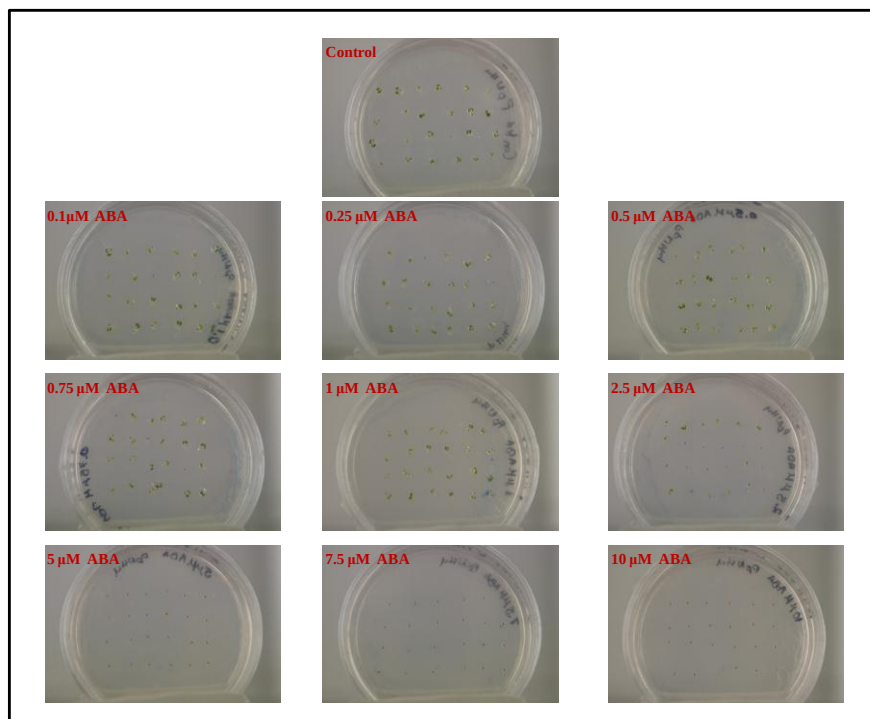


Fig. 34. Fotografías tomadas a los 5 días de germinación de las semillas de *Arabidopsis* sembradas en medio PpNH4 con diferentes concentraciones de ABA.

VIII.9 Cinética de germinación de esporas de *B. billarderi* Schwägr en medios adicionados con diferentes concentraciones de 2-Deoxi-Glucosa en presencia y ausencia de ABA

Con el objetivo de descartar que la inhibición de la germinación en medios con glucosa fuera causada por el efecto osmótico que esta molécula pudiera ejercer, un análogo de esta molécula fue utilizado, la 2 Deoxi-glucosa en diferentes concentraciones (0.5, 0.8 y 2 mM). Los resultados obtenidos después de monitorear la cinética por 8 días, mostraron que desde la concentración más baja (0.5 mM), la germinación se observó retrasada cerca de un 50% respecto al control, en 0.8 mM se alcanzó un 30% de germinación y en 2 mM se observa un retraso muy notable alcanzando apenas el 10% de esta, lo que nos sugiere que efectivamente la glucosa está actuando como una molécula que retrasa e inhibe la germinación de las esporas y que este efecto no es causado por algún efecto osmótico Fig. 35.

Para evaluar si la adición de ABA tenía una interacción con el efecto generado por la 2 D-G sobre la germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr, a los medios con diferentes concentraciones de 2 D-G se les adiciono 100 nM de ABA. Los resultados de la cinética después de 8 días de

evaluación mostraron que no parece haber una relación entre la 2 D-G y el ABA, sobre la germinación de las esporas ya que el comportamiento observado fue muy semejante al obtenido con los medios que no tenían ABA Fig. 36.

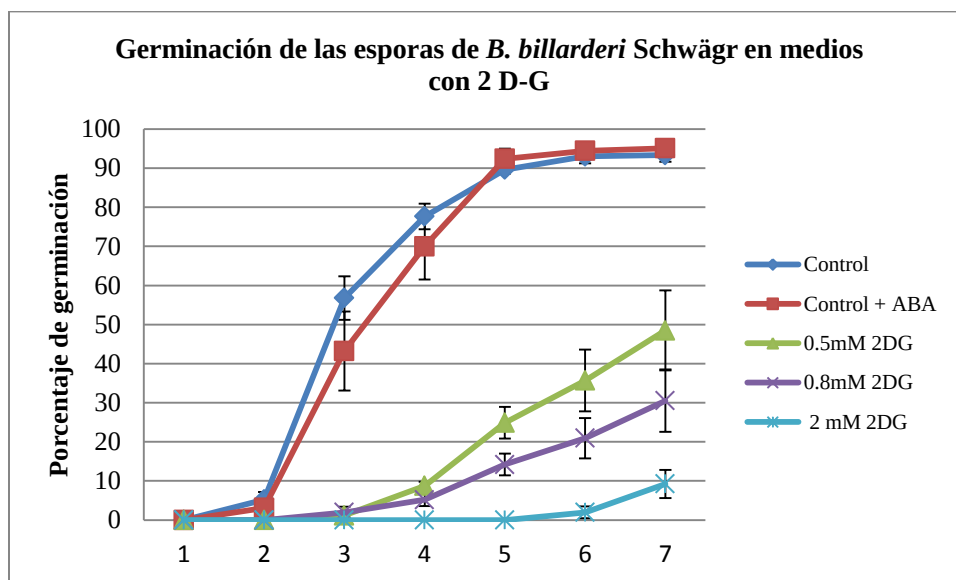


Fig. 35. Gráfica que muestra la cinética de germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr sembradas en medios con diferentes concentraciones de 2 D-G.

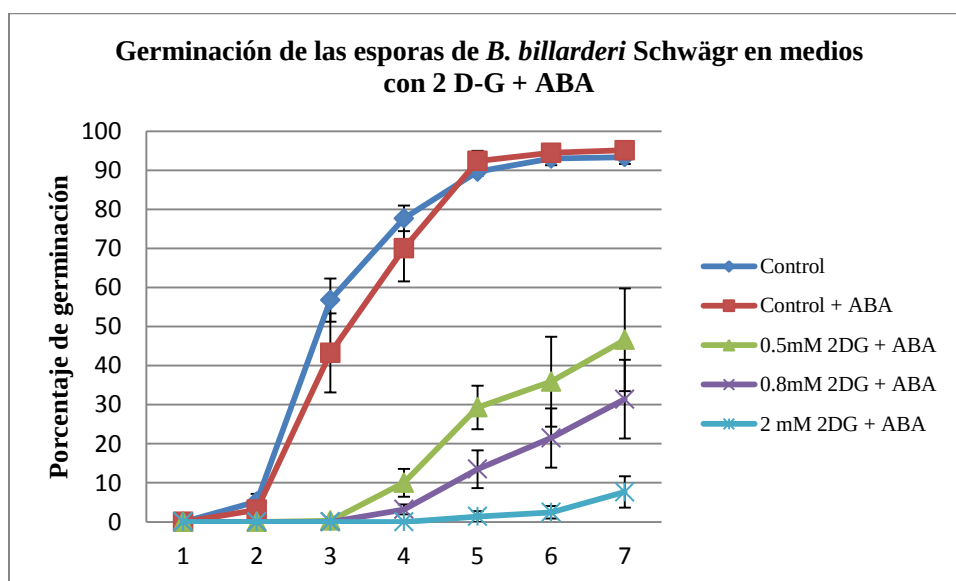


Fig. 36. Cinética de germinación de las esporas de *B. billarderi* Schwägr en medios adicionados con diferentes concentraciones de 2 D-G más 100 nM de ABA.

VIII.10 Caracterización fenotípica y fisiológica de la Línea 4 de *B. billarderi* Schwägr en respuesta a Glucosa

Debido a problemas de contaminación con la línea PcA que es la línea con la que se trabajó en un inicio, nuevas líneas mono-esporicas fueron aisladas como se describe en materiales y método. Al azar fue elegida la Línea 4 (L4) de un pool de 12 líneas obtenidas en el laboratorio y a continuación se muestran los resultados obtenidos de su caracterización.

Para realizar estos experimentos, protonemas con 10 días de edad de la línea 4 fueron expuestos por 15 días a medios adicionados con diferentes concentraciones de Glucosa y Sorbitol. Los fenotipos obtenidos al final del experimento mostraron una diferencia entre los protonemas a la concentración de 100 mM de Glc y Stl, ya que los protonemas expuestos a Glc presentan una mayor densidad de tejido y una reducción en la expansión de la colonia, en comparación con los expuestos a 100 mM de Stl y el control, donde no se observa tal fenotipo. En 300 mM de Glc y Stl los protonemas parecen mostrar el mismo diámetro de la colonia, sin embargo se observa mayor densidad de tejido en los que estuvieron expuestos a Glc. A partir de 500 mM tanto en Glc como en Stl, el desarrollo es inhibido completamente Fig. 37 y 38.

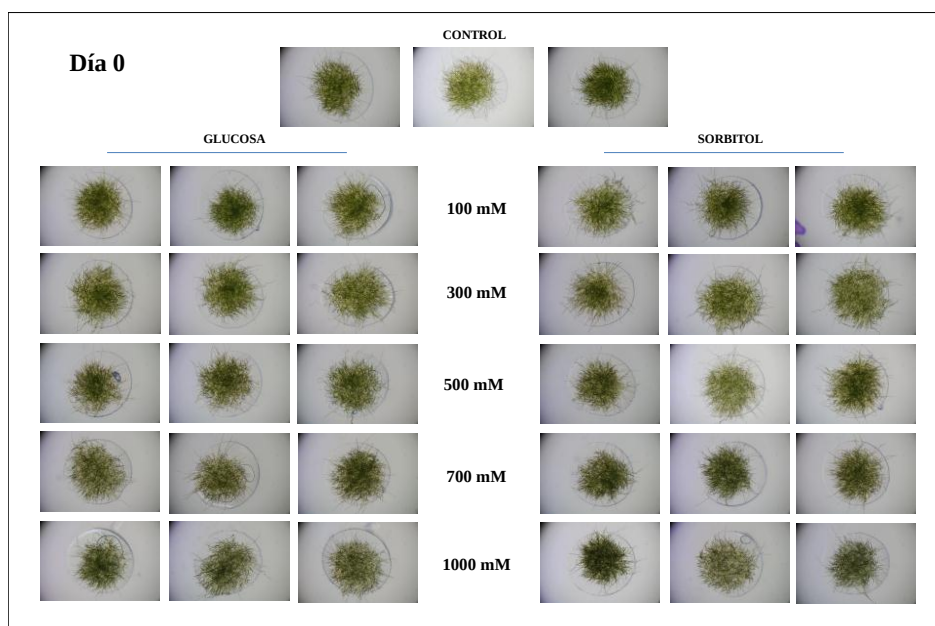


Fig. 37. Fotografías iniciales de la L4 de *B. billarderi* Schwägr en medios con diferentes concentraciones de Glucosa y su control iso-osmótico Sorbitol, en la parte superior se muestran los controles y de bajo de ellos los tratamientos n=3.

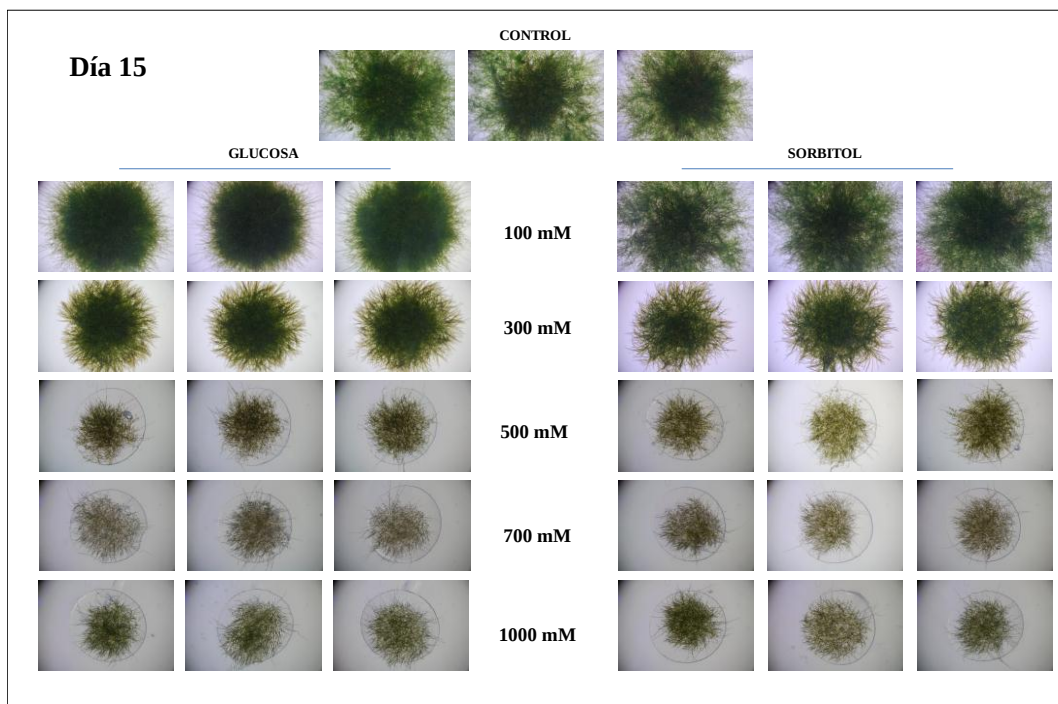


Fig.38. Fotografías que muestran los fenotipos de la L4 después de estar expuestos por 15 días en medios con Glucosa (izquierda) y Sorbitol (derecha), los controles son mostrados en la parte superior n=3.

Con el objetivo de tener un dato cuantitativo que pudiera respaldar los fenotipos observados en los protonemas de *B. billarderi* Schwägr expuestos a los medios con Glc y Stl, un análisis de imagen fue realizado a las fotografías tomadas durante el experimento, haciendo uso del programa ImageJ. Como puede observarse en las gráficas de las figuras 39 y 40, el análisis de imagen muestra una disminución en los pixeles conforme incrementa la concentración de Glc o Stl. Sin embargo esta técnica no es lo suficientemente sensible para poder hacer notar las diferencias que fenotípicamente se observan puesto que en la condición de 100 mM de Glc y Stl no se lograron cuantificar las diferencias observadas en los experimentos. Porque lo que la técnica no es lo suficientemente sensible para analizar los fenotipos obtenidos.

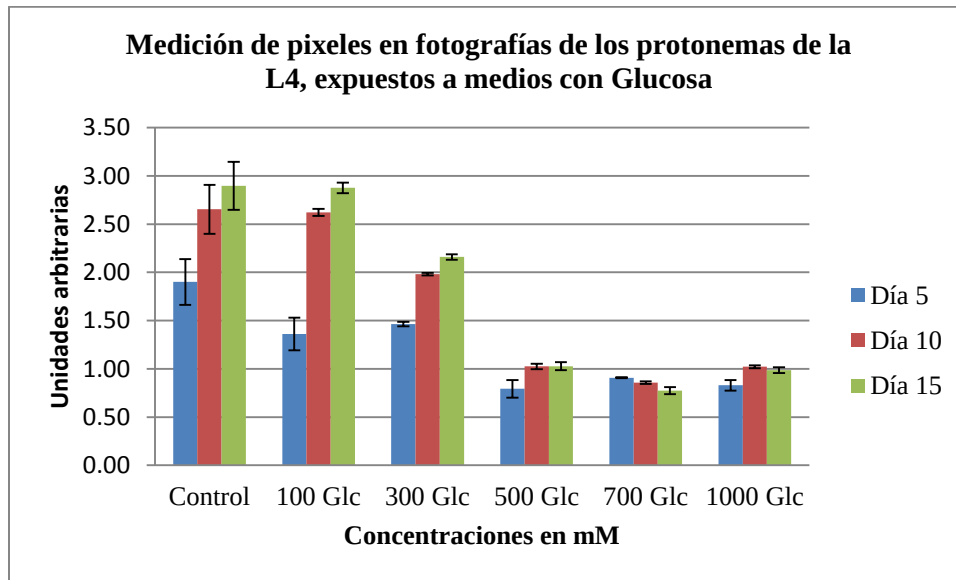


Fig. 39. Gráfica que muestra el análisis de imagen realizado por medio de ImageJ a las fotografías de la línea Pc4 durante el experimento de los protonemas expuestos a medios con diferentes concentraciones de Glucosa. En la gráfica se muestran los incrementos que tuvieron respecto al día inicial, n=3.

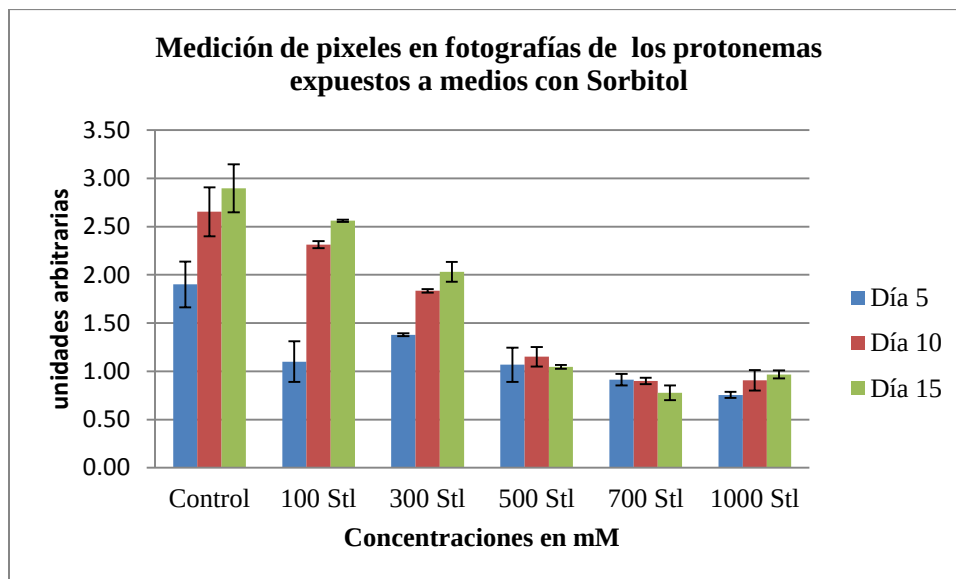


Fig. 40. Gráfica que muestra el análisis de imagen realizado por medio de ImageJ a las fotografías de la línea Pc4 durante el experimento de los protonemas expuestos a medios con diferentes concentraciones de Sorbitol. En la gráfica se muestran los incrementos que tuvieron respecto al día inicial, n=3.

Respecto a las mediciones obtenidas de la eficiencia fotosintética en los protonemas de la L4, se observó una disminución en dicho parámetro, conforme incrementaba la

concentración de Glucosa y Sorbitol en el medio; sin embargo, se observó una eficiencia muy semejantes en los protonemas expuestos a Glc y a Stl, aunque se observan una eficiencia fotosintética ligeramente mayor en los protonemas expuestos a Sorbitol que en los protonemas expuestos a condiciones de Glucosa Fig. 41 y 42.

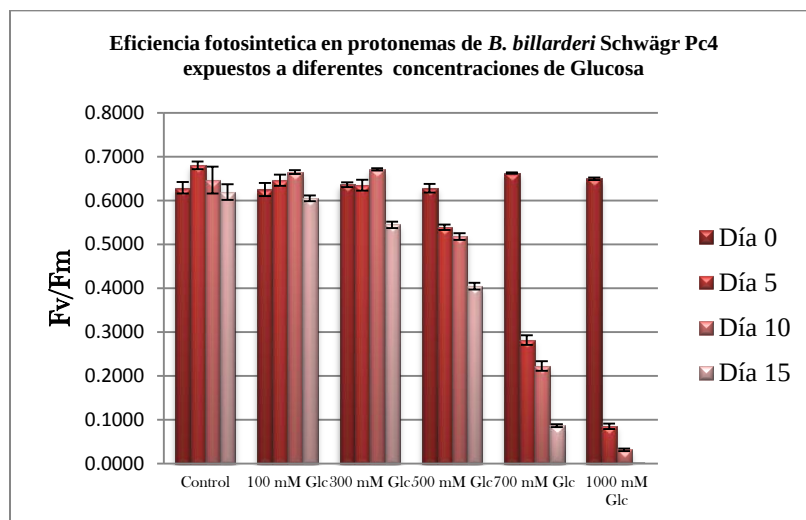


Fig. 41. Gráfica que muestra la eficiencia fotosintética de los protonemas de la L4, expuestos a medios con diferentes concentraciones de Glucosa por 15 días.

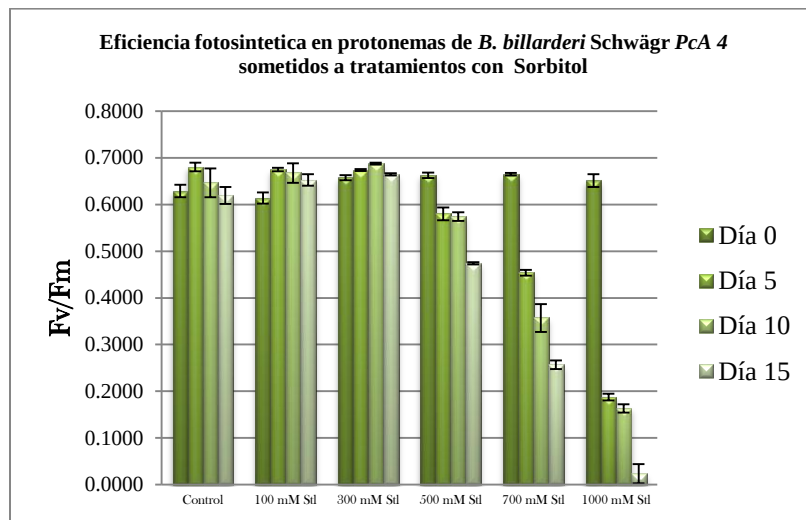


Fig.42. Eficiencia fotosintética de los protonemas expuestos por 15 días al control iso- osmótico sorbitol de la L4 de *B. billarderi* Schwäger.

VIII.11 Caracterización fenotípica y fisiológica de la línea 4 en respuesta a Glucosa y Acido abscísico

Con el objetivo de conocer si la L4 de *B. billarderi* Schwägr se comportaba fenotípica y fisiológicamente semejante a la línea PcA, se procedió a evaluar el efecto de la glucosa combinado con diferentes concentraciones de ABA, sobre el fenotipo y la fisiología de los protonemas de esta línea. Así protonemas con 10 días de edad, (Fig. 43) fueron transferidos a medios con diferentes concentraciones de Glucosa y del control iso-osmótico Sorbitol (Control, 100, 300 y 500 mM) y de ABA (100, 300 y 500 nM). En la figura 44 se pueden observar los fenotipos de los protonemas de la Línea 4 después de estar expuestos por 15 días a los diferentes tratamientos. Como puede apreciarse en la figura, no se observan diferencias entre las diferentes concentraciones de ABA evaluadas tanto en los controles como en los tratamientos, también es importante destacar que el patrón de desarrollo es idéntico al observado en las condiciones sin adición de ABA. Bajo estas condiciones se observó que 100 mM de Glc es la concentración donde se promueve el desarrollo de protonemas, fenotipo que no se observa en el control iso-osmótico donde el desarrollo es más radicular que la condición de Glc, ya en 300 mM de ambos agentes no se observan diferencias significativas, sin embargo a partir de esta concentración, el desarrollo comienza a ser inhibido. Con este experimento podemos corroborar que tanto la línea PcA como la línea 4 de *B. billarderi* Schwägr presentan el mismo fenotipo ante las condiciones evaluadas y el comportamiento de la eficiencia fotosintética es muy semejante. Así el uso de la nueva línea mono-esporica no interfiere con análisis de la expresión de genes a nivel molecular.

Respecto a la eficiencia fotosintética podemos observar en las gráficas mostradas en las figuras 45 y 46 que los protonemas expuestos a Stl presentaron una eficiencia fotosintética ligeramente mayor en comparación con los protonemas expuestos a Glc. También es muy importante resaltar que en las condiciones de Glc la eficiencia se ve disminuida a partir de 300 mM, mientras que en el control iso-osmótico disminuye a partir de 500 mM. Por otra parte es evidente observar que el ABA no tiene una relación directa con la Glc sobre el desarrollo, pero si tiene relación con el efecto osmótico generado en las condiciones

evaluadas, ya que conforme incrementa la concentración de ABA, la eficiencia fotosintética es mayor lo que hace evidente la participación del ABA por el estrés osmótico generado en las condiciones evaluadas.

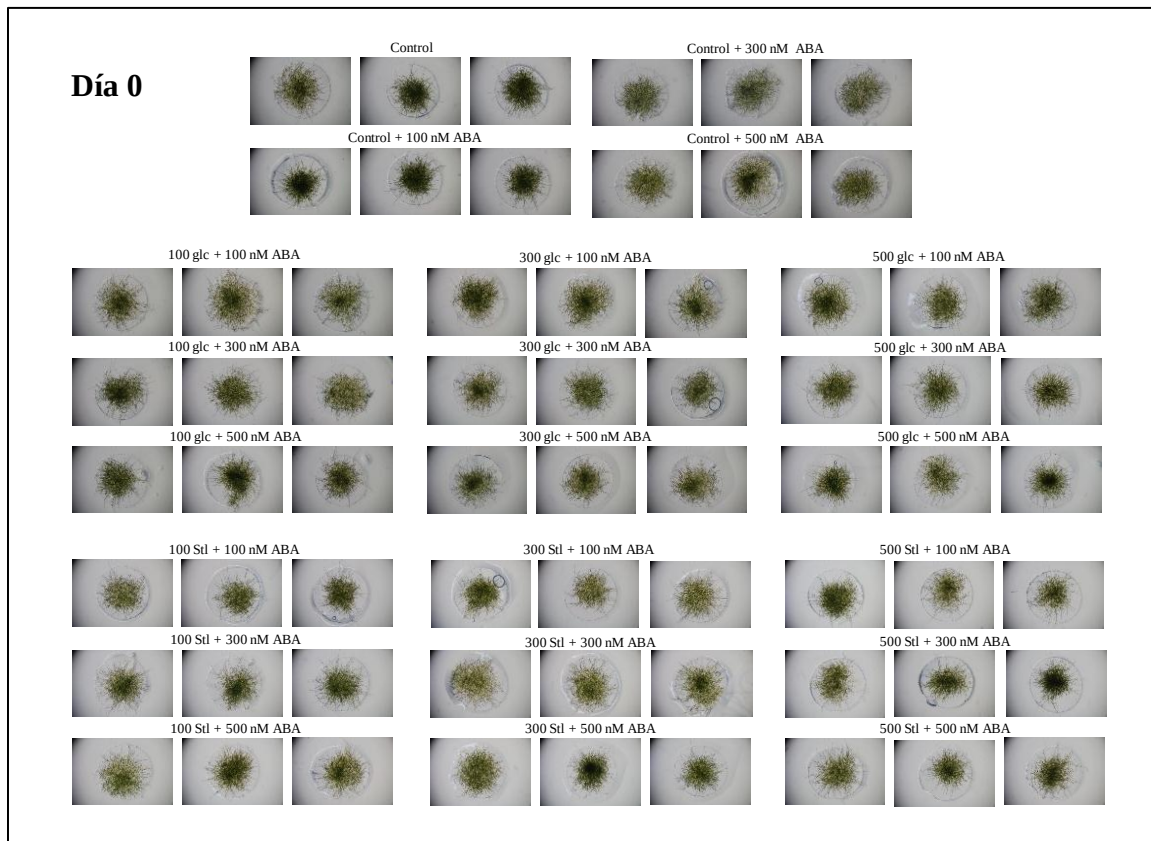


Fig. 43 Fotografías iniciales de los protonemas de la Línea 4 al día 0 del experimento. En la parte superior se observan los controles y en la parte inferior los diferentes tratamientos.

Día 15

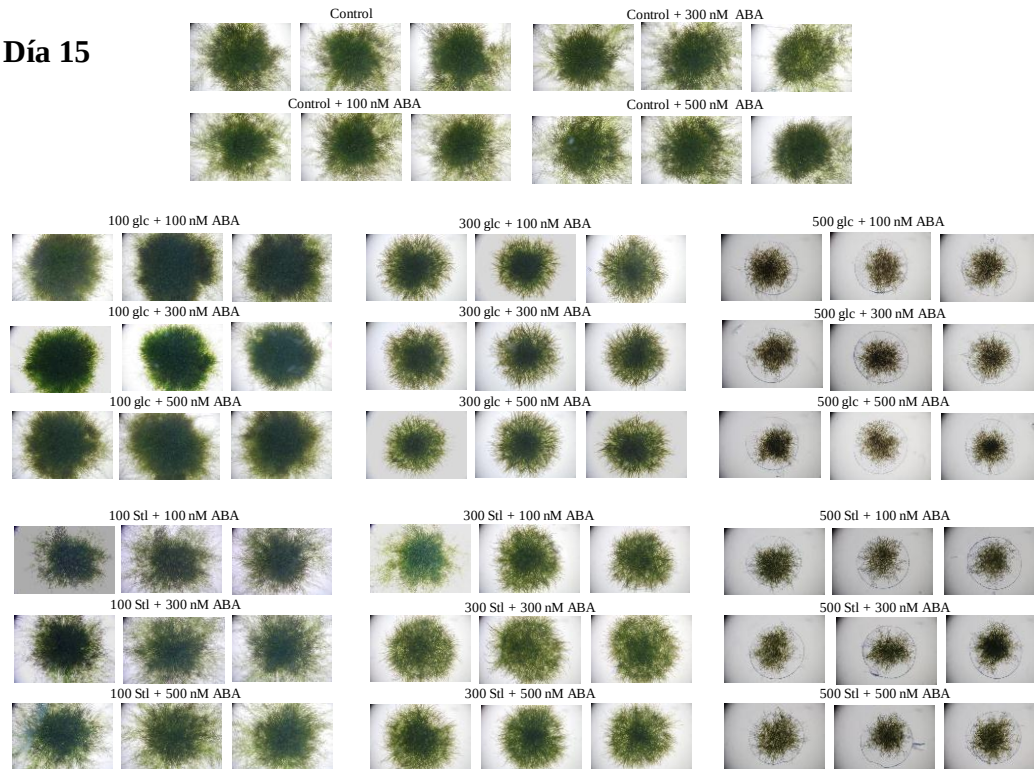


Fig. 44. Fenotipos de los protonemas de la L4, 15 días después de estar expuestos en medios con diferentes concentraciones de Glc, Stl y ABA.

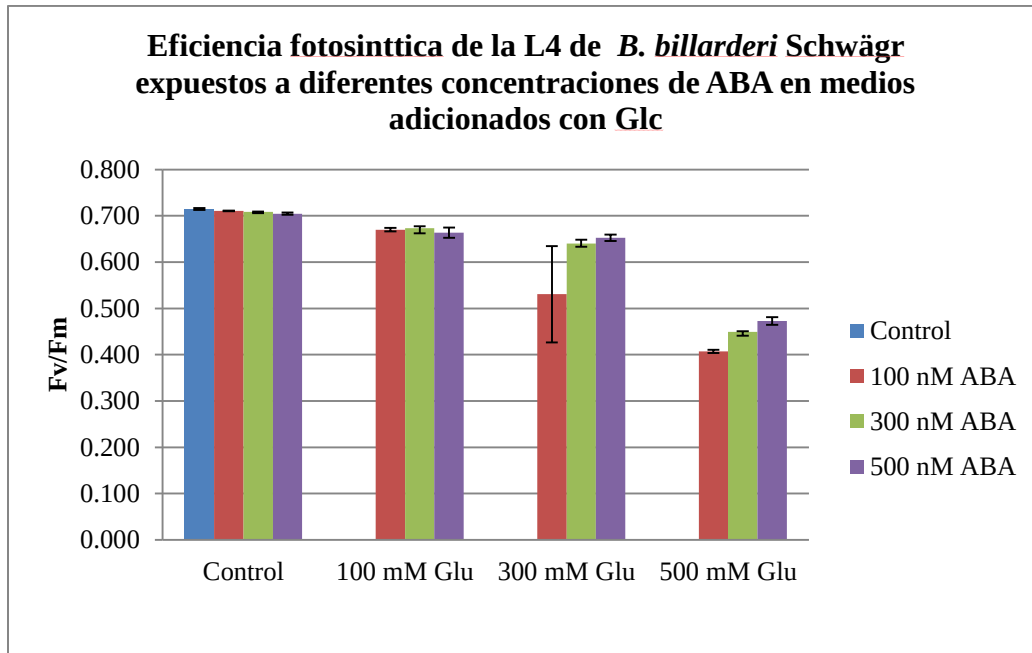


Fig.45. Efecto de la Glc y el ABA sobre la eficiencia fotosintética en los protonemas de la L4 de *B. billarderi* Schwägr.

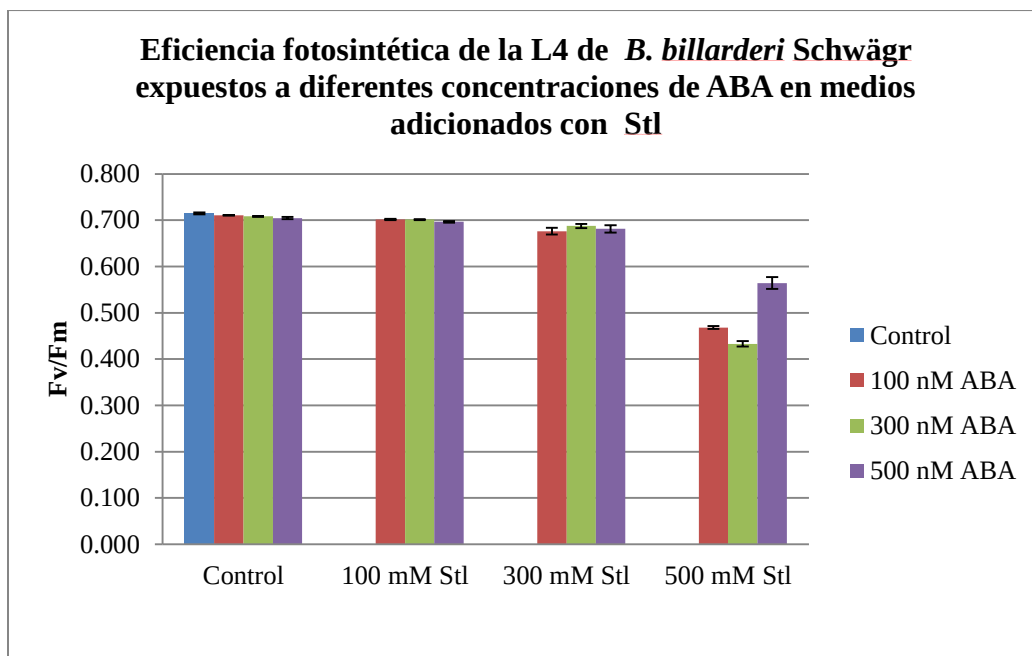


Fig. 46 Eficiencia fotosintética de los protonemas expuestos al control osmótico más ABA en protonemas de la L4 de *B. billarderi* Schwägr.

VIII.12 Efecto de la 2 Deoxi-glucosa sobre el fenotipo y la eficiencia fotosintética del musgo *B. billarderi* Schwägr

El uso de azúcares análogos para estudiar la función de los azúcares como moléculas señalizadoras ha sido una estrategia que nos permite conocer el papel señalizador de algunos azúcares. Con el objetivo de saber si la Glc tiene un efecto señalizador que module el desarrollo de los protonemas de la L4, el análogo 2 D-G fue utilizado para tal fin. Así diferentes concentraciones fueron utilizadas como se explica en materiales y métodos y los fenotipos observados muestran que desde el 3 día se ve un efecto sobre la pigmentación de los tejidos ya que estos presentan un fenotipo color café. Un dato importante a destacar es que no se observan diferencias entre las concentraciones de 2 D-G utilizadas. Tampoco se observa un fenotipo como el observado bajo las condiciones de glucosa, lo que nos sugiere que probablemente las concentraciones evaluadas son muy altas, ya que esta molécula es utilizada a muy bajas concentraciones.

En cuanto a la eficiencia fotosintética podemos observar en la fig. 48, que no se observan diferencias significativas entre los tratamientos. Lo que es importante resaltar es que la eficiencia fotosintética disminuye conforme transcurre el tiempo de exposición a la 2 D-G, sin llegar a disminuir tan drásticamente si lo comparamos con el control.

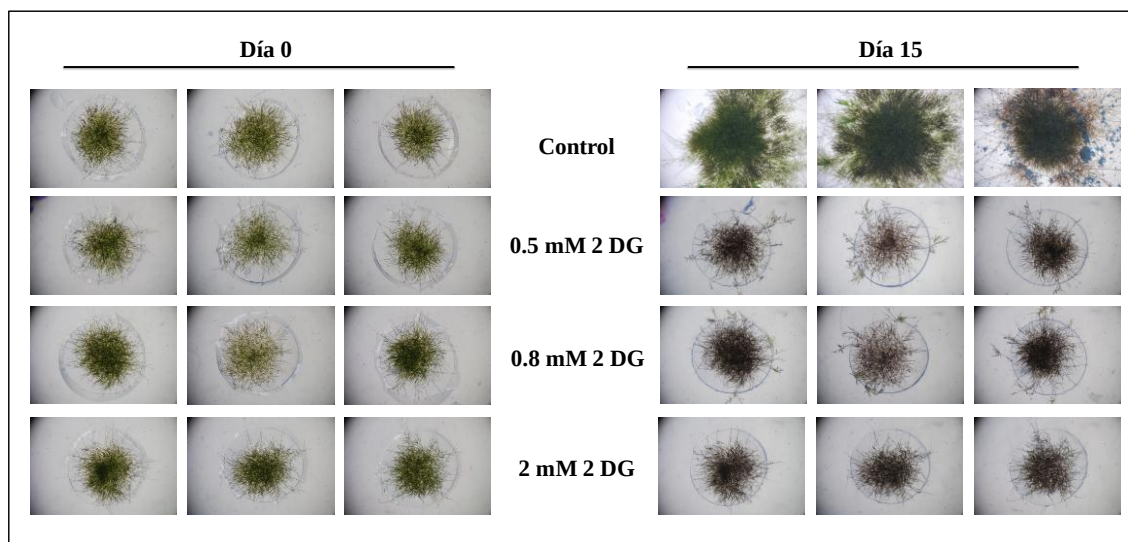


Fig.47 Fenotipos de los protonemas de *B. billarderi* Schwägr después de estar expuestos por 15 días en medios adicionados con diferentes concentraciones de 2 DG.

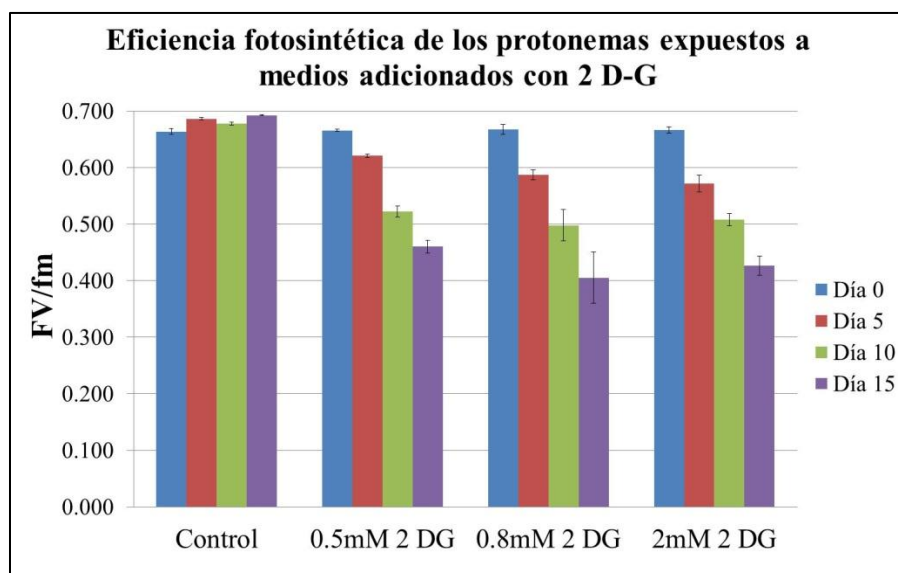


Fig. 48 En la gráfica se puede observar el efecto de la 2 D-G sobre la eficiencia fotosintética de los protonemas de la L4 de *B. billarderi* Schwäger.

VIII.13 Efecto de la Glc y el ABA sobre los protonemas después de estar expuestos por un mayor tiempo a los tratamientos evaluados.

Después de que los protonemas estuvieron expuestos por 45 días a los medios adicionados con diferentes concentraciones de Glc y ABA, se pudo observar que los controles que contenían ABA, se indujo la formación de gametóforos cosa que no ocurrió en el control que no contenía ABA. Por otra parte en los tratamientos con Glc, no se observó en ninguna concentración la formación de gametóforos, tampoco se observó esto en el control osmótico lo que sugiere que el ABA induce la formación de gametóforos y que al interactuar con la Glc y el Stl este proceso es inhibido Fig.49.

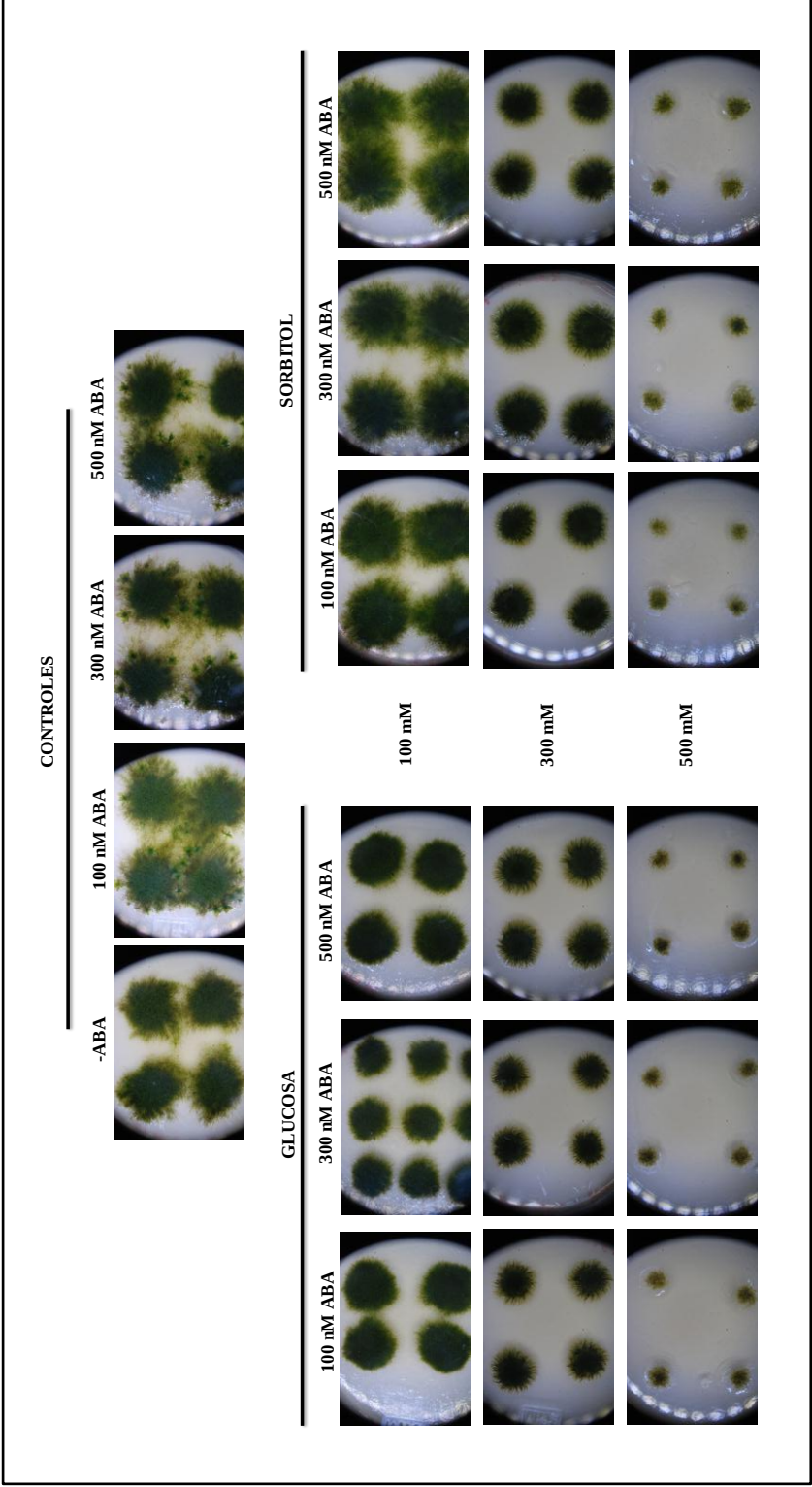
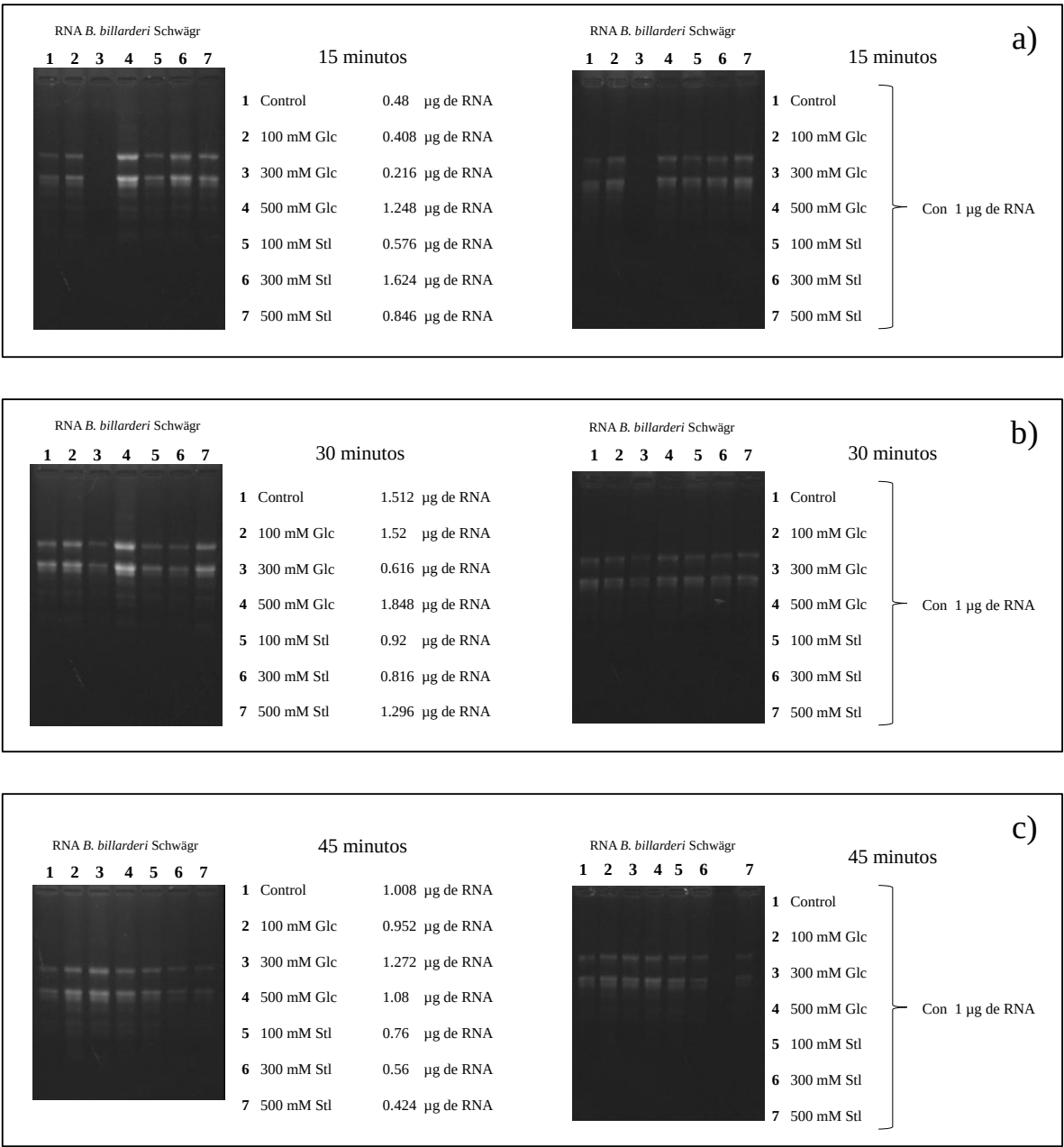


Fig. 49. Fenotipos de los protonemas de la L4 después de estar 45 días en medios adicionados con diferentes concentraciones de Glc, Stil y ABA.

VIII.14 Extracciones de los RNA de protonemas de *B. billarderi* bajo los diferentes tratamientos

Una vez que se realizaron las extracciones de RNA bajo los diferentes tratamientos, se procedió a corroborar su calidad en un gel de agarosa. Las imágenes mostradas a continuación verifican la integridad y la calidad del RNA (Fig. 50, panel a, b , c y d).



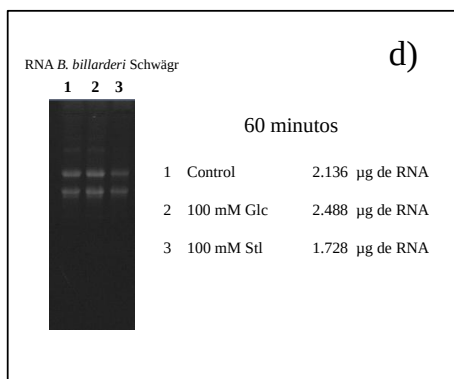


Fig. 50. En las figuras a, b y c se muestran las extracciones de RNA, del lado izquierdo se muestra la calidad del RNA y en la parte de la derecha las concentraciones homogenizadas a 1µg de RNA, excepto en la figura d donde las concentraciones son más homogéneas.

VIII.15 Extracciones de DNA de los musgos *B. billarderi* Schwägr y *P. patens*

Los resultados de las extracciones realizadas para los musgos *B. billarderi* Schwägr y *P. patens* son mostrados en los geles de las figuras 51 y 52.

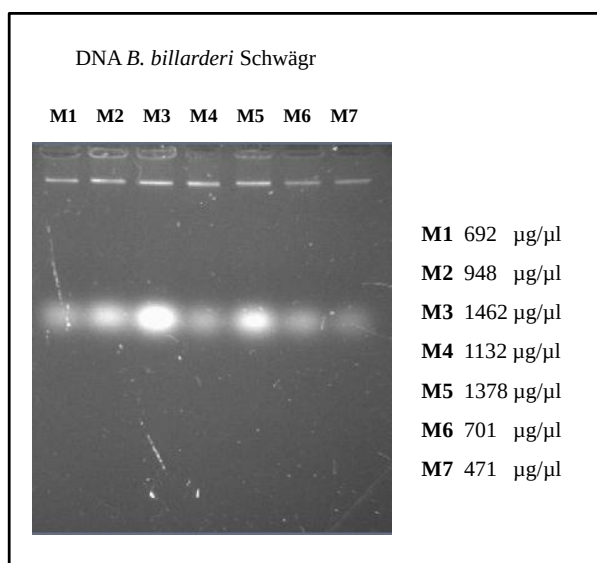


Fig. 51. Gel que muestra en DNA de 7 muestras de protonemas de *B. billarderi* Schwägr y *P. patens* corrido por 30 minutos a 60 volts.

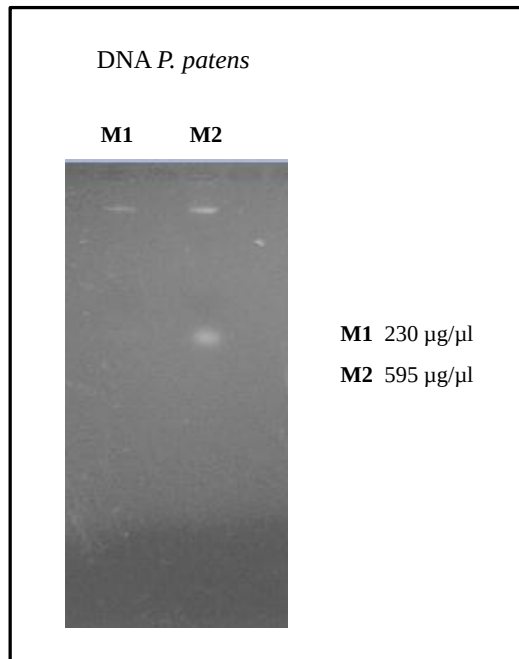


Fig. 51. DNA de 2 muestras de DNA de protonemas de *P. patens* corridas en un gel de agarosa durante 30 minutos a 60 volts.

DISCUSIÓN

En las plantas, los azúcares, cumplen funciones esenciales (Hassid y Putman *et al.*, 1950) ya que actúan como moléculas señalizadoras durante el desarrollo de la planta y en respuestas a estrés abiótico (Smeekens 2000, Loreti *et al.*, 2001), además modulan el metabolismo, desarrollo y fisiología de las plantas (Koch, 1996; Sheen, *et al.*, 1999; Smeekens, 2000; Coruzzi y Zhou, 2001; Rolland *et al.*, 2001).

En *Arabidopsis* se ha observado que bajas concentraciones de azúcares promueven el desarrollo; sin embargo, una alta concentración de estas moléculas reprime la movilización de nutrientes, la elongación del hipocótilo, el enverdecimiento y la expansión de los cotiledones, resultando en una interrupción del desarrollo temprano de la planta (Jang *et al.*, 1997). Los estudios concernientes al papel de los azúcares han sido dirigidos principalmente a las plantas vasculares y en menor medida a las briofitas. Aunque son pocos los estudios concernientes al papel de los azúcares en estas plantas se han obtenido datos importantes al respecto. En condiciones de cultivo *in vitro*, la adición de sacarosa (0.03-0.1 M), fructosa (0.05 M) y glucosa (0.1 M) favoreció el desarrollo de protonemas y la multiplicación de brotes en el musgo *B. argenteum*, mientras que en *A. undulatum* la presencia de los todos los azúcares en los medios inhibió la expansión del protonema y la multiplicación de los brotes, lo cual sugiere que esas diferencias pueden resultar de las diferentes estrategias y hábitats de las especies de musgos o a una ruta bioquímica que dirige el desarrollo de una manera diferente (Savoljeviv *et al.*, 2005). En *P. patens* se ha observado que la formación del caulonema se induce por luz intensa (30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) y por la adición de glucosa al medio (0.15 M) mientras que la ramificación del cloronema se estimula por luz de baja intensidad (6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) (Thelander *et al.*, 2005; Olsson T. *et al.*, 2003).

Estudios realizados en el musgo *P. patens* mostraron que los tratamientos con Glc a una concentración de 50 mM induce la formación de gametóforos, a 150 mM se induce la formación de caulonema y a 200 mM el desarrollo es inhibido, un dato importante a resaltar es que los fenotipos observados durante estos tratamientos no se observan en los

protonemas expuestos al control osmótico manitol (Olsson T. *et al*, 2003). Sin embargo estos datos no pueden ser comparables con los experimentos realizados en el presente trabajo debido a que las concentraciones evaluadas no son las mismas y los tiempos de exposición a dichos tratamientos no se mencionan, tampoco se menciona en que tiempo son formados los gametóforos y a los cuantos días se observa la diferenciación a caulonema.

Durante los experimentos realizados en el presente trabajo pudimos observar que 100 mM de Glc induce la formación del cloronema incrementando la densidad de estos, pero la expansión se observó reducida durante los 15 días de tratamiento y este fenotipo no es observado en el control osmótico por el contrario en 100 mM de Stl no se observa densidad en los tejidos y la expansión de la colonia es mayor en comparación con el tratamiento con Glc además no hay formación de caulonema, esto puede ser debido a que en musgos únicamente se induce la formación de caulonema cuando hay una fuente adecuada de nutrimentos y condiciones adecuadas para el desarrollo, por el contrario si las condiciones son desfavorables se continua con la expansión de la colonia (Olsson T. *et al*, 2003), lo que nos indica justamente que observamos un efecto osmótico por parte del sorbitol y que la glucosa no ejerce dicho efecto puesto que los fenotipos observados son completamente diferentes al control osmótico.

Respecto a la información que se tiene acerca del efecto del ABA sobre el desarrollo de los musgos, se sabe que en el musgo *Timmiella anómala* esta hormona inhibe el crecimiento del protonema y la formación de yemas así como la longitud del gametóforo (Chopra R. N. y Kapur A. 1989). En *P. patens* se observó que la adición de 0.1 μ M de ABA retrasa el desarrollo de la colonia y en 10 μ M de ABA el desarrollo es inhibido completamente. Mientras que en *Marchantia polymorpha*; una hepática, el desarrollo es inhibido completamente a una concentración de 1 μ M (Tougane K. *et al*, 2010).

Cuando los protonemas de *Bryum Billarderi* fueron transferidos a medios adicionados con diferentes concentraciones de ABA, no se observaron diferencias fenotípicas entre las concentraciones evaluadas durante los 15 días de observación, sin embargo 45 días después de estar en estas condiciones pudimos observar la formación de gametóforos, únicamente en los controles que contenían ABA. Lo que nos sugiere que a nivel de protonema el ABA

promueve la formación de gametofitos y que las respuestas a ABA en briofitos son distintas y dependen de la especie y esto es tal vez debido a las estrategias desarrolladas en el ambiente que habitan.

Por otra parte se ha sugerido en *P. patens* que la baja regulación de proteínas involucradas en la fotosíntesis, en la asimilación de carbono y en el ensamble del fotosistema, después de un tratamiento con ABA, puede inhibir la fotosíntesis en este musgo apoyados en la idea de que estos genes son también bajamente regulados en plantas superiores en donde el ABA reprime genes fotosintéticos (Wang X. *et al*, 2010). Sin embargo, en el presente trabajo, después de 15 días de exposición a medios adicionados con diferentes concentraciones de Glc y ABA y Stl y ABA, incluso en los controles que solo contenían ABA, la eficiencia fotosintética es muy alta lo que nos sugiere que el ABA no parece afectar la fotosíntesis de *B. billarderi* Schwägr en las concentraciones evaluadas como se sugiere en *P. patens*.

CONCLUSIONES

A nivel de protonema en *B. billarderi* Schwägr 100mM de Glc favorece el desarrollo de los protonemas, sin embargo concentraciones a partir de Glc 300 mM se inhibe el desarrollo.

Con los resultados y los fenotipos obtenidos de la cinética de germinación de las esporas del musgo *B. billarderi* Schwägr podemos concluir que bajo condiciones de Glc, está azúcar tiene un efecto sobre la germinación de las esporas y aunque en 300 mM de Glc, comienza a verse una tendencia sobre el retraso de la germinación comparado con el control iso-osmótico, 500 mM de Glc es la concentración a la cual la germinación es totalmente inhibida, cosa que no ocurre con el control iso-osmótico donde se alcanza un 40 % de germinación. Por otra parte se hace evidente una interacción entre el ABA y Glc a nivel post-germinativo debido a la inhibición de la formación de gametóforos en la condición de Glc 100 mM más ABA 100 nM.

A nivel de protonema la adición de ABA promueve la formación de gametóforos, sin embargo cuando esta molécula interactúa con el ABA no ocurre la formación de estas estructuras, lo que nos sugiere que a nivel protonemal el efecto entre interacción de la Glc y el ABA se hace evidente conforme transcurre el tiempo de exposición a estos agentes.

PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar el desarrollo de los protonemas en medios adicionados con otros azúcares.
- ❖ Realizar cinéticas de germinación en medios con otros azúcares.
- ❖ Utilizar el análogo en concentraciones más bajas y utilizar otros análogos.
- ❖ Analizar los azúcares acumulados durante los tratamientos con glucosa.
- ❖ Realizar experimentos de exposición de protonemas a concentraciones más altas para poder evaluar si el ABA reprime el desarrollo como ocurre en *P. patens*.
- ❖ Probar los genes evaluados en protonemas expuestos por un mayor tiempo a los diferentes tratamientos.
- ❖ Cultivar protonemas en medios adicionados con glucosa para colocarlos en la oscuridad y ver cuanta glucosa pueden consumir ya que esta actuaría en estas condiciones como fuente de carbono. Con esto se buscaría encontrar diferencias entre los protonemas crecidos en condiciones de luz y en oscuridad y entre el control iso-osmótico.

LITERATURA CITADA

Arenas F., Arroyo A., Zhou L., Sheen J. y León P. 2000. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development*.14: 2085-2096.

Arroyo A. 2004. Aislamiento y caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectadas en la detección y/o señalización de la glucosa. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología UNAM.

Arroyo A., Bossi F., Finkelstein R., y León P. 2003. Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 133(1):231-42.

Borisjuk L., Rolletschek H., Wobus U. y Weber H. 2003. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*. 54:503-512.

Borisjuk L., Walenta S., Rolletschek H., Mueller W., Wobus U., y Weber H. 2002. Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *The Plant Journal*. 29:521-530.

Cervantes D. 2009. "*Plagiomnium cuspidatum* (Hedw.) T. Kop: Un nuevo modelo para el estudio de las respuestas a déficit hídrico en briofitas". Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tesis de Licenciatura.

Chopra N. y Kumra K. 1988. Protonemal differentiation and bud formation in mosses. *Biology of bryophytes*. Wiley Eastern Limited, New Delhi, India. 40-46

Chopra R. N. y Kapur A. 1989. Effect of abscisic acid and kinetic on protonemal differentiation in *Timmiella anomala*. *Plant Science*. 61 (2):203-206.

Corbesier L., Lejeune P. y Bernier G.1998. The role of the carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: Comparision between the wild type and a starchless mutant. *Planta*. 206:131-137.

Coruzzi M. y Zhou L. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging “matrix effects.” *Current Opinion. Plant Biology*.4: 247–253.

Cove D., Bezanilla M., Harries P. y Quatrano R. 2006. Mosses as Model Systems for the Study of Metabolism and Development. *Annual. Review of Plant Biology*. 57:497–520

Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., & Rock, C.D. 2002. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 (Supplement): S15-S45

Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P.C., Bouvier-Durant, M., & Vartanian N. 1994. Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Molecular Biology* 26: 1557- 1577.

Giraudat, J. 1995. Absciscic acid signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 232-238.

Glime M. J., Bryophyte ecology, [en línea], Michigan, Michigan Technological University (MTU), Botanical Society of America (BSA), International Association of Bryologists (IAB), 2006,(Volume 1), published online at <http://www.bryoecol.mtu.edu/>

Goffinet B, Buck W R and Shaw A J. 2008. Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. In Goffinet B and Shaw A J, *Bryophyte Biology*: second edition, Cambridge University Press, pp: 55-138

Gushina A. I., Harwood L. J., Smith M. y R.P. Beckett. 2002. Absciscic acid modifies the changes in lipids brought about by water stress in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytologist*. 156:255-264

Hassid W. Z. and Putman E. W., 1950. Transformation of sugars in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1** : 109-124

Jang C. J. and Sheen J. Sugar Sensing in Higher Plants. 1997. Volume 2, Issue 6, Pages 208-214

Klein, D., Stitt M. Effects of 2-deoxyglucose on the expression of *rbcS* and the metabolism of *Chenopodium rubrum* cell-suspension cultures. *Planta*. 1998. 205:223-234

Koch K.E. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509–540

Leung, J., y Giraudat, J. 1998. Absciscic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 199-222

Loreti., Belis L.D., Alpi A. and Perata P., 2001. Why and how do plant cells sense sugars? *Ann. Bot.* **88** : 803-812.

Minami A., Nagao M., Arakawa K., Fujikawa S. and Takezawa D. 2003 Absciscic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *J. Plant Physiol.* 160. 475–483 Manabu N.,

Minami A., Arakawa K., Fujikawaa S., Takezawac D. 2005. Rapid degradation of starch in chloroplasts and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Physiology*. 162, 169—180.

Moore, B. and Sheen, J. 1999. Plant sugar sensing and signaling—a complex reality. *Trends Plant Sci.* 4: 250.

Mitra G.C. y Allsopp A. 1959. The effect of varios physiologically active substances on the development of the protonemata and bud formation in *Pohlia mutans* (Hedw.) Lindb. *Phytomorphology*. 9:64-71.

Oliver J.M., Dowd S.E., Zaragoza J., Mauget S. A. and Payton P.R. 2004. The rehydration transcriptome of the desiccation-tolerant bryophyte *Tortularuralis*: transcript classification and analysis. *BMC Genomics* 2004, 5:89 doi:10.1186/1471-2164-5-89

Olsson T., Thelander M. y Ronne H. 2003. A Novel Type of Chloroplast Stromal Hexokinase Is the Major Glucose-phosphorylating Enzyme in the Moss *Physcomitrella patens*. The journal of biological chemistry. Vol. 278, No. 45, Issue of November 7, pp. 44439–44447

Price J. Li T-C, Kang S.G., Na J.K., Jan J.C. 2003.Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. *Plant physiol.* 132:1424-1438

ProctorM. 2001.Patterns of desiccation tolerance and recovery in bryophytes.*Plant Growth Regulation* 35: 147–156

Quirino F. B, Noh S. Y., Himelblau E. and Amasino R. M. 2000.Molecular aspects of leaf senescence.Volume 5, Issue 7, 1 July 2000, Pages 278-282.

Ramon M., Rolland F. and Sheen J., 2008.Sugar Sensing and Signaling. *The Arabidopsis Book*.10.1199/tab.0117.

Rolland F., Winderickx J., Thevelein J. M. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26(5): 310-317.

Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185–S205

Russell A. 1993. Morphogenesis in the moss *Physcomitrella patens*. PhD thesis. University of Leeds, Leeds. 228 pp.

Sabovljevic A., Mabovljevic M., Grubisic D. and Konjevic R. 2005 The Effect of Sugars on Development of Two Moss Species (*Bryumargenteum* and *Atrichumundulatum*) During in vitro Culture. *Belg. Journ. Bot.* 138 (1): 79-84

Sheen J, Zhou L, Jang JC.1999. Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2: 410–418

Smeeckens S. and Rook F. 1997. Sugar Sensing and Sugar-Mediated Signal transduction in Plants. *Plant Physiol.* (1997) 115: 7-13

Smeeckens S. 2000. Sugar-induced signal transducción in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 51, Pages 49-81

Schumakerl S. K. y M. A. Dietrich. 1997. Programmed Changes in Form during Moss Development. *The Plant Cell*, Vol. 9, 1099-1 107

Stark L. R., Oliver J.M., Mishler B. D. and Mclethie D. N. 2007. Generational Differences in Response to Desiccation Stress in the Desert Moss *Tortula inermis*. *Annals of Botany* 99: 53–60.

Takezawa D., Komatsu K. y Sakata Y. 2011. ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone? *J Plant Res.* DOI 10.1007/s10265-011-0410-5

Thelander M., Olsson T. y Ronne H. 2005. Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens* *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 412, pp. 653–662

Tougane K., Komatsu K., Bhyan B.S., Sakata Y., Ishizaki K, Katsuyuki T. Y., Kohchi T. y D. Takezawa. Evolutionarily Conserved Regulatory Mechanisms of Absciscic Acid Signaling in Land Plants:

Characterization of ABSCISIC ACID INSENSITIVE1-Like Type 2C Protein Phosphatase in the Liverwort *Marchantia polymorph.*. *Plant Physiology*. March 2010, Vol. 152, pp. 1529–1543,

Villalobos López M. A. Análisis de la regulación de la expresión de los genes CpMYB10, CpMYB5 y CpMYB7 DE *Craterostigma plantagineum*. Tesis de Doctorado. 2004. Instituto de Biotecnología UNAM.

Wang X., Kuang T. y He Y. 2010. Conservation between higher plants and the moss *Physcomitrella patens* in response to the phytohormone abscísico acid: a proteomics analysis. BMC Plant Biology 10:192

Werner O., Espin R.M.R., Bopp M, Atzorn R. 1991. Abscísico acid-induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. *Planta* 186:99–103

Wingler A., Schaewen V. A., Richard C. Peter L., Lea J. and Quick W. P. 1998. Regulation of Leaf Senescence by Cytokinin, Sugars, and Light. *Plant Physiol.* (1998) 116: 329–335

Wobus U, Weber H. 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biological Chemistry* 380, 937±944

Wood J. A. 2007. Invited Essay: New Frontiers in Bryology and Lichenology. The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses. *The Bryologist*. 110 :(2) 163–177

Xiong L. and Jian K. Z. 2003. Regulation of Abscísico Acid Biosynthesis. *Plant*

Zhou R., Cutler J. A., Ambrose J.S., Galka M.M., Nelson M. K., Squires M .T., Loewen K. M., Jadhav S.A., Andrew R.S., Taylor C. D. and Abrams R. S. 2004. A New Abscísico Acid Catabolic Pathway. *Plant Physiology*, Vol. 134, pp. 361–369

diploide (Goffinet y Shaw, 2009 (Nishiyama et al., 2003 (Goffinet y Shaw , 2009; Wood, 2007). (Shaw y Renzaglia, 2004).

ANEXO 1

```

1cl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1
1cl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00

```

```
lcl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1
lcl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00
```

```
lcl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1
lcl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00
```

```
lcl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1
lcl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00
```

```
1cl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1
1cl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00
```

```

1cl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1
1cl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00

```

```
lcl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1
lcl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00
```

```
lcl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1
lcl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00
```

```
lcl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1
lcl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00
lcl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00
```

640 650 660 670 680 690 700

GGAGGCACTTAATTAAGGCTCTGCAAAGAGTTGCTTTGACATGGGAATCGAGGCACCTTGTTAAATGATACCG
CGAGCTCTACAGGGGACATTGAACGCGGAGGGTACAAGATGAGGATTGCTGGTTTGGTTAACGACACCG
CAGCGCTTACAGGGGCTATTGACGCGGAGGGTACAAGATGAGGATTGCTGGTTTGGTTAACGACATACCG
CGAGCTTTCAAAAGTCTATTGAACGATAGGGTCAAGATGAGGATTGCTGGTTTGGTTAACGATACCG
CGAGCACTTACAGGAGCATTGAATCCCTTAGGGTACAAGATGAGGATTATCGCTTTGATCAATGATACCT

710 720 730 740 750 760 770

TTGGAACTAGCTCCGTTGGTAGATACATATAACCCGGATGCTTGTTCGTGCTGTTATTTTATGGCACTGGGAC
TAGGAACCTTAGCTTGGTGGTCCCTATTGGAAATAACGACGTCATGATAGCTGTTATTTTGGGTACTGGCAC
TAGGAACCTTAGCTTGGTGGGACGATATTGGAAATAATGACGTAAATGATAGCTGTTATTTCTTGGGTACTGGGAC
TTGGTAACCTTAGCTTGGTGGTCCCTATTGGAAATAACGACGTCATGATAGCTGTTATTTTGGGTACTGGGAC
TAGGAACGCTAGCTCCGTTGGTCCCTATTTGGAAATAACGTCGATGATAGCTGTTATTTTGGGTACTGGGAC

780 790 800 810 820 830 840

AAACGGAGCCTATGTTGAGCGTCCAAACCGCGATCCCTAAATGGCATGGCTCTCCAAATATCGGAGAA
CAACGCCGTGCTATGTGGAGCGAGCTGAATCTATATCGAAGTGGGTGGCGAGCTCCGAAGTCTGGCCAG
CAACCGCTGCTATGTGGAGAGAGCTGAAGCTGTATCGAAGTGGCTGGGGAATTCGAAGTCTGGGGAG
CAATGCCCTGCTACGTGAGCGAGCTGAATCTATATCGAAGTGGCATCGGAGCTCCGAAGTCTGGCCAG
CAATGCCCTGCTACGTGAGCGAGCTGAAGCTGTATCGAAGTGGGTGGCGAGCTCCGAAGTCTGGACAG

850 860 870 880 890 900 910

ATGGTTCATAAAACATGGAGATGGGGAAGATTTCAGGTCATCACATTTTCCATTAAACCGAGTTTTCATGACACGGC
ATGGTTCATCAATATGGAGATGGGGAAGATTTTGGTCTGCACATTTTCCCTCGGACCTACGGGAGACGAGCTAT
ATGGTTCATAAAACATGGAGATGGGGAAGATTTTCTGGTCATCTCATTGCGCTCGGACCTATGCGGATGAGTCAT
ATGGTTCATCAATATGGAGATGGGGAAGATTTCGGTCATCACATTTTCCCTCGGACCTATGTGGATGAGTCAT
ATGGTTCATAAAACATGGAGATGGGGAAGATTTCTGGTCATCACATTTTCCCTAGGACCTATATGCGGATGAGTCAT

920 930 940 950 960 970 980

TGGATTTTCGAGAGTCTCAATCCAGGCAGAAACGATCTTCGAGAAAATCATTTCCGGTATCTGATCTTTGGGAGA
TGGATAACGAGAGTCTCAATCCAGGAGAAATAGGGCTTCGAGAAAAATGATTTCCGGAAATCTATTTGGGTGA
TGGATCAACGAGAGTTTCAATCCAGGAGAAATAGGGTTTCGAGAAAATGATCTCTCGGAATCTATTTGGGTGA
TGGATACCGAGAGCCTCCATCCAGGAGAAATAGGGTTTTGAAACGATGATTTCTGGAAATCTATTTGGGTGA
TGGATAACGAGAGTTTCAATCCAGGAGAAATAGGGTTTTGAAACGATGATCTCTCGGAATCTATTTGGGTGA

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050

GATTTTTGGCAAGAGTTCTTTCTAAGAGTGGCTGAAGATGCTGCTTTCTTTGGCGATACAGTTCCTCACTAAG
TTGTGTGAGGGCGTGTACTTGTAGAAATGGCTCAGGAAGCTGGGCATCTTTCGGTCCCATATGTTCCACACAAG
TTGTGTGAGGGCGCGTCTTGTAGAAATGGCCACAAGAAGCTGTCATTTTGGCACCCTCTGTCCACACAAG
TTGTGTGAGGGCGGAGTCTTGTGAGAAATGGCCACAAGAAGCTGGCATCTTTCGGTCCCATATGTTCCACACAAG
TTGTGTGAGGGCGCGTGTGTAGAAATGGCCACAAGAAGCATTTTGGTCCCATATGTTCCACACAAG

[illegible]

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

AGATTCTTGGGAGCAGAGATTAAAGGATATATATCGGAGGTCCCTACAACATTCTCTGAAAAATGACAAAAAGTTGT
AAATCGTTGCAGAAAGTTCTGAAGACAGTATATGGGATCCATAAACACACACTGGGGATTCCGCAAAATTTGT
AGGTGGTTGCTGAAGTTCTGAAACAGATTATACGGGATCCAGAACACTACAGTAGGGAATCGCGCAAAATCGT
AAGTACTTGGCAGAGTTCTGAAAGAAGTTATATGGGATCCAGAACACACACAGTAGGGAATTCGCAAAATCGT
GAGTCGTTGCGAGAAATCTCAAAACAGTTGTTTCCAGATTCACAAACACCACTTAGGGAATTCGCAAAATCGT

[illegible]

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 AAGAAACTGGGAAGAGATACCTCTAAAG
 AAGAAAATTGGAAGCATGGAAGTACAGCAAAATGGTTTATCAGGCGAAATGACG
 AAGAAAATGGGAAGAGATGGAAGTCGCGCAAAATGGTTGTTATTAAGCGCAATACCTTCGAAACAGACTGATTA
 AAGAAAATTGGGAGAGATGGAAGTACAGCAAAATGGCTTTATCAGGCGAAATGATA

1cl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00

1cl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1

1cl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00

1cl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1

1cl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00

1cl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1

1cl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00

1cl|U28214.1_cdsid_AAB49908.1

1cl|XM_001752177.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001754096.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001784282.1_cdsid_XP_00

1cl|XM_001784578.1_cdsid_XP_00

Alineamiento STP1

```

1cl|X55350.1_cdsid_CAA39037.1
1cl|XM_001753184.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001753251.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001768173.1_cdsid_XP_00
1cl|XM_001784990.1_cdsid_XP_00

10 20 30 40 50 60 70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
-----|ATGGCTGCGCGGTGGATTCTGCTGCGGGATGGCCAAAGGCTTATCCCAGCAAGTCACTCCC
ATGGCGGGGAGGTACCGTGGGGAAGCTATATATGGAGGGAAGCGGA---GTATGAAGGGAAGGTCACTGTA
ATGGCGGGCGGGTGGTGGGTGAGCTATCATGGTATCAAGGCGGATCAATATGGAGGGAAGGTAACTGTG
-----|ATGGCAGGGGGGGGTCTGCTTACGGCGGGGAGATCAAGCACTACCCCAGGCGCAACAACCTTC
-----|ATGGCTGGGGGAGGAGTTGTGATGGCGGGGGATATCAAGCACTACCCCAGGCGCAACAACCTTC

80 90 100 110 120 130 140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
TTTGTCTCTTCACTTGGGTTCTTGTCTGCGATGGGGGGTCTCATCTTCGGATACGATATCCGAATCTCCG
TTTGTGCTGCTTGGCTTGCATCGTTGCAGCCAGCGGTGGTCTTCTCTTCGGTTACGACATCCGTATAACTG
TTCTGTGTCATGGCGTGCATCGTTGCTGCCAGTGGAGGTCTTCTCTTGGCTATGACATCCGTATTTTCAG
TTTGTGATATATGGTCTGTATAGTGGCGCATCCGGAGGTCTCATGTTCGGATACGATCTCCGAATTTTCAG
TTCTGTGATCATGGTCTGTATAGTGGCGCATCAAGAGGTCTTATGTTCCGATACGATCTCCGAATTTTCAG

150 160 170 180 190 200 210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
GGGGTGTGACGCTCTATGCTCGTCTTCTCTCAAGCGATTCTTCCCGTCTGGTGTATCCGGAACACAA---GA
GGGGTGTGACGCCCATGGACGACTTCTCTAGTCAAGTTCTTCCCTCGCGTCTACGAGAGGAAGCACTCTGG
GGGGTGTCACTGCCATGGACGACTTTTGTGATCAAAATCTTCCCGCATGTCTACCGTAAATAACACTCCAA
GGGGTGTCACTGCTATGGACGAAATTTTGTGGCAAAATTTTCTTCTGCGGTGTGTGGCAAGAAAGCGAGGAGA
GTGGTGTCACTGCCATGGATGAATTTCTGGCTAAGTTTCTTCCCGCGGTCTTGAAGAAAGAGGGCGCGC

220 230 240 250 260 270 280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
GGACGCTCAAGCAACCGTACTGTCTAGTACGATAGCGCGAGCGCTAACGATCTTCACTACGCTCTCTATAT
CAACTTAAAAAGAGAGTCACTACTGCAAGTATGATGACCAGGGCTTGCAGCTCTTTAGCTCTCGCTTTAC
CGACTTGCACGAGAGCCACTACTGCAAGTATGACGACCAAGGCTTGCAACTTTTCACTCTCGTCACTCTAC
GGCAGCTTCGGAGAGCGCTACTGCAAGTATGATGACCAGAGCTGCAAGCCTTCACTCTCGTCTGCTAC
GGCAGCAACGGAGAGCGCATACTGCAAGTATGATGACCAGAGCTACAGCATTTACGCTCTGCTCTAC

290 300 310 320 330 340 350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
CTAGCGGGGCTAATTTCTGCTGGTGGTGGCTTCCACCGTGACAGAGAAAGTTCCGGACGCGCGTCTCTGATGC
TTGGCGCGTCTCTGTTGATCAATTTTCTGCTTCCCTTAACACCGGGTGTCTGGGACGCAAGGCAAGTATGC
TTGGCTGTCTCTGTTGGGACCTTTTCTGCTTCCCTTAACACCGGATGCTTGGGCGCAAGGTCAGTATGC
AATTTCCGCACTGCTGTGACATCTTCTCTGCTGATACACCCAGGCACTACGGCGGTAATTTACCATGC
ATCGCTGGCTCTGATGACCTTCTTCTGCTTACACCACTATGCAATTACGGTCTCGAAGGCAACCATGC

360 370 380 390 400 410 420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
TCTTCCGCGGCTAATTTCTGCTGGGCGGAGGCTCTCACTCAATGTTTCCGCAACATCTTTGGATGCTCAT
TCATTGCCGGTCTGCGCTTCTTGGCGAGGATCCGCTCTTTAAGCGAGCGCCACGAATCTGGCCATGCTCAT
TAATCGCGCGCTTGGCTTCTTGGCGGGGTCCATCTTCAATGCCGCTGCCGTGAATCTTGGCATGCTCAT
TCATAGTGGTTTCCGCTTCTGCTTCCGCGCTCATCTTACCGCGCGTGGCGCAAGAAATCATCATGCTAAT
TCATAGCCGGTATTTGCTTTTGGCTGGCGGCTCATCTTACAGCGCGTCCGCGCAAAATCATCATGCTCAT

430 440 450 460 470 480 490
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
CTCCGGTCTGCTATCTTGGCTTGGTTCTGCTATCGGTTTCTTAATCAGGCTGTCTCCACTCTACCTCTCTGAG
TATCGGTCGCATGCTCTGCGGTGTTGGGTGTTGGGTTTCTAATCAGTCAGTCCCCCTGTATCTGTGCGAG
TATTGGTCTGCTCTCTCTTGGAGCTTGGTGTGGATTCCGCAATCAGTCGGTACCCCTGTATCTGTGCGAG
CATAGGCGCGCTCTCTGCGGTGGGTGTTGGGTGTCGGATTGCTAACCAGGCTGTTCGGTGTACCTCTCTGAA
CATCGGCGCGCTCTCTGCTGCGGTGGGTGTCGGATTGCTAACCAGGCTGTTCGGTGTACCTCTCTGAG

500 510 520 530 540 550 560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
ATGGCTCCATACAAATACAGAGGAGCTTTTAAACATTTGGTTTCCAGCTCTCAATTTACAAATCCGGATCCCTCG
ATGGCGCGTCTGCTAGGCTCAGGGGAGGCTCTCAACATCATGTTTTCAGCTGGCAACCCCATCCGCATTTCTCG
ATGGCGCGTCTGCTAGGCTCAGGGGAGGCTCTCAACATCATGTTTTCAGCTGGCAACCCCATCCGCATTTCTCG
ATGGCACTCTCAGAGTGGCGAGGTTGGGCTCAACATCTCTTCCAATTTGGCGGTGACCATTTGGCATCTCTGT
ATGGCGCGTCTCAAGTGGCGAGGCGCTTAAATATCTTTTCCAGTTTGGCGGTGACCATCCGCATCTCTCT

570 580 590 600 610 620 630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
TCGCCGAGTGTCTAAATCTACTTCTTCCGCAACATCAAAAGGCGCTTGGGGATGGCGGTCTAGTCTCTCGAGG
CTGCTAACATAATCACTACGGCACCGACAAATTT---GCACTCTGGGGATGGCGTCTCTCTCTGGGGTT
CTGCTAGCTCTATCAATTACGGCACTGCTCAAGT---TCATCTCTGGGGATGGCGTCTCTCTCTGGGCTT
TCGCCAGTCTCTGAACTACGGCACAGAGAGAT---GGCTCGCAACGGGTGGCGTCTTTCTCTCTCGCAT
TCGCAATCTCTGAACTACGGCACGAAAGAT---GGCGCGAATGGATGGCGTCTCTCTCTCTCTCTCT

640 650 660 670 680 690 700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

```

1cl|X55350.1_cdsid_CAA39037.1
 1cl|XM_001753184.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001753251.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001768173.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784990.1_cdsid_XP_00

710 720 730 740 750 760 770
 GAGCGTGGCCAAACAGAGAGAGCCAAACCAAGCTCAGACGAATCCGTGGTCTCGATGACGTGAGCCAAAG
 GAGCGAGGCAAGACTGAGCAAGGCCGCCACATCTTAGCCAGATCCCGTGGCACTGAGGACGTGAATCTCG
 GAGCGAGGCAAGACTGAGCAAGGCCGCCACATCTTAGCCAGGATCCCGTGGCACTGAGGACGTGAATCTCG
 CAACCGGGCAAGCAGAGAGGCCGCCGCCAGGTCCTAGCCAGGATTCGTGGCTCGACACACATTTGAGGAAG
 CAGCGTGGCAAGCATGAAGAGGCCGCCAGGTTCTTCGCAAAATTCGAGGCATTGAAAACGTAGAAAG

780 790 800 810 820 830 840
 AGTTTGACGATTGGTGGCCGCTAGTAAAGAGTTCGAGTCGATAGAGGCCCGTGGAGAAAACCTCTCTCG
 ACTATGACGACATAGTGGAGGCCAGGAGATTGACAGAGAGTGCAGCATTCACATTTTGAATACTTCTGCA
 ACTACGACGACATGGTGGAGGCCAGGAGATTGACAGAGAGTAAAGGCCCATTTTGAATACTTCTGCA
 AGTTTCGACGACATCTTATTGGAGTAACGAAGCCGCTCCGTGAAGCACCCCTTTCGCAATATCTTGAA
 AGTTTCGACGACATCTTATTGGAGTAACGAAGTTCGCGCCGTGAAGCATCTTTCTCGCAACATTTCTGAA

850 860 870 880 890 900 910
 CCGCAAGTACCGACCAATCTCACAAATGGCCCTTATGATTCGGTTCTTTCAGACAGCTAACCGGAATCAAT
 AAAGAGGAACAGGCCGCCAGCTGGTGTAGGCCATCTCCATTCCCTTTTTTCCAGCAGGTCACTGGTATCAAC
 AAAGAGGAACAGGCCGCCAGCTGGTGTAGGCCATCGCCATTCCGTTTTTCCAGCAGGTCACTGGGATCAAT
 ACGCCGGAACCCGCCCTCAGCTGGTCAATCTCCATGGTCTTTCAGTTTTTCCAGCAATTCACCTGGAATTAAT
 ACGCCGGAATCTCCACAGCTTGTCAATATCCATGATCTTCAAATTTCTTCCAGCAGTTCACTGGAATCAAT

920 930 940 950 960 970 980
 GTGATTATGTTTACGCTCCGCTTTTGTTCAAACCACTTGGTTTCACGACGATGCTTCTCTATCTCCG
 GCCATCATGTTTACAGTCCCGTGGTCTTTCATTCATCCGATTTGGGACGAAAGGTCCTCTGTAATCAG
 GCCGTATGTTTACATCCCGTGGTCTTTCAAACCACTGGGTTCACTACAAACGATCCCTGTACTCAG
 GCTATTATGTTTACGCTCCGCTTCTTGTTCAGACGCTGGGATTCGGGATTCGCTTCACCTTACTCTG
 GCAATCATGTTTACGCTCCGCTTTTGTTCAAACCTTGGGATTCGCAAGCTCCGCTCTCTTACTCCG

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 CTGTGGTCACTGGCTCCGTTAAAGTTCGGCCACGCTTGTTCCTATCTACCGTGTTCACAGATGGGGACG
 CCGTCATCAGAGTGTTCGTAACGTTGGTGGCCACACTGGTATCGTTGGTGTGGTGGACAGTGGGGTCG
 CCGTCATCAGGGGCCGCCGTAAGCTGGTGGCCACACTGGTGTCTGTTGGTGTAGTGGACAGTGGGGTCG
 CTGTCACTGTTGGAGCCGTGAATGTGTGGCCACTTGCCTCCCTATCGCTGTGTGGATCGATTCGCTCG
 CTGTCACTGTCGGTGGCGTGAATGTACTAGCCACTTGCCTTCCTACTCTTGTAGATCGCATCGCTCG

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 TCGGTTCTCTTCTTCTGAAGGAGGTACACAAATGCTTATATGCCAGGCTGTGTGTTGAGCTTGCCATAGGG
 GCGCGTCACTTCTTCTGAGGGGGGAACGCAGATGCTCTTGTGCCAGGTGATCATCGCATCATCTTGGCA
 GCGCGTCCATTCTCTGAGGGGGGAATGCAGATGCTCATCAGCCAGTGAATCATCGCATCATCTTGGCT
 ACGATGTTGCTCTTGAAGCTTGCATCCAAATGTTCTTAGCAGACAGCGGCAATTGCAATATCTTGGCG
 GCGCTGGTGTCTACTCGAGCCCTGCATCCAAATGTTCTGTCGACAGACGGGCAATTGGGATCATCTTCTGCG

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 GCCAAGTTTGGGCTAGACGGGACCCCTGGTGAAGTACCAAACTGGTATGCTATAGTCTTGTAAACGTTCA
 TTCAAGTTTGGAG-----GAACA-----AACGAGCTGTCTAAGGGTGAAGGCATGGCCATTGTAAATATTGG
 CTGAAGTTCAAGC-----GAACA-----AACGAGCTGTCTAAGGGTGAAGGCATGGCCATTGTAAATATTGG
 GCGGGAATTGAAG-----GGAC-----CGAGATGCCGACTATCTGGGATGGAATCGCGTGGTATTGA
 TTAGGATTGGATG-----GCAA-----TTAATGCAACCTACCTGGGATGGAATCTGTGGCGTTGA

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 TTTGCACTATTTGGGCGGTTTTCGCGGTTCTGGGGCCCACTAGGCTGGTATAGTACCGAGTGAATCTCT
 TCTGCATATATTTGGCGGATTTTCGCGGTTCTGGGGCCCACTAGGCTGGTATAGTACCGAGTGAATCTCT
 TCTGCATATATTTGGCGGATTTTCGCGGTTCTGGGGCCCACTAGGCTGGTATAGTACCGAGTGAATCTCT
 TTTGCGTGTATCTGTCTTTTCGCGGTTCTGGGGCCCACTAGGCTGGTATAGTACCGAGTGAATCTCT
 TCTGTGTGTATCTGTCTTTTCGCGGTTCTGGGGCCCACTAGGCTGGTATAGTACCGAGTGAATCTCT

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 CCGGTTGGAGATTAAGGTCGGCGCGCAGAGTATCACCGTGTCCGTGAACATGATCTTTCACGTTCTATATC
 CCCCATCGAGACACGCTCTGCAAGGTATGGCCATCACAGTCTCCGTGAACCTCTCTTTCACGTTCTATATC
 CCCCATCGAGACACGCTCTGCAAGGTATGGCCATCACAGTCTCCGTGAACCTGATCTTTCACGTTCTATATC
 CCCCATTGGAGACGCTCTGCAAGGTATGGCCATCACAGTCTCCGTGAACCTGATCTTTCACGTTCTATATC
 CCCCATTGGAGACGCTCTGCAAGGTATGGCCATCACAGTCTCCGTGAACCTGATCTTTCACGTTCTATATC

	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
lcl X55350.1_cdsid_CAA39037.1	GGGCAA	TTCTTCTGACGATG	CTTTGTCATTGGAAGTTTGGGTATTCCTTGT	TTTCGCCCTTTTCCTGG			
lcl XM_001753184.1_cdsid_XP_00	GCGCAAG	CGTTCTTGTACGATTTTGTGTCACTTCGAGTACGGGATCTTCCTGTTCTTTCAGGATGGGTGG					
lcl XM_001753251.1_cdsid_XP_00	GCGCAAG	CGTTCTTGTACGATATTGTGTCACTTCGAGTACGGGATCTTCCTGTTCTTTCAGGATGGGTGG					
lcl XM_001768173.1_cdsid_XP_00	GCGCAAG	GTTCCTGTCTCAATGTTGTGCGCGTTCAAGTGGGGATCTTCCTCTTCTTCGCCCGCTGGGTGG					
lcl XM_001784990.1_cdsid_XP_00	GCCCAA	GTTCCTGTCTCAATGCTGTGTGACATTCAGTGGGGATCTTCCTCTTCTTCGCTGCTTGGGTGG					

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
lcl X55350.1_cdsid_CAA39037.1	TGGTGA	TGTCGATCTTTGTATACATTTTCTTGCCGGAGACGAAAGGATTC	CCGATAGAGGAGATGGGTCA				
lcl XM_001753184.1_cdsid_XP_00	TGATCATGACTGTCTTCATAGCATTTGTTTTCGCCGAAACGAAGGGAGTTCCGATCGAGGAGATGATTTA						
lcl XM_001753251.1_cdsid_XP_00	TGATTTATGACTGTCTTCATAGCATTTGTTTTCGCCGAAACGAAGGGTTC	CGATCGAGGAGATGATCTA					
lcl XM_001768173.1_cdsid_XP_00	TGGTGA	TGTTCCCTTTTACGTACTTTTTTAATTC	CCGAGACGAAGGGATCCCATCGAGGAGATGGATCT				
lcl XM_001784990.1_cdsid_XP_00	TGGTCA	TGTTCCCTGTTCACATTTTTTTCATCCCGAGACCAAGGGATTC	CCCATCGAGGAGATGGACCT				

	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
lcl X55350.1_cdsid_CAA39037.1	AGTGTGGAGGTCACACTGGTAT	TGGTCAAGGTTTGTGGAGGA	TTGGTGA	GTATGGAA	TGCGCTTGAG		
lcl XM_001753184.1_cdsid_XP_00	TGTGTGGCGGGCGCATTTGGTTCTGGGAAGCTGATCATGCCCT	CTGACGA	CTGCCTTCCTTTGAGGAA				
lcl XM_001753251.1_cdsid_XP_00	CGTGTGGCGGGCAGCATTTGGTTTGGGAAGCGCATCGTCCCG	CTGACGA	CTGCCTGTTTCATGGTGAA				
lcl XM_001768173.1_cdsid_XP_00	CGTGTGGACCAAGCACTGGTTCTGGGAAGCGCTACGTCCCTTACCCCTGAGACTCTCGCTCACAC	CAGCGGC					
lcl XM_001784990.1_cdsid_XP_00	CGTCTGGA	CTCGGCACCTGGTTCTGGGAAGAAATTACGTCCCGATCCCGACACTCTCGGCATCTTAATGGC					

	1550	1560	1570	1580	1590	1600
lcl X55350.1_cdsid_CAA39037.1	ATGGGC	AAGAACAGTAA	CCAAAGCTGGAACGAAGCATCTTTGA			
lcl XM_001753184.1_cdsid_XP_00	AAGCCCACGATCGTTTCACTAG					
lcl XM_001753251.1_cdsid_XP_00	AAGCCCAGGTTGCTGATTAG					
lcl XM_001768173.1_cdsid_XP_00	ATCCCCATGGGAGATATGAAGCTCAGCAAGCTGGAGAA	TGGCTCCGCAAA	TGGCCACAAACTGTAA			
lcl XM_001784990.1_cdsid_XP_00	ATCCCCATGGAGG	CCATGAAGACCCAGCAAGCTTGAGGATGGCGCTGCGAACGCCACAAACTCTGA				

Alineamiento NCED3 CLUSTALW

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

NCED3      ATGGCTTC-TTTCACGGCAACGGCTGCGG-TTTCTGGGAGATGGCTTGGT
Ppa173118  ATGCCATC-----TGAGC--CATCGACTACCCG-----GTTGCAG
Ppa57876   ATGGGAA-----C--AAA-GGTT-CCTA-----TTTCA-
Ppa58869   ATGGCTGAGGTTCACTGGAGG--AGAGGGCTATCAG----TGGCTGCGT
          ***                               *  *  *

```

```

NCED3      GGCAATCATACTCAGCCGCCATTATCGTCTTCTCAAAGCTCCGACTTGAG
Ppa173118  C-C-CTTGGCACCCAAG-ACAA---GGC--ACCTCAAC--TTCGC-----
Ppa57876   -----AAAGGATTTGTT-----GC-----
Ppa58869   C-CACGCAGAACCCGTCGCCATGG---GTTGCGGAAC--CGGATGTG--

```

```

NCED3      TTATTGTAGCTCCTTACCTATGGCCAGTCGTGTCACACGTAAGCTCAATG
Ppa173118  -CCAGAAAA-----TCGC-----GGACA-----AGGTG
Ppa57876   -----
Ppa58869   -----AAAGAA-----G-GGGATAGGG-AGCGGGATG

```

```

NCED3      TTTCATCTGCGCTTCACACTCCTCCAGCTCTTCATTTCCCTAAGCAATCA
Ppa173118  ATC-----GAAG-----CC--GT-GGAGAA--GAATTT
Ppa57876   -----AAAA--GAT--
Ppa58869   ATGGTTATGGGGCTGGCAGC--T-TAAATCATG--TTTACTA--CAATCC
                      *      *

```

```

NCED3      TCAAACTCTCCCGCCATTGTTGTTAAGCCCAAAGCCAAAGAAATCC--AAC
Ppa173118  GGAGAAATC-TG---CAT-TTGGGAAATCGTG-----
Ppa57876   -----GTC-TT---C-----AAATCA-----
Ppa58869   GAAGAAGGTTG---AGT-TTAGGAGGCCGAAGGTTGGTAGCTGGGCGGC
                      *      *

```

```

NCED3      ACTAAACAGATGAATTTGTTCCAGAGAGCGGCGGCGGCAGCGTTGGACGC
Ppa173118  -----
Ppa57876   -----
Ppa58869   G-TCGGTGTGTGATTTTGTGTT-GAGAGGGCGGTAGTGTGGGCGTTTGATGC

```

```

NCED3      GCGCGAGGGTTTCCTTGTCAGCCACGAGAAGCTACACCCGCTTCCTAAAA
Ppa173118  -----AAC-----CGCTGCCATCCA
Ppa57876   -----AAT-----T-----
Ppa58869   C--G---G-----TCTCAGCGATAAGAAGGCGTACTTG-----
                      *

```

```

NCED3      CGGCTGATCCTAGTGTTTCAGATCGCCGGAATTTTGCTCCGGTGAAATGAA
Ppa173118  CAGTGGATCCTCACGTGCAACTGGAGGGCAATTTCTTCCCAGTTGAAGAA
Ppa57876   TTTTATGATCCTCATGTGCAATTGGAAGGCAACTTCTCCCCAGTCGATGAA
Ppa58869   -----TTGTTC-----GATAACTATGCGCCCGTGGAGGAA
          ** *                      *  ** *      ** ** * ***

```

```

NCED3      CAGCCCGTCCGGC--GTAATCTTCCGGTGGTCGGAATACTTCCCGATTCC
Ppa173118  TCACCCGCGCATC--ACAATTTGGAAGTGGAGGGCAACCTTCCAGAATGC
Ppa57876   TCCCCGGCGCGGC--ACAATTTGAAGGTAGAAGGCAATCTCCAGATTGT
Ppa58869   TTGG--GTCCGGTGGGGGATTTGCCCATTAATCGGCACCATTCGGGAATGT
          *  *                      *  ** *      * ** ** *

```

NCED3
 Ppa173118
 Ppa57876
 Ppa58869

ATCAAAGGAGTGTATGTGCGCAACGGAGCTAACCCACTTACGAGCCGGT
 TTGGAAGGCGTGTATGTGCGAAATGGCCCGAACCCCTCAGTTTTTCCCAAC
 TTGGAAGGCGTGTATGTGCGCAACGGACCCAAACCCCAAGATTTTTTCCAAAC
 TTGAATGGCGAGTTCGTGCGTGTGGGCCCCAACCCAAAGATTGAAACCT--

* * ** * ** * * * * * * * * * * *

NCED3
 Ppa173118
 Ppa57876
 Ppa58869

GACAGGTCACCACTTCTTCGACGGAGACGGTATGGTTACGCCGTCAAAT
 AGGCCGTCACCATCTGTTCGATGGCGATGGCATGTTGCATGCTGTGAGCT
 AGGTCGTCACCATCTGTTCGATGGCGATGGCATGTTGCATGCTGTGAGCT
 -----ATCT-CTGGATATCACT-GGATGATGCATGGTTTAAACA

* * * * * * * * * * *

NCED3
 Ppa173118
 Ppa57876
 Ppa58869

TCGAACACGGTTACGCTAGCTACGCTTGCCGGTTTACTCAGACTAACCGG
 TCAATGGAGGGTCGGTCAGCTATGCGTGTGGTACACGCGTACCTATCGT
 TCAATCAAGGGTTGGTCAGCTACGCCTGCCGGTACACGCGCACATATCGG
 TTAAGGATGGGAAAGCCACATATGTGGCCCGATTCTGTA AAACTTCACGG

* * * * * * * * * * *

NCED3
 Ppa173118
 Ppa57876
 Ppa58869

TTTGTTACGGAACGTC AATTGGGTCGACCGGTTTTCCCCAAAGCCATCGG
 TTCATGGAGGAGGAGAAGCATGGAAGGGCATTCTTCCCCAAGCCAATTGG
 TTCATGGAGGAGGAGAAGCATGGGCGAGCATTCTTTCCGAAGCCAATTGG
 TTACAGCAAGAGGAATATTACGGTGCAGCCAAATTTTTGAAG--ATTGG

** * * * * * * * * * *

NCED3
 Ppa173118
 Ppa57876
 Ppa58869

TGAGCTTACGG-CCACACCGGTATTGCCCGACTCATGCT--ATTCTAC
 GGAGCTGCACGG-ATATGGCGCGTGCGCAAGTTGATGAT--GTATTGG
 AGAGCTGCACGG-ATATGGCGGTGTGGCGAGGTTGATGGT--GTACTGG
 ACAACTGAAAGGGCTTCGGGGGCTATTTTACATTGCTGTGGA AAAACTAC

* ** * ** * * * * *

NCED3
 Ppa173118
 Ppa57876
 Ppa58869

GCCAGAGCTGCAG-CCGGTATAGTCGACCCGGCACACGGAACCGGTGTAG
 GCTCGGTCTTTGT-TCGGAATTTTGGATGCATCAC AAGGCATGGGAATGG
 GCTCGGTCCCTGT-TTGG AATATTGGATGCATCGCAAGGGATGGGAATGG
 GA-----CTTAGCTTGGGCGTCCTTGACGAATCCAATGGCTTATATGGAG

* * * * * * * * *

NCED3
 Ppa173118
 Ppa57876
 Ppa58869

CTAACGCCGGTTTGGTCTATTTCAATGGCCGGTTATTGGCTATGTGCGGAG
 CAAATGCAGGGCTTGTATACTTCAACTCAAGGCTACTGGCTATTTCCGAG
 CAAATGCAGGGCTAGTGTACTTCAACAAGCGGTTGCTCGCGATTTCCGAG
 GCAACACAGCCTTCGTGTATCACAATAATAGGCTTCTTGCGTTACACGAG

** * * * * * * * * *

NCED3
 Ppa173118
 Ppa57876
 Ppa58869

GATGATTTACCTTACCAAGTTCAGATCACTCCCAATGGAGATTTAAAAAC
 GACGACTTGCTGTGCAAGTGCGCATCACGGAAGACAATGACATCGAAAC
 GATGACCTTCCGTCGAAGTGCGCATCACGGAAGACAATGACATAGTGAC
 ATCGACAAACCTTATGCTATCAGGGTGTGGACGATGGGGACCTGCAAAC

** * * * * * * *

NCED3
 Ppa173118
 Ppa57876
 Ppa58869

CGTTGGTCGGTTCGATTTTGGATGGACAATTAGAATCCACAATGATTGCCC
 TGTGGGACGGTATGATTTCCATGGACAGCTGACGCATTCCATGATCGCGC
 GGTGGGACGGTACGATTTCCATGGGACAGCTCACACATTCCATGATCGCGC
 AATGGGCCTCCAAGATTACGAGCAGAGACTGGGACATTTCATTACAGCCC

* ** * * * * *

NCED3
 Ppa173118

ACCCGAAAGTCGACCCGGAATCCGGTGAACCTCTTCGCTTTAAGCTACGAC
 ACCCAAGATTGATCCACATACTGGAGAGCTCTTCAGCCTGAGTTACAAC

Ppa57876 ACCCCAAGATTGATCCACACACAGGAGAGCTCTTTAGCCTTAGTTACAAC
Ppa58869 ACCCAAAAATAGATTCCACCACAGGAGAATTGTTTATGTTTGCATACCAA

NCED3 GTCGTTTCAAAGCCTTACCTAAAATACTTCCGATTCTCACCGGACGGAAC
Ppa173118 GTTTTGTCTAGCTCCATATTTGAAGTACTTGATATTCTCGGCAGACGGTGA
Ppa57876 GTATTGTCTGGCGCCGTAAGTAAATACTTGATATTCTCAGCGGATGGCGA
Ppa58869 GA--GAAGGTCCCATATCTGATCTATCGTGTAATATCCAAGAATGGTAC
* **

NCED3 TAAATCACCGGACGTC-GAGATTCTAGCTTGATCAGCCAACGATGATGCAC
Ppa173118 GAAGAAGGCTGAGGTGCCGGTCGCA-TTGCCCGAGGCAGCCATGACGCAT
Ppa57876 AAAGAAGGCCGAGGTACAGTTACA-TTAGACGAGGCAGCCATGACGCAT
Ppa58869 TCTTCGGGAGCCGGTGCCATTACC-ATCCCCGAATGCGTCATGATGCAC
* * * *

NCED3 GATTTCTGCGATTACAGAGAACTTCGTCGTCGTACCTGACCAAGTCGT
Ppa173118 GACTTCGCAATCACGAGAACTTTGTTGTCTATCCCCGACCAAGCAGATAGT
Ppa57876 GATTTTGCATCACGAGAACTTTGTGGTAATCCCCGACCAAGAGATAGT
Ppa58869 GACTTCGCCATCACGAGAACTATGCCCTGTTTATGGACCTTCTCTTCG
* * * * *

NCED3 TTTCAGCTGCCGGAGATGATCCTCGGTG-GGTCTCCGGTGGTTTACGAC
Ppa173118 GTTCCGCCTGAAGGAAATGCTGACGGGTG-GTTCCCCGGTTGTTCTAGAC
Ppa57876 TTTCCGTCTGAAGAGATGCTGACGGGCG-GTTCGCCTGTTGTTCTAGAC
Ppa58869 ATTCACCCCCACGGGTTTGCCAAAAGGGGAGTTTCAATTT-TCAAGTTTGAT
* * * *

NCED3 AAGAACAAGGTCGCAAGATTCTGGGATTTTAGACAAATACGCCAAGATTTC
Ppa173118 CCGAAGAAGACCCCGCGTTTTTGGTGTGATGCCCCAAGTATGCAACCTCGGA
Ppa57876 CCGAAGAAGACCCCTCGGTTTGGCGTGATGCCCCAAGTACTCAACCTCGGA
Ppa58869 CCCAGCAAAGAATCACGGTTTGAATACTGCCCCGGTACGCCACCGATGA
* * * *

NCED3 ATCGAACATTAAGTGGATTGATGCTCCAGATTGCTTCTGCTTCCATCTCT
Ppa173118 GGACGAATTGAAGTGGATTGGAGTTCTGATTGTTTTTTCTTCCACTTGT
Ppa57876 GGAGGAGTTACAGTGGATTGACGTGCCTGGCTGTTTTTTCTTTCATTGT
Ppa58869 GTCGCAGATTCTGCTGGTGTAAAGATCCCCACTTGTTTCTATCTTTCACAAATG
* * * *

NCED3 GGAACGCTTGGGAAGAGCCAGAAACAGATGAAGTCGTCGTGATAGGGTCC
Ppa173118 ACAACGCGTGGGAAGAA-----GGTGACGAAGTGGTGGTTATTGGCTCC
Ppa57876 ATAACGCGTGGGAGGAC-----GGCGACGAGGTGGTTGTCAATTGGCTCG
Ppa58869 CGAATGCATGGGAAGAG-----GGGGATGAAGTTGTGCTTATAACGTGC
* * * *

NCED3 TGTATGACTC-CACCAGACTCAATTTTCAAC--GAGTCTGAC--GAG-A
Ppa173118 TCCATGACCC-CCGCCGATATCATTTTCAAG--ACATCG-----GA---
Ppa57876 TCCATGACTC-CCGCCACATCATTTTCAAG--ACTTCG-----GA---
Ppa58869 CGAATGCCCGGCATCGAACTTGACTTGAATTGAATTCAAGAAAGAAAA
* * * *

NCED3 -ATCTCAAGAG-TGT-----CCTGTCTGAAATCCGCCTGAATCTCAAA
Ppa173118 AGTGCCGCGAGCTAT-----TTTGACCGAGGTGCGGCTCAACCGTCGC
Ppa57876 GGTTCGCGCGCTAT-----TTTGACCGAGGTGCGGCTCAACCGCCGC
Ppa58869 GGCTTGGAGTG-TGTTCTCCAAATTATTCGAGTTTAGGATGAACCTTAAG
* * * *

NCED3 ACCGGTGAATCAACTCGCCGTCCGATCATCTCCAACGAAGATCA-ACAAG
Ppa173118 ACGGGAACATCCACCAAACG-----CG-----AGCTCGCAGAAT
Ppa57876 ATGGCGACCTCCACGAAACG-----CG-----AGCTCGCTGACT
Ppa58869 ACCGGAGAGGTGAAGCAACG-----AC-----AACTCTCAAGTT
* * * ** * **

NCED3 TCAACCTCGAAGCAGGGATGGTCAACAGAAACATGCTCGGCCGTAAAACC
Ppa173118 TGAACCTTAGAAGTGGGAAAAATGAACCCTCAATTTCGTAGGGGTAAAGACC
Ppa57876 TGAACCTTAGAAGTGGGAAAAATGAATCCCCAATTTCGTTGGCGTAAAGACC
Ppa58869 TAAGCACAGATTTTCCCAAGATCAACGAGGAATACACTGGCAGAAAGACC
* * * ** * * * * ** ** ***

NCED3 AAATTTCGCTTACTTGGCTTT--AGCCGA---GCCGTGGCCTAAAGT--
Ppa173118 CAATATATGTACCTCGCTAT--CGTTGA---ACCATGGCCGAAGGT--
Ppa57876 CAATTTCATATACCTCGCCAT--TGTTGA---ACCATGGCCGAAGGT--
Ppa58869 CGGTTTGTCTACTGTGGAGTATTTGACGAGCTAAACAGGGTAATAGGTGT
* *** * * * * * ** * **

NCED3 -----CTCAGGATTTCGCTAAAGTTGATCTCA
Ppa173118 -----ATCGGGCATCGCCAAGGTGGACTTGC
Ppa57876 -----GTCGGGTATTGCCAAGGTGGATTTGC
Ppa58869 TGTC AAGTATGACCTTGACGAGGAGCCATGCCTCACGACAGGTGACCTGC
* * * * * * * *

NCED3 CTACTGG--AGAAGTTAAGAAAC--ATCTTTACGGCGATAACCGTTAC
Ppa173118 AATCGGG--CCAAGTGGTGGCCCGACACAACACTACGGCACGCATCGTTAC
Ppa57876 AATCGGG--TCAGGTGGTGGCTCGCCATGACTACGGCACGGATCGTTAC
Ppa58869 AAAAGGGTGGCAACGTGGCGGGAGTGTTACGCCTTGGACCAAGGTTCGCTCA
* * * * * * * *

NCED3 GGAGGAGAGCCTCTGTTTCTCC-CCGGAG-----AAGGAG-GAGAGGA
Ppa173118 GGC GGCGAGCCCGTGTTTCGTGCCACGGA CTTCGACCCAGTGCCCCAGA
Ppa57876 GGTGGTGAAGCCCGTGTTTCGTACCAACGACCTCGGATTCTAACGCCGCTGA
Ppa58869 GGAAGCGAGGCAATTTTTGTGCCACTCAAGCGTGGTATGGAGGGACCCGA
* * * * * * * *

NCED3 AGACGAAGGATACATCCTCTGTTTTCGTTACGACGAGAAGACATGGAAAT
Ppa173118 AGATGATGGATTTTTTGCTTGCA TTTTGCCACAATGAAGACTCCGGGGAGT
Ppa57876 AGATGATGGATTTTTTGCTTGCGTTTTCGCAATGAAGCCTCTGGAGAAT
Ppa58869 AGACGACGGCTACTTGATCCTGTTTGTGTACGATGAGAACAAAGGGACAT
*** ** * * * * * * *

NCED3 CGGAGTTACAGATAGTTAACCCGTTAG----CT-TAGAGGTTGAAGCA
Ppa173118 CGCAACTGCTCGTTCTCGACGCAGCCACCCCACTCTGGAGCAAGTGCGC
Ppa57876 CGGAGCTGCTCGTTCTCGATGCAGCCACCCCTCGCTGGAGCCAGTGCGC
Ppa58869 CAGAAGCGGTGATCATTGATGCCAAGACGATGGCTGCAGATCCCGTGGCA
* * * * * * * *

NCED3 ACGGTTAAACTTCCGTCAAGGGTTCCGTACGGATTTACGGTACATTTCAT
Ppa173118 TCTGTCAGTCTGCCCTCTCGAGTCCCCTACGGATTCCACGAGCATTCAT
Ppa57876 TCAGTCAAGCTGCCCTCCCGAGTCCCCTATGGATTCCATGGAGCGTTTCAT
Ppa58869 ACCGTGAAATTGCCAGACGGGTTCTTACGGATTTTCATGCCATTTTGT
* ** * * * * * * * * * * * *

NCED3 CGGAGCCGATGATTTGGCGAAGCAGGTCGTGTGA
Ppa173118 CCCTGCGGCTGATTTGCTGCA-----TTAA

Ppa57876
Ppa58869

CCCTGCGGCTGATTTGTTGCA-----CTAA
TAGCCAGGAGCAACTGATGCAACA--GGCATGA
 * * ** * * * *

Alineamiento NCED3

```

      10      20      30      40      50      60      70
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  ATGGCTTCTTTTACGGCAACGGCTGCGGTTTCTGGGAGATGGCTTGGTGGCAATCATACTCAGCCGCCAT
1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00  -----

      80      90     100     110     120     130     140
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  TATCGTCTTCTCAAAGCTCCGACTTGAGTTATTGTAGCTCCTTACCTATGGCCAGTCGTGTGCACAGCTAA
1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00  -----ATGGCTGAGGTTCACTGGAGGAGAGGGCTATCAGTGGCTG
1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00  -----

      150     160     170     180     190     200     210
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  GCTCAAATGTTTTCATCTGCGCTTCACACTCCTCCAGCTCTTCATTTCCTTAAGCAATCATCAA-ACTCTCC
1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00  CGTCCACGCAGAACCCCTCGCCATGGGTTTGCAGAACCGGATGTGAAGAAGAGGGATAGGGAGGGGATGA
1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00  -----ATGCCATCTGAGCCATCG-ACCTACCC

      220     230     240     250     260     270     280
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  CGCCATGTTTGTAAAGCCAAAGCCAAAGAAATCCAAACAATAAAACAGATGAATTTGTTTCCAGAGAGCGCGG
1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00  -----ATG
1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00  TGGTTATGGGGCTGGGCACTTAATCATGTTTACTACAAATCCGAAGAAGGTTGAGTTTAGGAGGGCCGAAG
1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00  GATTGCAAGCCCTTGGCACCCAGACAAAGGCACCTCACTTCGCCAGAAAATCG--CGGACAAAGGTGATC

      290     300     310     320     330     340     350
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  GCGGCAGCGTTGGACGGGCGCGAGGGTTTCTTGTCAAGCCACGAGA--ACCTACACCCGTTTCCATAAA
1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00  GGAACAAAGGTTCCCTATTTCAAAGGATT--TGTT--GCAA--AAGATGCTTCAAAATCAAT
1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00  GTTGGTAGCTGGCGGGCTCGGTCTGTGATTTTGTGTGAGAGGGCGGTAGTGTGGGCGTTTGTATGCCGGTC
1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00  GAAGCCCTGGACAGAAATTTGCAGAAATCTGCAATTTG--GGA--ATCGTGAACCGCTGCCATCC

      360     370     380     390     400     410     420
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  ACGGCTCATCCTAGTGTTCAT--GATCCCGGAATTTTGTCTCCGGTGAATGAACACCCCGTCCGGGGTAT
1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00  TTTTATAGATCCCTCATGTGCA--ATTGGAAGGCAACTCTCCCCAGTCCATGAATCCCGGGCGGGGACA
1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00  TCAGC--GATAAGAGGCGTACTTGTCTTTCGATAAATATGGCCCCGTGGAGCAATTTGGTCCGGTGGGG
1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00  ACAGTGCATCCTCACGTGCA--ACTGGAGGGCAATTTCTTCCAGTTGAAGCAATCAACCCGGCATCACA

      430     440     450     460     470     480     490
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  ATCTTCCGGTGTCTGGGAAACTTCCCATTCCATCAAGGAGTGTATGTGCGCAACGGAGCTAACCCACT
1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00  ATTTCAAGGTACAAAGCAATCTCCAGATTGTTTGGAGGGCTGTATGTGCGCAACGGACCCCAACCCCA
1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00  ATTTGCCCATTATCCGGACCAATCCGGAATGTTTGAATGGCGAGTTCGTGCGTGTGGGCCCAACCCA--
1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00  ATTTGGAGATGCGAGGGCAACCTTCCAGAAATGCTTGAAGGCGTGTATGTGCGCAATGGCCCACCCCTCA

      500     510     520     530     540     550     560
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  TCACGAGCCGGTGACAGCTCACCACTTCTTCGACCGGACACGGTATGCTTCAAGCCGTCAAATTCGAACAC
1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00  GATTTTTCCAAACAGGTCTGTACCACTCTGTTTGTATGGCGATGGCATGTTGCATGCTGTGAGGCTCAATCAA
1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00  -----
1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00  -----AGATTGAACCTATCTCTGGATATCACTGG-ATGATGCATGGTTTAAACATTAAAGAT
1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00  GTTTTTCCAAACAGGCGTCAACCATCTGTTTCCATGGCGATGGCATGTTGCATGCTGTGAGCTCAATGGA

      570     580     590     600     610     620     630
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  GGTTCAGCTAGTACGCT--TTGCCGGTTTACTCAGACTAAACGGTTTGTTCAGGAACGTCATTTGGGTCG
1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00  GGGTTGGTCTAGTACGCT--CTGCCGGTACACCGGCACATATCGGTTTCATGGAGGAGGAGAACGATGGCGG
1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00  ATGCCCTGGCAGTATCCGGGGCCCTGTATAGCACCCGAGAAAGATCCAAAACAGGGGGCAATGCCGCAC
1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00  GGGAAAGCCACATATGT--GGGCCGATTCGTGAAAACCTTCAAGGTTACAGCAAGAGGAATATTACGGTGC
1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00  GGGTCGTCTAGCTATGC--GTCTCGGTACACCGGTACCTATCGTTTCATGGAGGAGGAGAAGCATGGAAG

      640     650     660     670     680     690     700
1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.  ACCGGTTTTCCTCCCAAGGCATCGGTGAGCTTACGGCCACACCG--GGTATTGCCCGGACTCA-TGCTATTCT

```

1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

710 720 730 740 750 760 770
 1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.
 1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

780 790 800 810 820 830 840
 1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.
 1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

850 860 870 880 890 900 910
 1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.
 1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

920 930 940 950 960 970 980
 1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.
 1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.
 1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.
 1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.
 1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.
 1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 1cl|AY056255.1_cdsid_AAL07104.
 1cl|XM_001765944.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001769256.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001770976.1_cdsid_XP_00
 1cl|XM_001784544.1_cdsid_XP_00

	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
1cl AY056255.1_cdsid_AAL07104.	TCAA	CGAGTCTGACGAGAA	TCTCAGAGTCTC	CTGTCTCAAA	TCCGCTGAATCTC		
1cl XM_001765944.1_cdsid_XP_00	TCAA	GACTTCGGA	GGTT	CCGCGGC	TATT	TTGACCGAGGTGCGGCTCAACCGC	
1cl XM_001769256.1_cdsid_XP_00							
1cl XM_001770976.1_cdsid_XP_00	GGAAATTGGAA	TCAAGAAAGAAAGG	CTGGAGTGTGTTCTCCAAAT	TATT	CGAGTTAGGATGAACCTT		
1cl XM_001784544.1_cdsid_XP_00	TCAA	GACATCGGA	AGTG	CCGCGAGC	TATT	TTGACCGAGGTGCGGCTCAACCGT	

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
1cl AY056255.1_cdsid_AAL07104.	AAACCCGGTGAATCAACTCGCGTCCGATCATCTCCACGAGATCA	CAAGTCAACCTCGAAGCAGGGA					
1cl XM_001765944.1_cdsid_XP_00	CGCATGGCGACTCCACGAAACGCGAGCTCGC				TGACTTGAACTTAGAAGTGGGA		
1cl XM_001769256.1_cdsid_XP_00							
1cl XM_001770976.1_cdsid_XP_00	AAACCCGGAGAGGTGAGCAACGACAACTCTC				AAGTTTAAAGACAGATTTCCTCCA		
1cl XM_001784544.1_cdsid_XP_00	CGCACGGGAACATCCACCAACGCGAGCTCGC				AGAATTGAACCTTAGAAGTGGGA		

	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
1cl AY056255.1_cdsid_AAL07104.	TGGTCAACAGAAACATGCTCGCGCTAAACCCAAATTCGCTTACTTGGCTTTAGCCGA						
1cl XM_001765944.1_cdsid_XP_00	AAATGAATCCCAATTCTGTTGGCGTAAAGACCCAAATTCATATACCTCGCCATTTGTTGA						
1cl XM_001769256.1_cdsid_XP_00							
1cl XM_001770976.1_cdsid_XP_00	GAAATCAACGAGGAAATCACTGGCAGAAAGACCGGGTTTGTCTACTGTGGAGTATTTGACGAGCTAAACAG						
1cl XM_001784544.1_cdsid_XP_00	AAATGAACCCCTCAATTCGTTAGGCGTAAAGACCCAAATATATGTACCTCGCTATCGTTGA						

	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
1cl AY056255.1_cdsid_AAL07104.		GCCGTGGCCCT	AAAGTCTCAGGATTCGCTAAAGTTGATCTCACTACTGGA				
1cl XM_001765944.1_cdsid_XP_00		ACCATGGCCG	AAGGTCTCGGCTATTGCCAAGGTGGATTTGCAATCGGGT				
1cl XM_001769256.1_cdsid_XP_00							
1cl XM_001770976.1_cdsid_XP_00	GCTAATAGGTGTGTCAAGTATGACCTTGACGAGGAGCCATGGCTCAGGACAGGTGACCTGCAAAAGGGT						
1cl XM_001784544.1_cdsid_XP_00		ACCATGGCCG	AAGGTATCGGGCATCGCCAAGGTGGACTTGCAATCGGGC				

	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
1cl AY056255.1_cdsid_AAL07104.	G	AACTTAAGA	AACATCTTTACGGCGATAACCGTTACGGAGGAGAGCCCTCTGTTCT	CCCGGA			
1cl XM_001765944.1_cdsid_XP_00	C	AGTGGTGGCTCGCCATCTACTAGGCACGGATCGTTACGGTGGT	GAGCCCGTCTTCGTACACGGA				
1cl XM_001769256.1_cdsid_XP_00							
1cl XM_001770976.1_cdsid_XP_00	GGCAACCTGGCGGGAGTGTTCAGCCTTGGACTAGGTGGCTCAGGAAGGAGGCAATTTTGTGCCATCA						
1cl XM_001784544.1_cdsid_XP_00	C	AACTGGTGGCCCGACACAACTACGGCAGCATCGTTACGGCGGCGAGCCCGTCTTCGTGCCACGGA					

	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
1cl AY056255.1_cdsid_AAL07104.	GAA	GGAGGAGAGGAAGACCAAGGATACATCCTCTGTTTCTGTTCAAGACAGAAACATGGAA					
1cl XM_001765944.1_cdsid_XP_00	CTCTGGATTTCTTAACCCCGCTGAAGATGATGGATTTTTCTTGGCTTTTGGCCAAATGAAGCTCTTGGAGA						
1cl XM_001769256.1_cdsid_XP_00							
1cl XM_001770976.1_cdsid_XP_00	AGCGTGCATATGACGGGACCCGAAGACGACGGCTTACTTCATCCTGTTTCTGTACGATGAGAACAAAGGGAC						
1cl XM_001784544.1_cdsid_XP_00	CTTCCGACCCAGTGTCCCAAGATGATGGATTTTTGCTTGCATTTTGGCCAAATGAAGACTCCGGGGA						

	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
1cl AY056255.1_cdsid_AAL07104.	ATCGGAGCTTACAGATAGTTAACGCCGTAGCT			TAGAGGTTCAAGCAACGGTTTAAACTTCCGTCA			
1cl XM_001765944.1_cdsid_XP_00	ATCGGAGCTGCTCGTTCTCGATGCAGCCACCCCTCTCCTGGAGCCAGTGGGCTCAGTCAAGCTGCCCTCC						
1cl XM_001769256.1_cdsid_XP_00							
1cl XM_001770976.1_cdsid_XP_00	ATCAGAACCGGTGATCATTTGATGCCAAGACGATGGCTGCAGATCCCTGGCAACCGTGAATTTGCCCA						
1cl XM_001784544.1_cdsid_XP_00	GTCCGCAACTGCTCGTTCTCGACGACGACCCCACTCTGGAGCAACTGGGCTCTGTCAAGTGTCCCTCT						

	1830	1840	1850	1860	1870	1880
1cl AY056255.1_cdsid_AAL07104.	AGGGTTCCGTACGGATTTCACGGTACATTCATCGGAGCCGATGATTTGGCGAAGCAGGTCGGTGA					
1cl XM_001765944.1_cdsid_XP_00	CGAGTCCCTATGGATTCCATGGAGCTTCATCCCTGCGGCTGATTTGTTCGACTAA					
1cl XM_001769256.1_cdsid_XP_00						
1cl XM_001770976.1_cdsid_XP_00	CGGGTTCTTACGGATTTTCATGCCCATTTTGTAGCCAGGAGCAACTGATGCAACAGGCATGA					
1cl XM_001784544.1_cdsid_XP_00	CGAGTCCCTACGGATTCCACGGAGCATTCATCCCTGCGGCTGATTGCTGCATTAA					

```

      10      20      30      40      50      60      70
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  ATGGACCCTTTAGCTTCCCAACATCAACACAAACCCTTGGAGAGATAATAACCAACCCCTAACCCATAATA
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00      ATGCAGTTTGGGCAGCGAGGGGATGACAAGCTGAGCCCAGCTTCTGGTC
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  -----

      80      90     100     110     120     130     140
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  ATCCTCAATCCGATTCCACCACCGACTCATCAACTTCTTCCGCTCAACGCCAAGCAGCAAGGCAAGGCTGG
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  ATATTGAGA--AGCCAGCCCGCAAACCCGGAAAGAGATGGAGAGAAAGGGGCAATG--AAAGGCAAGGGCGG
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00      ATGAAGAAAAAGGCTGAG--AAA--CGATTGCGGT
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  -----ATG--AAAGGCAAGGGCGG

      150     160     170     180     190     200     210
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  TCCGGACAACCTCAAGTTCCGTTACCCTGGCGTTCGACAAAGAAGCTGGGGCAAATGGGTTCGCCGAGATC
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  CCTTGAGAACGCTGCTTTCGAATTCCGTGGCGTTCGACAGAGAACTTGGGGCAAATGGGTTCGTAAGAAAT
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00  ACCTC--GACGAAAGCT---CTATCCAGGCGTTCTGTCAGCGGCACTGGGGCAAATGGGTTCGACAGATC
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  TCCGGAGAACCTTGTCTTGTTGAATTTCTGGTCTGCGACAGAGAACCTGGGGCAAATGGGTTCGAGAAATTT

      220     230     240     250     260     270     280
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  CGAGAGCCACGTAAGCGCAGCTCGCAACTGGCTTGGTACTTTTCGCAACCGCCGAGAGCGCCGACGTCGCTT
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  CGGGAGCCTAA--AAACCGGCTCGCCTCTGGCTCGGAAGCTTTTCGACCGCCA--GAGAGCTTGGCTTGGCTT
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00  CGCCTGCCCTCGAAAATAGGACCGCTCTTGGTTAGGGAACGTTCTGATACCGCCCAAGAAGCAGCTTTGGCCT
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  CGGGAGCCCAAAAAACGTTTTCGCCTCTGGCTCGGAAGCTTTTCGACCGCTTAAAGAAGCAGCGCTGGCTT

      290     300     310     320     330     340     350
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  ACGACCGGGCTCGCGTTTACTATACGGCTCAGTGCCTCAGCTCAACTTAAGCCCTTCGTTCTCCTTCCTC
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  ACGATATTTGCGAGCTCGCAAAATGTACGGTTCTATGGCGGAGCTCAATCTGCCTCCAGTGAGTCAGCTGG
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00  ACGATGCCGCTGCATACAAGCTTCGGGGAGAAATATGCCAGACTCAACTTTCTCT
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  ACGACATCGCGGCTCGCAAGTTTATGGTCTCTTGGCAGAGCTCAATTTGCTTGCTCACGAGTCGGCCGG

      360     370     380     390     400     410     420
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  CCTCTCTTCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  AATTGATTCCGTTTCCTTCTCTCAACG
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  G-----

      430     440     450     460     470     480     490
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  CTAAGACCTCTCTCTCCCTCGCCCCCGCCGCCACCTAGGAGGAGGAGCCAACTTTTGGTCCGTACGGTA
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  -----

      500     510     520     530     540     550     560
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  TCCCTTTTAACAACAACATCTTCCCTTAATGGTGGGACCTCTATGTTATGCCCTAGTTATGGTTTTTTTCCC
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  -----

      570     580     590     600     610     620     630
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  TCAACAACAACAACAACAAAATCAGATGGTCCAGATGGGACAAATTCCAACACCAACAGTATCAGAATCTT
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  -----

      640     650     660     670     680     690     700
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  CATTCTAATACTAACAATAACAAGATTTCTGACATCGAGCTCACTGATGTTCCGGTAACTAATTCGACTT
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00  -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00  -----

      710     720     730     740     750     760     770
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155  CGTTTCATCATGAGGTGGCGTTAGGGCAGGAACAAGCAGGAAGTGGCTGTAAATAATAATAGTTTCGATGGA
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00  -----
```

```

lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00 -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00 -----

              780       790       800       810       820       830       840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155 GGATTTGAACTCTCTAGCTGGTTTCGGTGGGTTCGAGTCTATCAATAACTCATCCACGCGCGTTGGTTGAT
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00 -----
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00 -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00 -----

              850       860       870       880       890       900       910
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155 CCGGTATGTTCTATGGGTCTGGATCCGGGGTTATATGGTTGGAGATGGATCTTCGACCATTTGGCCTTTTC
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00 -----
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00 -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00 -----

              920       930       940       950       960       970       980
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155 GAGGAGAAGAAGAAATATAGTCATAATTGGGGGAGTATTTGGGATTTTATTTGATCCCATCTTGGGGGAATT
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00 -----
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00 -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00 -----

.....|...
lcl|NM_129580.1_cdsid_NP_18155 CTATTAA
lcl|XM_001773378.1_cdsid_XP_00 -----
lcl|XM_001775093.1_cdsid_XP_00 -----
lcl|XM_001780951.1_cdsid_XP_00 -----

```

Alineamiento ABI4

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

ABI4      ATGGACCCCTTTAGCTTCCCAACATCAACACAACCATCTGGA--AGATAAT
Ppa139961 ATGCA-----GTT-----G--GGCAGC-----GGAGGGGATGAC
Ppa142112 ATGAA-----G-----A--AAAC-----GG-----CTGAG
Ppa149195 ATGAA-----AG-----
          ***  *

```

```

ABI4      AACCAAACCTAACCCATAATAATCCTCAATCCGATTCCACCACCGACTC
Ppa139961 AA---GC--TGA-----GCCCGACTT-----
Ppa142112 AA---A-----CGGA-----
Ppa149195 -----

```

```

ABI4      ATCAACTTCCTCCGCTCAACGCAAACGCAAAG-----
Ppa139961 -----CTGGTCAT---ATTGAGAAGCCAGCCCGCAAACCCGGA
Ppa142112 -----
Ppa149195 -----

```

```

ABI4      -----GCAAAGGTGGTCCGGACAACTC
Ppa139961 AAGAGATGGAAGAAAGGGGCAATGAAAGGCAAGGGCGGCCCTGAGAACGC
Ppa142112 -----TTGGAGTACCT
Ppa149195 -----GCAAGGGCGGTCCGGAGAACTC
                      **  **

```

```

ABI4      CAAGTTC--CGTTACCGTGCGTTCGACAAAGAAGCTGGGGCAAATGGGT
Ppa139961 TGCTTGC--GAATTCCGTGGCGTGCGACAGAGAACTTGGGGCAAATGGGT
Ppa142112 CGGACGAAGCTGTATCGAGGCGTTCGTCAGCGGCACTGGGGAAAATGGGT
Ppa149195 TGCTTGT--GAATTTTCGTGGTGTGCGACAGAGAACTTGGGGCAAATGGGT
          *  **  **  **  **  **  *  *****

```

```

ABI4      CGCCGAGATCCGAGAGCCACGTAAAGCGCACTCGCAAGTGGCTTGGTACTT
Ppa139961 TGCTGAAATTCGGGAGCCTA-----
Ppa142112 CGCAGAGATCCGCCTGCCTC-----
Ppa149195 TGCAGAAATTCGGGAGCCCA-----
          **  **  **  **  ****

```

```

ABI4      TCGCAACCGCCGAAGACGCCGACGTGCCTACGACCGGGCTGCCGTTTAC
Ppa139961 -----AGAAA-----CG-----
Ppa142112 -----GAAAT-----AG-----
Ppa149195 -----AAAAA-----CG-----
          *                      *

```

```

ABI4      CTATACGGGTCACGTGCTCAGCTCAACTTAACCCCTTCGTCTCCTTCCTC
Ppa139961 -----CGC-----TCG-----
Ppa142112 -----GAC-----CCG-----
Ppa149195 -----TGT-----TCG-----
                      **

```

```

ABI4      CGTCTCTTCTCTTCTCCTCCTCCGTCTCCGCCGCTTCTTCTCCTTCCACCT
Ppa139961 --CCT-----CTGGCTCGGAAGCTT-----TTC----
Ppa142112 --TCT-----TTGGTTAGGGACGTT-----CGA----
Ppa149195 --CCT-----CTGGCTCGGAAGCTT-----TCC----
          **                      **

```


ABI4 TGGCCTTTTGGAGGAGAAGAAATATAGTCATAATTGGGGGAGTATTTG
Ppa139961 -TGCTCCAG-----TG-----AGTCA--GCTG--GA--ATT-
Ppa142112 -TGCCAG-----ACTCA--AC-----T--
Ppa149195 -TGCCTGCTCA-----CG-----AGTCG--G-----
*** * **

ABI4 GGATTTTATTGATCCCA-TCTTGGGGGAATTCTATTAA
Ppa139961 -GATT-----CCGTTCTT-----TCCTCAACG
Ppa142112 -----T-----TC-----CT
Ppa149195 -----CC-----GGG
★

Alineamiento GPA1

	10	20	30	40	50	60	70	80
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	ATGACAGGGGACAGGAAGAAGGAGCCACCTACTCGCATTGAGGTAGTAGTTGGGGATGCTGGAGTCGGAATACTCTAG							
PHYPADRAFT_168862	ATGCGAGATTGTCTAGAGAGAGTCTCGTGCATATCTTCCGATGCCATCGCCAAGCTGCAGCGCCGGTCGTCAGGCAGATGG							
PHYPADRAFT_95903								
Arabidopsis	90	100	110	120	130	140	150	160
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	CATGATTTTGGCAATTG--CCACGGATTGTTTGCGGAAGGCGTCCCGCATGTACTGCCGCTACACGCCTGCCCTACCGA							
PHYPADRAFT_168862	TAGAGCTTTGATCACTTGGGATATGGCAATCATTGGAGAAGAGCATTTTTCTGCCCTTGCCAACCTCCCTTCCCCGCTCTTCT							
PHYPADRAFT_95903								
Arabidopsis	170	180	190	200	210	220	230	240
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	TTTCTATCCTGACTGCGTGGCCTTAAGTATCTATGATTCTCTTCAAGGCCGGAAGACAAGTCAAAGCTGGACATGGAGC							
PHYPADRAFT_168862	TAGTGCAGCTAAAACTATCCGTAAAGTTTGTGCGAATTGCGGACTTGCGATTGATTTGGGAATTCGAACCTGTATATACAT							
PHYPADRAFT_95903								
Arabidopsis	250	260	270	280	290	300	310	320
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	TCAAAAAAGCTGACGTCGCTAG--TACTGACATATGCATGGGATCAAACGAAACACTTACACGTTTGTCTAGCTATTGGCT							
PHYPADRAFT_168862	GGTCTTGACTTCAGGTTGTGGATAGCGATGATTAATATGTGATGTCTACGGTCTTTTCAAGCCGAGTTCCTCTGGGTTCA							
PHYPADRAFT_95903								
Arabidopsis	330	340	350	360	370	380	390	400
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	TCCAGAACTTCGACGCTCTAAAGCTTAATTTGCCAGTTATAGTAGTTGGATGTAAAGCTAGATCTCCGTGATGTTTCCCAAC							
PHYPADRAFT_168862	CCTAGCACCTCTTGGAGTAAGGTCGAGGCTTTGGGATTTACCTGTCTCAGAGCGACTCTGACTGAGAAACACAGTTTGATGT							
PHYPADRAFT_95903								
Arabidopsis	410	420	430	440	450	460	470	480
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	--ATGGGGCTTACTCTGCGCTAGAGAGTCCA--CATCATCTGAGAGATCTGATCAGAAATACACAG--G--CTGCTGAAATC							
PHYPADRAFT_168862	CAGGCTTAGAAGAAATGATGGCGCTTTCATGTCGAAAGTTCCGGCAGATTGAAACTTTGATAGAGTGGCTCAGCCGCAATA							
PHYPADRAFT_95903	TCCGAAATATGGTAAATGCAAAAAATACCA--CAGTGGTCTTTA--ACATGGCGGGAGTCTGTAAG--GAACCTTCTCAATA							
Arabidopsis	490	500	510	520	530	540	550	560
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	GAAAGACGGCTTAGAGCAAGAA--GCAAGGCTGAAAAAGCA--TATTCGGAGGCTTTTCTACTTGGTGGTGGGGAA							
PHYPADRAFT_168862	CAAAATACAGGTTTACCGAAGCTGTTTTATTACGCTCAGAAAGCTGTATTATATCCAAACAGCTCCACTCCTCGACCAAGAAAC							
PHYPADRAFT_95903	TATAGTTTATGAAATTGTAATTGCGTCCAGGATCCGAGGA--TATTGCAAAACTTTCGGTAAC--TGCAAGCAT							
Arabidopsis	570	580	590	600	610	620	630	640
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	TCTCGAAATCTTACAAT--TTTTAGCAGATAAACCTTCTATTCCAAACGGGAT--TCATGAAGGAGAACTAA--A							
PHYPADRAFT_168862	CCAAACCTTGAAACACGATGTGCGCGAGCTCTCAAGAGCAATTTTCATCTTGTGTGATCGTGTATCGGGATGGATCCTTGA							
PHYPADRAFT_95903	TCCAGGAAGCTAGTACAAATGTCAAGTCAATGCAATTTAAAGATCTTGAAATGAGCA--TCATGAACGGGCCCGAATTCCTG							
Arabidopsis	650	660	670	680	690	700	710	720
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	GAGCTATGT--TCCAGTC--ATTCAATGCAATGTCTATCAGACTATAAATTTATTC--ATGATGGAAACAAAGGAGT							
PHYPADRAFT_168862	GTGATGCGCAGTTCAATGATTTTTCAGGTCAAGTCTTCAATGCGCCTCTACAGCTCCCGAAATAGTAGCAGTGAAGAA							
PHYPADRAFT_95903	TAGATATGT--CTCACCGAATTCCTGGTTCGCAACGTGCAATCTGAAGGATACCTGTGCTGAACTTTGATCAAGAAC							
Arabidopsis	730	740	750	760	770	780	790	800
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	--TTGCTC--AAAATGAACACAGATTCT--GCTAATATATGTTATCTTCTGAAAGTATTGCAATTGGGAGAGAACTATC							
PHYPADRAFT_168862	GTGCTCTCGGAGAAAGTTAGCAGAGCGGTGGAATGAGAAATGGGTTGACTTTGACTGGGTTTCTATATCTCCATGCTTTATT							
PHYPADRAFT_95903	GTACAGGT--AGAGCGGCTGCGCATTTGAGTTGAGCCGAGGCTACAGTTCGAAAGAAGTTCC--TGAAAATGAAAGACG							
Arabidopsis	810	820	830	840	850	860	870	880
Arabidopsis								
PHYPADRAFT_147168	TGACATTGCTGGTAGGTAGAA--CTATCCACGCTCTTACCAAGGA--CATTCGCTCAGGGAAATA--GAAACACTATCG							
PHYPADRAFT_168862	CATCGAAAGGGGTGGCTAGAGACAACTTGGACAGTGTCTCAAAAAGTTTGGCTAGCAATCAGGAATTTGCTTACGAGACG							

PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

890 900 910 920 930 940 950 960

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760

Arabidopsis
PHYPADRAFT_147168

PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840

Arabidopsis

PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920

Arabidopsis

PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

1930 1940 1950 1960

Arabidopsis

PHYPADRAFT_147168
PHYPADRAFT_168862
PHYPADRAFT_95903

TCAAGAAAGTCGT TGGCCAGAAATGCACACCTTCATTCTTCACA -- TCATTCCACACAATCCGGAATCTTCTCTTCGTC
AGAAA TTTTCACATTTT TGA

GGATTGTTGAGGCCCTCAGCGTCCCCATTTGAGCATTCAGAGAAACAGAGTAGGGAAGAGTACTAAACAACATCGACAT
TGTTGCAAA TGATATTGGGACCTTCAGTTGAGAA TTTGACAA TTTATATACACAAATCTGGTCCTGTAGATTGCAAGCTA

CAGATCCAAAGTTTCTGTTGTGCTGACATTGGGCATCTGTATTGACAGTGGGCGCAACATTAA TTGTTGGGGGAATTAC
ATGAAAGCAAA GAATAGAA GAAATTTGATATGCAAAAAATAAAATCTACTTTGAGAGAA TGGACAACTAGCCTTGATTTTAC

GTTCTATCGGTTTTTCAACATGAGGAAGCTTCACCTCAAGCAGTTGA
ATGTTTTAGCTTCTAA

Alineamiento GPA1 CLUSTALW

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
GPA1      ATGGGCTT--ACTCTGCAGTAGAAGTCGACATCATACTGAAGATACTG--
Ppa147168 ATGACAGG--GGACAGG--A--AGAAG-----GAGCCACGTAC
Ppa168862 ATGGAGATTGTGTCAGA--G--AGAGTG----TC--GT--GCA--TAT
Ppa95903  ATGCGAAATG--GAAGG-----GTAG-----GAACC---AC
          ***                *
```

```
GPA1      -----ATGAG-----AA--TA-CACAGGCTGCT-----
Ppa147168 TCGCATTTCAGGTAGTAG--TAGTTGGGGATGCTGGAGTCGGAAAATCTAG
Ppa168862 C--TTCGATGCCATCGCCAAAGCTGCAGCGCCGGTCGTCAGGCA-GATGG
Ppa95903  T--TTTGAGA-----G--CA-TTCCAGATGCCGT-----
          *                *      *
```

```
GPA1      -----GA-----AA--TC-GA--AAGA-CGGATAG
Ppa147168 CATGATTTTGGCAATTGCC--ACGG-ATTCTGTTGCGGAAGG-CG--TCC
Ppa168862 TAGAGCTTTGATCACTGGGATATGGCAATCATTGGAG-AAGAGCA--TTT
Ppa95903  -----CC-----TT-GTC-AAGA-TA--TT-
                      *  *  ***  *
```

```
GPA1      AGCAAGAAGCAAAGGCTGA-----AAAG-----CATAT
Ppa147168 CGCAT--GTA CTGCCGCCTACACGCCTGCCTACCGATTTCTATCTGAC
Ppa168862 -----TTCTGC--CTTGCCAACTCCCTTCCCCG--CTCTTCTTAG
Ppa95903  TGC-T--TTACTGCCGT-----CCTCG-----CAGAT
          *                                *  *
```

```
GPA1      TCGGAAGCTTTTGC-TACT-----
Ppa147168 TG-CGTGCCCTTAAGTATCTATGATTCTCTTCAAG-GCCGGAAGACAAG
Ppa168862 TG-CAAGTA-AAAACTATCCGTAAAGTTTGTGCGAATTGCGGACTTGCGA
Ppa95903  TG-CGAGCTCCTGCGCA-----
          *      *      *
```

```
GPA1      -----TGGTG--CTG-GG----GA-A
Ppa147168 TCAAAGCTGGACATGGAGCTCAAAAAAGCTGACG--TCGTAGTACTGACA
Ppa168862 TTGATTTGGGAATTGCAACTGTATA-TACTGGTG--TTG-AGTTCAGG-T
Ppa95903  -----CTTGTTGTGCAG-A-----
                      *  *  *
```

```
GPA1      TCTG-----GA-----AAATCTACAAT--TTTTAAGCAGA--
Ppa147168 TATGCAT-GCGATCAACCA--GAAACACTTACACGTTTGTCTAGCTATTG
Ppa168862 TGTGGATAGCGATGATTAAATGTGATGTCTACGGTCTTTTCAAGCCGGAG
Ppa95903  --GCATGGCGA-----GACTCCAC--CTGTGATGC-----
          *      **                *  *  *  *
```

```
GPA1      -----TAAAACT-TCT-AT-----TCCAAA---CG
Ppa147168 G-CTTCCAGA--A-CTTCGACG-TCT-AAAGCTTAATTTGCCAGTTATA
Ppa168862 TTCTTCTGGGTTACCTAGCACC-TCTTGGAG--TAAGGTGCAGGCTTTG
Ppa95903  -----GACCCTGT-GGAG-----C-----
                      **  *  *      *
```

```
GPA1      GGATTTG--ATGAA--GGAG-----AACTAAAGAGCTA
Ppa147168 GTAGTTGGATGTAAGCTAGATCTCCGTGATGTTTGCCAACCAAGCTTAGA
Ppa168862 GGATTTACCTGTGCAGAGCGA-CTCT--GA--CTGAGAAACACAGTTTGA
Ppa95903  G-AATTG--TGTGAGG--G--CTCTG-GA--TTGAG-----A
          *  *  *      *  *  *
```

GPA1	TGTTCCAGTCATTCA--TGCC-----AAT--GTCT-----
Ppa147168	-----AGAAATGATGGCGCCTTTGATGCAAAA-GTTCCGGGAGA----
Ppa168862	TGTTCCCGAAAATG--G-----TAATGCAAAAAATACCGACAGTGGTC
Ppa95903	-----GGAATGA--CGC--AATGCA-----GTG-CC
	* * *

GPA1	-ATCAGACT-----AT-----
Ppa147168	-TTGAAACTTGTATAGAGTGCTCAGCCGCAAAACAA--ATACAGGTTACC
Ppa168862	TTTAACA-CTGGCGGGAGTCGTAAAGAACTTCCTCAATATATA-GTTGAT
Ppa95903	T-----T-----

GPA1	AAAAATT---ATTGCATGATGGAA-CAAAG-GAGTTTGCTCA-----
Ppa147168	GAAGTGTTTTATTACGCTCAGAAAGCTGTATTATAT-CCAACAGCTCCAC
Ppa168862	GAAATTGTAAATTGCGTCGAGGATGCGAGG-GATATTGCAAACTTTTCGG
Ppa95903	-----GGCGGAT-GGAAG-G-GTTTATTTCG-----G
	* * *

GPA1	-AAAT-GAAACAGATTCT-----GCTAA--ATAT-ATGT-----TA-T
Ppa147168	TCCTCGACCAAGAAACCCA--AACCTTGAAACACGATGT--GCGCGAG
Ppa168862	TAACTTGCAAAAGCATTCAGGAAGCTAGTCA--CAATGTGAGGTCAATG
Ppa95903	T-----TCCGTCTACG-----GC-GT--CAAT-TTGA-----TC-G
	* * *

GPA1	CTTCTGAAAGT--A--TTG-----
Ppa147168	CTCTCAAGAGAATT--TTCATCTTGTGTGATCGTGATCGGGATGG-AT-C
Ppa168862	CATTTAAAAGT--G--TTGAA--TGAG-GATCATGAACGGGCCGAATTC
Ppa95903	CTTCTCCA--T--ACTTCGA-----A-----CGAATTC
	* *

GPA1	-----
Ppa147168	CTTGAGTGATGCG-GAGTTGAAT--GATTTTCA-GGTCAAGTGCTTCAA
Ppa168862	CTGTAGATATGTCCTCACCGAATTCTGGTTCGCAACGTCGAAATCT-GAA
Ppa95903	-----ATTACCTC--G-----ACGCCGA--C-----

GPA1	-----CAATTGG--
Ppa147168	TGCGCCTCTACAG--CCTCCCGAAATAGTAGGAGTGAAG-AAAGTGGTCT
Ppa168862	GGATACTGTGGTGAACATTGTATCAAAG-AAGCGTCACGTAGAGCGGCTG
Ppa95903	CG--ACT-----CAA-----GCATCAATTCTTGCGGC--
	* *

GPA1	-GGA--GAAACT-ATCTGAGATTG-----GT--GGTAGG-----
Ppa147168	CGGA--GAAGTT-AGCAGAGGGTGTGAATGAG--AATGGGTTGA-----
Ppa168862	CGCATTGAAGTTGAGCCGAGGCTACAGTCGAAAGAAGTTCCTGAAAATGA
Ppa95903	--CATGGGA-----GCCCA-----AG--CACCGG--CTC-
	* * *

GPA1	----TTAGACT-----A--TCCACGTCTTAC-----CAAGGACA
Ppa147168	----CTTTGACTGGGTTTCTATATCTCCATGCTTTATTCATCGAAGGGG
Ppa168862	AAGACGGAGAACAGATTTTTTGGATGAGCGATCCGTATT--TTGTAAGGGA
Ppa95903	-----AT-----T-----ATCGACC-----

GPA1	TCGCT--GAGGGAATAG-AAACACTATGGAAGGA-T--CCTGCAATTCA
Ppa147168	TCGGCTAGAGACAACCTT-GGACAGTGCTCAAAAAGTTTGGCTACAA-TGA

Ppa168862 ATGGTTACC-TCGTCTAGGGGCTA-----
Ppa95903 -----AG-----

GPA1 GGAAACTTGTGCTCGTGGTAATGAGCT-TCAGGT-TCCTG-ATTGT----
Ppa147168 GGAAATTTGCTTACGAGACGATGTGCTTTCAAGT-CCTTC-ATACA----
Ppa168862 -----CGCT-TCAGCATTTATGCATAGTGGAC
Ppa95903 -----G---GTGGC-TCAGTTTTC--CA--GCG---
* ** *

GPA1 ---ACGAAATATCTGA---TG--GAGAACT-----TGAAGAGACTATC
Ppa147168 ---AGCGATCACCTGA---C-----CAGAGTATC
Ppa168862 TATGGGAAGCAGGCCATAATGCGCAGATCTAGCGTCCTTAAGATTATATC
Ppa95903 ---CGG-----TGG---TG--GCGACG-----GTGTATT

GPA1 AGA-TA---TAAATT-----ATATTCCAAC TAAGGAGGATGTA----
Ppa147168 GAATTAACAGAAAAGGCAT-T--AGACTACTTGAAAGGAGTATTCACGGC
Ppa168862 ACA-TAACTGCAAATTGGTGAAGACGCTGGATCTAAGGAATATGTA----
Ppa95903 GCG-TGA-----GTGTCCCGCATCTG-----
*

GPA1 CT-TTATGCAAGAGTTC-----
Ppa147168 TTTTGACAAGGATGGGGATGGAGCATTGCGA-CCA-GCCGAATTAGAAGA
Ppa168862 TATTGATACAAGTGA CTGTGAAGTAATGAGCTCCATGTTGAGCATGACGT
Ppa95903 -----ACTG-----CTCTCCTTGTC-----

GPA1 -----G---CACAACTGGTGTCTGGAATACA-GTTCAGCCCTGTGGGA
Ppa147168 TATTTT---TTCAACAGCT-CCATCGAACCCTGGGACAGCCCTATGTAT
Ppa168862 TACGTTGTGTTAAAGTGAT-GGGTGAATTT-T-AGAT--GATATGAAC
Ppa95903 -----CTGTTGCCGTGGATAAAC-T-----CCTTATGGCG
* * * ** * **

GPA1 GAGAATA---AAAAAGTGGTGA-AGTGTACCGATTGTTTGACGT-----
Ppa147168 AAGGATACTATGGAAACTAATTCAGTTGGAGGCATTACTTTGAATGGTTT
Ppa168862 AAATTTA-TGCCGAATCTA---CAGACGTTGGCGCTGCTTGGGGTATTTG
Ppa95903 ACCTCTT---GGCACTGGGGTAA-GGTGCAGC-AGTAT-----GT-----
* * * * *

GPA1 GGGTGGACAGAG--AAATGA-GAGG-----A-----GGAAAT-GG---
Ppa147168 TATTTACAGTGGAATTGATGACCTTGCTGGAACCTCAGAAAA-GCTCA
Ppa168862 GTGTGGAGAAAGGGAATC--TGAAGTTT-AA-AAATA-TGAAAGTGCTTT
Ppa95903 TGGTCTCCAAC--ATTTTC-C-----AA-----CAA-G-----
* * * * *

GPA1 -ATT--C--ATCTGTTTGAAGG-----TGTAACAGC-TGTG
Ppa147168 GCTTCTCTTGTCTATTTGGGGTAT-CCCGGGGACACATTAACAGCATTTTC
Ppa168862 GCCTC---GGTCTCTC--AACTCCAGCAAAGAACGTCTTAATGGATCTTC
Ppa95903 --TT--CC--TG-AATTGCAGT-----CCT---CCC-ATG
* * * *

GPA1 ATA-TT--TTG-----TGCTGCCATCAGCG-A-G-TACGACCA-----
Ppa147168 AAC-TCACTCGACGCAGGAAATACGATCAGAAAAAGCAACGATTACAACG
Ppa168862 CTAGTC--TTGA---GAAGCTGCAATTAAAG-ATGCAATGTCCA-----
Ppa95903 ATG-TT--TTCA-----ATCTGGTA--CGCGG--A-CAG--GA-----
* * * * *

Ppa168862
 Ppa95903
 GPA1
 Ppa147168
 Ppa168862
 Ppa95903
 GPA1
 Ppa147168
 Ppa168862
 Ppa95903
 GPA1
 Ppa147168
 Ppa168862
 Ppa95903
 GPA1
 Ppa147168
 Ppa168862
 Ppa95903
 GPA1
 Ppa147168
 Ppa168862
 Ppa95903
 GPA1
 Ppa147168
 Ppa168862
 Ppa95903

CATCAAGAA--GTCGTTGGCCAAGA-----ATGCACACCTTGATTC---
 CAGCAGTG---G-CTTCCA-CAG-----ACCCAAAT---
 * * * * *
 -----TCAAA--A-TC-TACAGGA-----C
 TAAGTTTAAA--ACTCGGAGACAA-----TAACAACCTT--ATTTC
 ----TTCACATGATTC-CACACAATCCGGAATCTTCTCTTCGTGTGTTGC
 ----TCACA--T--C-TGTAAAG-----C
 * * * * *
 GA-----CG--GC-----TTTGGA---CCAGAAGCT
 GAAGGATTGTTGAGGCCGCTCAGCGTCCCCATTTGAGCATTCAGAAACA
 AAATGAT-ATTGGGACC-TTCAGT-TGAGAATTTGA-CAATTTATATACA
 TA-----CA--A-----TTCGTG---CC---GCT
 * * * * *
 --TGTA-----AAGAA-----AACGTTCAAG
 GAAGTAGGGAAGAGTACTAAACAACATCGACATCAGATCCAACGTTTCAGT
 CAAATCTGGTCCTGTAGATTGCAAGCT--AAT--GAAGCAAAGA
 --TAAC-----GAGGT-----ACCGTTGTG-
 * *
 CTCGTAGATGAGACAC-----TAAGA-----AGGA---
 --TGTTGCT--GACATTGGGCATCTGTT-ATTGACAGTGGGCGCAACATT
 --ATAGAA--GAAATTGA-TATGCAAAAAATAA-AATG---TACTTT
 --TATTGATGA--ACC-----TGCG-----TGCAA---
 * * * * *
 -----GAAATT-----TACTG-----GAGGCTGG
 AATTGTTGGGGGAATTACGTTGTATCGGTTTTACAACATGAGGAAGCTTC
 GAGAGAATGGACAACATA--GCCTTGATTTTAC--ATG-----T--
 -----GAAATT-----TTCAC--AT-----
 * * * * *
 C--CT--TTTATGA
 AGTCAAGCAGTTGA
 --TTTAGCTTCTAA
 -----TTTTGA
 * *

Alineamiento PYR1 CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

PHYPADRAFT_136355 ATGGAGACCTCGACTT--CGCTGGAATGGTGC GGTCGAACTTAGCGAGGGT
PHYPADRAFT_213389 ATGAG--GTTTGATAT--TG-GG--CATAACGAT-GTACG-----TGGGT
PRY ATGCC--TTCGGAGTTAACACCAGA-AGAACGATCGGAAC-----TAAAA
          ***          **      *                  * * * * *

PHYPADRAFT_136355 TTATCCTTAGTGCCTTGC ACTCTCATCTCGCTCTCCTTCGTCCGCGCGGA
PHYPADRAFT_213389 TTTTCACTTG TGAGGAG-----GAGCACGCGTA
PRY AACTCAATCG--CCGAG-----TTCCACACATA
          **      * *      *                  * * * *

PHYPADRAFT_136355 CGT-GTCCGTGCGCCCCGTCGACGAATGGAAGCTGAAGGAGGGATTGACT
PHYPADRAFT_213389 CGCACTCCATTCGC-----AGAC-AGTAG-AACTGAACCACT--GTGGTT
PRY CCAACTCGATCC-----A-----GGAAGCTGTTC-----ATCACT
          *      **      * *                  * * * *

PHYPADRAFT_136355 GCTCTGTTTAAAGAAG-ACATTCGGGCTGACGGTGGCCGACCGGGACCTTG
PHYPADRAFT_213389 -CTATATTGATGCAGCAGATCC-----ATG--CACCCATAGAGGTTGTG
PRY CCAC-GC-----GCAACGAATCC-----ACG--CGCCTCCGGAACTCGTC
          *      * *      ** *      * *      **      *

PHYPADRAFT_136355 TTGTCCAGAAAGAGAAGAATTATTTTAAAAAACGGA--GGGACGAGCCCA
PHYPADRAFT_213389 TGGTCCATTGTG---AGGTGCTTTGGCAGTCCACAGATTTACAAGAAGT
PRY TGGTCAATCGTA---CGACGATTTCGACAAACCACAAACATACAAACACT
          * * * * *      **      * *      * *      *

PHYPADRAFT_136355 TCGCGCATGGAGTCTTGCA TTTGTGGGGTTCGAAACCTGAGGGAGACCCC
PHYPADRAFT_213389 T----TATACAAGCTTGTA-TC-----
PRY T----CATCAAATCCTGCT-CC-----GTCTGA-----
          *      **      * *      *

PHYPADRAFT_136355 TTGAGA--GTTGGTGGTGAGGGAGCTGATTGGAGGAAGTATGTAGCGGA
PHYPADRAFT_213389 TTGACA--GTGGGCGATGGTGGGG---TTG--GGAGTATC-AGAGAA
PRY ---ACAAAACCTTCGAGATGC--GCG---TCG--GATGCACG-CGCGAC
          * *      * *      * *      * *      * *      *

PHYPADRAFT_136355 GTCTGTGAA--TGGCATCGAGCTGAACGTTAGCGGGTTGAAACTTAGATG
PHYPADRAFT_213389 G----TGTTTCTGGTGTCG--GG--TGTTCCAG-----C
PRY G----TGAT--CGTCATCA-GTGG--ATTACCGG-----C
          *      **      * *      *      *      * *

PHYPADRAFT_136355 CATTGCTCTTATTAAGAGACGAATAACTTTGACGCTCTCAAGC-AATCA
PHYPADRAFT_213389 CACTTCCAGTATAGAACGGTTGGAATCCTTGACGATGAGAAGCATGTTT
PRY GAACACATCAACGGAAGACTCGATATACTCGACGACGAACGGAGAGTTA
          *      *      * *      * *      * * * *

PHYPADRAFT_136355 TGGGAGGCGGTATTTGGCCCTCGTCGTGGAGGCGCACAAGCAGGTCCAAC
PHYPADRAFT_213389 TTAGTTTTAGGG-----T-----
PRY CCGGATTCAGTA-----T-----
          *      *      *

PHYPADRAFT_136355 TACTCTCACATTGAAAGGCGTGCCGTCTCGGTGGTTTGCCGAGCCACGGG
PHYPADRAFT_213389 -----GTTGAAGGGAGG-CCA-----TCGTCTGCAAGATTAT--
PRY -----CATCG-GAGGCGA-ACA-----TAGGCTGACGAATTAC--
          * *      ** *      *      * *      *

```

PHYPADRAFT_136355 TGTCATCGAAACCTTCTGTGTTGGTCACTCATACAATATTCTCCAGTTTC
 PHYPADRAFT_213389 -----CGG-----TCCGTG-----ACCACG-----C-----TTC
 PRY -----AAA-----TCCGTT-----ACGACG-----G-----TGC
 * * * * *

PHYPADRAFT_136355 GGTGAAATCAGGAATTTGGAGGTGCTGGGCAATGAAGAGCTGGCAAAGAA
 PHYPADRAFT_213389 -----ATGAGC-----AGGAG-----GT-AAATGGCAGGCAGACTA
 PRY -----ATCGGT-----TCGAG-----AA-AGAGAATCGGATCTGGA
 * * * * *

PHYPADRAFT_136355 TCCTAGGGACGTTGGAAGTATGGCTGCCGCTTTACAGTGCCAAAGTGTGGG
 PHYPADRAFT_213389 CC--A-----CA-----GTGTTAGAGTCTTA--T-----
 PRY CG--G-----TG-----GTTTTGGAATCTTA--C-----
 * * * * *

PHYPADRAFT_136355 TGCAGTTCATCAACCATGCGAGTTTCTGCAAAACTTTACAGACTTTTTTGT
 PHYPADRAFT_213389 -GTTGTTGATGTACC-----AGA-----T
 PRY -GTCGTTGATATGCC-----GGA-----A
 * * * * *

PHYPADRAFT_136355 GGTCGTGCAATGCAAAAGGCAGGGTCCAG-CTTCCGAGCAACGTATGAGG
 PHYPADRAFT_213389 GGT-----AA--CACGAGGGAGG--AGACT-----CACAT--G
 PRY GGT-----AA--CTCGGAGGATG--ATACT-----CGTAT--G
 * * * * *

PHYPADRAFT_136355 TTGACTGGGATAAAGAGAACTTCTTTAGTGTGATGAACGTTCCGGCGGAGG
 PHYPADRAFT_213389 TTTGCTG--ATACT-----GT-----TGTAATG--T-----G
 PRY TTTGCTG--ATACG-----GT-----TGTAAG--C-----T
 * * * * *

PHYPADRAFT_136355 AAATTTGAAAAAGAAAGACTTGAGCAACAGTTGCGAATAGAGGCCGAGTT
 PHYPADRAFT_213389 CAACTTGAAA-----TCCTTG--GCGCAAGTTGCAG-----
 PRY TAATTTGCAG-----AAACTC--GCGACGGTTGCTG-----
 * * * * *

PHYPADRAFT_136355 ACTTCGAAAGCGGGAAGCTGAAGCTCGACAGGCTGAGTTTGCTCGTGTAG
 PHYPADRAFT_213389 -----AGTGGAGGGC-CATGC-----AAGG-----
 PRY -----AAGCTATGGCTCGTAAC-----TCC-----
 * * * * *

PHYPADRAFT_136355 AGGAGGAAAGGTTGAAGATGGAAC-GTATGGCCGCTGCTTTGAGGTGA
 PHYPADRAFT_213389 -----GATTACGCAAC-AATTGTCAACCTCCTCCCTGTAA
 PRY -----GGTGACGGAAGTGGTTCTCAGG-----TGACGTGA
 * * * * *