

APROXIMACIÓN BIOINFORMÁTICA Y MOLECULAR DE LA RUTA DE SÍNTESIS
DE LOS ALCALOIDES MAYORITARIOS EN LAS ESPECIES LOCALES
ZEPHYRANTHES CARINATA Y *ZEPHYRANTHES ROSEA*

DIANA MARCELA HERNÁNDEZ PALOMINO

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2014

APROXIMACIÓN BIOINFORMÁTICA Y MOLECULAR DE LA RUTA DE SÍNTESIS
DE LOS ALCALOIDES MAYORITARIOS EN LAS ESPECIES LOCALES
ZEPHYRANTHES CARINATA Y *ZEPHYRANTHES ROSEA*

DIANA MARCELA HERNÁNDEZ PALOMINO

TRABAJO DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
PREGRADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA

Tutor, Marcela Santaella Tenorio Ph.D.

SANTIAGO DE CALI
2014

APROBADO POR:

Federico Odreman, Ph.D.
Evaluador

Rafael Santiago Castaño, Ph.D
Evaluador

Marcela Santaella Tenorio, Ph.D
Tutor

Santiago de Cali, 06 de agosto de 2014

AGRADECIMIENTOS

Doy especial agradecimiento a mi Madre, mi Padre y mi Hermano por el apoyo incondicional en los momentos más críticos del desarrollo de esta investigación.

A Martha Ceballos, amiga especial de la familia por su apoyo incondicional en todo momento.

A la Universidad Icesi y al semillero de investigación GIByQ de la Facultad de Ciencias Naturales, por el apoyo y espacio otorgado.

A Colciencias (Convocatoria 617 de 2013, Capítulo 1) por el apoyo económico para el desarrollo de este proyecto de investigación, a través del semillero de investigación GIByQ.

A Marcela Santaella Tenorio, Ph.D por su acompañamiento durante el desarrollo de este proyecto, por su interés constante en enseñar a sus estudiantes y por las recomendaciones orientadas al mejoramiento.

A Rafael Santiago Castaño, Ph.D por su interés en el desarrollo del proyecto y sus aportes pertinentes.

A Isabel C. Ocampo por su disponibilidad para compartir sus conocimientos en bioinformática, factor que fue fundamental para enfrentar el manejo de los programas y tomar decisiones sobre las problemáticas presentadas en este proceso.

CONTENIDO

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	16
2.1. PLANTEAMIENTO DE LA PROPUESTA Y JUSTIFICACIÓN	16
2.2. MARCO TEÓRICO.....	18
<i>Familia Amaryllidaceae</i>	18
<i>Distribución de las plantas de la familia Amaryllidaceae</i>	18
<i>Alcaloides de la familia Amaryllidaceae</i>	19
<i>Ruta biosintética elucidada de los alcaloides de Amaryllidaceae</i>	21
<i>Aspectos generales de las enzimas PAL, OMT y TYDC</i>	23
<i>Fenilalanina amonio liasa (PAL)</i>	23
<i>Tirosina descarboxilasa (TYDC)</i>	24
<i>O-metiltransferasa (OMT)</i>	25
<i>Abordaje para la identificación de enzimas dentro de la ruta biosintética</i>	25
<i>Uso de cebadores degenerados para amplificar por PCR genes desconocidos</i>	26
<i>Clonación molecular como técnica molecular para la identificación de secuencias de interés</i>	27
2.3. OBJETIVOS	29
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos.....	29
2.4. METODOLOGÍA.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.4.1. Revisión bibliográfica y bioinformática	30
2.4.2. Diseño de cebadores	32
2.4.3. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	35
2.4.4. Extracción de ARN total	36
2.4.5. Síntesis de ADNc.....	36
2.4.6. Amplificación por PCR de ADNc.....	37
2.4.7. Visualización de los productos de PCR	38
2.4.8. Clonación molecular	38

2.4.9.	Transformación bacteriana	39
2.4.10.	Confirmación de la presencia del inserto en el vector	39
2.4.11.	Propagación de colonias recombinantes	40
2.4.12.	Extracción del plásmido	40
2.4.13.	Secuenciación	41
2.5.	RESULTADOS	42
2.5.1.	Revisión de bibliografía y bioinformática	42
2.5.2.	Diseño de los cebadores.....	43
2.5.2.1.	Cebadores obtenidos a partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos.....	43
2.5.3.	Preparación de las muestras para amplificación.....	49
	Extracción de ARN total.....	49
	Síntesis de ADNc.....	49
2.5.4.	Amplificación de ADNc y visualización de los productos de PCR.....	50
2.5.4.1.	Cebadores obtenidos a partir del alineamiento de secuencias de ARNm	51
2.5.5.	Amplificación de ADNc de los nuevos cebadores.....	54
2.5.6.	Clonación molecular y transformación bacteriana en <i>E. coli</i>	55
2.5.7.	Extracción del plásmido	59
2.5.8.	Secuenciación.....	60
2.6.	DISCUSIÓN.....	64
2.7.	CONCLUSIONES.....	68
2.8.	RECOMENDACIONES	69
3.	REFERENCIAS	70
4.	ANEXOS.....	73
	ANEXO 1: ESQUEMAS SOBRE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LOS ALCALOIDES DE LA FAMILIA AMARYLLIDACEAE.....	73
	ANEXO 2: PROTOCOLOS DE LABORATORIO – TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	75
	ANEXO 3: BIOINFORMÁTICA PARA DISEÑO DE CEBADORES – ALINEAMIENTOS DE SECUENCIAS	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Números de referencia en la base de datos de proteínas de las secuencias de aminoácidos utilizadas para hacer el alineamiento para cada enzima.....	32
Tabla 2. Nomenclatura para expresar la degeneración en la secuencia de nucleótidos de los cebadores.....	33
Tabla 3. Números de referencia en la base de datos de nucleótidos de las secuencias de ARNm utilizadas para hacer el alineamiento para cada enzima....	34
Tabla 4. Material vegetal de la colección de la Universidad Icesi. Especies <i>Z. carinata</i> y <i>Z. rosea</i>	35
Tabla 5. Condiciones de amplificación por PCR utilizadas en el análisis de las diferentes combinaciones de cebadores diseñados.....	37
Tabla 6. Lista de cebadores diseñados teniendo en cuenta los alineamientos obtenidos a partir de secuencias de aminoácidos de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Se muestra el análisis teniendo en cuenta longitud, Tm, %GC y estructuras secundarias.....	45
Tabla 7. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima OMT.....	46
Tabla 8. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima PAL.....	47
Tabla 9. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima TYDC.....	48
Tabla 10. Concentración y calidad del ARN total extraído de las hojas en individuos de <i>Z. carinata</i> y <i>Z. rosea</i>	49
Tabla 11. Lista de cebadores diseñados teniendo en cuenta los alineamientos obtenidos a partir de secuencias de ARNm de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Se muestra el análisis teniendo en cuenta longitud, Tm, %GC y estructuras secundarias.....	52
Tabla 12. Combinación de cebadores evaluada mediante amplificación para la enzima OMT.....	53
Tabla 13. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima PAL.....	53

Tabla 14. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima TYDC 53

Tabla 15. Resultados de la búsqueda de secuencias similares a las secuencias de los insertos en las bases de datos mediante BLAST 61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Reacción enzimática mediada por la enzima PAL en la biosíntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae. Tomado de http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:4.3.1.24 24
- Figura 2. Reacción enzimática mediada por la enzima TYDC en la biosíntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae. Tomado de http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn:R00736 24
- Figura 3. Código genético estándar. Tomado de <http://blog.cienciasdelanaturaleza.es/> 33
- Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR a partir de las muestras de ADNc células HeLa. RT(+): cóctel de PCR contiene la enzima *Reverse Transcriptase (RT)*. RT(-): No se le adicionó enzima. MP: Marcador de Peso. 49
- Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR donde se evaluaron las siguientes combinaciones: A (Comb 5), B (Comb 7), C (Comb 17), D (Comb 14), E (Comb 20), A1 (Comb 1), B1 (Comb 3), C1 (Comb 4), D1 (Comb 11), E1 (Comb 13) F1 (Comb 18), G1 (Comb 23), H1 (Comb 25), I1 (Comb 26). Las temperaturas especificadas corresponden a la temperatura de *annealing (Ta)* empleada para la pareja de cebadores. Por cada combinación se hizo un control negativo (-) sin ADNc molde. Las muestras evaluadas fueron: 36 (IA-036) y 23 (IA-023). Mp: Marcador de peso molecular, 1Kb (Promega)..... 50
- Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR con las combinaciones de cebadores degenerados A: comb. 32; B: comb. 38; C: comb. 40; D: comb. 37; E: comb. 39; F: comb. 33. Las temperaturas especificadas corresponden a la temperatura de *annealing (Ta)* empleada para cada pareja de cebadores. Por cada combinación se hizo un control negativo (-) sin ADNc molde. Las muestras evaluadas fueron: 45 (IA-045) *Z. rosea* y 100 (IA-100) *Z. carinata*. Mp: Marcador de peso molecular, *Fast Ruler Low Range DNA Ladder* (Fermentas). El fragmento amplificado tiene una longitud esperada de ~490pb. 54
- Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR con los cebadores degenerados *DegOMTfor6 - DegOMTrev6* a una temperatura de *annealing (Ta)* de 51,1°C. Los individuos analizados son 23 (IA-023), 100 (IA-100), 36 (IA-036), 21iv (IA-021iv obtenido de cultivo *in vitro*), 25iv (IA-025iv obtenido de cultivo *in vitro*), 100iv (IA-100iv obtenido de cultivo *in vitro*), todos de *Z. carinata* y 45 (IA-045) de *Z. rosea*; (-) indica el control negativo. MP: marcador de peso molecular *Fast Ruler Low Range DNA Ladder* (Fermentas). El fragmento amplificado tiene una longitud esperada de ~490pb. 55

Figura 8. Cultivo de bacterias transformadas con la ligación conteniendo el fragmento amplificado de OMT en el individuo IA-036.....	56
Figura 9. Cultivo de bacterias transformadas con la ligación conteniendo el fragmento amplificado de OMT en el individuo IA-025iv.	56
Figura 10. Cultivo de bacterias transformadas con la ligación conteniendo el fragmento amplificado de OMT en el individuo IA-021iv.	56
Figura 11. Cultivo de bacterias transformadas con la reacción de ligación conteniendo un inserto de un fragmento amplificado de 953pb como control positivo.	56
Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR a partir de las colonias provenientes de la transformación bacteriana con las ligaciones con el fragmento de OMT para los individuos IA-036, IA-021iv y IA-025iv de <i>Z. carinata</i> . Los números indican el número de la colonia aislada que fue tomada para la reacción de PCR. MP1: marcador de peso molecular 1Kb, Promega. MP2: marcador de peso molecular <i>Fast Ruler Low Range DNA Ladder</i> (Fermentas)	58
Figura 13. Electroforesis de los plásmidos extraídos a partir de las colonias que se identificaron como informativas en la amplificación por PCR. A: Plásmidos provenientes de la amplificación en los Individuos IA-021iv e IA-036. B: Plásmidos provenientes de la amplificación en el individuo IA-025iv. C: Plásmidos provenientes de la amplificación en los individuos IA-100, IA-025iv e IA-100iv. ...	58
Figura 14. Electroforesis de los plásmidos obtenidos a partir de colonias transformadas y sus correspondientes reacciones de digestión mediante las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. Los plásmidos provienen de las ligaciones con el fragmento amplificado de OMT de los individuos IA-100, IA-025iv, IA-100 de <i>Z. carinata</i> . En los cuatro primeros carriles pC1 y pC2 corresponden a los plásmidos de la colonia 1 y 2 de la respectiva ligación. En los últimos cuatro carriles dC1 y dC2 corresponden a la digestión de los plásmidos de las colonias de las respectivas ligaciones. La banda a ~650pb en los últimos cuatro carriles corresponde al fragmento del inserto de interés.	59
Figura 15. Secuencia de ADNc consenso para una región de la enzima OMT en especies de <i>Z. carinata</i>	62
Figura 16. Dominios conservados en la secuencia consenso para la enzima OMT en <i>Z. carinata</i> , identificadas mediante BLAST. A: dominio conservado que hace referencia a la superfamilia de metiltransferasas 2. B: dominio conservado que hace referencia a la región de dimerización en proteínas OMT en plantas. C: dominio conservado que se corresponde con la región del sitio de unión a SAM en enzimas OMT dependiente de SAM.....	62

Figura 17. Estructura química de los núcleos básicos de los alcaloides de Amaryllidaceae (Osorio Durango, 2008)	73
Figura 18. Ruta de biosíntesis de los alcaloides típicos de Amaryllidaceae. Etapa inicial (Berkov <i>et al.</i> , 2009)	74
Figura 19. Síntesis del precursor O-metilnorbeladina mediante la acción enzimática de la enzima Catecol-O-metiltransferasa (Eichhorn <i>et al.</i> , 1998)	74
Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima OMT. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores.	80
Figura 21. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima PAL. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores	80
Figura 22. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima TYDC. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores	84
Figura 23. Alineamiento múltiple de secuencias de ARNm de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima OMT. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores.....	85
Figura 24. Alineamiento múltiple de secuencias de ARNm de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima PAL. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores.....	87
Figura 25. Alineamiento múltiple de secuencias de ARNm de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima TYDC. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores.....	94
Figura 26. Alineamiento múltiple de secuencias de ADNc correspondientes al inserto para la enzima OMT en plásmidos recombinantes. Transformación proveniente de amplificadores de ADNc obtenidos a partir de muestras de <i>Z. carinata</i>	97
Figura 27. Alineamiento múltiple de secuencias de ADNc correspondientes al inserto para la enzima OMT en plásmidos recombinantes. Transformación	

proveniente de amplificadas de ADNc obtenidos a partir de muestras de *Z. carinata*. No se ha incluido la secuencia del individuo IA-021iv_OMT_Colonia9. 100

Figura 28. Cromatograma correspondiente a la secuenciación del inserto del amplificado de la enzima OMT en plásmidos recombinantes. La secuencia pertenece a la muestra de IA-036_OMT_Colonia19. Macrogen Korea es el proveedor del servicio de secuenciación..... 102

Figura 29. Alineamiento múltiple de las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los insertos correspondientes a un fragmento de la enzima OMT para el individuo IA-100..... 103

Figura 30. Alineamiento múltiple de las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los insertos correspondientes a un fragmento de la enzima OMT para el individuo IA-036..... 103

Figura 31. Alineamiento múltiple de las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los insertos correspondientes a un fragmento de la enzima OMT para el individuo IA-021 obtenido de cultivo *In vitro*. 104

Figura 32. Alineamiento múltiple de las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los insertos correspondientes a un fragmento de la enzima OMT para el individuo IA-025 obtenido de cultivo *In vitro*. 105

Figura 33. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos obtenidas del proceso de traducción. Se obtiene la misma secuencia de aminoácidos para los 4 insertos descritos en el alineamiento, los cuales provienen de los individuos IA-100, IA-036 e IA-025iv..... 105

Figura 34. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos obtenidas del proceso de traducción, a partir del cual se identifican 6 secuencias diferentes. . 106

RESUMEN

La familia Amaryllidaceae comprende un grupo de plantas herbáceas caracterizadas por tener un amplio uso ornamental por ser plantas muy diversas en cuanto a formas y colores, pero también por su capacidad de producir gran diversidad de alcaloides, los cuales son exclusivos de esta familia. Estos metabolitos secundarios tienen actividades farmacológicas importantes, tales como efectos antitumorales, antivirales, antiparasitarios y analgésicos.

La mayor parte de las investigaciones que se han hecho sobre esta familia, se ha dirigido a la caracterización fitoquímica, mientras que los aspectos moleculares de la biosíntesis natural de los alcaloides no han sido caracterizados de forma clara y precisa. Lo que hasta el momento se ha reportado incluye la identificación de las enzimas biosintéticas PAL (*Phenylalanine ammonia-lyase*), TYDC (*Tyrosine decarboxylase*) y OMT (*Catechol-O-methyltransferase*), involucradas en la etapa inicial de la ruta. Adicionalmente en Colombia se encuentran los géneros *Calicharis*, *Caliphruria*, *Crinum*, *Eucharis*, *Hippeastrum*, *Phaedranassa*, *Plagiolirion* y *Zephyranthes* para los cuales no se han encontrado reportes acerca de la caracterización genética de estas enzimas.

En este estudio se determinó una secuencia de ADNc correspondiente a un fragmento de la enzima OMT en individuos de *Zephyranthes carinata*, familia Amaryllidaceae. A partir de regiones conservadas en secuencias reportadas para las enzimas OMT, PAL y TYDC, se generaron cebadores degenerados los cuales fueron empleados para hacer amplificación mediante PCR. El análisis bioinformático a través del cual se abordó el diseño de los cebadores degenerados, permitió concluir que los alineamientos de secuencias de ARNm fueron más informativos que los alineamientos de secuencias de proteínas a partir de los cuales se crearon los cebadores.

Los resultados obtenidos en esta investigación tienen el potencial de aportar al desarrollo de estrategias dirigidas hacia la caracterización de otras enzimas dentro de la ruta biosintética de los alcaloides en *Z. carinata* y en otras especies de Amaryllidaceae, así como identificar variantes enzimáticas que intervengan en el patrón de producción de alcaloides específicos.

PALABRAS CLAVE: Amaryllidaceae, *Zephyranthes carinata*, Biosíntesis de alcaloides, Bioinformática, Enzimas, Análisis molecular.

ABSTRACT

The Amaryllidaceae family comprises a group of herbaceous plants characterized by having a broad ornamental use because plants are very diverse in terms of shapes and colors, but also for its ability to produce wide variety of alkaloids, which are unique to this family. These secondary metabolites have important pharmacological effects such as antitumor, antiviral, antiparasitic and analgesic activities.

Most of the research that has been done on this family, has been directed to the phytochemical characterization, while the molecular aspects of the natural alkaloid biosynthesis have not been characterized clearly. What has been currently reported include the identification of the biosynthetic enzymes PAL, TYDC y OMT, involved in the initial step of the pathway. Additionally, in Colombia are gender Calicharis, Caliphurria, Crinum, Eucharis, Hippeastrum, Phaedranassa, Plagiolirion y Zephyranthes for which no reports have been found about the genetic characterization of these enzymes.

In this study, an mRNA sequence corresponding to a fragment of OMT enzyme was identified on the specie Zephyranthes carinata, family Amaryllidaceae. From conserved regions in sequences reported for the enzymes OMT, PAL y TYDC, degenerate primers which were used for PCR amplification were designed. Bioinformatic analysis whereby the design of degenerate primers were addressed, allowed to conclude that the mRNA sequence alignments were more informative than the alignments of protein sequences from which the primers were created.

The results of this research have the potential to contribute to the development of strategies aimed at the characterization of other enzymes in the biosynthetic pathway of the alkaloids in Z. carinata and other species of Amaryllidaceae. Also have the potencial to developing strategies to identify enzyme variants involved in the pattern of production of specific alkaloids.

KEYWORDS: Amaryllidaceae, *Zephyranthes carinata*, Alkaloid biosynthesis, Bioinformatics, Enzymes, Molecular analysis.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Amaryllidaceae está conformada por un grupo de plantas herbáceas que se caracterizan por tener un bulbo subterráneo grueso. Su importancia se fundamenta en que son plantas que han sido ampliamente utilizadas como ornamentales debido a la diversidad de formas y colores impactantes de sus flores, ideales para embellecer parques y jardines. Por otro lado se encuentra la capacidad que tienen estas plantas de producir una gran diversidad de alcaloides a los que se les ha atribuido actividades farmacológicas importantes, tales como efectos antitumorales, antivirales, antiparasitarios y propiedades analgésicas (Berkov et al., 2009; Cahlikova, Valterova, Macakova, & Opletal, 2011; Herke et al., 2009). La propiedad farmacológica de mayor relevancia terapéutica ha sido el efecto anticolinesterasa principalmente asociado a los alcaloides galantamina y licorina (Bastida Armengol et al., 2011). Estos representan los alcaloides en Amaryllidaceae de mayor impacto en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, pero sólo la galantamina ha llegado a comercializarse. Dentro de los alcaloides típicos de esta familia se encuentran los alcaloides tipo galantamina, tazetina, crinina y licorina.

Los aspectos fitoquímicos se reportan ampliamente, sin embargo los aspectos moleculares de la biosíntesis no han sido caracterizados de forma clara y precisa. Hasta el momento, la ruta biosintética elucidada comprende la acción de las enzimas PAL y TYDC en la transformación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina respectivamente. El intermediario formado tras las reacciones anteriores, que es la norbeladina, es metilada en un paso posterior por la enzima OMT mediante la cual se forma el precursor común O-metilnorbeladina, a partir del cual se forman todos los alcaloides exclusivos que representan a la familia Amaryllidaceae (Bastida Armengol et al., 2011). A pesar que se han identificado estas enzimas en los pasos iniciales de la ruta de biosíntesis, actualmente todavía no se han reportado estas enzimas en especies locales de plantas de Amaryllidaceae.

En este contexto, mediante este trabajo se quiso generar información sobre la secuencia de ADNc de al menos una enzima involucrada en los pasos iniciales de la ruta biosintética de los alcaloides mayoritarios que se producen en las especies *Zephyranthes carinata* y *Zephyranthes rosea*, familia Amaryllidaceae.

Como estrategia para abordar el problema de investigación planteado, se partió de un análisis bioinformático, mediante el cual se diseñaron diferentes combinaciones de cebadores degenerados con base en regiones conservadas en alineamientos de secuencias de ARNm y proteínas de especies relacionadas o no con las especies de la familia Amaryllidaceae. Las regiones flanqueadas por los cebadores fueron amplificadas por PCR y visualizadas mediante electroforesis con

geles de agarosa. Los fragmentos que tuvieron éxito en la amplificación fueron clonados en el plásmido pTZ57R/T con el cual se hizo transformación bacteriana en células competentes de *E. coli*. Posteriormente los plásmidos de colonias transformadas con el inserto de interés fueron secuenciados. El análisis de las secuencias de ADNc obtenidas fue llevado a cabo mediante herramientas bioinformáticas como BLAST, Chromas Lite y ClustalW2.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. PLANTEAMIENTO DE LA PROPUESTA Y JUSTIFICACIÓN

La ruta de biosíntesis de los alcaloides producidos en las plantas de la familia Amaryllidaceae que se ha caracterizado hasta el momento, comprende los pasos iniciales que involucran la conversión de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. Se ha identificado que las enzimas que intervienen en este primer paso son la *fenilalanina amonio liasa* (PAL, por sus siglas en inglés) y la *tirosina descarboxilasa* (TYDC, por sus siglas en inglés) (Tako & Rook, 2013). A partir de estos aminoácidos, y con la intervención de la enzima *catecol-O-metiltransferasa* (OMT, por sus siglas en inglés) se da la formación de la O-metilnorbeladina, precursor común de los diferentes tipos de alcaloides en estas plantas (Tako & Rook, 2013). El conocimiento de los pasos enzimáticos posteriores a la formación del precursor es actualmente limitado, sin embargo se identifica que las diferentes reacciones de acoplamiento fenol oxidativo que sufre la O-metilnorbeladina, son pasos limitantes que determinan la exclusividad de alcaloides en las especies de Amaryllidaceae. Adicionalmente, aun partiendo de que las enzimas PAL, TYDC y OMT han sido identificadas dentro de los pasos iniciales de la ruta biosintética, hasta el momento no se han encontrado reportes de las secuencias de ARNm en especies colombianas pertenecientes a esta familia.

En este contexto, el desarrollo de este proyecto de investigación buscó generar información crítica y precisa sobre la secuencia de ADNc correspondiente a una o varias enzimas involucradas en la ruta biogénica de la síntesis de los alcaloides mayoritarios en las especies locales *Zephyranthes carinata* y *Zephyranthes rosea*. Estas enzimas podían estar involucradas tanto en los pasos iniciales como en las etapas finales que determinan las diferentes variantes de cada núcleo de alcaloides (tipo galantamina, tipo licorina, tipo crinina).

Se conoce que las especies de Amaryllidaceae producen un amplio y exclusivo grupo de alcaloides con propiedades farmacológicas de gran interés, tales como actividad anticolinesterasa, efectos citotóxicos contra células tumorales, efectos hipotensores, actividad antimalárica y efecto antimicótico (Bastida Armengol *et al.*, 2011). Particularmente, las especies de *Zephyranthes* tienen una promisorio actividad de inhibición de la acetilcolinesterasa y actividad antitumoral, debido a la presencia de los alcaloides galantamina y licorina (Cahlikova *et al.*, 2011; Reyes-Chilpa *et al.*, 2011).

Tomando en cuenta estas características, la generación de conocimiento en cuanto a la biogénesis de los alcaloides en las especies de *Zephyranthes* de la colección de la Universidad Icesi, tiene el potencial de ser un componente motivador para seguir la investigación sobre la secuencia completa de ADNc de

las enzimas candidatas en estas especies locales. El nuevo conocimiento podrá aportar en el desarrollo de estrategias que permitan usar estas enzimas como biomarcadores en el proceso de caracterización enzimática dentro de la ruta biosintética de alcaloides en otras especies de Amaryllidaceae, con el objetivo de identificar variantes enzimáticas que intervengan en el patrón de producción de alcaloides específicos.

Viendo un poco desde una perspectiva a largo plazo, el conocimiento tiene la capacidad de ser el punto de partida en el planteamiento de estrategias dirigidas a optimizar la obtención de estos metabolitos secundarios, tanto en las mismas especies como en especies no relacionadas, mediante el uso de herramientas biotecnológicas.

2.2. MARCO TEÓRICO

Familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae está constituida por un grupo de plantas que pertenecen a la subclase de las monocotiledóneas del orden Asparagales. Son plantas perennes y tienen un bulbo subterráneo grueso que las caracteriza. Dentro de esta familia se han clasificado tres subfamilias entre las que se encuentran, Agapanthoideae, con un sólo género, *Agapanthus*; la subfamilia Allioideae, que se compone de un amplio número de especies de cebollas y ajos. Y por último está la subfamilia Amaryllidoideae (Tako & Rook, 2013), siendo la única que se ha identificado como fuente promisoría de metabolitos secundarios con actividad farmacológica importante, como es el caso de los alcaloides. Esta familia comprende cerca de 75 géneros y alrededor de 1100 especies (Ramawat, Mérillon, Jin, & Xu, 2013), donde la subfamilia Amaryllidoideae comprende aproximadamente 60 géneros con 850 especies (Tako & Rook, 2013). Este último grupo es de interés tanto científico como comercial por dos razones importantes: son plantas ornamentales que presentan formas y colores impactantes, y adicionalmente se han identificado como una fuente promisoría para el descubrimiento de nuevos fármacos, principalmente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, donde la galantamina es el alcaloide representativo de esta familia para estos propósitos (Berkov *et al.*, 2009).

Distribución de las plantas de la familia Amaryllidaceae

En cuanto a la distribución de la familia Amaryllidaceae, son plantas que se encuentran ampliamente en los trópicos y con alta diversidad en las regiones del sur de África y en la región Andina (Bastida Armengol *et al.*, 2011). Algunas especies como *Leucojum aestivum* se encuentran en la región del Mediterráneo y en el este de Europa (Berkov *et al.*, 2009). Especies del género *Narcissus* son plantas endémicas de Europa y norte de África, con su centro de biodiversidad en la península ibérica (Tako & Rook, 2013). Otras especies como *Lycoris radiata* se encuentran distribuidas en China, Japón y Corea (Berkov *et al.*, 2009), países donde se han cultivado ampliamente como plantas ornamentales por muchos siglos (Tako & Rook, 2013).

En cuanto a la distribución de esta familia en Colombia, se ha reportado en el Valle del Cauca, la presencia de *Calicharis*, *Caliphruria*, *Crinum*, *Eucharis*, *Hippeastrum*, *Phaedranassa*, *Plagiolirion* y *Zephyranthes*, las cuales se consideran en peligro de extinción debido a la destrucción de su hábitat (Silverstone-Sopkin, 2011), en especial poblaciones de los géneros *Eucharis* y *Caliphruria* (Viladomat *et al.*, 2007).

Como el proyecto de investigación va dirigido hacia el género *Zephyranthes*, es importante destacar su distribución en el territorio nacional. En Colombia, se reportan 6 especies de *Zephyranthes*. En Bogotá, Cundinamarca, como especie cultivada, y en Bolívar, se encuentra *Z. albiella* (1 registro biológico). En un enclave semiárido de Cundinamarca, en el municipio de Suesca, se encuentra *Z. susatana* conocida como “*papa de marrano*” (9 registros). *Z. carinata* (16 registros) se encuentra en Cundinamarca conocida como “*lirio*”, en Santander, Boyacá y Antioquia, sin embargo es nativa de México y Guatemala. *Z. puertoricensis* (2 registros) se encuentra en Bolívar y Tolima. *Z. robusta*, nativa de Argentina y Uruguay, se encuentra en Antioquia y se conoce como “*cebollita*”. Por último está *Z. rosea* (4 registros) que se encuentra en San Andrés y Providencia y en Bolívar. Para estas plantas se reporta una distribución amplia en América central y las Antillas (Fernández Alonso & Groenendijk, 2004) (Sistema de Información Sobre Biodiversidad de Colombia, 2013).

Alcaloides de la familia Amaryllidaceae

La mayoría de estudios que se han realizado sobre estas plantas, se han enfocado en la ocurrencia de los alcaloides reportados como característicos de esta familia, por lo que la mayor literatura disponible ha sido sobre los perfiles fitoquímicos y sobre las posibles aplicaciones farmacéuticas (Berkov *et al.*, 2009; Cahlikova *et al.*, 2011; Lamoral-Theys *et al.*, 2010; Reyes-Chilpa *et al.*, 2011). Por el contrario, el conocimiento sobre las vías biogénicas de la síntesis de los alcaloides aún no es concluyente (Takos & Rook, 2013). Actualmente es limitada la información acerca de la caracterización de genes que codifiquen las enzimas claves que regulan la producción de estos metabolitos secundarios.

Las investigaciones publicadas evidencian que la mayoría de los estudios acerca de las plantas de la familia Amaryllidaceae se han llevado a cabo principalmente en Europa y en Asia (Berkov *et al.*, 2009). Contrario ha sido en las regiones de Sudamérica y Sudáfrica, donde las investigaciones son limitadas a pesar de ser los dos centros de más alta biodiversidad de esta familia (Berkov *et al.*, 2009).

La característica particular de la familia Amaryllidaceae es la presencia de un amplio y exclusivo grupo de alcaloides, los cuales han sido aislados de todos los géneros que la constituyen. Es importante aclarar que los alcaloides sólo han sido aislados de los géneros de la subfamilia Amaryllidoideae, en la más reciente clasificación de APGIII. Originalmente la subfamilia actual Amaryllidoideae se constituía solamente en la familia Amaryllidaceae, por ello el concepto de los *alcaloides de Amaryllidaceae* se ha tomado como una extensión a toda la familia dentro de la nueva clasificación por motivos prácticos. Sin embargo, para las subfamilias Allioideae y Agapanthoideae de la clasificación actual, aún no se reporta ocurrencia de estos alcaloides típicos de Amaryllidoideae (Takos & Rook,

2013). En toda la extensión de este trabajo, se aplicará el concepto de alcaloides de Amaryllidaceae como los que están presentes exclusivamente en la subfamilia Amaryllidoideae.

Se ha identificado que los alcaloides de Amaryllidaceae presentan siete tipos de estructuras que pertenecen a una misma ruta biogénica. A partir de estos núcleos estructurales se deriva la gran diversidad de estructuras de alcaloides con un amplio número de efectos farmacológicos. Hasta el momento se han aislado alrededor de 300 alcaloides diferentes, pero se ha encontrado que todos se derivan de un mismo núcleo, el precursor O-metilnorbeladina, primer producto de los pasos iniciales de la biosíntesis de todos los alcaloides asociados a estas plantas (Bastida Armengol *et al.*, 2011).

Las siete estructuras básicas se forman a partir de una serie de diferentes ciclaciones, seguidas de rearrreglos, con la adición, o no, de dos carbonos y/o la apertura del anillo, que finalmente producen alcaloides específicos (Lamoral-Theys *et al.*, 2010). Estas estructuras básicas incluyen licorina, crinina, narciclasina, galantamina, tazetina, licorenina y montanina (Figura 17, en anexos), siendo la galantamina el núcleo con más interés farmacéutico por sus potentes propiedades farmacológicas asociadas a la inhibición reversible de la acetilcolinesterasa (Berkov *et al.*, 2009; Cahlikova *et al.*, 2011; Herke *et al.*, 2009; Zupko *et al.*, 2009). Pero no solo la galantamina tiene estas propiedades, se ha encontrado que otros alcaloides también poseen actividad anticolinesterasa aunque en menor grado. Dentro de estos se encuentra el alcaloide licorina, la caranina, seudolicorina, unginorina y ungeremina (Bastida Armengol *et al.*, 2011).

A pesar del gran número de alcaloides que se producen en estas plantas, solo la galantamina se produce de forma comercial, destacándose por su actividad anticolinesterasa. A pesar de que esta propiedad inhibitoria de la acetilcolinesterasa es la que genera mayor interés, son muchas otras las actividades farmacológicas que también son de importancia terapéutica, las cuales son atribuidas a otros alcaloides en las plantas de Amaryllidaceae. Estas propiedades terapéuticas incluyen efectos citotóxicos contra células tumorales, efectos hipotensores para el control de la tensión arterial (tipo homolicorina), actividad antimalárica contra cepas sensibles a cloroquina (tipo crinina y hemantamina), efecto antimicótico (tipo narciclasina), actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (tipo montanina) (Bastida Armengol *et al.*, 2011; Lefranc *et al.*, 2009; Takos & Rook, 2013).

De forma particular, licorina es un alcaloide con un anillo del tipo pirrolofenantridina, característico por su poderosa actividad inhibitoria de la síntesis del ácido ascórbico. También se le ha puesto gran interés por sus potentes efectos antitumorales incluso en el rango micromolar y hasta el momento licorina es el componente más activo con este efecto (Lamoral-Theys *et al.*, 2009). Los análisis *in vivo* sobre la actividad antitumoral han revelado que el alcaloide

licorina proporciona beneficio terapéutico significativo en ratones portadores de injertos cerebrales del melanoma B16F10 en dosis no tóxicas. Se sugiere que la licorina es un alcaloide potencial para el desarrollo de fármacos capaces de combatir cánceres resistentes a estímulos pro-apoptóticos, dentro de los que se incluyen el glioblastoma, melanoma, cáncer de pulmón, cánceres metastásicos (Lamorale-Theys *et al.*, 2009). Ensayos indican que la vía por la cual este alcaloide inhibe la proliferación de células tumorales se da por la interacción con el ARNt debido a la formación de un complejo con este (Takos & Rook, 2013).

Otras propiedades biológicas que han sido atribuidas a la licorina, son las actividades antivirales contra virus de ARN y ADN, así como actividad antiprotozoarios contra parásitos como *Plasmodium falciparum*, causa de la malaria y *Trichomonas vaginalis*, causante de la tricomoniasis, enfermedad de transmisión sexual (Takos & Rook, 2013).

Ruta biosintética elucidada de los alcaloides de Amaryllidaceae

La formación de los múltiples tipos de alcaloides de Amaryllidaceae depende de las transformaciones subsecuentes a la formación del precursor O-metilnorbeladina. Se ha reportado que todos los alcaloides se derivan de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina (Takos & Rook, 2013), los cuales son usados por los sistemas enzimáticos para generar el precursor común O-metilnorbeladina. Posteriormente, por medio de varias vías de acoplamiento fenólico oxidativo, se producen los tres esqueletos principales que darán lugar a la diversidad de alcaloides.

Los pasos iniciales consisten en la conversión de la fenilalanina en ácido cinámico y amoníaco por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa, PAL (por sus siglas en inglés). Paralelamente, la tirosina sufre un proceso de descarboxilación para formar la estructura tiramina por medio de la enzima tirosina descarboxilasa, TYDC (por sus siglas en inglés). Para la formación del precursor O-metilnorbeladina, el ácido cinámico es degradado primero al aldehído protocatéquico (figura 18, en anexos), para después dar lugar a la condensación con la tiramina. Como producto intermediario se forma una base de Schiff, que sufre una reducción en un paso posterior para formar así la norbeladina (Takos & Rook, 2013). Este precursor es metilado adicionalmente por la acción de la enzima catecol-O-metiltransferasa, OMT (por sus siglas inglés) que transfiere un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina (SAM) para formar finalmente el tipo O-metilnorbeladina (Eichhorn, Takada, Kita, & Zenk, 1998) (figura 19, en anexos), intermediario clave en la mayoría de los casos (Bastida Armengol *et al.*, 2011).

A partir de la O-metilnorbeladina se despliegan tres vías alternativas de acoplamiento fenólico oxidativo. Mediante el acoplamiento *para'-para'* se generan

los alcaloides tipo crinina, hemantamina, tazetina, narciclasina y montanina. El acoplamiento fenol oxidativo *para'-orto'* da lugar a los alcaloides tipo galantamina. La tercera vía de acoplamiento es la de *orto'-para'* que da lugar a los alcaloides tipo licorina y homolicorina (Bastida Armengol *et al.*, 2011) (figura 18, en anexos).

Como se observa en la ruta biosintética caracterizada hasta el momento (figura 2, en anexos), los pasos limitantes que determinan la exclusividad de los diferentes tipos de alcaloides enmarcados en estos tres núcleos base, licorina, crinina y galantamina, son los que involucran sistemas enzimáticos claves que especifican la presencia o ausencia de un grupo de alcaloides en cualquiera de las especies de Amaryllidaceae. Justamente son estos pasos específicos y claves de la ruta de biosíntesis los que despiertan gran interés científico, ya que es un paso bastante complejo y poco comprendido, lo que restringe y hace difícil su reproducción por síntesis química (Takos & Rook, 2013). En este contexto, se evidencia la razón por la cual la producción a gran escala a partir de la síntesis química es pobre en el área experimental, y adicionalmente nace un gran desafío para los investigadores que tienen especial interés en métodos alternativos a la extracción tradicional de alcaloides en esta familia.

Lo que se conoce de estas enzimas involucradas en los tres diferentes acoplamientos no es realmente concluyente, sin embargo se ha planteado la hipótesis de que es muy probable que la enzima que cataliza el acoplamiento intramolecular a partir de la O-metilnorbeladina sea una enzima altamente específica de la familia del citocromo P450 dependiente de oxidasas (Eichhorn *et al.*, 1998). Esta hipótesis se basa en el conocimiento sustentado sobre la función de estas enzimas de catalizar reacciones de acoplamiento fenol oxidativo en otros procesos metabólicos. Sin embargo, una limitante se presenta al tratar de evaluar esta hipótesis, ya que la capacidad de estas enzimas para catalizar las reacciones de acoplamiento ha evolucionado de manera independiente en diferentes especies, lo que hace más difícil proponer específicamente genes candidatos que puedan estar involucrados en el paso clave de la biosíntesis (Takos & Rook, 2013).

En este contexto, es importante hacer notar que la identificación de enzimas específicas que catalizan las reacciones del acoplamiento fenol oxidativo del precursor O-metilnorbeladina en la ruta de biosíntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae, es una hipótesis prometedora, que en términos de investigación y conocimiento científico se constituye en un punto de partida clave para el desarrollo de especies de Amaryllidaceae con mayor contenido de alcaloides, o para promover propuestas dirigidas a incrementar la composición y la diversidad de alcaloides (Takos & Rook, 2013). Este conocimiento será la base para el desarrollo de nuevos fármacos que podrá ser desarrollado mediante el abordaje de herramientas biotecnológicas enfocadas a mejorar la producción y la disponibilidad comercial de los mismos.

El entendimiento de las enzimas que limitan el paso del acoplamiento fenol oxidativo permitirá desarrollar estrategias de manipulación genética de la biosíntesis de los alcaloides típicos de Amaryllidaceae, con el que se podrá promover alternativas como por ejemplo la transformación genética de organismos que sirvan como plataformas de producción en masa de estos metabolitos secundarios, como es el caso de los sistemas bacterianos o de levaduras. También se podrán desarrollar estrategias de transformación genética en otras especies de plantas no relacionadas con la familia. Adicionalmente, este entendimiento aportará conocimiento para el desarrollo de estrategias que permitan usar estas enzimas como biomarcadores en la caracterización de enzimas dentro de la ruta de biosíntesis de alcaloides en otras especies de Amaryllidaceae, con el objetivo de identificar variantes enzimáticas que intervengan en el patrón de producción de alcaloides específicos. Incluso podrían ser útiles como marcadores complementarios para la clasificación taxonómica dentro de la familia Amaryllidaceae.

Aspectos generales de las enzimas PAL, OMT y TYDC

Los alcaloides como metabolitos secundarios han sido definidos históricamente como moléculas con funciones ecoquímicamente importantes en la defensa de las plantas contra el ataque de organismos patógenos y contra herbívoros (Kutchan, 1995).

Se cree que la función potencial de los alcaloides en la defensa química natural está dirigida hacia actividades como fitoalexinas, como forma de almacenamiento de nitrógeno o como protectores contra la radiación UV (Kutchan, 1995). Estos metabolitos han despertado gran interés tanto por su función en las plantas como por sus actividades biológicas tan potentes que han permitido que sean aprovechados como agentes farmacológicos. Es por esto que la investigación ha logrado elucidar enzimas biosintéticas como fuente para facilitar la obtención de alcaloides, mediante técnicas de aislamiento, purificación y caracterización de estas enzimas (Facchini, 2001).

Fenilalanina amonio liasa (PAL)

La enzima PAL (EC 4.3.1.24) pertenece a la familia de las liasas que escinde enlaces carbono-nitrógeno. Dentro de la ruta biosintética de los alcaloides de Amaryllidaceae, cataliza la desaminación no oxidativa del aminoácido fenilalanina a ácido trans-cinámico, reacción que representa un paso importante para el control del flujo del carbono dentro de la ruta. La enzima PAL existe universalmente en las plantas superiores como una familia de genes, la cual incluye la presencia de isoformas que posiblemente tengan diversos roles metabólicos (Kumar & Ellis,

2001). Se ha encontrado que entre estas existen 4 genes reportados PAL1, PAL2, PAL3 y PAL4, los cuales se encuentran involucrados en el crecimiento, desarrollo y en el sistema de defensa natural vegetal (Yoon et al., 2013).

Se ha reportado que la expresión de la enzima PAL se ha correlacionado con la exposición de la planta a diferentes estímulos de estrés tales como infección por hongos, heridas mecánicas, radiación UV y cambios bruscos de temperatura (Bagal, Leebens-Mack, Lorenz, & Dean, 2012).

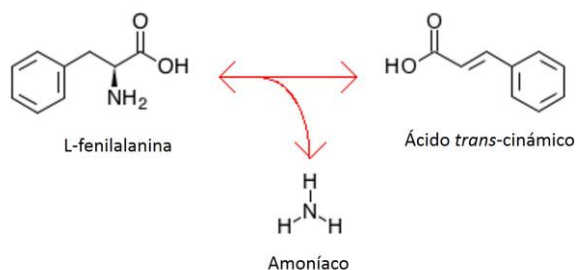


Figura 1. Reacción enzimática mediada por la enzima PAL en la biosíntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae. Tomado de http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:4.3.1.24

Tirosina descarboxilasa (TYDC)

La enzima TYDC (EC. 4.1.1.25) es una enzima que hace parte de la familia de las liasas que escinde enlaces carbono-carbono. Está involucrada en la biosíntesis de numerosos metabolitos secundarios entre los que se encuentran los alcaloides. Esta cataliza la descarboxilación del aminoácido tirosina para dar tiramina, desviando de esta manera a la tirosina del metabolismo primario hacia la biosíntesis de los alcaloides. Se ha encontrado que esta enzima es estimulada por la presencia de patógenos en varias plantas y por tanto se cree que la tiramina sirve como precursor para la biosíntesis de metabolitos de respuesta para la defensa (De la Cruz, González, & Riley, 2012). Para algunas especies, la enzima es altamente específica para la acción sobre la fenilalanina.

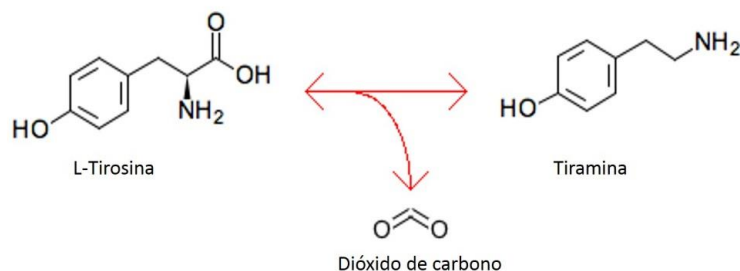


Figura 2. Reacción enzimática mediada por la enzima TYDC en la biosíntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae. Tomado de http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn:R00736

O-metiltransferasa (OMT)

Las enzimas que pertenecen a las OMT de la superfamilia 2 (EC. 2.1.1.6) catalizan la transferencia de un grupo metilo desde SAM (*S-adenosil-L-metionina*) a un átomo de oxígeno de un hidroxilo de la molécula aceptora y participan en la formación de varios metabolitos especializados entre los que se encuentran los metabolitos secundarios. El grupo metilo está asociado en muchos casos con la alteración de la solubilidad de la molécula y el incremento de las actividades ecológicas (De la Cruz et al., 2012).

Análisis comparativos de las secuencias de aminoácidos predictivos de estas enzimas OMT en plantas, han permitido concluir que presentan cinco regiones altamente conservadas, de las cuales se cree que la región I está involucrada en el sitio de unión de SAM (Ibrahim, Bruneau, & Bantignies, 1998).

Abordaje para la identificación de enzimas dentro de la ruta biosintética

Es importante abordar cómo se ha venido dando el enfoque en investigación para enfrentarse a la búsqueda de enzimas biosintéticas en las especies de Amaryllidaceae, ya que a pesar de que todavía no hay una perspectiva clara que permita resolver la actividad enzimática de forma secuencial y precisa, si es de destacar que es un tema de bastante interés científico y comercial. Dentro de las estrategias que se han venido usando en la búsqueda de enzimas asociadas a la biosíntesis de los alcaloides en especies diferentes a las de Amaryllidaceae, se encuentra el análisis transcriptómico o análisis proteómico.

El objetivo de este enfoque es poder comparar la información del transcriptoma y/o proteoma con el perfil metabólico, teniendo en cuenta siempre usar el mismo tejido. Este análisis combinado permite establecer relaciones concretas entre la expresión de genes específicos con la producción de alcaloides, para finalmente acercarse a la identificación de genes claves (Goossens & Rischer, 2007). Zeng *et al.* (2013) muestran resultados satisfactorios que proveen información importante para la identificación de genes potenciales involucrados en la biosíntesis de alcaloides en *Macleaya spp.* a través de un análisis del transcriptoma, integrado con el análisis del proteoma para comparar con el perfil metabólico en diferentes órganos.

Otra forma de abordar la búsqueda de enzimas biosintéticas, es el análisis bioinformático como herramienta de apoyo a los resultados obtenidos a partir de técnicas de biología molecular. Según NIH (*National Institutes of Health*) la bioinformática es el “estudio, desarrollo o la aplicación de herramientas computacionales enfocadas para extender su uso en el análisis de información biológica, médica, sobre el comportamiento o de salud” (Pevsner, J., 2009). El

análisis bioinformático involucra la manipulación computacional para analizar datos de secuencias biológicas tales como ADN, ARNm o proteínas mediante la aplicación de algoritmos para abordar por ejemplo la construcción de alineamientos múltiples o por parejas con el fin de identificar secuencias homólogas en entradas de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos (Pevsner, J., 2009).

El análisis bioinformático parte de la indagación de información sobre los genes o las proteínas involucradas en el problema que se quiere resolver. Con esta información se inicia una búsqueda en las bases de datos (GeneBank, Entrez, OMIM) con el objeto de encontrar entradas de secuencias que puedan ser de interés. Una vez se ha recopilado la información con entradas suficientemente informativas se inicia con su análisis mediante la comparación de secuencias de proteínas o ADN con otras secuencias publicadas en varias bases de datos con la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). El investigador puede usar esta información de acuerdo a su objetivo de investigación y por ejemplo para el caso de diseño de cebadores para la amplificación por PCR de genes o secuencias específicas, los alineamientos son útiles para diseñarlos de acuerdo a las regiones homólogas entre las entradas las cuales son identificadas por los diferentes algoritmos (Pevsner, J., 2009). Existen varios programas que se pueden encontrar en la Web para hacer el diseño de cebadores, dentro de los que se encuentra *primer3*, usado también por *primer-blast*, *in silico PCR*. Otros que han sido ampliamente utilizados para el diseño de cebadores degenerados son *CODEHOP*, *amplicon*, *primers4clades*, *primaclade*, entre otros.

Otras de la aplicaciones de programas bioinformáticos es analizar la información que se obtiene después de la secuenciación, mediante los cuales se puede hacer un proceso de edición de secuencias para organizar la información y que de esta manera sea útil para resolver la problemática de investigación. Dentro los programas en la Web más usados se encuentran *CHROMAS*, *Sequencher*, *BioEdit*, *DNAtools*, *MEGA*, entre otros.

Uso de cebadores degenerados para amplificar por PCR genes desconocidos

Una de las tecnologías que han sido de gran impacto en la biología molecular ha sido el desarrollo de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta permite la amplificación *in vitro* de un fragmento particular de ADN de forma exponencial, la cual involucra ciclos que se repiten entre 28 y 35 veces y un perfil de temperaturas para promover la desnaturalización del ADN, la hibridación de los cebadores a la cadena molde, la síntesis de las nuevas cadenas con la acción de la enzima *Taq* ADN polimerasa y la extensión de las cadenas (Innis, M. *et al.* 1990)

Para que la reacción de amplificación sea exitosa, es fundamental que los cebadores se unan específicamente a una región de la cadena de ADN molde. Sin embargo para el caso en donde se busca amplificar una cadena de ADN desconocida correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, es necesario que se diseñen las diferentes posibilidades de cebadores que sean complementarios a la región de interés del ADN molde. Para esto se diseñan cebadores degenerados que consisten en una secuencia en donde algunas de las posiciones tienen varias bases posibles y por tanto hay varias secuencias posibles para un mismo cebador (Linhart, C. and Shamir, R., 2005). La degeneración del cebador es el número de combinaciones de secuencias únicas que puede contener, y para identificar las bases posibles para una misma posición es necesario examinar el código genético para correlacionar una secuencia de aminoácidos con sus posibles secuencias de nucleótidos que puede ser traducida. Es importante tener en cuenta que la selección de una secuencia de aminoácidos con una degeneración mínima es la opción más deseable para lograr que los cebadores sean suficientemente específicos y puedan hibridarse a la cadena molde (Linhart, C. and Shamir, R., 2005).

Clonación molecular como técnica molecular para la identificación de secuencias de interés

Es importante mencionar que la clonación molecular es una estrategia ampliamente utilizada para abordar la problemática de la identificación de secuencias de ADN de interés. Esta permite obtener un gran número de copias del fragmento de ADN con el objetivo de obtener cantidades suficientes para los subsecuentes análisis.

La clonación molecular es un conjunto de técnicas que se han desarrollado para replicar selectivamente un segmento de ADN de interés. El fragmento clonado puede replicarse dentro de una célula hospedera mediante la tecnología del ADN recombinante, o puede hacerse usando la técnica de amplificación por PCR.

Para el caso del ADN recombinante, la clonación involucra la inserción de un fragmento de ADN de interés, que puede ser un producto de PCR, en un vector de clonación que debe tener la característica de autoreplicación. Este vector recombinante luego es transferido a una célula hospedera, siendo *E. coli* el microorganismo más utilizado. Dentro de estas células, se producen docenas de copias a partir de la molécula de ADN recombinante y finalmente los segmentos de ADN clonados pueden ser recuperados de las células bacterianas mediante la purificación para ser analizados de diferentes maneras. La clonación de productos de PCR en un vector estable es a menudo una técnica muy oída para facilitar los análisis posteriores de la información contenida en el ADN recombinante. Tales análisis comprenden estudios de hibridación, expresión, modificación o procesos de subclonación. Adicionalmente con la clonación

molecular de los productos de PCR se garantiza una secuenciación de ADN de alta calidad (Bird, Smith, & Jiang, 2002)

2.3. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar la secuencia específica de ADNc de al menos una enzima involucrada en la ruta de síntesis de los alcaloides mayoritarios en especies locales del género *Zephyranthes* tales como *Z. carinata* y *Z. rosea*.

Objetivos específicos

1. Identificar mediante aproximación bioinformática, la secuencia de ARNm de enzimas involucradas en la ruta biosintética de alcaloides en diferentes especies de plantas para determinar las regiones más conservadas entre ellas, con base en las secuencias reportadas.
2. Diseñar cebadores degenerados con base en regiones conservadas de posibles enzimas involucradas en la síntesis de alcaloides, que permitan la amplificación de ADNc en *Z. carinata* y *Z. rosea*.
3. Amplificar mediante PCR las regiones de ADNc correspondientes al transcrito de la enzima candidata, y secuenciar estas regiones en las especies locales *Z. carinata* y *Z. rosea*.
4. Analizar la ocurrencia y similitud de las secuencias de ADNc de al menos una de las enzimas identificadas que amplificaron en los individuos de *Z. carinata* y *Z. rosea* obtenidas mediante la secuenciación de los insertos en un vector de clonación, los cuales corresponden a los productos de PCR.

2.4. METODOLOGÍA

El desarrollo de la presente investigación se llevó a cabo en la Universidad Icesi, en la ciudad de Cali, Colombia. Específicamente se desarrolló en el Laboratorio de investigación de Biología Molecular (LBM) ubicado en el quinto piso del edificio L, y en el Laboratorio de docencia de Biotecnología, 406L. También se requirió el espacio del cuarto frío ubicado en el primer piso del área de investigación para el almacenamiento de material vegetal y muestras de ARN a -80°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Revisión bibliográfica y bioinformática

Se hizo una amplia búsqueda de información en artículos científicos sobre estudios previos de identificación de enzimas relacionadas con la ruta de síntesis de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae (Bastida Armengol et al., 2011; Eichhorn et al., 1998; Takos & Rook, 2013). La búsqueda estuvo enfocada a encontrar información sobre las enzimas candidatas propuestas por los autores en sus investigaciones sobre la familia. Con este contexto fue posible identificar enzimas involucradas en los pasos iniciales de la ruta de biosíntesis donde intervienen las enzimas PAL, TYDC y OMT. Así mismo se identificó que existe una hipótesis acerca de que una enzima altamente específica de la familia del citocromo P450 dependiente de oxidasas, es la que cataliza el acoplamiento fenol oxidativo del precursor O-metilnorbeladina (Eichhorn et al., 1998), sin embargo no se ha identificado una enzima puntual por la complejidad de la función de la misma. Bajo este panorama se seleccionaron las enzimas PAL, TYDC y OMT para ser evaluadas en esta investigación.

Se hizo una revisión amplia en las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) encaminada a encontrar las enzimas identificadas tanto en la base de datos de proteínas como en las bases de datos de genes y de ESTs. En esta búsqueda se identificó que los reportes de secuencias de genes o de nucleótidos en los que se incluye ESTs son limitados en comparación con los reportes de secuencias de aminoácidos. Es por esta razón que se decidió filtrar la búsqueda con el fin para encontrar información sólo referente a secuencias de proteínas en especies de plantas, entre ellas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Entre las plantas monocotiledóneas se buscó hacer un filtro para aquellas especies relacionadas con la familia, sin embargo como fueron limitados los resultados, se seleccionaron otras secuencias de especies monocotiledóneas que han sido ampliamente estudiadas como el arroz y el maíz.

Se hizo un BLAST con cada una de las entradas seleccionadas por cada enzima (OMT, PAL y TYDC) con el objetivo de evidenciar si se encontraban dominios conservados con otras especies de plantas. Con esta Información se buscaba poder establecer la hipótesis de que si las secuencias referían a dominios conservados, estas se podrían encontrar también en especies de plantas de Amaryllidaceae.

Una vez se tuvieron todas las entradas analizadas mediante BLAST se agruparon las secuencias correspondientes a cada enzima y con estas se realizó posteriormente el alineamiento con el programa gratuito en internet ClustalW2. Teniendo las secuencias alineadas para cada enzima, se identificaron las regiones más conservadas entre al menos 5-7 especies dentro del alineamiento.

Específicamente para hacer el alineamiento correspondiente a la enzima OMT se consideraron sólo las entradas de especies monocotiledóneas seleccionadas, ya que al hacer el alineamiento con dicotiledóneas y monocotiledóneas se observó que el primer grupo difería bastante del segundo con respecto a las regiones conservadas entre las especies. Es importante mencionar que para esta enzima se encontró una secuencia de aminoácidos reportada para *Narcissus tazetta*, la cual se usó como referencia teniendo en cuenta que es una especie perteneciente a la familia Amaryllidaceae.

Para el caso del alineamiento para la enzima PAL, se consideraron entradas tanto para especies dicotiledóneas como para monocotiledóneas, ya que a partir de estos dos grupos se encontraron regiones de aminoácidos conservadas. Para este alineamiento se tomaron como referencia secuencias reportadas de especies que pertenecen a la familia Amaryllidaceae, tales como *Lycoris radiata*, *Narcissus tazetta*, *Allium cepa* y *Allium sativum*.

Para hacer el alineamiento para la enzima TYDC, se consideraron sólo las secuencias de especies de plantas monocotiledóneas, ya que fue el grupo que más información brindó en cuanto a las regiones conservadas identificadas. Para esta enzima no se encontraron secuencias de aminoácidos reportadas en las bases de datos para especies de la familia Amaryllidaceae.

A continuación se presenta la información correspondiente al número de referencia en la base de datos de proteínas de las secuencias que se emplearon para hacer el alineamiento y a partir de las cuales se diseñaron los cebadores (Tabla 1).

Tabla 1. Números de referencia en la base de datos de proteínas de las secuencias de aminoácidos utilizadas para hacer el alineamiento para cada enzima.

Enzima	Referencia de la secuencia
OMT	NM001067566.1 <i>Oryza sativa</i>
	AAQ24351.1 <i>Zea mays</i>
	AAL57301.1 <i>Sorghum bicolor</i>
	AGI97942.1 <i>Narcissus tazetta</i>
TYDC	NP001059509.1 <i>Oryza sativa</i>
	NP001044376.1 <i>Oryza sativa</i>
	NP001064486.2 <i>Oryza sativa</i>
	NP001064543.2 <i>Oryza sativa</i>
	XP004983131.1 <i>Setaria italica</i>
	EMT10380.1 <i>Aegilops tauschii</i>
PAL	ACL53545.1 <i>Zea mays</i>
	ABM63378.1 <i>Saccharum officinarum</i>
	NP001047484.1 <i>Oryza sativa</i>
	CAA34226.1 <i>Oryza sativa</i>
	NP001168086.1 <i>Zea mays</i>
	ACM61988.1 <i>Lycoris radiata</i>
	ADO24189.1 <i>Allium sativum</i>
	ADD82537.1 <i>Narcissus tazetta</i>
	AGZ95691.1 <i>Allium cepa</i>
	AGZ95690.1 <i>Allium cepa</i>
	XP_004246650.1 <i>Solanum lycopersicum</i>
	AAN32867.1 <i>Coffea arabica</i>
	BAF36967.1 <i>Lotus japonicus</i>
	BAF36970.1 <i>Lotus japonicus</i>
	BAF36972.1 <i>Lotus japonicus</i>
	AAM15324.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>
BAA24928.1 <i>Lithospermum_erythrorhizon</i>	

2.4.2. Diseño de cebadores

Una vez identificadas las regiones candidatas para el diseño de los cebadores, por ser regiones conservadas con longitud mínima de 6 aminoácidos, se hizo la traducción de la información de aminoácidos a nucleótidos teniendo en cuenta el código genético estándar (Ver figura 3). Con base en estas secuencias posibles de nucleótidos se diseñaron los cebadores con secuencias degeneradas teniendo en cuenta la nomenclatura de la Tabla 2.

Los cebadores que se diseñaron en el sentido 5'-3' de la secuencia de la enzima, es decir los cebadores *Forward*, se obtuvieron a partir de la secuencia original en el alineamiento. Mientras que los cebadores antisentido, es decir los cebadores *Reverse*, se diseñaron teniendo en cuenta la secuencia complementaria y reversa de la secuencia original (Ver tabla 6, en resultados).

Cuando se tuvo el consenso de los cebadores en una lista final, se hizo un análisis de cada uno de los oligonucleótidos considerando criterios tales como longitud del cebador, expresada como pares de bases, la temperatura de fusión o *T_m* (*melting Temperature*), el porcentaje de GC y la presencia de estructuras secundarias tales como horquillas y/o homodímeros.

- Longitud del cebador: Se buscó que los cebadores tuvieran una longitud entre 18 y 30 pb. Esta es una longitud que es lo suficientemente larga como para ser específica, pero lo suficientemente corta para unirse a la cadena molde fácilmente a la temperatura de hibridación o temperatura de *annealing* (*T_a*).
- *Melting Temperature*: El rango de temperaturas de fusión, *T_m*, que se consideraron fue entre 40 y 65°C. El rango inferior fue considerado principalmente para la *T_m* mínima calculada para cada cebador.
- Porcentaje de GC: Se consideró un porcentaje ideal del contenido de las bases Guanina (G) y Citosina (C) de 40 - 60%.
- Estructuras secundarias: Principalmente se analizó la presencia de formación de horquillas o *Hairpins* y formación de homodímeros, buscando que el valor de ΔG para la estructura fuera el menos negativo, es decir que la estructura secundaria fuera la más inestable. El valor de $\Delta G < 0$ indica condición de espontaneidad, mientras que el valor $\Delta G > 0$ indica que el proceso no es espontáneo. Con base en esto un valor de ΔG menos negativo indica que la estructura secundaria tiende a ser menos estable.

El análisis de estos criterios se llevó a cabo mediante una herramienta gratuita que ofrece la página oficial del proveedor IDT (<https://www.idtdna.com/site>) con el cual se solicitó el servicio de síntesis de cebadores.

Tabla 2. Nomenclatura para expresar la degeneración en la secuencia de nucleótidos de los cebadores.

Letra	Nucleótidos presentes
M	A/C
R	A/G
W	A/T
S	C/G
Y	C/T
K	G/T
V	A/C/G
H	A/C/T
D	A/G/T
N	A/C/G/T
B	C/G/T

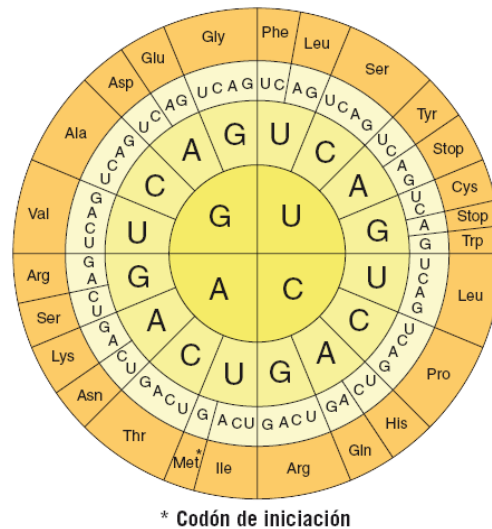


Figura 3. Código genético estándar. Tomado de <http://blog.cienciasdelanaturaleza.es/>

Nuevas consideraciones para el diseño de cebadores

Debido a los resultados obtenidos (los cuales se presentan en la siguiente sección 2.5) en la primera etapa de experimentación en el análisis con los cebadores diseñados a partir de alineamientos de secuencias de aminoácidos, se decidió emplear una técnica alternativa a la descrita anteriormente para el diseño.

Para ello se diseñaron nuevos cebadores degenerados pero teniendo en cuenta únicamente las secuencias de ARNm de plantas monocotiledóneas reportadas en las bases de datos del NCBI. Para esto se hizo una búsqueda mediante BLAST partiendo de las secuencias de aminoácidos ya identificadas, utilizando el programa *tblastn* (compara una secuencia proteica con la base de datos de nucleótidos traducidos) con el propósito de encontrar secuencias de nucleótidos para estas mismas entradas. Teniendo una lista de entre 4 y 7 entradas por cada una de las tres enzimas (OMT, TYDC y PAL) se hizo para cada una el alineamiento correspondiente mediante el programa ClustalW2. En la tabla 3 se presenta la información correspondiente al número de referencia en la base de datos de nucleótidos de las secuencias que se emplearon para hacer el alineamiento.

Tabla 3. Números de referencia en la base de datos de nucleótidos de las secuencias de ARNm utilizadas para hacer el alineamiento para cada enzima.

Enzima	Referencia de la secuencia
OMT	NM_001112577.1 <i>Zea mays</i>
	AF387790.1 <i>Sorghum bicolor</i>
	DQ288259.1 <i>Oryza sativa</i>
	KC588942.1 <i>Narcissus tazetta</i>
TYDC	XM_004983074.1 <i>Setaria italica</i>
	NM_001148740.1 <i>Zea mays</i>
	NM_001071078.2 <i>Oryza sativa</i>
	AK065830.1 <i>Oryza sativa</i>
	XM_002467238.1 <i>Sorghum bicolor</i>
PAL	FJ603650.1 <i>Lycoris radiata</i>
	KF741223.1 <i>Galtonia saundersiae</i>
	GU574806.1 <i>Narcissus tazetta</i>
	GU456381.1 <i>Allium sativum</i>
	KF421111.1 <i>Allium cepa</i>
	KF421110.1 <i>Allium cepa</i>
	NM_001054016.1 <i>Oryza sativa</i>

Con ayuda del programa gratuito PRIMA CLADE en internet, se adjuntó cada alineamiento (información en FASTA) tras lo cual se obtuvo información precisa sobre la posición y la longitud de los cebadores predichos por el programa. Es importante mencionar que PRIMA CLADE (Gadberry, Malcomber, Doust, & Kellogg, 2005) permite obtener varios cebadores con unas características que pueden ser especificadas previamente tales como rangos para la longitud, máximo

número de degeneraciones, T_m mínima, óptima y máxima y un rango para el porcentaje de GC. Una ventaja importante es que este programa analiza el par de cebadores (*forward* y *reverse*) al tiempo, dando información sobre las condiciones posibles de amplificación, cosa que no tiene la aproximación inicial que se hizo.

Una vez se tuvo esta información, se seleccionaron los cebadores para cada una de las enzimas. Estos cebadores fueron luego analizados mediante la herramienta que provee IDT (*Integrated DNA Technologies*) tal como se mencionó anteriormente para los otros cebadores. También se realizó un análisis haciendo un BLAST con las secuencias de los cebadores con el propósito de evidenciar si estos referían a la enzima OMT, PAL o TYDC o si referían a enzimas fuera de interés.

Mediante esta nueva alternativa se diseñaron 10 nuevos cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de ARNm (Ver tabla 11, en resultados) y se obtuvieron 9 combinaciones diferentes, 1 para OMT, 4 para PAL y 4 para TYDC (Ver tablas 12, 13 y 14, en resultados).

2.4.3. Material vegetal y condiciones de crecimiento

En la etapa inicial de experimentación, se seleccionaron tres individuos de la especie *Zephyranthes carinata* (IA-023, IA-036 e IA-100) y un individuo de la especie *Zephyranthes rosea* (IA-045), provenientes de la colección de Amaryllidaceae de la U. Icesi. El material vegetal fue colectado entre agosto del año 2012 y marzo de 2013 como se observa en la Tabla 4. Estos ejemplares se encuentran actualmente bajo condiciones de invernadero en macetas individuales.

En una segunda etapa de experimentación, también se emplearon los materiales IA-021, IA-025 e IA-100 de *Z. carinata*, provenientes de cultivo *In vitro* (Peralta L. y cols, comunicación personal). Al momento de usar el material vegetal de cultivo *In vitro*, las plantas se encontraban completamente formadas con hojas, bulbos y raíces.

Tabla 4. Material vegetal de la colección de la Universidad Icesi. Especies *Z. carinata* y *Z. rosea*.

No.	Especie	Fecha de recolección	Colector	Origen
IA-023	<i>Z. carinata</i>	Ago-2012	WV	Cali, Valle del Cauca
IA-036	<i>Z. carinata</i>	Sep-2012	ER	Popayán, cauca
IA-045	<i>Z. rosea</i>	Dic-2012	WV	Barranquilla
IA-100	<i>Z. carinata</i>	Mar-2013	MST	Cali, Valle del Cauca
IA-021	<i>Z. carinata</i>	Ago-2012	WV	Cultivo <i>in-vitro</i>
IA-025	<i>Z. carinata</i>	Ago-2012	WV	Cultivo <i>in-vitro</i>

IA-100	<i>Z. carinata</i>	Mar-2013	MST	Cultivo <i>in-vitro</i>
--------	--------------------	----------	-----	-------------------------

WV: William Vargas. MST: Marcela Santaella Tenorio. ER: Eduardo Ruiz.

2.4.4. Extracción de ARN total

La extracción de ARN del material vegetal se llevó a cabo a partir de las hojas usando como reactivo de extracción TRIzol® Reagent casa comercial Ambion. Se utilizaron aproximadamente 200mg de tejido por individuo.

Las hojas fueron cortadas de la planta en maceta y fueron almacenadas en papel aluminio dentro de un recipiente con nitrógeno líquido para evitar la degradación del ARN durante el transporte hacia el laboratorio y durante el mismo proceso de extracción, el cual se presenta en el protocolo No.1, en anexos. El *pellet* de ARN total obtenido como producto de la extracción se resuspendió en agua con DEPC y fue almacenado a -80°C.

La concentración del ARN extraído de cada una de las muestras se midió usando el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 a 260nm (ADN y ARN). Para ello se usaron 2µL de la muestra.

2.4.5. Síntesis de ADNc

El ARN es una molécula menos estable estructuralmente que la molécula del ADN, ya que la presencia del grupo OH en el azúcar ribosa hace que la molécula de ARN sea más reactiva en comparación con el ADN en donde este grupo está ausente. Por otro lado, la doble cadena en el ADN hace que su estabilidad aumente. Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario que las muestras extraídas sean lo suficientemente estables para poder utilizarlas en los estudios de laboratorio, situación que no se logra si se trabaja directamente con las muestras de ARN. Para superar esta limitante, se hizo una síntesis de ADNc a partir del ARN usando la enzima *Reverse Transcriptase* (RT), según el protocolo *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* casa comercial Invitrogen (Ver protocolo No.2, en Anexos)

Para la síntesis se usó el cebador Oligo(dT)₂₀, provisto dentro del kit, siendo este el método más específico de hibridación en donde el cebador se une a la cola 3'- poli (A), la cual se encuentra en la gran mayoría de los ARN mensajeros (ARNm) eucarióticos. El cebador Oligo(dT)₂₀ es una cadena de 20 dTMPs (Desoxitimina) que al unirse a la cola poli (A) del ARNm permite la síntesis de la cadena complementaria de ADNc con la enzima RT.

Como control de la reacción de síntesis de ADNc a partir del ARN de las muestras, se hizo un control positivo usando ARN proveniente de células HeLa. Esta muestra control viene incluida en el kit, y consiste en la amplificación por PCR con cebadores específicos para el gen de la β -actina humano. Adicionalmente se hizo un control negativo, en el cual no incluyó la enzima RT con el objetivo de evidenciar, si es el caso, contaminación cruzada.

2.4.6. Amplificación por PCR de ADNc

Para analizar cada una de las combinaciones de cebadores degenerados que se diseñaron, se hizo amplificación de las secuencias flanqueadas por los cebadores diseñados mediante la técnica molecular de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). El equipo utilizado para hacer la amplificación fue el Termociclador *Mastercycler gradient, Eppendorf*.

La enzima utilizada para la amplificación a partir del ADNc molde, fue la enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase*, Promega. Teniendo en cuenta esta enzima, se usaron los reactivos como el Buffer compatible con la *Taq* y la solución de $MgCl_2$ que vienen dentro del mismo *kit* (Ver protocolo No.3, en anexos).

Los perfiles de amplificación para la evaluación de las diferentes combinaciones, se construyeron considerando las recomendaciones dadas por Promega para la enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Ver protocolo No.3) y se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de amplificación por PCR utilizadas en el análisis de las diferentes combinaciones de cebadores diseñados.

Componente	[Inicial]	[Final]	Volumen por reacción
Agua tipo 1	-	-	9,7 μ L
<i>Colorless GoTaq® Flexi Buffer</i>	5X	1X	4,0 μ L
$MgCl_2$	25mM	1,5mM	1,2 μ L
dNTPs	5mM c/u	0,25mM	1,0 μ L
DegPrimer <i>Forward</i>	10 μ M	0,5 μ M	1,0 μ L
DegPrimer <i>Reverse</i>	10 μ M	0,5 μ M	1,0 μ L
<i>GoTaq® Flexi DNA Polymerase*</i>	5U/ μ L	0,5U	0,1 μ L
ADNc	-	-	2,0 μ L
TOTAL			20,0 μ L

* La enzima es el último reactivo adicionado a la reacción de amplificación

Con respecto a los perfiles de temperatura, se utilizó para la desnaturalización inicial del ADNc una temperatura de 94°C durante 2 minutos y para la desnaturalización dentro de cada ciclo 94°C por 30 segundos. La temperatura de *annealing* (*Ta*) para cada pareja de cebadores fue calculada a partir de la *Tm* de los mismos y se determinó un rango según cada pareja. Para los cebadores

diseñados a partir de los alineamientos de secuencias de aminoácidos, la temperatura de *annealing* variaba entre 40°C y 50°C, mientras que para las nuevas combinaciones de cebadores degenerados, la *Ta* varió entre 42°C y 51°C (Ver tablas 7-9 y 12-14, en resultados). Como se obtuvieron varias combinaciones de cebadores con *Ta* diferentes, se usó la función *Gradiente* en el termociclador para tener la posibilidad de hacer PCR de varias combinaciones de cebadores en los mismos individuos a las diferentes *Ta*. Con respecto a la temperatura de extensión, se manejó una temperatura de 72°C durante 2 minutos. Es importante mencionar que el número de ciclos por reacción fue de 35. Como extensión final, la temperatura fue de 72°C durante 5 minutos, y como temperatura de mantenimiento se manejó una temperatura de 12°C por un tiempo indeterminado. Una vez finalizado el ciclo de reacción de PCR, los productos de PCR fueron almacenados a -20°C hasta su análisis por electroforesis.

2.4.7. Visualización de los productos de PCR

Para observar la amplificación de los posibles fragmentos flanqueados por las diferentes combinaciones de cebadores diseñados, se corrieron los productos de PCR en gels de agarosa al 1,5% en el buffer de corrida TBE 0,5X.

Como agente de tinción de las moléculas de ADNc amplificadas, se usó el fluoróforo SYBR® Green. Como marcadores de peso molecular, se utilizaron el marcador *Fast Ruler Low Range DNA Ladder (Fermentas)* y el marcador *1Kb DNA Ladder (Promega)*. El gel fue visualizado en un transiluminador con lámpara UV.

2.4.8. Clonación molecular

Después del análisis de amplificación y electroforesis de los cebadores degenerados diseñados, con los cuales se logró visualizar bandas definidas del tamaño esperado, se procedió a hacer clonación molecular de los productos de PCR

Para la clonación molecular se hizo una ligación del inserto de interés, directamente el producto de PCR, en el vector de clonación pTZ57R/T, el cual consiste en 2886pb con un sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés) entre las posiciones 615-695pb. Esta ligación se hizo de acuerdo al protocolo *InstAclone PCR Cloning Kit*, Thermo Scientific (ver protocolo No.4). Es importante mencionar que antes de hacer la ligación, los productos de PCR se limpiaron, precipitando el ADNc con etanol al 96% para retirar el exceso de sales de la reacción de PCR. Todas las ligaciones fueron incubadas a 4°C toda la noche para lograr obtener el mayor número de transformantes.

Como control del proceso de clonación, se hizo una ligación adicional como control positivo, el cual consiste en la ligación de un inserto de 953pb de un amplificado purificado provisto dentro del mismo *kit* de clonación.

2.4.9. Transformación bacteriana

Tras una noche de incubación, se procedió a hacer la transformación bacteriana en células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli*, de acuerdo al protocolo No.5. Para la transformación se utilizó el método de electroporación, para el cual se usó el electroporador (*Eporator, Eppendorf*) en la función P2, de acuerdo al volumen de celda empleado para ello.

Las bacterias se cultivaron a 37°C en una incubadora *BINDER* toda la noche en medio LB sólido con ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (0,40M) y X-Gal (40 μ g/mL). Una vez crecieron las colonias se hizo la verificación mediante el sistema de alfa-complementación con el reconocimiento fenotípico de colonias blancas/recombinantes y azules/no recombinantes. Las colonias blancas fueron aisladas de las colonias azules en nuevas placas con medio sólido LB/ampicilina/IPTG/X-Gal.

2.4.10. Confirmación de la presencia del inserto en el vector

Para evaluar la presencia del inserto de ADNc proveniente de los productos de PCR que amplificaron fragmentos definidos, además de aplicar el sistema de alfa-complementación se hizo confirmación mediante PCR a partir de las colonias y también mediante análisis de restricción del plásmido aislado de las colonias recombinantes.

a. PCR de colonias

Se hizo amplificación por PCR usando directamente las colonias recombinantes como molde. Para ello se hizo un cóctel de reacción con volumen final de 20 μ L. Se usó la enzima *Taq ADN polimerasa*, producida en la U. Icesi. La concentración final del buffer compatible para la enzima fue de 1X, el MgCl₂ fue de 1,5mM y los dNTPs fue de 0,125mM c/u. Se usaron los cebadores *Forward* y *Reverse* M13/pUC para amplificar el fragmento inserto en el plásmido.

Con respecto al perfil de temperaturas se usó el siguiente: 94°C, 2 minutos; 94°C, 30 segundos; 46°C, 30 segundos; 72°C, 2 minutos; repetido 35 ciclos desde la segunda desnaturalización, y extensión final a 72°C por 5 minutos.

Los amplificadores fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1,5% esperando ver bandas de una longitud aproximada de 650-700pb.

b. Análisis con enzimas de restricción

El análisis de restricción de los plásmidos extraídos de las colonias recombinantes de *E. coli* (Ver sección 2.4.12) se llevó a cabo mediante las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (ambas de la casa comercial Promega) las cuales generan un fragmento de 45pb + la longitud del inserto. La digestión del plásmido fue una reacción de digestión múltiple, en donde se combinaron las dos enzimas en la misma reacción, para lo cual fue necesario el uso del reactivo MULTI-CORE™ Buffer (Promega) que está diseñado para ser compatible con un amplio grupo de enzimas, como las que se usaron (<http://www.promega.es/resources/product-guides-and-selectors/restriction-enzyme-resource/restriction-enzyme-reference-information/>). El protocolo de restricción del plásmido se encuentra en el protocolo No.6, en Anexos.

2.4.11. Propagación de colonias recombinantes

Una vez se tuvieron los resultados de la confirmación del inserto mediante PCR y/o restricción de plásmidos de las colonias, se identificaron las colonias recombinantes de interés. A partir de estas colonias, se hizo una propagación en medio LB líquido conteniendo ampicilina 100µg/mL. Para esto se crecieron en tubos de ensayo de vidrio con 3mL de medio, y con una punta estéril se picó suavemente la colonia, la cual fue sumergida en el medio. Los tubos fueron incubados a 37°C en un Shaker (*Heidolph Inkubator 1000/Unimax 1010*) a 250rpm toda la noche, con el objeto de promover un rápido crecimiento.

2.4.12. Extracción del plásmido

Después de una noche de incubación de las colonias recombinantes en el medio LB líquido con ampicilina, se procedió a hacer la extracción del plásmido. Para ello se usó el método de *Minipreps con lisis por calentamiento*, LBM (Ver protocolo No.7, en Anexos), tras el cual se tuvieron las muestras listas para hacer la solicitud de secuenciación. Para evaluar el proceso de extracción del plásmido, se corrieron las muestras obtenidas en un gel de agarosa al 1% esperando obtener bandas sin barrido de una longitud aproximada de 3Kb.

El método de *Minipreps con lisis por calentamiento* consiste brevemente en una centrifugación de las colonias creciendo en LB líquido. Luego se promueve la lisis de las células con la adición de una solución de STET y de Lisozima, y las células se ponen en un baño hirviendo. El *pellet* de los plásmidos es resuspendido en una

solución de TE. Estos plásmidos son analizados mediante electroforesis y/o restricción con EcoRI y BamHI (Ver sección 2.4.10-b)

2.4.13. Secuenciación

Se midió la concentración de cada uno de los plásmidos de 22 colonias recombinantes mediante el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 a 260nm (ADN y ARN). Para ello se usaron 2 μ L de la muestra y 2 μ L del blanco que en este caso es una solución de TE. Finalmente se hizo una dilución del stock de los plásmidos para obtener alícuotas de 100ng/ μ L cada uno.

Los plásmidos (22) fueron enviados a Macrogen Korea, para secuenciar con el cebador estándar *Reverse* M13/pUC. Se eligió el cebador *Reverse* debido a que la región de hibridación se encuentra a mayor longitud de pares de bases de la región en donde se encuentra el inserto en comparación con el cebador *Forward*.

Las secuencias obtenidas de cada uno de los insertos de los plásmidos se analizaron mediante BLAST con el objetivo de identificar las secuencias que realmente incluían una región correspondiente a la enzima OMT. Las secuencias seleccionadas se editaron mediante *Chromas Lite* y se hizo un alineamiento múltiple con el programa *ClustalW2* para evidenciar las secuencias homólogas entre las secuencias de cada plásmido y obtener una secuencia consenso de ADNc para la enzima OMT en los individuos evaluados de *Zephyranthes*.

Adicionalmente, se hizo un proceso de traducción de las secuencias de ADNc para conocer los posibles marcos de lectura que permitieran identificar una secuencia de aminoácidos con una pauta de lectura continua.

2.5.RESULTADOS

2.5.1. Revisión de bibliografía y bioinformática

Como resultado de la búsqueda bibliográfica en artículos científicos publicados, se seleccionaron las enzimas OMT, PAL y TYDC, las cuales están involucradas en los pasos iniciales de la ruta de síntesis de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae.

Según la revisión bibliográfica, la enzima PAL convierte el aminoácido aromático fenilalanina en ácido cinámico y amonio, y el ácido cinámico es degradado a aldehído protocatéquico, mientras que la enzima TYDC de forma paralela convierte el aminoácido tirosina en tiramina por medio de un proceso de descarboxilación. Estas nuevas estructuras se condensan en un paso posterior para formar el núcleo común Norbeladina, el cual es luego metilado por la enzima OMT para dar lugar al precursor de todos los alcaloides producidos en estas plantas, la O-metilnorbeladina (Bastida Armengol et al., 2011; Eichhorn et al., 1998; Takos & Rook, 2013). Teniendo esto claro, se reconoce que este último paso intermedio es un paso clave en la ruta, por lo que la identificación de la secuencia de ADNc parcial o total de la enzima OMT es la de sumo interés en este estudio.

La amplia revisión en las bases de datos de genes, de EST, de proteínas y de dominios conservados del NCBI indicó que los reportes de secuencias de genes son limitados en comparación con los reportes de secuencias de aminoácidos y de ARNm para las enzimas PAL, OMT y TYDC. De la búsqueda en la base de datos de proteínas, ARNm y ESTs se encontraron secuencias reportadas tanto para especies dicotiledóneas como monocotiledóneas, dentro de las que se incluyen algunas secuencias para especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae.

Se creó una lista con varias secuencias de aminoácidos y ARNm por cada una de las enzimas. Como la mayor información de las secuencias, extraídas de la base de datos, estuvo representada por secuencias de aminoácidos, los alineamientos fueron realizados únicamente a partir de estas secuencias de proteínas. Adicionalmente, lo anterior estuvo fundamentado en la hipótesis de que al considerar secuencias de aminoácidos no se sesgaba en mayor medida el diseño de cebadores teniendo presente que la información de especies de Amaryllidaceae era bastante limitada.

Por medio de la herramienta bioinformática ClustalW2 disponible en la página de EMBL-EBI, se obtuvieron los alineamientos correspondientes para cada una de las enzimas seleccionadas. Para la enzima OMT, el alineamiento de referencia para el diseño de los cebadores, se construyó a partir de las secuencias de aminoácidos

de las especies monocotiledóneas *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa Japonica* y *Narcissus tazetta* (Figura 20, en anexos). Para la enzima PAL, el alineamiento de referencia se hizo a partir de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas reportadas. Dentro de las dicotiledóneas están las especies *Solanum lycopersicum*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Coffea arabica*, *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus*. Dentro de las monocotiledóneas están las especies *Lycoris radiata*, *Narcissus tazetta*, *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Saccharum officinarum* y el género *Brachiaria* (Figura 21, en anexos). Para el caso de la enzima TYDC, el alineamiento a partir del cual se diseñaron los cebadores, se hizo con las especies monocotiledóneas *Setaria itálica*, *Zea mays*, *Oryza sativa Japonica* y *Aegilops tauschii* (Figura 22, en Anexos).

2.5.2. Diseño de los cebadores

Teniendo en cuenta las consideraciones para el diseño de los cebadores (mencionados en la sección 2.4.2, en metodología), se obtuvo la siguiente información que permitió discriminar entre todas las posibilidades para obtener los cebadores idóneos que finalmente se mandaron a sintetizar.

2.5.2.1. Cebadores obtenidos a partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos

Los cebadores obtenidos a partir de los alineamientos de secuencias de aminoácidos se presentan en la dirección 5'-3' tanto para los cebadores *Forward* como *Reverse*. Las diferentes combinaciones *Forward-Reverse* para cada enzima, que fueron evaluadas por PCR en los individuos, se presentan en las Tablas 7, 8 y 9.

En general, los cebadores degenerados diseñados tienen una longitud entre 18 y 26pb y en todos se presenta la posibilidad de formación de estructuras secundarias tales como *hairpin* y/u homodímeros, sin embargo los cebadores elegidos presentan las estructuras secundarias internas menos estables encontradas (con el valor de ΔG más negativo posible para estas estructuras, Tabla 6).

En cuanto a la degeneración, se obtuvo cebadores con un número mínimo de 5 bases degeneradas y un número máximo de 10 bases degeneradas (referirse a la Figura 3 para ver la traducción del código genético). Es necesario mencionar que como existen varias secuencias posibles para un cebador degenerado, cuando se hace el análisis de la T_m , se obtiene una T_m mínima que corresponde a la secuencia de nucleótidos con menor contenido de GC, una T_m máxima que corresponde a la secuencia de nucleótidos con mayor contenido de GC, y una

temperatura intermedia que corresponde al promedio de temperaturas de todas las secuencias posibles. Aquí sólo se muestra la T_m mínima para cada cebador degenerado, ya que fue la temperatura a partir de la cual se calculó la temperatura de *annealing* (T_a) y con la que se inició el proceso de amplificación en las muestras de ADNc.

Con respecto a las combinaciones de cebadores degenerados, se calcularon las diferentes T_a teniendo en cuenta que corresponden a 3°C por debajo de la T_m más baja de los dos cebadores de la combinación (Ver ecuación 1). Las temperaturas de hibridación se presentan en las tablas 7, 8 y 9.

$$T_a = T_m - 3^\circ C$$

Ecuación 1

Con las T_a definidas para cada combinación de cebadores, se evaluaron inicialmente las parejas que amplificaran la longitud del fragmento más largo, de tal manera que se pudiera evaluar la mayor parte de la secuencia esperada para cada una de las enzimas. En esta etapa se evaluaron 8 combinaciones diferentes dentro las cuales tres eran para la enzima OMT, tres para PAL y dos para TYDC.

Tabla 6. Lista de cebadores diseñados teniendo en cuenta los alineamientos obtenidos a partir de secuencias de aminoácidos de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Se muestra el análisis teniendo en cuenta longitud, T_m, %GC y estructuras secundarias.

No.	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Longitud (bases)	T _m mínima (°C)	%GC	Hairpin	Homodímeros	
							ΔG* (Kcal/mol)	pb complementarias* ¹
1	DegOMTfor1	NGCNYTNCCNATGACNYT	18	44,9	52,8	No	-11,96	6
2	DegOMTfor3	ATGGARGCNTGGTAYAAYYTNA	23	48,3	39,1	Si	-11,39	6
3	DegOMTfor5	TTYAAYGARGGNATGAARGGNTAY	24	47,8	39,6	Si	-6,13	4
4	DegOMTrev1	AAATCYTCYTCNGTNCKYTCYTTNCC	26	51,3	48,1	Si	-10,4	6
5	DegOMTrev2	ATDATDATNACYTTNCCNCC	20	41,4	38,3	Si	-12,39	9
6	DegOMTrev_2	NGCYTTCCARCARTTYTTNAR	21	46,8	46,8	No	-8,7	6
7	DegOMTrev4	CKDATNACRTGNGGNARRTC	20	42,9	49,2	Si	-13,93	8
8	DegPALfor1	GAYGARGTNAARMGNATGGTN	21	45,1	45,2	Si	-6,89	4
9	DegPALfor2	GGNACNGAYWSNTAYGGNGTNACN	24	50,8	54,2	Si	-11,02	8
10	DegPALfor3	GGNGAYTNGTNCCNYTNWSNTA	23	47,0	50,0	Si	-15,03	8
11	DegPALfor4	GAYCCNYTNCARAARCCNAARCAR	24	49,8	47,9	No	-13,08	8
12	DegPALrev1	NGCNCCRTTCCARTCYTCNAR	21	51,2	54,8	No	-13,61	6
13	DegPALrev2	DATYTCYTCNCKNACRAANCKRTA	24	44,9	41,0	No	-14,34	8
14	DegPALrev3	ARRTCYTTYTCRCARAANCK	20	43,4	40,0	Si	-9,14	6
15	DegTYDCfor1	NWSNYTNCCNYTNGAYGC	18	42,5	55,6	No	-10,95	7
16	DegTYDCfor2	CCNGGNYTNTAYCAYTGGCA	20	49,6	55,0	Si	-15,78	8
17	DegTYDCfor3	GCNGGNGARATGYTNWSN	18	46,3	55,6	No	-13,61	6
18	DegTYDCrev1	NACRTGNCKCATYTCRTA	18	41,7	44,4	Si	-13,66	8
19	DegTYDCrev2	CKNARNCKRAARCANACNA	19	38,1	44,7	No	-15,8	9
20	DegTYDCrev3	YTGCCARTCYTTRTARTC	18	41,5	41,7	Si	-7,54	6

* Representa el valor ΔG más negativo posible, es decir la estructura más estable posible. *¹ Indica el número de pares de bases complementarias para el valor de ΔG más negativo.

Tabla 7. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima OMT

Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Combinación	Ta (°C)	Longitud esperada del fragmento
DegOMTfor1 5'-NGCNYTNCCNATGACNYT-3'	DegOMTrev1 5'-AAYTCYTCYTCNGTNCKYTCYTTNCC-3'	1	40	~936pb
	DegOMTrev2 5'-ATDATDATNACYTTNCCNCC-3'	2	39	~810pb
	DegOMTrev_2 5'-NGCYTTCCARCARTTYTTNAR-3'	3	40	~780pb
	DegOMTrev4 5'-CKDATNACRTGNGGNARRTC-3'	4	40	~633pb
DegOMTfor3 5'-ATGGARGCNTGGTAYAAYYTNAA-3'	DegOMTrev1 5'-AAYTCYTCYTCNGTNCKYTCYTTNCC-3'	5	44	~603pb
	DegOMTrev2 5'-ATDATDATNACYTTNCCNCC-3'	6	39	~477pb
	DegOMTrev_2 5'-NGCYTTCCARCARTTYTTNAR-3'	7	44	~447pb
	DegOMTrev4 5'-CKDATNACRTGNGGNARRTC-3'	8	41	~300pb
DegOMTfor5 5'-TTYAAYGARGGNATGAARGGNTAY-3'	DegOMTrev1 5'-AAYTCYTCYTCNGTNCKYTCYTTNCC-3'	9	44	~486pb
	DegOMTrev2 5'-ATDATDATNACYTTNCCNCC-3'	10	39	~360pb

Tabla 8. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima PAL

Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Combinación	Ta (°C)	Longitud esperada del fragmento
DegPALfor1 5'-GAYGARGTNAARMGNATGGTN-3'	DegPALrev1 5'-NGCNC CRTTCCARTCYTCNAR-3'	11	40	~2013pb
	DegPALrev2 5'-DATYTCYTCNCKNACRAANCKRTA-3'	12	40	~1878pb
	DegPALrev3 5'-ARRTCYTTYTCRCARAANCK-3'	13	40	~1572pb
DegPALfor2 5'-GGNACNGAYWSNTAYGGNGTNACN-3'	DegPALrev1 5'-NGCNC CRTTCCARTCYTCNAR-3'	14	46	~1827pb
	DegPALrev2 5'-DATYTCYTCNCKNACRAANCKRTA-3'	15	40	~1692pb
	DegPALrev3 5'-ARRTCYTTYTCRCARAANCK-3'	16	40	~1386pb
DegPALfor3 5'-GGNGAYYTNGTNCNNTNWSNTA-3'	DegPALrev1 5'-NGCNC CRTTCCARTCYTCNAR-3'	17	44	~1527pb
	DegPALrev2 5'-DATYTCYTCNCKNACRAANCKRTA-3'	18	40	~1392pb
	DegPALrev3 5'-ARRTCYTTYTCRCARAANCK-3'	19	40	~1086pb
DegPALfor4 5'- GAYCCNYTNCARAARCCNAARCAR - 3'	DegPALrev1 5'-NGCNC CRTTCCARTCYTCNAR-3'	20	46	~1116pb
	DegPALrev2 5'-DATYTCYTCNCKNACRAANCKRTA-3'	21	40	~981pb
	DegPALrev3 5'-ARRTCYTTYTCRCARAANCK-3'	22	40	~675pb

Tabla 9. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima TYDC

Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Combinación	Ta (°C)	Longitud esperada del fragmento
DegTYDCfor1 5'- NWSNYTNCCNYTNGAYGC -3'	DegTYDCrev1 5'- NACRTGNCKCATYTCRTA -3'	23	40	~1443pb
	DegTYDCrev2 5'- CKNARNCKRAARCANACNA -3'	24	36	~1293pb
	DegTYDCrev3 5'- YTGCCARTCYTTRTARTC -3'	25	40	~1101pb
DegTYDCfor2 5'-CCNGGNYTNTAYCAYTGGCA-3'	DegTYDCrev1 5'- NACRTGNCKCATYTCRTA -3'	26	40	~1218pb
	DegTYDCrev2 5'- CKNARNCKRAARCANACNA -3'	27	36	~1068pb
	DegTYDCrev3 5'- YTGCCARTCYTTRTARTC -3'	28	40	~876pb
DegTYDCfor3 5'-GCNGGNGARATGYTNWSN-3'	DegTYDCrev1 5'- NACRTGNCKCATYTCRTA -3'	29	40	~1146pb
	DegTYDCrev2 5'- CKNARNCKRAARCANACNA -3'	30	36	~996pb
	DegTYDCrev3 5'- YTGCCARTCYTTRTARTC -3'	31	40	~804pb

2.5.3. Preparación de las muestras para amplificación

Extracción de ARN total

La extracción del ARN se llevó a cabo a partir de las hojas del material vegetal. Se midió la concentración mediante espectrofotometría UV-Vis y también se estimó la calidad del ARN como se muestra en la tabla 10. La calidad está determinada por la relación entre las absorbancias a 260nm y 280nm. Una relación de A260/A280 entre 1,8 a 2,0 indicaba que la muestra ARN estaba pura.

Tabla 10. Concentración y calidad del ARN total extraído de las hojas en individuos de *Z. carinata* y *Z. rosea*.

Nombre de la muestra	Concentración (ng/μL)	A260/A280
IA-023	1195,7	2,07
IA-036	1977,2	2,02
IA-045	1462,95	1,97
IA-100	811,2	1,70
IA-21iv	1760,8	2,02
IA-25iv	1754,3	2,03
IA-100iv	1798,7	2,04

Síntesis de ADNc

Se hizo una síntesis de ADNc a partir de ARN total de células HeLa como control positivo. Este consistió en la amplificación por PCR con los cebadores específicos para el gen de la β -actina humano, ensayo que permitió concluir el éxito de la síntesis de ADNc a partir de la muestra control (Ver figura 4). Por medio del análisis del producto de PCR control mediante electroforesis, se observó la banda esperada que permitió concluir que la síntesis de ADNc a partir del ARNm de las muestras provenientes del material vegetal fue también exitosa, por lo que se tiene ADNc a partir del ARNm extraído para cada muestra.

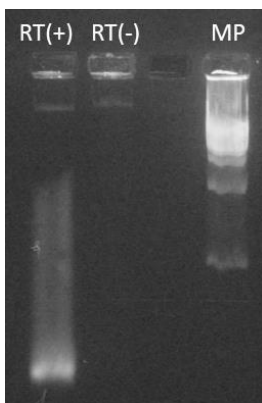


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR a partir de las muestras de ADNc células HeLa. RT(+): cóctel de PCR contiene la enzima *Reverse Transcriptase (RT)*. RT(-): No se le adicionó enzima. MP: Marcador de Peso.

2.5.4. Amplificación de ADNc y visualización de los productos de PCR

Se evaluaron las diferentes combinaciones de los cebadores diseñados en las muestras de ADNc por medio de la técnica de amplificación por PCR. La visualización de las posibles bandas amplificadas, se analizó mediante geles de agarosa al 1,5%. En un primer análisis se evaluaron 8 de las combinaciones de cebadores degenerados diseñados, pero no se obtuvieron bandas específicas. Partiendo de esto, se hicieron ajustes de las condiciones de PCR tales como aumento en la concentración de $MgCl_2$ y variación de la T_a , y se evaluaron todas las combinaciones posibles restantes teniendo en cuenta que la longitud del fragmento no fuera menor a 200pb. Con lo anterior se buscaba que la secuencia amplificada fuera suficientemente informativa de la secuencia esperada, conociendo que la longitud total para la enzima OMT es de ~1200pb, para la enzima PAL es de ~2400pb y para la enzima TYDC la longitud total aproximada es de ~1600pb.

Se evaluaron en total 31 combinaciones de cebadores degenerados, para las cuales no se obtuvieron bandas específicas que permitieran definir el éxito de amplificación de alguna de las combinaciones probadas. En la figura 5 se presenta una muestra de uno de los geles correspondientes a la evaluación de 14 combinaciones.

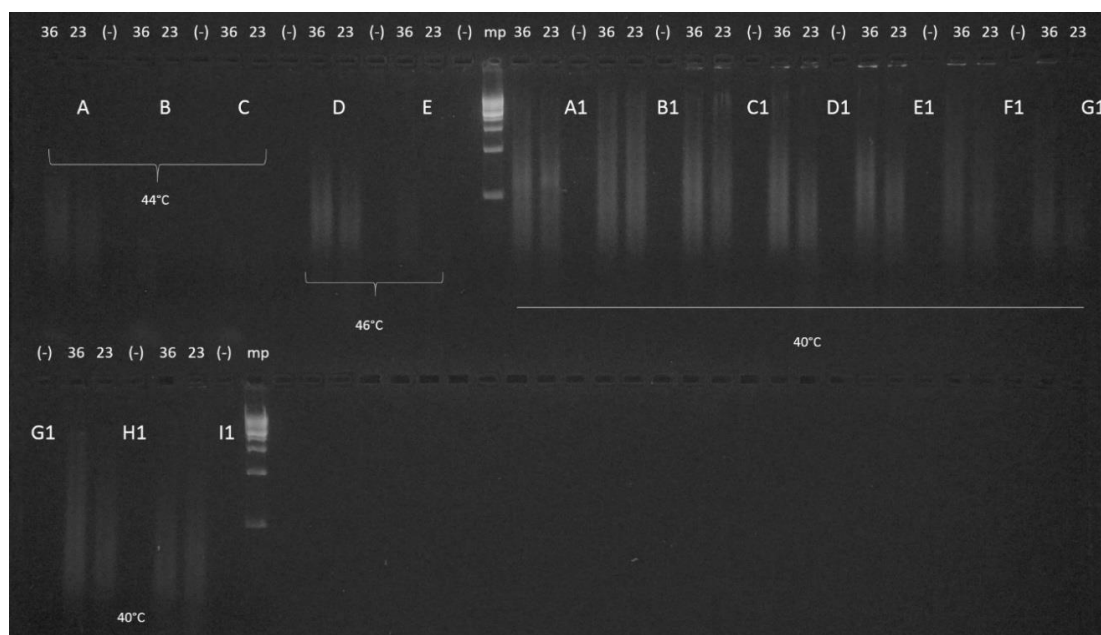


Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR donde se evaluaron las siguientes combinaciones: A (Comb 5), B (Comb 7), C (Comb 17), D (Comb 14), E (Comb 20), A1 (Comb 1), B1 (Comb 3), C1 (Comb 4), D1 (Comb 11), E1 (Comb 13) F1 (Comb 18), G1 (Comb 23), H1 (Comb 25), I1 (Comb 26). Las temperaturas especificadas corresponden a la temperatura de *annealing* (T_a) empleada para la pareja de cebadores. Por cada combinación se hizo un control negativo (-) sin ADNc molde. Las muestras evaluadas fueron: 36 (IA-036) y 23 (IA-023). Mp: Marcador de peso molecular, 1Kb (Promega).

En vista de estos resultados, se decidió diseñar nuevos cebadores utilizando el programa PRIMA CLADE (<http://primaclade.org/>), pero esta vez teniendo en cuenta el alineamiento únicamente de secuencias de ARNm correspondientes a las enzimas PAL, TYDC y OMT en plantas monocotiledóneas reportadas en la base de datos del NCBI (ver figura 23, 24 y 25, en anexos). De estos nuevos alineamientos se tiene que la longitud reportada para la enzima OMT es de ~1500pb, para la enzima PAL es de ~2500pb y para la enzima TYDC la longitud es de ~1900pb.

2.5.4.1. Cebadores obtenidos a partir del alineamiento de secuencias de ARNm

Los cebadores obtenidos a partir de los alineamientos de secuencias de ARNm se presentan en la dirección 5'-3' tanto para los cebadores *Forward* como *Reverse* (Ver Tabla 11). Las diferentes combinaciones *Forward-Reverse* evaluadas en los individuos se presentan en las tablas 12,13 y 14.

Para estos nuevos cebadores se obtuvieron secuencias de nucleótidos con una longitud de 18 a 22pb. A pesar de que se presenta la posibilidad de formación de estructuras secundarias como *hairpin* y/o homodímeros, si se compara con los cebadores diseñados a partir de alineamientos de secuencias de aminoácidos, se observa que los nuevos cebadores presentan mejores propiedades ya que las posibles estructuras secundarias son menos estables (ΔG menos negativo) y también el número de las pares de bases que pueden ser complementarias al interior del mismo cebador es menor, las cuales van de 3 a 6 pares (Ver tabla 11). Tan sólo se presenta un caso con 10 pares de bases complementarias internas, para el cebador número 25, *DegPALrev4*.

Con respecto al número de degeneraciones en estos nuevos cebadores, se obtuvieron entre 3 y 5 bases degeneradas y en cuanto al análisis de la T_m , también se muestra para cada cebador sólo la temperatura de fusión mínima (T_m), la cual corresponde a la secuencia de nucleótidos con menor contenido de GC (ver tabla 11).

Una vez se tuvieron los cebadores degenerados nuevos, se evaluaron 4 combinaciones diferentes para la enzima PAL, 4 combinaciones para la enzima TYDC y una combinación para la enzima OMT. Las temperaturas de *annealing* (T_a) para cada pareja de cebadores fueron calculadas como se menciona en la Ecuación 1, y se presentan en las tablas 12, 13 y 14.

Tabla 11. Lista de cebadores diseñados teniendo en cuenta los alineamientos obtenidos a partir de secuencias de ARNm de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Se muestra el análisis teniendo en cuenta longitud, T_m, %GC y estructuras secundarias.

No.	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Longitud (bases)	T _m mínima (°C)	%GC	Hairpin	Homodímeros	
							ΔG* (Kcal/mol)	pb complementarias
21	DegOMTfor6	AYGAGGRYGGSGTSTCCA	18	55,1	55,56	Si	-7,22	4
22	DegOMTrev6	TGCKCGTCRYCCAGTCR	18	53,6	55,56	Si	-8,57	4
23	DegPALfor5	AGGCNAGYAGYGABTGGR	18	49,2	55,56	No	-11,15	6
24	DegPALfor6	RTCAACACBCTCCTCCARG	19	51,3	57,89	No	-4,67	3
25	DegPALrev4	TARTCCARGCTNGGGTTNC	19	48,4	57,89	Si	-21,1	10
26	DegPALrev5	CCRTTGTTGTARAAVTCRTTVA	22	45,4	40,91	Si	-5,33	4
27	DegTYDCfor4	TCMTCGCCGRSTACTACSS	19	56,0	57,89	No	-14,43	6
28	DegTYDCfor5	CYWCTTCGCSYACTTCCCS	19	54,5	57,89	No	-10,09	4
29	DegTYDCrev4	CGGAARCAAYACSAGVGMGA	19	51,0	52,63	No	-7,72	4
30	DegTYDCrev6	GRTSYSCCAGTCCTTGTAGTCK	22	55,3	54,55	Si	-7,94	4

* Representa el valor ΔG más negativo posible, es decir la estructura más estable posible. *¹ Indica el número de pares de bases complementarias para el valor de ΔG más negativo.

Tabla 12. Combinación de cebadores evaluada mediante amplificación para la enzima OMT

Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Combinación	Ta (°C)	Longitud esperada del fragmento
DegOMTfor6 5'-AYGAGGRYGGSGTSTCCA-3'	DegOMTrev6 5'-TGCKCGTCRYCCAGTCR-3'	32	51	~491pb

Tabla 13. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima PAL

Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Combinación	Ta (°C)	Longitud esperada del fragmento
DegPALfor5 5'- AGGCNAGYAGYGABTGGR-3'	DegPALrev4 5'- TARTCCARGCTNNGGTTNC-3'	33	45	~1087pb
	DegPALrev5 5'- CCRTTGTTGTARAAVTCRTTVA-3'	34	42	~1042pb
DegPALfor6 5'-RTCAACACBCTCCTCCARG-3'	DegPALrev4 5'- TARTCCARGCTNNGGTTNC-3'	35	45	~869pb
	DegPALrev5 5'- CCRTTGTTGTARAAVTCRTTVA-3'	36	42	~824pb

Tabla 14. Combinaciones de cebadores evaluadas mediante amplificación para la enzima TYDC

Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Combinación	Ta (°C)	Longitud esperada del fragmento
DegTYDCfor4 5'- TCMTCGCCGRSTACTACSS -3'	DegTYDCrev4 5'- CGGAARCAYACSAGVGMGA -3'	37	48	~1232pb
	DegTYDCrev6 5'- GRTSYSCCAGTCCTTG TAGTCK -3'	38	51	~1050pb
DegTYDCfor5 5'- CYWCTTCGCSYACTTCCCS -3'	DegTYDCrev4 5'- CGGAARCAYACSAGVGMGA -3'	39	48	~1045pb
	DegTYDCrev6 5'- GRTSYSCCAGTCCTTG TAGTCK -3'	40	51	~863pb

2.5.5. Amplificación de ADNc de los nuevos cebadores

Del análisis por amplificación y electroforesis de las 9 combinaciones nuevas de cebadores degenerados, se encontró que una pareja de cebadores que flanquean un fragmento de la enzima OMT tuvo éxito en la amplificación por PCR observándose una banda bien definida de una longitud esperada de ~490pb en las muestras de *Z. carinata* (Figura 6 y 7). Por el contrario el análisis con las combinaciones de cebadores para las otras enzimas PAL y TYDC, dio resultados negativos ya que no se observó ninguna banda esperada (Figura 6).

El cebador *forward DegOMTfor6* inicia en la posición 489 y el cebador *reverse DegOMTrev6* finaliza en la posición 980 de acuerdo a la secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento con las entradas de los diferentes individuos. De esta manera el fragmento esperado es de aproximadamente 491pb sin tener en cuenta la presencia de mutaciones como inserciones o deleciones.

Al hacer la búsqueda del fragmento en la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST con la opción *blastx*, la cual permite hacer una búsqueda en la base de datos de proteínas partiendo de una secuencia de entrada de nucleótidos como ARNm, se encontró que este fragmento corresponde a una región de dominio conservado de la enzima OMT el cual está dentro de la clasificación de la superfamilia de metiltransferasas 2. Este fragmento además incluye un dominio de dimerización en el extremo aminoterminal de la proteína.

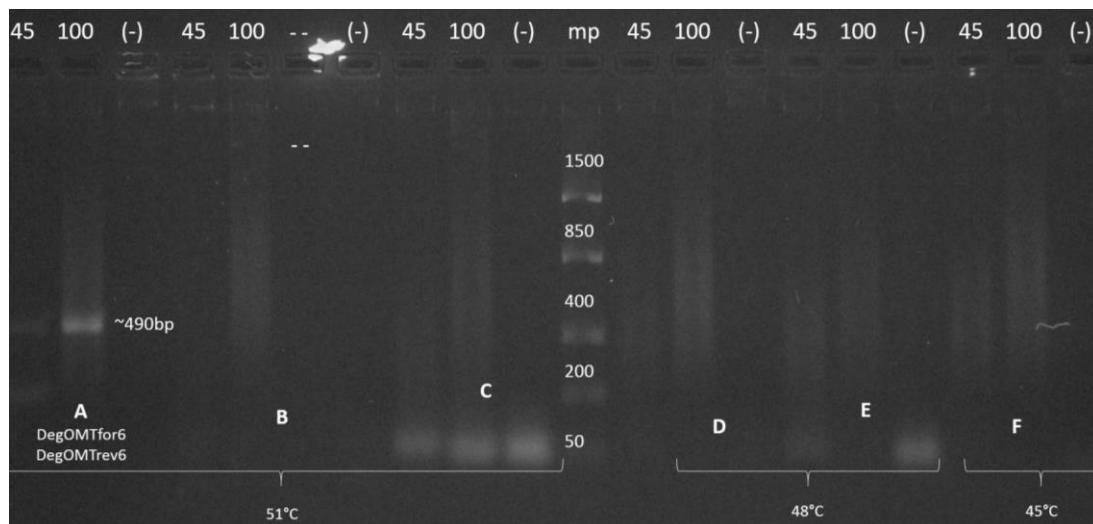


Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR con las combinaciones de cebadores degenerados A: comb. 32; B: comb. 38; C: comb. 40; D: comb. 37; E: comb. 39; F: comb. 33. Las temperaturas especificadas corresponden a la temperatura de *annealing* (T_a) empleada para cada pareja de cebadores. Por cada combinación se hizo un control negativo (-) sin ADNc molde. Las muestras evaluadas fueron: 45 (IA-045) *Z. rosea* y 100 (IA-100) *Z. carinata*. Mp: Marcador de peso molecular, *Fast Ruler Low Range DNA Ladder* (Fermentas). El fragmento amplificado tiene una longitud esperada de ~490pb.

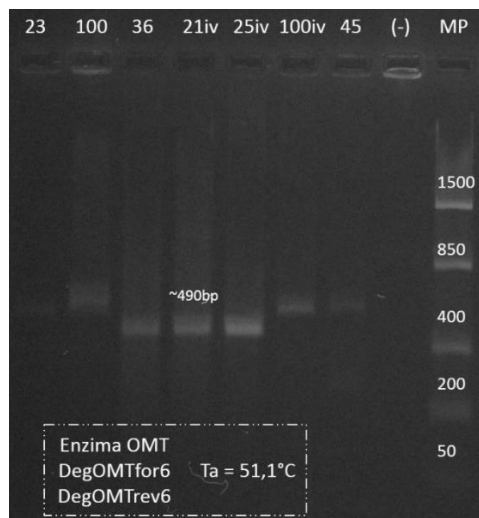


Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR con los cebadores degenerados *DegOMTfor6* - *DegOMTrev6* a una temperatura de *annealing* (T_a) de 51,1°C. Los individuos analizados son 23 (IA-023), 100 (IA-100), 36 (IA-036), 21iv (IA-021iv obtenido de cultivo *in vitro*), 25iv (IA-025iv obtenido de cultivo *in vitro*), 100iv (IA-100iv obtenido de cultivo *in vitro*), todos de *Z. carinata* y 45 (IA-045) de *Z. rosea*; (-) indica el control negativo. MP: marcador de peso molecular *Fast Ruler Low Range DNA Ladder* (Fermentas). El fragmento amplificado tiene una longitud esperada de ~490pb.

2.5.6. Clonación molecular y transformación bacteriana en *E. coli*

Los productos de PCR correspondientes al fragmento amplificado de la enzima OMT obtenidos a partir de los individuos de *Z. carinata*, fueron usados directamente como inserto para la ligación en el vector pTZ57R/T (*InsTAclone PCR Cloning Kit*, Thermo Scientific). Esta ligación fue usada posteriormente para la transformación de células competentes de *E. coli* cepa DH5 α , las cuales fueron cultivadas en medio LB sólido con ampicilina, IPTG y X-Gal.

La verificación de colonias transformantes se llevó a cabo mediante el sistema alfa-complementación con el reconocimiento fenotípico de colonias blancas/recombinantes y azules/no recombinantes. En las Figuras 8 - 11 se muestran las placas de la transformación bacteriana con el inserto del fragmento amplificado de OMT para los individuos IA-036 (Figura 8), IA-025iv obtenido de cultivo *in vitro* (Figura 9), IA-021iv obtenido de cultivo *in vitro* (Figura 10) y la transformación bacteriana con la ligación control con un inserto de 953pb como control positivo (Figura 11).

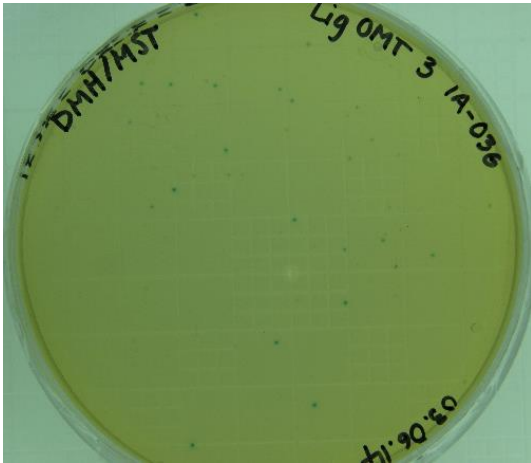


Figura 8. Cultivo de bacterias transformadas con la ligación conteniendo el fragmento amplificado de OMT en el individuo IA-036.

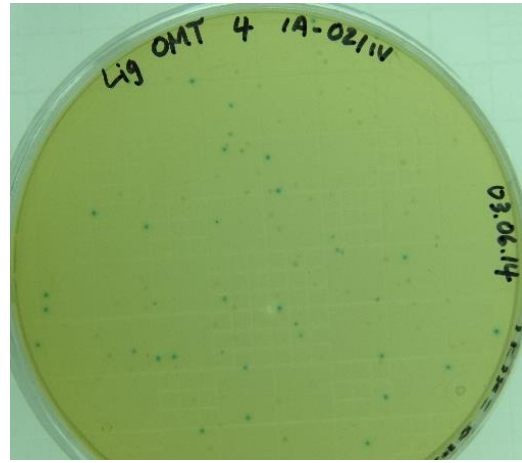


Figura 10. Cultivo de bacterias transformadas con la ligación conteniendo el fragmento amplificado de OMT en el individuo IA-021iv.

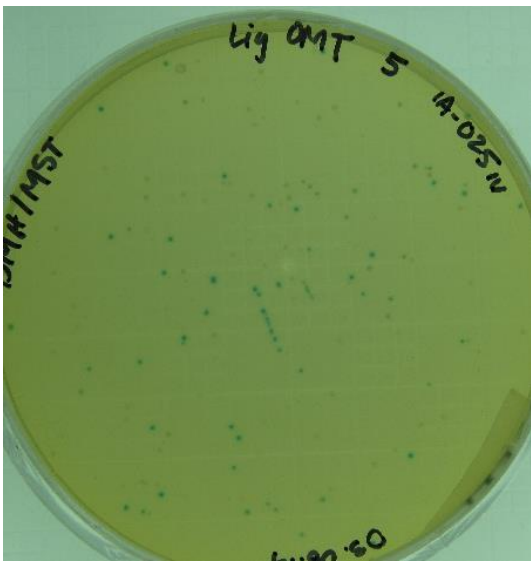


Figura 9. Cultivo de bacterias transformadas con la ligación conteniendo el fragmento amplificado de OMT en el individuo IA-025iv.

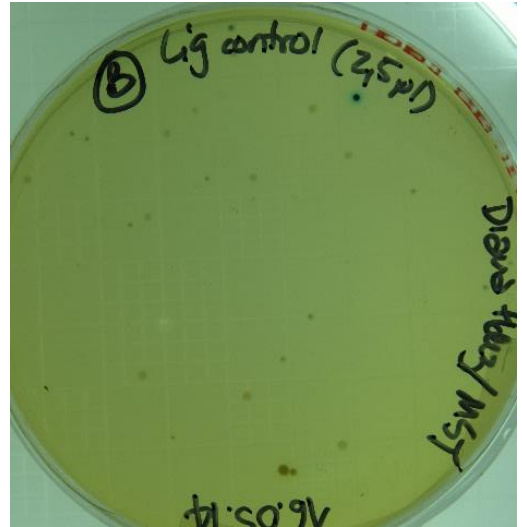


Figura 11. Cultivo de bacterias transformadas con la reacción de ligación conteniendo un inserto de un fragmento amplificado de 953pb como control positivo.

2.5.6.1. Eficiencia de la ligación

El porcentaje de eficiencia de la ligación es calculada con respecto al control positivo teniendo en cuenta la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de eficiencia} = \frac{\text{No. colonias blancas}}{\text{No. colonias blancas} + \text{No. colonias azules}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

El porcentaje de la eficiencia de la ligación calculado fue del 54%, con la aparición de 15 colonias recombinantes y 13 no recombinantes en el cultivo con la ligación control.

2.5.6.2. Confirmación de la presencia del inserto esperado mediante PCR

Para la verificación de la inserción del fragmento amplificado para la enzima OMT en el vector de clonación pTZ57R/T se realizó una PCR a partir de las colonias recombinantes con los cebadores *Forward* y *Reverse* M13/pUC. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa 1,5% y las bandas que se observaron se presentan en la Figura 12. Con la visualización en el gel, se observó un patrón de bandas con longitudes aproximadas entre 450pb y 850pb. Con esta información se seleccionaron las colonias que según las bandas observadas presentan una inserción de un fragmento que posiblemente incluya el fragmento amplificado de la enzima OMT. Para el individuo IA-036 las colonias seleccionadas fueron la 10, 16, 17, 18, 19 y 20. Para IA-021iv (obtenido de cultivo *in vitro*) se seleccionaron las colonias 1, 2, 3, 4, 9, 12,13 y 20 y para el individuo IA-025iv (obtenido de cultivo *in vitro*) las colonias fueron la 7, 8, 9, 15 y 17. Estas colonias identificadas fueron posteriormente propagadas en medio LB líquido ampicilina para hacer la debida extracción de los plásmidos.

Los plásmidos fueron analizados en un gel de agarosa 1% y se observaron bandas bien definidas con una longitud esperada de 3000pb como se observa en la Figura 13.

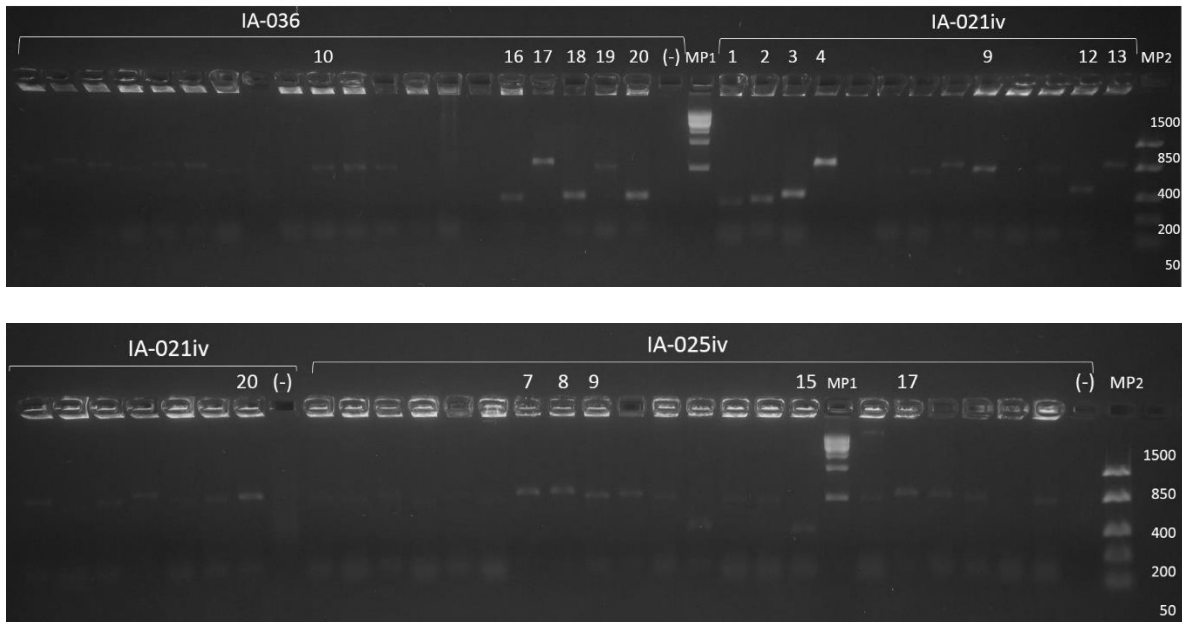


Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR a partir de las colonias provenientes de la transformación bacteriana con las ligaciones con el fragmento de OMT para los individuos IA-036, IA-021iv y IA-025iv de *Z. carinata*. Los números indican el número de la colonia aislada que fue tomada para la reacción de PCR. MP1: marcador de peso molecular 1Kb, Promega. MP2: marcador de peso molecular *Fast Ruler Low Range DNA Ladder* (Fermentas)

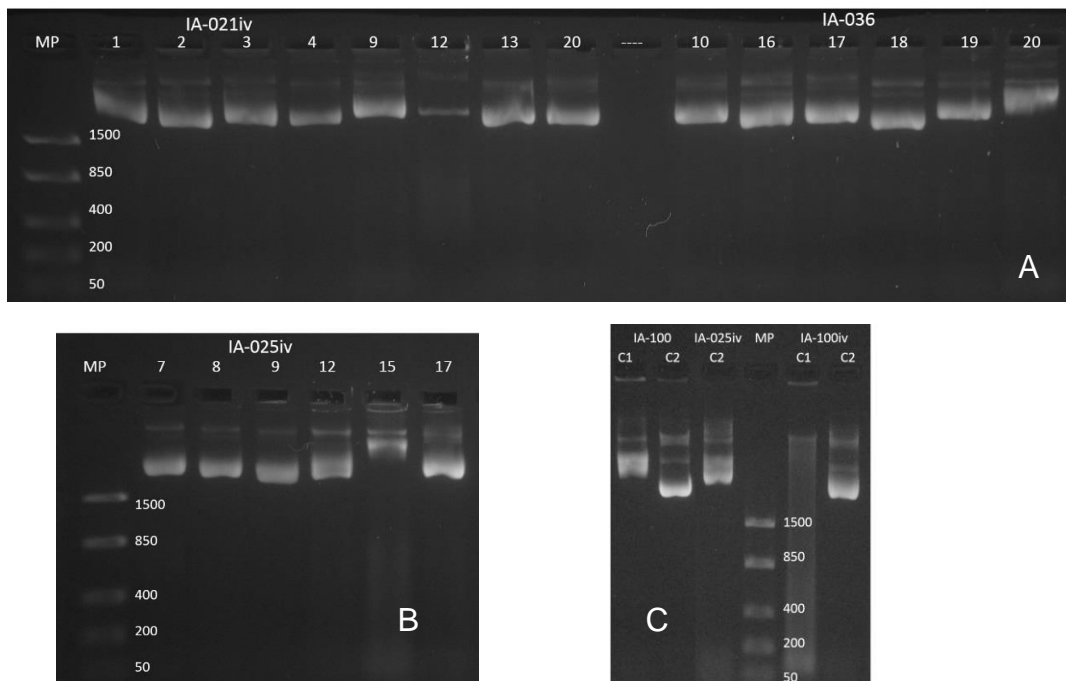


Figura 13. Electroforesis de los plásmidos extraídos a partir de las colonias que se identificaron como informativas en la amplificación por PCR. A: Plásmidos provenientes de la amplificación en los Individuos IA-021iv e IA-036. B: Plásmidos provenientes de la amplificación en el individuo IA-025iv. C: Plásmidos provenientes de la amplificación en los individuos IA-100, IA-025iv e IA-100iv.

2.5.6.3. Confirmación de la presencia del inserto esperado mediante análisis de restricción

La verificación de la transformación también se hizo mediante la digestión de los plásmidos provenientes de las colonias transformadas con las ligaciones conteniendo los fragmentos amplificados para OMT a partir de los individuos de *Z. carinata* IA-100, IA-025iv y IA-100iv. Como resultado se observaron algunas bandas correspondientes al fragmento digerido de una longitud esperada de 640-700pb, y adicionalmente bandas de una longitud aproximada de 2500pb correspondientes al fragmento lineal del plásmido (Ver Figura 14)

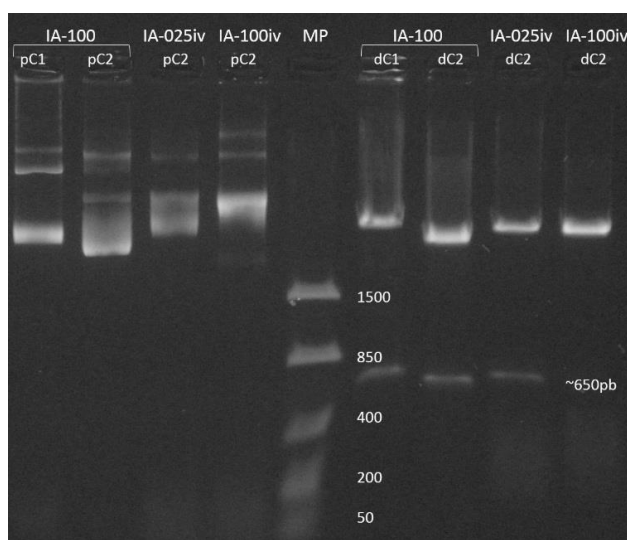


Figura 14. Electroforesis de los plásmidos obtenidos a partir de colonias transformadas y sus correspondientes reacciones de digestión mediante las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. Los plásmidos provienen de las ligaciones con el fragmento amplificado de OMT de los individuos IA-100, IA-025iv, IA-100 de *Z. carinata*. En los cuatro primeros carriles pC1 y pC2 corresponden a los plásmidos de la colonia 1 y 2 de la respectiva ligación. En los últimos cuatro carriles dC1 y dC2 corresponden a la digestión de los plásmidos de las colonias de las respectivas ligaciones. La banda a ~650pb en los últimos cuatro carriles corresponde al fragmento del inserto de interés.

2.5.7. Extracción del plásmido

Los plásmidos extraídos como ya se ha mencionado fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Adicionalmente se midió la concentración de cada una de las muestras para determinar con exactitud el volumen necesario para la preparación de alícuotas con concentración de 100ng/μL, teniendo en cuenta que es la concentración requerida para la posterior secuenciación según lo específica MacroGen Korea, compañía biotecnológica que presta este servicio (http://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/sequencing-service/macrogen.html).

2.5.8. Secuenciación

Con respecto a las secuencias de ADNc obtenidas a partir del inserto en los plásmidos recombinantes en general fueron secuencias de muy buena calidad. Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación tienen picos bien definidos y se indica que hay una alta probabilidad de que las bases que se muestran son las correctas. Se presenta una muestra de un cromatograma para la secuenciación del inserto OMT para el individuo IA-036 colonia 19 en la Figura 28, en anexos.

De las 22 secuencias de ADNc obtenidas a partir de los plásmidos recombinantes, 12 de estas incluyen secuencias que se corresponden en la base de datos de nucleótidos con la enzima OMT mediante la herramienta BLAST. En la mayoría de las secuencias se produjeron alineamientos significativos con secuencias de ADNc de especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Ver Tabla 15, se muestran algunas secuencias) y el inserto en 11 de las secuencias comprende una longitud de 474pb, sin embargo se observa polimorfismo en este fragmento de ADNc amplificado para la enzima OMT entre los individuos de *Z. carinata* y entre las secuencias del inserto dentro de un mismo individuo (Ver Figura 30, 31 y 32). Dentro de los individuos para los cuales se obtuvieron estas 11 secuencias de ADNc se encuentran IA-100 (2 clones), IA-036 (3 clones), IA-021iv (2 clones) y IA-025iv (4 clones), provenientes de diversos orígenes como Cali, Popayán y Zarzal (los dos últimos).

Particularmente la secuenciación del inserto para el individuo IA-100 en los clones de las colonias 1 y 2, dio como resultados secuencias de ADNc idénticas para ambos insertos (Figura 29). Resultados opuestos se encontraron para las demás secuencias de los insertos de los clones de los otros individuos. Tanto para IA-036, IA-021iv como para IA-025iv, las secuencias obtenidas para el inserto del fragmento de OMT dentro de cada individuo, presentan en la mayoría de los casos cambios en nucleótidos para una sola posición, los cuales se encuentran en toda la extensión de la secuencia.

Adicionalmente, se obtuvo que una de las secuencias del inserto para el individuo IA-021iv presenta un fragmento de ADNc de 1174pb, lo que permite suponer que es posible que haya una inserción en la secuencia de ADNc para la enzima OMT en el caso particular de este individuo.

La inserción de 700pb en la secuencia de ADNc de OMT en el individuo IA-021iv (*IA-021iv_OMT_Colonia9*) inicia a partir de la posición 281 con respecto a las secuencias de ADNc para OMT de los demás insertos. Sin embargo se observa que el fragmento adicional a partir de esa posición, es una secuencia que comparte varias regiones homólogas de entre 2 y 6 nucleótidos contiguos con las demás secuencias de los otros insertos (Ver Figura 26).

Siendo esta secuencia más larga que todas las demás secuencias de los insertos fue necesario sacarla del alineamiento. De esta manera se obtuvo el alineamiento presentado en la figura 27 con el objetivo de generar una secuencia de ADNc consenso para evidenciar finalmente la secuencia que se logró determinar con los cebadores degenerados diseñados para el fragmento de la enzima OMT. Es así como se obtuvo la secuencia para esta enzima en los individuos pertenecientes a la especie *Zephyranthes carinata* de la familia Amaryllidaceae evaluados en este estudio (Figura 15).

Tabla 15. Resultados de la búsqueda de secuencias similares a las secuencias de los insertos en las bases de datos mediante BLAST. Las secuencias en las bases de datos hacen referencia a la enzima OMT.

Individuo para el cual fue secuenciado el inserto	Accesión de las secuencias que produjeron alineamientos significativos	Nombre de la especie	Valor E*
IA-100 Colonia1	AB183825.1 GQ337077.1	Iris x hollandica (M) Jatropha curcas (D)	8e-94 1e-57
IA-100 Colonia2	AB183825.1 GQ337077.1	Iris x hollandica (M) Jatropha curcas (D)	8e-94 1e-57
IA-036 Colonia 10	AB183825.1 AK359402.1	Iris x hollandica (M) Hordeum vulgare subsp. Vulgare (M)	6e-95 1e-56
IA-036 Colonia 17	AB183825.1 GQ337077.1	Iris x hollandica (M) Jatropha curcas (D)	4e-92 5e-56
IA-036 Colonia 19	AB183825.1 XM_003573422.1	Iris x hollandica (M) Brachypodium distachyon (M)	4e-87 8e-54
IA-021iv Colonia 4	AB183825.1 GQ337077.1	Iris x hollandica (M) Jatropha curcas (D)	2e-95 1e-61
IA-021iv Colonia 9	AB183825.1 GQ337077.1	Iris x hollandica (M) Jatropha curcas (D)	5e-40 8e-18
IA-021iv Colonia 20	AB183825.1 XM_003573422.1	Iris x hollandica (M) Brachypodium distachyon (M)	2e-90 2e-55
IA-025iv Colonia 20	AB183825.1 GQ337077.1	Iris x hollandica (M) Jatropha curcas (D)	1e-91 1e-56
IA-025iv Colonia 7	AB183825.1 GQ337077.1	Iris x hollandica (M) Jatropha curcas (D)	7e-95 1e-57
IA-025iv Colonia 8	AB183825.1 XM_003573422.1	Iris x hollandica (M) Brachypodium distachyon (M)	4e-87 8e-54
IA-025iv Colonia 17	AB183825.1 GQ337077.1	Iris x hollandica (M) Jatropha curcas (D)	4e-92 2e-59

* Un valor E cercano de cero indica que la probabilidad de que el alineamiento se haya producido al azar es cercana a cero. Por tanto un pequeño valor E se refiere a los mejores alineamientos.

(M)= Monocotiledónea (D)= Dicotiledónea

```

>Enzima OMT_Secuencia consenso_ Zephyranthes carinata
TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTCCACT
AGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCCAGGAATAGGTTCC
TGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTTCAGGTGAGGATG
TTTCTTGATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCTCCTCCGACATCGACGAG
AACTTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGAGGTTTCGAGAATCTTCTTGGTGATGAT
GGTGGAGTGATTCTCATCCCTTCGTTGAAAACCTTGTTGAATCTTGGGTCCGT
GCCGTGGTATTCTGAACGCGGTCATTCCATAGGCTTTGTTGAATGGGATGCCTC
CATCTAAGACGGCATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCTC
GGTTCATGAGCCCAAGAGCGGCCATGGACACCCCACCCTCATA

```

Figura 15. Secuencia de ADNc consenso para una región de la enzima OMT en especies de *Z. carinata*

Cuando se hace BLAST de esta secuencia identificada para la enzima OMT en la base de datos de proteínas mediante el programa *blastx* (Búsqueda en la base de datos de proteínas usando una secuencia de entrada de nucleótidos traducidos) se encuentra que esta región de ADNc hace referencia a un dominio conservado que permite hacer la clasificación dentro de la superfamilia de las enzimas metiltransferasas 2 (Ver figura 16-A). Entre las posiciones 40 y 100pb está presente una secuencia para un dominio de dimerización que se encuentra en el extremo amino de una variedad de O-metiltransferasas en plantas, el cual media la dimerización de estas proteínas (Ver figura 16-B). También se identifica que dentro de la secuencia consenso entre las posiciones 60 y 150pb hay un dominio común que sitúa el sitio de unión a la S-adenosilmetionina (SAM) en las enzimas metiltransferasas dependientes de SAM clase 1, que es la clase estructural más grande y diversa de este tipo (Ver figura 16-C).

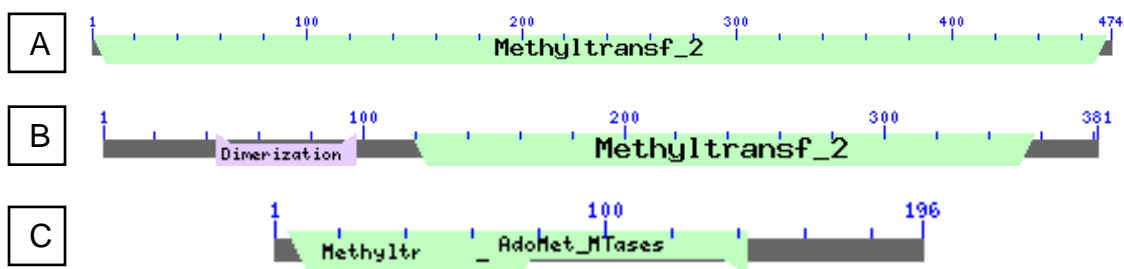


Figura 16. Dominios conservados en la secuencia consenso para la enzima OMT en *Z. carinata*, identificadas mediante BLAST. A: dominio conservado que hace referencia a la superfamilia de metiltransferasas 2. B: dominio conservado que hace referencia a la región de dimerización en proteínas OMT en plantas. C: dominio conservado que se corresponde con la región del sitio de unión a SAM en enzimas OMT dependiente de SAM.

Con el objetivo de identificar las secuencias posibles de aminoácidos que se podrían expresar a partir de las secuencias de ARNm implícitas en el ADNc identificado para cada inserto, se hizo el proceso de traducción teniendo en cuenta el código genético estándar (ver figura 3). A partir de las 10 secuencias de ADNc polimórficas para la enzima OMT, se identificaron 7 secuencias de aminoácidos diferentes. Estas están constituidas por una pauta de lectura continua de 152 aminoácidos correspondientes a la región central de la enzima OMT; localización que se infiere teniendo en cuenta la posición de los cebadores en la secuencia de ARNm completa reportada para esta enzima (Ver figura 23, en Anexos).

Para las secuencias de ADNc provenientes de los insertos de IA-100 colonia 1, IA-036 colonia 10, IA-025iv colonias 7 y 17 se obtuvieron secuencias de aminoácidos idénticas (figura 33). Para los 6 insertos restantes provenientes de IA-036 colonias 17 y 19, IA-021iv colonias 4 y 20 e IA-025iv colonias 2 y 8, se obtuvieron secuencias de aminoácidos diferentes entre sí (figura 34, en Anexos).

2.6. DISCUSIÓN

Para el desarrollo de esta investigación, el componente bioinformático constituyó quizá la estrategia más importante para abordar el problema científico planteado que es la identificación de la secuencia de ADNc de alguna enzima dentro de la biosíntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae. La forma de abordarlo mediante el diseño de cebadores degenerados permitió identificar secuencias de nucleótidos que pudieran ser específicas para una región de ARNm que hasta el momento era desconocida. Lo anterior se logra partiendo de la premisa de que si se identifican secuencias de proteínas o de ARNm conservadas para las enzimas de interés PAL, TYDC y OMT en especies de plantas no relacionadas con las de la familia Amaryllidaceae, es posible identificar una secuencia en *Z. carinata*, siempre y cuando los cebadores se diseñen con base en esas regiones conservadas en otras especies.

El diseño de cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de ARNm en general fue más específico que el diseño a partir de alineamientos de secuencias de proteínas. La limitante que se encontró para esta última aproximación, fue que los cebadores degenerados presentaban mucha más degeneración (entre 5 y 10 bases degeneradas), por lo que aumentaban las posibilidades de secuencias para cada cebador y adicionalmente las posibles estructuras secundarias tales como homodímeros o *hairpin* eran más estables con respecto a los cebadores diseñados a partir de secuencias de ARNm.

Estas características permitieron concluir que los cebadores degenerados obtenidos a partir de secuencias de proteínas no fueron suficientemente específicos para las regiones esperadas para las enzimas PAL, TYDC y OMT o presentaron problemas de hibridación significativos, ya que no se obtuvo ningún éxito de amplificación con la cual se pudiera definir una banda de un tamaño específico.

Por otro lado, los cebadores degenerados diseñados a partir de ARNm fueron más informativos en cuanto a que se logró amplificar una región de ADNc para la enzima OMT flanqueada por la combinación de cebadores *DegOMTfor6-DegOMTrev6*. Con esta pareja de cebadores se obtuvo una banda bien definida de una longitud aproximada de 490pb, que es el tamaño estimado del fragmento de ARNm calculado para la combinación de estos cebadores. Al comparar la degeneración de estos cebadores con los obtenidos a partir de secuencias de proteínas, se destaca que el número de degeneraciones es significativamente menor (entre 3 y 5 bases degeneradas), lo que conllevó a reducir el número de secuencias de nucleótidos posibles para cada cebador y por lo tanto se convirtió en un factor que hizo posible la amplificación.

La reducción de la degeneración se debe a que las secuencias de ARNm de las especies obtenidas en la base de datos del NCBI con las cuales se hizo el alineamiento, son secuencias de nucleótidos definidas, es decir que dentro de cada una de estas secuencias no se presentan degeneraciones. De esta manera la degeneración sólo aparece cuando se construye el alineamiento y se identifican las regiones más conservadas entre las secuencias, regiones donde puede presentarse más de una base para una misma posición en la secuencia elegida para el cebador. Caso contrario es lo que se presenta con las secuencias de aminoácidos, ya que para la mayoría de los aminoácidos pueden haber varios codones posibles lo que conlleva a que se aumente el número de las secuencias de nucleótidos para cada cebador (Linhart, C. and Shamir, R., 2005). La degeneración en estos casos, además de incluir la correspondiente al aminoácido, también incluye la degeneración correspondiente a la variación de aminoácidos para una misma posición dentro de la secuencia elegida para el cebador (Pevsner, J. 2009).

Otro factor importante en la evaluación de las diferentes parejas de cebadores era la correcta selección de la *Ta* a la cual los cebadores se hibridan al ADN molde. Esta etapa de hibridación es crítica dentro del perfil de amplificación por PCR debido a que la *Ta* determina la especificidad de la amplificación de los fragmentos esperados y es a partir de la cual se logran reacciones exitosas si se escoge la temperatura adecuada. Este es el caso de la pareja de cebadores que amplificó el fragmento para OMT, *DegOMTfor6-DegOMTrev6* para la cual se encontró que la *Ta* específica para esta región fue de 51,1°C.

Al analizar las bandas en el gel de agarosa de los productos de PCR de este fragmento de OMT en los individuos evaluados (Ver Figura 7, en resultados), se observa que hay una diferencia evidente en la intensidad entre las bandas para las diferentes muestras. Las bandas para los individuos IA-023, IA-100, IA-100iv y el IA-045 son menos intensas que las observadas para los individuos IA-036, IA-021iv, IA-025iv. Este resultado puede estar relacionado con un nivel diferencial de la expresión de la enzima, mayor en los tres individuos con bandas de mayor intensidad. Lo anterior teniendo en cuenta que las moléculas de ARNm indican el nivel de expresión de las proteínas, ya que contienen la secuencia de codones molde que en el proceso de traducción se decodifica a aminoácidos en la síntesis de las cadenas polipeptídicas. Sin embargo, las condiciones de PCR con 35 ciclos de amplificación sobrepasan la fase exponencial de aumento de productos, con lo que no es posible tener un dato acertado de estos niveles de expresión.

Adicionalmente, se esperaba que las muestras de ARN total obtenidas de los individuos obtenidos a partir de cultivo *In vitro* presentaran bandas de mayor intensidad, ya que eran plantas crecidas bajo condiciones controladas mucho más jóvenes que las plantas en maceta, sin embargo no se observó un patrón que permitiera concluir lo anterior. Con esto se podría suponer a modo muy general que la producción de alcaloides en estas plantas, y por tanto la expresión de las

enzimas biosintéticas puede estar relacionada con una función complementaria al metabolismo primario independientemente si la planta es joven o madura, además de la función en el sistema natural de defensa que se ha reportado en la literatura (Bagal et al., 2012; Kutchan, 1995; Yoon et al., 2013).

Con los productos de PCR provenientes del fragmento para la enzima OMT, los cuales se evidenciaron mediante electroforesis, se hizo clonación molecular y transformación bacteriana en células competentes de *E. coli* con el objetivo de poder analizar secuencias únicas por colonia transformante aislada. Del análisis de las secuencias obtenidas a partir de los insertos en el plásmido pTZ57R/T, se determinó una secuencia consenso de ADNc para la enzima OMT en los individuos evaluados de *Z. carinata* (ver figura 15) a partir de secuencias polimórficas. La secuencia de ADNc comprende una longitud de 474pb la cual es alineada con secuencias en las bases de datos del NCBI mediante BLAST e identificada dentro de la superfamilia de las metiltransferasas 2 dependientes de SAM.

A pesar de que se llegó a una secuencia consenso mediante el análisis bioinformático, es importante mencionar que las diferencias en las secuencias de los insertos de los clones dentro de un mismo individuo puede hacer referencia a que muy posiblemente existan varios genes relacionados para la enzima OMT, o que a través del proceso de *splicing alternativo* en la formación del ARNm maduro, se generen varias secuencias a partir del mismo gen, situación que puede ser ocasionada por polimorfismos tipo SNP (<http://ghr.nlm.nih.gov/>).

En el figura 7, se observa que en la amplificación del fragmento para la enzima OMT hay un patrón de bandas con longitudes de aproximadamente 490pb y 500pb. Este resultado permite plantear que la diferencia en las longitudes del fragmento puede estar relacionada con los diversos orígenes de las plantas a partir de las cuales se obtuvieron las muestras de ARN total. La influencia del ambiente sobre los diferentes individuos puede generar polimorfismos y consecuentemente diferencias en la secuencia del gen dentro de la misma especie. Sin embargo, es necesario destacar que al analizar las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los insertos, no se obtuvieron secuencias de 500pb (longitud no esperada para el fragmento), pero es posible que estas secuencias representadas por las bandas amplificadas con esta longitud no hayan sido insertadas en los plásmidos y por tanto no se hayan secuenciado. Lo anterior teniendo en cuenta que por banda amplificada pueden haber fragmentos de diferentes longitudes dentro de un rango estrecho.

Además de los factores presentados anteriormente, no se pueden descartar los errores que se hayan introducido por la enzima *Taq* ADN polimerasa en la reacción de amplificación del ADNc y también representarían una posibilidad para explicar los polimorfismos observados al interior de la secuencia.

Por otro lado, es necesario destacar que por medio del análisis mediante electroforesis de las bandas amplificadas se esperaba un fragmento con una longitud aproximada de 491pb. Al contrastar con la longitud real amplificada de 474pb se concluye que la especificidad de los cebadores degenerados diseñados *DegOMTfor6-DegOMTrev6* fue alta, de tal manera que fue posible alcanzar el objetivo terminal de esta investigación.

Con respecto al proceso de traducción de las secuencias de ADNc teniendo en cuenta el código genético estándar, se identificaron 7 secuencias de aminoácidos diferentes (Figura 33 y 34). En esta etapa, se esperaba que el polimorfismo tipo SNP observado al interior de las secuencias de ADNc introdujeran combinaciones de codones que tradujeran aminoácidos de parada, con lo cual se generarán marcos de lectura incompletos. Con la aparición de los codones de parada se esperaba identificar los nucleótidos que generaban el polimorfismo entre las secuencias y de esta manera ir reduciendo el número de secuencias de aminoácidos correspondientes para la región de la enzima OMT. Sin embargo, se encontró que todas las secuencias de ADNc tienen combinaciones de codones con un marco de lectura completo, resultado que le dio peso a la premisa de que no deberían traducirse aminoácidos de parada, ya que se trata de una secuencia ubicada en la región central de la enzima teniendo en cuenta la ubicación de los cebadores diseñados.

Adicionalmente la estrategia del diseño de los cebadores degenerados partiendo de alineamientos con secuencias de ARNm fue exitosa. Y se puede concluir que para problemáticas de investigación donde no se tiene conocimiento de la secuencia de una enzima biosintética y tampoco se cuenta con mucha información de estudios previos, esta estrategia presenta ventaja sobre el diseño de cebadores a partir de alineamientos con secuencias de proteínas, a pesar que en la literatura se reporta que un alineamiento de proteínas es más informativo que un alineamiento de nucleótidos (Pevsner, J. 2009). Una de las razones que se justifica es que hay muchos cambios en una secuencia de nucleótidos (particularmente en la posición 3 de un codón) que no producen cambios en los aminoácidos de una secuencia (Pevsner, J. 2009). Por tal razón, la secuencia de proteínas muestra una información más concisa y se aplica muy bien cuando se está investigando una proteína específica conocida. Sin embargo en el desarrollo de este trabajo se evidenció lo contrario con resultados significativos, siendo el primer reporte de secuencias de ADNc de un fragmento de esta enzima OMT en la especie *Z. carinata* en Colombia.

2.7. CONCLUSIONES

- 2.7.1. Se diseñaron cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de proteínas y de alineamientos de secuencias de ARNm, de los cuales la pareja de cebadores *forward* y *reverse*, *DegOMTfor6-DegOMTrev6*, amplificó una región de ADNc para la enzima OMT en individuos de *Z. carinata*.
- 2.7.2. Se evidenció que la estrategia para el diseño de cebadores degenerados a partir de alineamientos de secuencias de ARNm condujo a la obtención de información más precisa, por medio de la cual se logró amplificar la región de ARNm para la enzima OMT.
- 2.7.3. Se identificaron 10 secuencias de ADNc polimórficas para una región de la enzima OMT involucrada en la síntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae. Estas secuencias representan los primeros reportes para la especie *Z. carinata* en la región.
- 2.7.4. Se identificaron 7 secuencias de aminoácidos que incluyen 152 aa correspondientes a la región central de la enzima OMT en la especie *Z. carinata*.
- 2.7.5. Se determinó en la especie *Z. carinata*, una secuencia consenso de ADNc para la enzima biosintética OMT. Esta fue obtenida considerando las 10 secuencias de ADNc a partir de 4 individuos distintos de la misma especie.

2.8. RECOMENDACIONES

- 2.8.1. Con la intención de generar mayor conocimiento sobre la enzima biosintética OMT en la ruta de biosíntesis de los alcaloides de Amaryllidaceae, se recomienda diseñar nuevos cebadores específicos para lograr amplificar las regiones adyacentes a la secuencia de ADNc identificada para la enzima OMT en individuos de *Z. carinata*.
- 2.8.2. En este trabajo de investigación se diseñaron cebadores degenerados para las enzimas PAL y TYDC, enzimas igualmente importantes que OMT, por lo que se sugiere seguir evaluando las combinaciones de cebadores correspondientes con los ajustes necesarios en la *Ta* y otras condiciones de amplificación con el objetivo de descartar completamente las posibilidades de amplificación para estos cebadores.
- 2.8.3. Se amplificó, aunque con baja intensidad, un fragmento en *Z. rosea*, por lo que sería un gran aporte continuar explorando este individuo con los cebadores diseñados en futuros estudios.
- 2.8.4. Se encontró una secuencia de ADNc de OMT de 1174pb correspondiente al inserto de la colonia 9 para el individuo IA-021iv, secuencia con una longitud no esperada, por lo que se recomienda que se haga una resecuenciación del inserto para descartar la posibilidad de que haya una inserción en la secuencia del fragmento para esta enzima.
- 2.8.5. Con el objetivo de descartar la posibilidad de errores introducidos por la *Taq* ADN polimerasa en la reacción de PCR, se recomienda utilizar una enzima ADN polimerasa de alta fidelidad para disminuir la tasa de error en la síntesis de la nueva hebra complementaria.
- 2.8.6. Se recomienda usar como control positivo una muestra de ARN total obtenida a partir de la especie *Lycoris radiata* y/o *Narcissus tazetta*, ambas especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae y que se encuentran dentro de los alineamientos para las enzimas OMT y PAL. Con la evaluación de los cebadores en estas especies se podría contrastar con los resultados obtenidos para *Z. carinata* y con ello afirmar con mayor certeza la identidad de la secuencia dentro de Amaryllidaceae.

3. REFERENCIAS

- Bagal, U. R., Leebens-Mack, J. H., Lorenz, W. W., & Dean, J. F. (2012). The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. *BMC genomics*, 13(Suppl 3), S1.
- Bastida Armengol, J., Berkov, S., Torras Clavería, L., Pigni, N. B., Andradre, J. P. d., Martínez, V., . . . Viladomat Meza, F. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, 2011, Chapter 3, p. 65-100*. Editor: Diego Muñoz-Torrero.
- Berkov, S., Georgieva, L., Kondakova, V., Atanassov, A., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (2009). PLANT SOURCES OF GALANTHAMINE: PHYTOCHEMICAL AND BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(2), 1170-1176.
- Bird, R. C., Smith, B., & Jiang, W. (2002). Cloning PCR Products *Genetic Library Construction and Screening* (pp. 21-32): Springer Berlin Heidelberg.
- Cahlikova, L., Valterova, I., Macakova, K., & Opletal, L. (2011). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(4), 575-580. doi: 10.1590/s0102-695x2011005000089
- De la Cruz, I., González, A. R., & Riley, C. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos (pp. 189-202). Universitas Scientiarum.
- Eichhorn, J., Takada, T., Kita, Y., & Zenk, M. H. (1998). Biosynthesis of the amaryllidaceae alkaloid Galanthamine. *Phytochemistry*, 49(4), 1037-1047. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01024-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01024-8)
- Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology*, 52(1), 29-66.
- Fernández Alonso, J. L., & Groenendijk, J. P. (2004). A new specie of *Zephyranthes* Herb. s.l. (Amaryllidaceae, Hippeastreae) with notes on the genus in Colombia.
- Gadberry, M. D., Malcomber, S. T., Doust, A. N., & Kellogg, E. A. (2005). Primaclade—a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics*, 21(7), 1263-1264. doi: 10.1093/bioinformatics/bti134

- Goossens, A., & Rischer, H. (2007). Implementation of functional genomics for gene discovery in alkaloid producing plants. *Phytochemistry Reviews*, 6(1), 35-49. doi: 10.1007/s11101-006-9018-0
- Herke, K., Hazai, L., Hudak, M. S., Abraham, J., Santa, Z., Hada, V., & Szantay, C. (2009). Synthesis of the tetracyclic skeleton of the galanthamine-type Amaryllidaceae alkaloids. *Arkivoc*, 235-246.
- Ibrahim, R. K., Bruneau, A., & Bantignies, B. (1998). Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant molecular biology*, 36(1), 1-10.
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Ed): Academic Press. California.
- Kumar, A., & Ellis, B. E. (2001). The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant physiology*, 127(1), 230-239.
- Kutchan, T. M. (1995). Alkaloid Biosynthesis [mdash] The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *The Plant Cell*, 7(7), 1059.
- Lamoral-Theys, D., Andolfi, A., Van Goietsenoven, G., Cimmino, A., Le Calve, B., Wauthoz, N., . . . Evidente, A. (2009). Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *J Med Chem*, 52(20), 6244-6256. doi: 10.1021/jm901031h
- Lamoral-Theys, D., Decaestecker, C., Mathieu, V., Dubois, J., Kornienko, A., Kiss, R., . . . Pottier, L. (2010). Lycorine and its derivatives for anticancer drug design. *Mini Rev Med Chem*, 10(1), 41-50.
- Lefranc, F., Sauvage, S., Van Goietsenoven, G., Mégalizzi, V., Lamoral-Theys, D., Debeir, O., . . . Kiss, R. (2009). Narciclasine, a plant growth modulator, activates Rho and stress fibers in glioblastoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(7), 1739-1750. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0932
- Linhart, C. and Shamir, R. (2005). The Degenerate Primer Design Problem: Theory and Applications *Journal of Computational Biology*. 12(4): 431-456. doi:10.1089/cmb.2005.12.431.
Disponibile en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882141>
Página visitada el 10 de junio de 2014

- Osorio Durango, E. J. (2008). Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: alcaloides de "Phaedranassa dubia" (Amaryllidaceae) y biflavonoides de "Garcinia madruno" (Clusiaceae).
- Pevsner, J. (2009). *Bioinformatics and Functional Genomics*. Segunda edición. (Ed): Wiley-Blackwell. New Jersey.
- Ramawat, K. G., Mérillon, J.-M., Jin, Z., & Xu, X.-H. (2013). Amaryllidaceae Alkaloids *Natural Products* (pp. 479-522): Springer Berlin Heidelberg.
- Reyes-Chilpa, R., Berkov, S., Hernández-Ortega, S., Jankowski, C. K., Arseneau, S., Clotet-Codina, I., . . . Bastida, J. (2011). Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(11), 9520-9533. doi: 10.3390/molecules16119520
- Silverstone-Sopkin, P. A. (2011). *Los muertos vivos: la historia natural de cuatro lirios amazónicos del suroccidente de Colombia (Eucharis y Plagiolirion, Amaryllidaceae)*: Universidad del Valle, Programa Editorial.
- Takos, A. M., & Rook, F. (2013). Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11713-11741. doi: 10.3390/ijms140611713
- Viladomat, F., Codina, C., Cabezas, F., Bastida, J., Argoti, J., & Martínez, S. (2007). Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subdentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de amaryllidaceae. *Scientia Et Technica*, 13(33), 237-241.
- Yoon, H., You, Y. H., Kim, Y. E., Kim, Y. J., Kong, W. S., & Kim, J. G. (2013). Cloning and mRNA expression analysis of the gene encoding phenylalanine ammonia-lyase of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* *J Microbiol Biotechnol* (Vol. 23, pp. 1055-1059). Korea South.
- Zupko, I., Rethy, B., Hohmann, J., Molnar, J., Ocsovszki, I., & Falkay, G. (2009). Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In Vivo*, 23(1), 41-48.
- Sistema de Información Sobre Biodiversidad de Colombia. (2013). Datos de registros biológicos Colombianos repatriados. En línea: <http://data.sibcolombia.net/inicio.htm>. (Accedido a través del portal de datos del SIB Colombia, [http://data.sibcolombia.net/occurrences/search.htm?c\[0\].s=20&c\[0\].p=0&c\[0\].o=82183](http://data.sibcolombia.net/occurrences/search.htm?c[0].s=20&c[0].p=0&c[0].o=82183), 2013-11-19)

4. ANEXOS

ANEXO 1: ESQUEMAS SOBRE LA RUTA BIOSINTÉTICA DE LOS ALCALOIDES DE LA FAMILIA AMARYLLIDACEAE

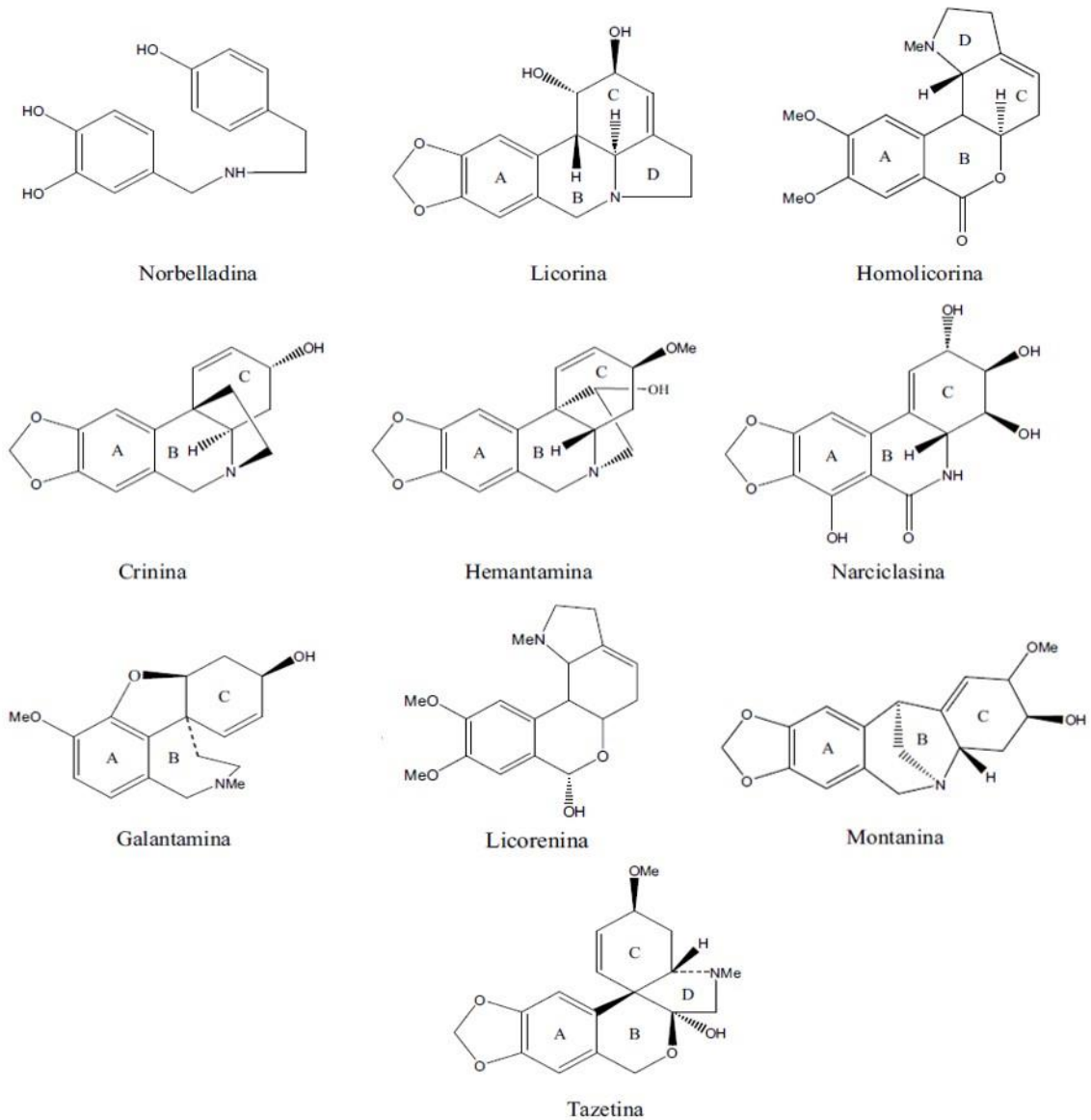


Figura 17. Estructura química de los núcleos básicos de los alcaloides de Amaryllidaceae (Osorio Durango, 2008)

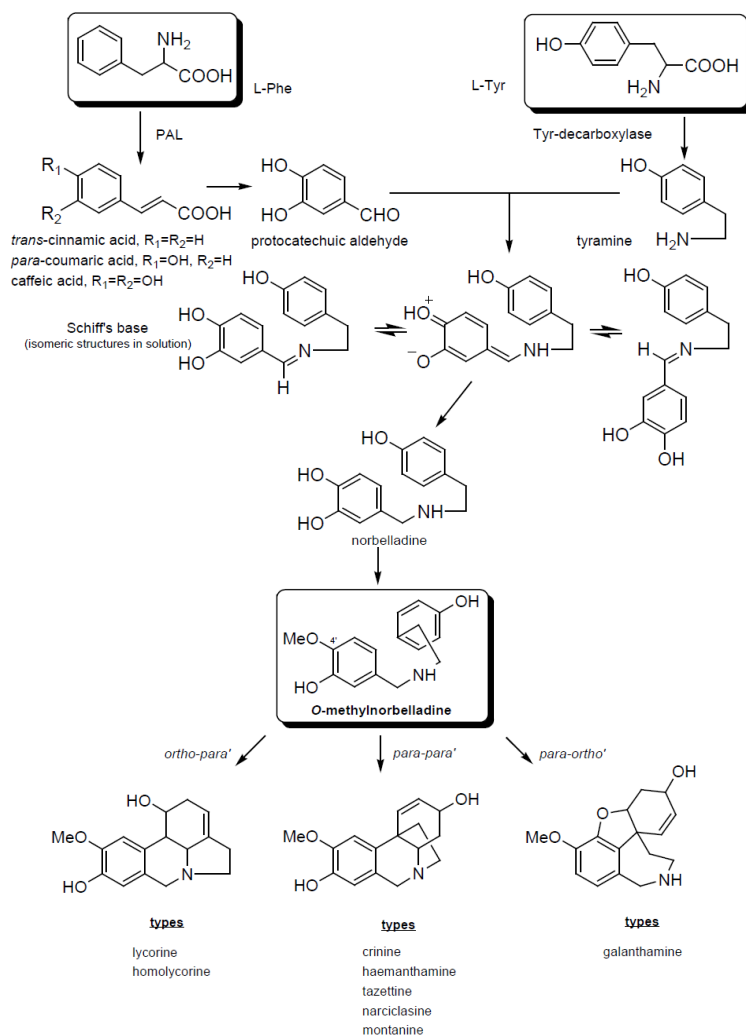


Figura 18. Ruta de biosíntesis de los alcaloides típicos de Amaryllidaceae. Etapa inicial (Berkov *et al.*, 2009)

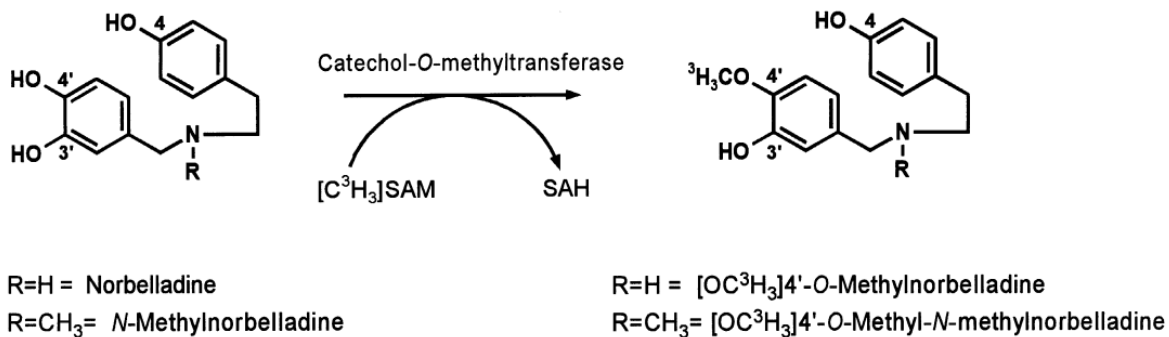


Figura 19. Síntesis del precursor O-metilnorbeladina mediante la acción enzimática de la enzima Catecol-O-metiltransferasa (Eichhorn *et al.*, 1998)

ANEXO 2: PROTOCOLOS DE LABORATORIO – TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Protocolo No.1. Extracción de ARN a partir de hojas de individuos de *Z. carinata* y *Z. rosea*. Tomado del *TRIzol® Reagent*, Ambion.

1. Limpiar el área de trabajo con una solución de SDS 0,5% y enjuagar con agua con DEPC. Estar pendiente de cambiar los guantes constantemente.
2. Guardar las hojas del material vegetal en papel aluminio durante el periodo de transporte en un recipiente con Nitrógeno líquido para evitar la degradación del ARN total.
3. Macerar el tejido vegetal vigorosamente.
4. Adicionar 1mL del reactivo TRIzol® Reagent por cada 50-100mg de tejido y homogenizar las muestras.
5. Incubar la muestra homogenizada durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Adicionar 0,2mL de cloroformo por cada 1mL de reactivo TRIzol y tapar el tubo.
7. Agitar el tubo vigorosamente de forma manual por 15 segundos.
8. Incubar de 2-3 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C. (enfriar previamente la centrifuga). Se separan dos fases, una fase inferior roja (fenol-cloroformo) y una fase traslúcida superior (acuosa) en la cual está solubilizado el ARN.
10. Remover la fase acuosa inclinando el tubo y pipeteando la fase. Evitar llevarse volumen de la interfase o de la fase orgánica.
11. Transferir fase acuosa a un nuevo tubo.
12. Adicionar 0,5mL de isopropanol 100% a la fase acuosa por cada 1mL de TRIzol.
13. Incubar la muestra a temperatura ambiente por 10 minutos.
14. Centrifugar a 12,000 x g durante 10 minutos a 4°C. se forma un *pellet* en pegajoso en el fondo del tubo.
15. Remover el sobrenadante dejando sólo el *pellet* y lavar con 1mL de etanol 75% por cada 1mL de TRIzol utilizado.
16. Agitar en vórtex y luego centrifugar a 7500 x g por 5 minutos a 4°C.
17. Secar al aire el tubo que contiene el ARN forma invertida sobre una toalla de papel por 5-10 minutos.
18. Resuspender el *pellet* en 25µL de agua con DEPC (libre de ARNasas) pipeteando varias veces.
19. Incubar los tubos en baño maría a 55-60°C por 10-15 minutos.
20. Almacenar a -80°C

Protocolo No.2. Síntesis de ADNc por RT-PCR a partir de muestras de ARN total. Tomado de *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, Invitrogen.

1. Diseñado para convertir 1pg-5µg de ARN total en la primera hebra de ADNc.
2. Agitar cada componente antes de usar.
3. Combinar en un tubo de 0,2-0,5mL los siguientes componentes en el orden mencionado:

Componente	Volumen por 1Rxn	Control RT(+) y RT(-)	
ARN total	$n \mu\text{L}^*$	ARN total HeLa (100pg/ μL)	1 μL
Cebador Oligo(dT) ₂₀ (50µL)	1 μL		1 μL
Mezcla de dNTP (10mM)	1 μL		1 μL
Agua con DEPC	Completar a 10 μL		7 μL

* Depende de la concentración de ARN de cada muestra

4. Incubar el tubo a 65°C por 5 minutos y luego poner en hielo por al menos 1 minuto.
5. Preparar en otro tubo la mezcla de síntesis de ADNc en el siguiente orden:

Componente	Volumen por 1 Rxn	Control RT(+)	Control RT(-)
RT buffer (10X)	2 μL	2 μL	2 μL
MgCl ₂ (25mM)	4 μL	4 μL	4 μL
DTT (0,1M)	2 μL	2 μL	2 μL
RNaseOUT (10 U/ μL)	1 μL	1 μL	1 μL
SuperScript® III RT (200U/ μL)	1 μL	1 μL	-
Agua DEPC	-	-	1 μL

6. Adicionar 10 μL de la mezcla de síntesis a cada tubo que contiene el ARN y el cebador. Mezclar suavemente e incubar a 50°C por 50 minutos.
7. Terminar las reacciones a 85°C por 5 minutos y luego enfriar en hielo.
8. Adicionar 1 μL de RNase H a cada uno de los tubos e incubar a 37°C por 20 minutos
9. Las reacciones de síntesis de ADNc se almacenan a -20°C

Protocolo No.3. Condiciones estándar de PCR usando la enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase*, Promega.

1. En un tubo estéril mezclar en hielo los siguientes componentes:

Componente	[Inicial]	[Final]
<i>Colorless GoTaq® Flexi Buffer</i>	5X	1X
Solución de MgCl ₂	25mM	1,0-4,0mM
Mezcla de dNTPs	10mM c/u	0,2mM c/u
Upstream primer	XµM	0,1-1,0µM
Downstream primer	YµM	0,1-1,0µM
<i>GoTaq® Flexi DNA Polymerase</i>	5U/µL	1,25U
ADN molde	-	<0,5µg/50µL
Agua estéril	-	-

Protocolo No.4. Ligación de productos de PCR en plásmido. Tomado de InstAclone PCR Cloning Kit, Thermo Scientific.

1. En tubos de 0,2mL mezclar los siguientes componentes para la reacción de ligación:

Componente	Volumen por reacción
Vector pTZ57R/T	1µL
Buffer de ligación 5X	2µL
Producto de PCR	2,5µL
T4 ADN Ligasa	0,34µL
Agua estéril	4,16µL
TOTAL	10µL

2. Mezclar suavemente e incubar la ligación toda la noche a 4°C para obtener un número significativo de transformantes.

Protocolo No.5. Transformación bacteriana.

1. Tomar 5 μ L de la reacción de ligación previamente limpia o purificada.
2. Mezclar con pipeta suavemente en tubo eppendorf de 1.5ml con 40 μ L de células competentes.
3. Poner la mezcla en las celdas de electroporación, llevar al electroporador y utilizar la función P2.
4. Tomar la muestra electroporada y llevarla a un tubo de crecimiento conteniendo 1mL de medio LB sin antibióticos.
5. Mezclar suavemente con pipeta e incubar a 37°C por 1 hora.
6. Después de la hora, centrifugar los tubos a 2500rpm por 5 minutos.
7. Descartar el sobrenadante pero dejar en el tubo aproximadamente 100 μ L del mismo.
8. Resuspender pipeteando el *pellet* en este volumen.
9. Tomar los 100 μ L del cultivo anterior y sembrarlos en una caja Petri conteniendo LB sólido, con IPTG, X-Gal y ampicilina.
10. Incubar a 37 °C por toda la noche.
11. Al día siguiente revisar las cajas y guardar las positivas a 4 °C.

Protocolo No.6. Digestión de los plásmidos mediante análisis de restricción con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. Tomado de *Assembly of Restriction Enzyme Digestions*, Promega.

1. En un tubo estéril mezclar los siguientes componentes en el siguiente orden:

Componente	Volumen por reacción
Agua estéril	10,8 μ L
MULTI-CORE™ Buffer 10X	2 μ L
BSA acetilado, 10 μ g/ μ L	0,2 μ L
ADN plasmídico	5 μ L
Mezclar pipeteando suavemente	
Enzima de restricción EcoRI	1 μ L
Enzima de restricción BamHI	1 μ L
TOTAL	20 μ L

2. Mezclar suavemente pipeteando, cerrar el tubo y centrifugar por unos pocos segundos en una microcentrifuga.
3. Incubar la reacción de digestión a 37°C por 1-4 horas.
4. Analizar mediante electroforesis en gel de agarosa.

Protocolo No.7. Extracción del plásmido a partir de colonias blancas propagadas en medio LB líquido con antibiótico. Tomado de *Minipreps usando lisis por calentamiento*, LBM, Icesi.

1. En cabina de bioseguridad transferir 1,5mL del cultivo en el medio líquido LB con ampicilina a un tubo eppendorf.
2. Centrifugar a 12000rpm durante 2 minutos.
3. Descartar el sobrenadante y dejar secar el tubo invertido sobre una toalla de papel.
4. Resuspender el *pellet* en 520µL de STET* y adicionar 33µL de una solución fresca de Lisozima (10mg/mL en 10mM Tris-HCl pH 8,0).
5. Mezclar en vórtex suave hasta que se disuelva el *pellet*.
6. Colocar los tubos en un baño hirviendo (100°C) durante 60 segundos exactamente.
7. Centrifugar a 12000rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Remover el *pellet* con una punta estéril o transferir el sobrenadante a otro tubo (se conserva el sobrenadante).
9. Adicionar al sobrenadante 52µL de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 600µL de isopropanol frío.
10. Mezclar en vórtex muy suave por 3 segundos.
11. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 12000rpm durante 5 minutos a 4°C.
13. Descartar el sobrenadante y dejar secar completamente el tubo invertido sobre una toalla de papel.
14. Añadir 1mL de etanol 70% y centrifugar a 12000rpm por 2 minutos a 4°C.
15. Descartar el etanol y dejar secar completamente a temperatura ambiente por 5 minutos.
16. Resuspender el *pellet* en 50µL de TE pH 8 y almacenar a -20°C.
17. Analizar los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.
18. Preparación de la solución STET* (15mL):

Componente	[Final]	Volumen
NaCl 5M	0,1M	300µL
Tris-HCl (pH 8) 1M	10mM	150µL
EDTA (pH 8) 0,5M	1mM	30µL
Tritón X-100	5%	750µL
Agua tipo 1	-	Para 15mL

ANEXO 3: BIOINFORMÁTICA PARA DISEÑO DE CEBADORES - ALINEAMIENTOS DE SECUENCIAS

Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima OMT. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
OMT_Zeal          MGSTAGDVAAVVDEEACMYAMQLASSSILPMTLKNAIELGLLEVLQKEAGGG----KAAL 56
OMT_Sorghum1     MGSTAEADVAAVADEEACMYAMQLASSSILPMTLKNALELGLLEVLQKDG-----KAL 53
OMT_Oryzal       MGSTAADMAAAADEEACMYALQLASSSILPMTLKNAIELGLETLOSAAVAGGGGKAAL 60
CCOMT_Narcissus  MGS-----CNINDEAFTYAAQLLSLSALEPMTLAAAVELNLFDIITKAGPN-----AYL 49
***          *:* ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

OMT_Zeal          APEEVVARMPAAPGDPAAAAAMVDRMLRLLASVDV--RCQMED-RDGRYERRYSAAPVC 113
OMT_Sorghum1     AAEVVARLFPVPTNP-AAADMVDRI LRLLASVDV--KCQMED-KDGKYERRYSAAPVC 109
OMT_Oryzal       TPAEVADKLP-SKANP-AAADMVDRMLRLLASVNVV--RCMEEGADGKLSRRYAAAPVC 116
CCOMT_Narcissus  PVSEIVAKLP--TENP-QASEMFDRLRLLAGFDVVTFKSVTMDETSGRMERRYANNVT 106
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

OMT_Zeal          KWLTPNE--DGVSMALALMNQDKVLMESWYYLKDAVLGGIPFNKAYGMTAFHEYHGTD 171
OMT_Sorghum1     KWLTPNE--DGVSMALALMNQDKVLMESWYYLKDAVLGGIPFNKAYGMTAFHEYHGTD 167
OMT_Oryzal       KWLTPNE--DGVSMALALMNQDKVLMESWYYLKDAVLGGIPFNKAYGMTAFHEYHGTD 174
CCOMT_Narcissus  KYFCKDEGGDGC SLAPGSKLFHDHTTMEAWYNLKNAVLGGDPFKAHGMMNIFEFAKANP 166
*::  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

OMT_Zeal          RFNRVFNEGKMHNSVITTKKLLDFYTGFEV--VSTLVDVGGGVGATLHAITSRHPHISGVN 230
OMT_Sorghum1     RFNRVFNEGKMHNSVITTKKLEFYTGFEV--VSTLVDVGGGIGATLHAITSRHPHISGVN 227
OMT_Oryzal       RFNRVFNEGKMHNSVITTKKLLDLYTGFEV--ASTVVDVGGGVGATVAAVSRHPHIRGIN 233
CCOMT_Narcissus  RFNSLFNEGKMGYSCIIMKKVLDVSTAFDD-LNVLDVGGGTGGTLGAI IARHPHIKGIN 225
*** :*****:* ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

OMT_Zeal          FDLPHVISEAPPFPGVHRVGGDMFASVP-AGDAILMKWILHDWSDAHCATLLKNCYDALP 289
OMT_Sorghum1     FDLPHVISEAPPFPGVHQVGGDMFKSVP-AGDAILMKWILHDWSDAHCATLLKNCYDALP 286
OMT_Oryzal       YDLPHVISEAPPFPGVEHVGGDMFASVPRGGDAILMKWILHDWSDAHCARLLKNCYDALP 293
CCOMT_Narcissus  YDLPHVIREAPSPFPGIEHIGGDMFKSIP-SGDAILLKTLCCDWDEHVLKLKNCWKALP 284
:***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

OMT_Zeal          ENG-KVIVVECVLPVNTTEATPK---AQQVFHVDMIMLAHNPGGKERYEREFRELAKGAGF 345
OMT_Sorghum1     EKGKVVIVVECVLPVTTDAVPK---AQQVFHVDMIMLAHNPGRERYEREFRLAKAAGF 343
OMT_Oryzal       EHG-KVVVVECVLPESSDATAR--EQGVFHVDMIMLAHNPGGKERYEREFRELARAAGF 349
CCOMT_Narcissus  DNG-KVIIDDIFPMIVEEESTNSLEK FALLIDLITLVHVPSGKERTEEFWKLAKSAGF 343
:* ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

OMT_Zeal          SGFKATYIYANAW----- 358
OMT_Sorghum1     SGFKATYIYANAWAIEFIK 362
OMT_Oryzal       TGFKATYIYANAWAIEFTK 368
CCOMT_Narcissus  SRFRVGNCAVVTIMEFYK 362
: * . * .

```

Figura 21. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima PAL. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
PAL_Solanum2          -----
PAL_Lithospermum     -----METIVENGNGK 11
PAL_Lycoris           -----MAYANGNGN 9
PAL_Narcissus         -----
PAL_Allium_sativum    -----MGAMNGDFSVN 11
PAL_Allium_cepaz      -----MGAVNGDFSVN 11
PAL_Allium_cepaz1     -----MENG-----N 5
PAL_Coffea            -----
PAL_Solanum1          -----
PAL1_Arabidopsis      -----MEINGAHKSNNGGVDAMLCGGDIKTK 26
PAL1_Lotus2           -----MAPTNSNHESLNSIFC 18
PAL4_Lotus3           -----GCTAA 5
PAL6_Lotus5           -----
PAL_oryza2            -----MECENGR-VSANGMSGL 16

```

PAL_Zea2	-----MECENGRGVAATNSDSL	17
PAL_Brachiararia	-----	
PAL_Saccharum1	AVRCRYXSGXPXDXHASARRARQLLRLFSSSSPPAAPPSSPPATARPQPHSIMG	60
PAL_Zea1	-----HASAPTPALLLHRHQSTTSHLLPPRGPQPHRSAAMAG	39
PAL_Oryza3	-----MAG	3
PAL_Solanum2	-----	
PAL_Lithospermum	TMEFCMKDPLNWEMASESMKGSGLDEVKRMVAEFRKPVVQLAGKTLTIGQVAAIAARDG	71
PAL_Lycoris	ANGFCILDPLNWGAAAALGSHLDEVKRMVKDYREAYVKLEGATLKVAQIAAVANDGSA	69
PAL_Narcissus	-----	
PAL_Allium sativum	DEIIRIQDPLNWGAAAEMSGSHLDEVKRMVKEYRGSVKLEGATLKVGQVAAVAAG-EI	70
PAL_Allium cepa2	NEIIRIEDPLNWGAAAAMSGSHLDEVKRMVNEYREKSVKLEGATLKVAQVAAVAAG-EI	70
PAL_Allium cepa1	SALCMRSDPLNWGKAAEALSGSHLEEVKRMVDDFRNFPVVKLEGEDLKSQVAAVAAMGGK	65
PAL_Coffea	-----	
PAL_Solanum1	-----	
PAL1_Arabidopsis	NMVINAEPLNWGAAAEMKGSGLDEVKRMVAEFRKPVVNLGGETLTIGQVAAISTIGN-	85
PAL1_Lotus2	TAAKAGSDPLSWGVAADSMKGSGLDEVKRMVAEYRKPVVKLGGETLTIAQVAAIAANDQ-	77
PAL4_Lotus3	NGTATATDPLSWGVAEEMKGSGLDEVKRMVAEYRKPVVKLGGETLTIAQVAAIAANEQ-	64
PAL6_Lotus5	-TAKGSDPLNWGMAAESMKGSGLDEVKRMVAEYRKPVVRLGGETLTIAQVAAVAHDQH	59
PAL_oryza2	CVAAPRADPLNWGKATEEMTGSGLDEVKRMVAEYRQPLVKIEGASLRIAQVAAVAA-AGE	75
PAL_Zea2	CMATPRADPLNWGKAAEELMGSGLDEVKRMVAEYRQPLVKIEGASLSIAQVAAVATGAGE	77
PAL_Brachiararia	-----	
PAL_Saccharum1	NGAIVESDPLNWGAAAELAGSHLDEVKRMVAQARQPVVKIEGSTLRVQVAAVAAAKDA	120
PAL_Zea1	NGAIVESDPLNWGAAAELAGSHLDEVKRMVAQARQPVVKIEGSTLRVQVAAVAAAKDA	99
PAL_Oryza3	NGPINKEDPLNWGAAAEMAGSHLDEVKRMVAQFREPLVKIQGATLRVQVAAVAQAQKA	63
PAL_Solanum2	-----GGALQKELIR-	10
PAL_Lithospermum	VTVELA--EAAREGVKASSDWMDSMNKGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKQGGALQKELIR-	128
PAL_Lycoris	VKVELD--ESARARVKASSDWMDSMNKGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKQGGALQKELIR-	126
PAL_Narcissus	-----ELIR-	4
PAL_Allium sativum	KEVVLD--EGAREGVKASSDWMDSMCKGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKNGAALQNELIR-	127
PAL_Allium cepa2	KEVVLD--EGAREGVKASSDWMDSMCKGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKNGVALQNELIR-	127
PAL_Allium cepa1	VSVKLA--ETARGRVKASSDWMKKSLEDGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKNAEALQTELIR-	122
PAL_Coffea	-----	
PAL_Solanum1	-----	
PAL1_Arabidopsis	-SVKVELSETARAGVNASSDWMESMNKGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKNGVALQKELIR-	143
PAL1_Lotus2	-GVSVELCESARAGVKASSDWMNSMNGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKNGNALQLELIRI	136
PAL4_Lotus3	-GVSVELCESARAGVKASSDWMNSMNGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKNGNALQLELIRI	122
PAL6_Lotus5	HGVSVELCESARAGVKASSDWMNSMNGTDSYGVTTFGFGATSHRRTNQGNALQLELIR-	118
PAL_oryza2	ARVELD--ESARERVKASSDWMNSMNGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKEGGALQRELIR-	132
PAL_Zea2	ARVELD--ESARSVKASSDWMVTSMNGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKEGGALQRELIR-	134
PAL_Brachiararia	-----	
PAL_Saccharum1	SGVAVELDEEARPRVKASSEWILDICIAHGGDIYGVTTGFGGTSRRRTKDGPAQVELLR-	179
PAL_Zea1	SGVAVELDEEARPRVKASSEWILDICIAHGGDIYGVTTGFGGTSRRRTKDGPAQVELLR-	158
PAL_Oryza3	ARVAVELDEEARPRVKASSEWILTICIAHGGDIYGVTTGFGGTSRRRTKDGPAQVELLR-	122
PAL_Solanum2	-----FLNAGVFNNGTSSHTLPHSATRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	58
PAL_Lithospermum	-----FLNAGIFNGTETSHLPHSATRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	176
PAL_Lycoris	-----FLNAGIFESGHNSNTLPASTRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEVI	174
PAL_Narcissus	-----FLNAGIFGAGRDCNTLPASTRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	52
PAL_Allium sativum	-----FLNAGIFGS-PNSGNSLPSTTTRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILESI	174
PAL_Allium cepa2	-----FLNAGIFGS-PNSGNSLPSTTTRAAMLVRVNTLLQGYSGIRFEILESI	174
PAL_Allium cepa1	-----FLNAGIFGSGKNSGNTLPSTTTRAAMLVRINTLLQGYSGIHFEILEAI	170
PAL_Coffea	-----	
PAL_Solanum1	-----	
PAL1_Arabidopsis	-----FLNAGIFGSKTETSHTLPHSATRAAMLVRINTLLQGFSGIRFEILEAI	191
PAL1_Lotus2	KVVVDVNMFLFFRFLNAGIFNGTETSHLPQATRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	196
PAL4_Lotus3	-----FLNAGIFNGTETSHLPQATRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	170
PAL6_Lotus5	-----FLNAGIFNGTETSHLPQATRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	166
PAL_oryza2	-----FLNAGAFGTGDG-HVLPAAETRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	179
PAL_Zea2	-----FLNAGAFGTGADG-HVLPAAETRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	181
PAL_Brachiararia	-----	
PAL_Saccharum1	-----HLNAGIFGTGSDG-HTLPSEVTRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	226
PAL_Zea1	-----HLNAGIFGTGSDG-HTLPSEVTRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	205
PAL_Oryza3	-----YLNAGIFGTGSDG-HTLPSETVTRAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAI	169
PAL_Solanum2	TKLINSNITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGEKLNABEEAFRVAG	118
PAL_Lithospermum	TKFLNNTITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGEKINABEEAFRLAG	236
PAL_Lycoris	TRLLNNTITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGEKIDASEAFKLAG	234
PAL_Narcissus	TRLLNSNVTCPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGEKIDASEAFKLAG	112
PAL_Allium sativum	TRLLNNTITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAALLTGRPNKAVGPTGEKIDASEAFKLAG	234
PAL_Allium cepa2	TRLLNNTITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAALLTGRPNKAVGPTGEKIDASEAFKLAG	234
PAL_Allium cepa1	AAFLNSDITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGEKIDASEAFKLAG	230
PAL_Coffea	-----	
PAL_Solanum1	-----	
PAL1_Arabidopsis	TSFLNNTITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGEKIDASEAFKLAG	251
PAL1_Lotus2	TKLINNTITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGEKIDASEAFKLAG	256
PAL4_Lotus3	TKLINNTITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGEKIDASEAFKLAG	230

PAL6_Lotus5	TKLLNNSITPCLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGLLTGRQNSKAVGPSGEVLNAKEAFQLAS	226
PAL_oryza2	AKLLNANVTCPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLVTGRENNAVAVAPDGSKVNAAEAFKVIAG	239
PAL_Zea2	VKLLNANVTCPCLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGLVTGRENSVAVAPDGSKVNAAEAFKVIAG	241
PAL_Brachiaria	-----	-----
PAL_Saccharum1	TKLLNTGVSPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLITGRPNAQATVVDGRKVDAAEAFKVIAG	286
PAL_Zea1	TKLLNTGVSPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLITGRPNAQAVTVDGRKVDAAEAFKVIAG	265
PAL_Oryza3	TKLLNTGVTPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLITGRPNAQAI SPDGRKVDAAEAFKVIAG	229
PAL_Solanum2	VTSGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEENILAVMSEVLSAIFAEVMNGKPEFTD	178
PAL_Lithospermum	ISTGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEENILAVLSEVLSAIFAEVMNGKPEFTD	296
PAL_Lycoris	ITDGGFFLQPKKEGLALVNGTAVGSGLASTVLYDNTILAVLAEVLSAIFCEVMQKPEFTD	294
PAL_Narcissus	ITGGFFLQPKKEGLALVNGTAVGSGLASTVLYDANILAVLAEVSSAIFCEVMQKPEFTD	172
PAL_Allium_sativum	ITSGFFRLQPKKEGLALVNGTAVGSGLASIVLYETNVLAVLAEVMSALFCEVMQKPEFTD	294
PAL_Allium_cepae2	VTSGFFLQPKKEGLALVNGTAVGSGLASIVLYETNVLAVLAEVMSALFCEVMQKPEFTD	294
PAL_Allium_cepae1	IPSTFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGLASIVLFEANVLAVLSEIISAVFCEVMQKPEFTD	290
PAL_Coffea	-----	-----
PAL_Solanum1	-----	-----
PAL1_Arabidopsis	ISSGFFDLQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEENILAVLSEVLSAIFAEVMNGKPEFTD	311
PAL1_Lotus2	IDSGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGLASIVLFDANILAILSEVLSAIFAEVMQKPEFTD	316
PAL4_Lotus3	IDSGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGLASIVLFDANVLAIIAEVLSAIFAEVMQKPEFTD	290
PAL6_Lotus5	IDSGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGLASIVLFEANILAILAEVLSAIFAEVMQKPEFTD	286
PAL_oryza2	IQGGFFELQPKKEGLAMVNGTAVGSGLASTVLFANILAILAEVLSAVFCEVMNGKPEYTD	299
PAL_Zea2	IQGGFFELQPKKEGLAMVNGTAVGSGLASTVLFANILAILAEVLSAVFCEVMNGKPEYTD	301
PAL_Brachiaria	-----	-----
PAL_Saccharum1	IEGGFFKLNPKKEGLAIVNGTAVGSGALAAATVMDANVTLVSEVLSAVFCEVMNGKPEYTD	346
PAL_Zea1	IEGGFFKLNPKKEGLAIVNGTAVGSGALAAATVMDANVTLVSEVLSAVFCEVMNGKPEYTD	325
PAL_Oryza3	IEGGFFTLNPKKEGLAIVNGTAVGSGALAAATVMDANILAVLSEVLSAVFCEVMNGKPEYTD	289
PAL_Solanum2	YXTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSS-----	205
PAL_Lithospermum	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQKLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	356
PAL_Lycoris	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILEGSSYMKMAKKLHEH DPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	354
PAL_Narcissus	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILAGSSYMKMAEKLEHLDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	232
PAL_Allium_sativum	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILEGSSYMKMAKLNHMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	354
PAL_Allium_cepae2	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILEGSSYMKMAKKLHDTDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	354
PAL_Allium_cepae1	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILEGSSYMKMAEKLEHLDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	350
PAL_Coffea	-----LKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSFVKEAQRVHEFDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	55
PAL_Solanum1	-----	-----
PAL1_Arabidopsis	HLTHRLKHHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYMKLAQKLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	371
PAL1_Lotus2	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYMKAAKKLHEVDPDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	376
PAL4_Lotus3	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYMKAAKKLHEVDPDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	350
PAL6_Lotus5	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYMKAAKKLHEVDPDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGP	346
PAL_oryza2	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILEGSSYMKHAKKLGLDPLMKPKQDRYALRTSPQWLGP	359
PAL_Zea2	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILEGSSYMKLAKKLGLDPLMKPKQDRYALRTSPQWLGP	361
PAL_Brachiaria	-----	-----
PAL_Saccharum1	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSAFMKHAQKLNELDPLKPKQDRYALRTSPQWLGP	406
PAL_Zea1	HLTHKCLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSFMKQAKKLNELDPLKPKQDRYALRTSPQWLGP	385
PAL_Oryza3	HLTHKCLKHHPGQIDAAAIMEHILAGSSFMHAKKVNEMDPLKPKQDRYALRTSPQWLGP	349
PAL_Solanum2	-----	-----
PAL_Lithospermum	QIEVIRSATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLAIASIGKL	416
PAL_Lycoris	QIEVIRSATKSIEREISSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLAIASISKL	414
PAL_Narcissus	QIEVIRSATKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLAIASIGKL	292
PAL_Allium_sativum	QIEVIRAATKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAVHGGNFQGTPIGVMDNTRLAVAAIGKL	414
PAL_Allium_cepae2	QIEVIRAATKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKAVHGGNFQGTPIGVMDNTRLAVAAIGKL	414
PAL_Allium_cepae1	QIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLAIAAIGKL	410
PAL_Coffea	LIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLAIASIGKL	115
PAL_Solanum1	-----	-----
PAL1_Arabidopsis	QIEVIRYATKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLAIAAIGKL	431
PAL1_Lotus2	LIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLALAAIGKL	436
PAL4_Lotus3	LIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLALAAIGKL	410
PAL6_Lotus5	LIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLALASIGKL	406
PAL_oryza2	QIEVIRAATKSIEREINSVNDNPLIDVSRGKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLAIAAIGKL	419
PAL_Zea2	QIEVIRAATKSIEREINSVNDNPLIDVSRKALHGGNFQGTPIGVMDNTRLAIAAIGKL	421
PAL_Brachiaria	-----	-----
PAL_Saccharum1	QIEVIRAATKSIEREINSVNDNPLIDVHRGKALHGGNFQGTPIGVMDNARLAIANIGKL	466
PAL_Zea1	QIEVIRAATKSIEREINSVNDNPLIDVHRGKALHGGNFQGTPIGVMDNARLAIANIGKL	445
PAL_Oryza3	QIQVIRAATKSIEREINSVNDNPLIDVHRGKALHGGNFQGTPIGVMDNARLAIANIGKL	409
PAL_Solanum2	-----	-----
PAL_Lithospermum	LFAQFSELVNDYNNGLPSNLTGSRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQS	476
PAL_Lycoris	MFAQFSELVNDYNNGLPSNLLGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQS	474
PAL_Narcissus	VFAQFSELVNDYNNGLPSNLGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQS	352
PAL_Allium_sativum	MFAQFSELVNDYNNGLPSNLTGSRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQS	474
PAL_Allium_cepae2	MFAQFSELVNDYNNGLPSNLTGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQS	474

PAL Allium cepal	LFAQMSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMAAYCSEIQYLANPVTNHVES	470
PAL Coffea	MFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMAAYCSELQFLANPVTNHVQS	175
PAL Solanum1	-----	
PAL1 Arabidopsis	MFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQYLANPVTSHVQS	491
PAL1 Lotus2	MFAQFTELVDHNNGLPSNLTASRNPSLDYGLKGAEIAMASYCSELQYLANPVTTHVQS	496
PAL4 Lotus3	MFAQFTELVDHNNGLPSNLTASRNPSLDYGLKGAEIAMASYCSELQYLANPVTTHVQS	470
PAL6 Lotus5	MFAQFTELVDHNNGLPSNLTASRNPSLDYGLKGAEIAMASYCSELQYLANPVTTHVQS	466
PAL_oryza2	MFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLGNPVTNHVQS	479
PAL Zea2	MFAQFSELVNDYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLGNPVTNHVQS	481
PAL Brachiaria	-----	
PAL Saccharum1	MFAQFSELVNEFYNNGLTSLNLAGSRNPSLDYGFKGTEIAMASYCSELQYLGNPITNHXQS	526
PAL Zea1	MFAQFSELVNEFYNNGLTSLNLAGSRNPSLDYGFKGTEIAMASYCSELQYLGNPITNHVQS	505
PAL_Orzya3	MFAQFSELVNEFYNNGLTSLNLAGSRNPSLDYGFKGTEIAMASYCSELQYLANPITNHVQS	469
PAL Solanum2	-----	
PAL Lithospermum	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEILKLMSSSFLVALFQAVDLRHIEENVRVLAVKNTVSQ	536
PAL Lycoris	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAIIDLRHLEENLKSTVKTTSIQ	534
PAL Narcissus	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAIIDLRHLEENLKSTVKTTSIQ	412
PAL Allium sativum	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAVDLRHLEENLRQVVKGVVQS	534
PAL Allium cepa2	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAIIDLRHLEENVRQAVKNAVQS	534
PAL Allium cepal	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAIIDLRHLEENLKCAVKNTVSQ	530
PAL Coffea	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAIIX-----	217
PAL Solanum1	-----	
PAL1 Arabidopsis	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAVDLRHLEENLRQVVKNTVSQ	551
PAL1 Lotus2	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAIIDLRHLEENLRQVVKNTVSQ	556
PAL4 Lotus3	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAIIDLRHLEENLRQVVKNTVSQ	530
PAL6 Lotus5	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAIIDLRHLEENLRQVVKNTVSQ	526
PAL_oryza2	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAVDLRHIEENVRQAVKNAVQS	539
PAL Zea2	AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEIILKLMSTTFLVGLCQAVDLRHIEENVRQAVKNAVQS	541
PAL Brachiaria	-----	
PAL Saccharum1	AEQHNQDVNSLGLVRSARKTAEAIIDILKLMSTTYIVALCQAIIDLRHLEENIKTSVKNVTVQ	586
PAL Zea1	AEQHNQDVNSLGLVRSARKTAEAIIDILKLMSTTYIVALCQAVDLRHLEENIKASVKNVTVQ	565
PAL_Orzya3	AEQHNQDVNSLGLVRSARKTAEAIIDILKLMSTTYIVALCQAVDLRHLEENIKSSVKNCVTQ	529
PAL Solanum2	-----	
PAL Lithospermum	VAKRRLTTGVNGELHPSRFCEKDLLRVVDREYVFAYADDPCLTTPMLQKLRQVTVLGHAL	596
PAL Lycoris	VAKRRLTMGAKGELHPSRFCEKDLIKVVDREYVFYSYIDDDPCSTTYPLMQKLRQVTVLGHAL	594
PAL Narcissus	VAKRALTSVNGELHPSRFCEKDLIKVVDREYVFYSYIDDDPCSATYPLMQKLRQVTVLGHAL	472
PAL Allium sativum	AVKRRLTVGANGEPHPSRFCEKDLIKMIEREYVFYADDACSAGYPLMQKVRQVTVLGHAL	594
PAL Allium cepa2	AAKRRLTVGANGEPHPSRFCEKDLIKMIDREYVFYADDACSAAYPLMQKVRQVTVLGHAL	594
PAL Allium cepal	VCKMVLTTGVNGEPHPSRFCEVELTKVIDREYVFAYIDDDPCSQTYPLMEKLRQVTVLGHAL	590
PAL Coffea	-----	
PAL Solanum1	-----	
PAL1 Arabidopsis	VAKKVLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVYADDPCSATYPLIQKLRQVTVLGHAL	611
PAL1 Lotus2	VAKRRLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREAVFAYIDDDPCLATYPLMQKLRQVTVLGHAL	616
PAL4 Lotus3	VVKRRLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDRETFYSYIDDDPCSATYPLMQKLRQVTVLGHAL	590
PAL6 Lotus5	VAKRRLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDRETFVYIDDDPCSATYPLMQKLRQVTVLGHAL	586
PAL_oryza2	VAKKTLSTNSTGDLHVARFCEKDLLEIIEAEVFAVYADDPCSHNYPLMCKLRNVLVERAL	599
PAL Zea2	VAKKTLSTNSTGDLHVARFCEKDLLEIIEAEVFAVYADDPCSANYPMLMCKLRNVLVERAL	601
PAL Brachiaria	-----	
PAL Saccharum1	VAKKVLTMNPSGDLSSARFSEKELITAIIDREGVFTYAEDPASGSLPLMQKLRVTVLGHAL	646
PAL Zea1	VAKKVLTMNPSGDLSSARFSEKELISAIIDREAVFTYAEDAASGSLPLMQKLRVTVLGHAL	625
PAL_Orzya3	VAKKVLTMNPTGDLSSARFSEKELITAIIDREAVFVYADDPCSANYPMLMQKLRVTVLGHAL	589
PAL Solanum2	-----	
PAL Lithospermum	DNGENEKDVNTSIFHKIAIFEEELKAILPKEVENARASVENGIPAINRIECCRSYPLYK	656
PAL Lycoris	NNGEKEKDANTSIFQKISAFEEELNVLVLPKEVENARAVAYENGTSAIKNRIECCRSYPLYK	654
PAL Narcissus	SNGEKEKDANTSIFRKISAFEEELKVVLPKEVENARAVAYENGTSAIKNRIECCRSYPLYR	532
PAL Allium sativum	GNVEREKDAETSIFQKIGAFEEELKRTLKPEVEAVRVAFDNGKCAVFNRIECCRSYPLYR	654
PAL Allium cepa2	GNGEREKDSETSIFHKIGAFEEELKRTLKPEVEAVRVAAAFENGKCVLPNRIECCRSYPLYR	654
PAL Allium cepal	NNGENEKDFNTSIFQKIAAFETELKAKLPKEVEAARLSVENGSAVVPNRIECCRSYPLYK	650
PAL Coffea	-----	
PAL Solanum1	-----PAIPNRIECCRSYPLYR	17
PAL1 Arabidopsis	INGESEKNAVTSIFHKIGAFEEELKAVLPKEVEAARAAYDNGTSAIPNRIECCRSYPLYR	671
PAL1 Lotus2	VNGENEKDSKTSIFQKIATFEDELKSLLPKEVESARAAYESGNPTISNKNINECCRSYPLYK	676
PAL4 Lotus3	VNGENEKDSKTSIFQKIATFEDELKSLLPKEVESARAAYESGNPTIPNKNINECCRSYPLYK	650
PAL6 Lotus5	VNEENEKNMNTSIFQKIATFEDELKSLLPKEVESARAAYESGNPAIPNKNINECCRSYPLYK	646
PAL_oryza2	ANGAAEFNADTSVFAKVAQFEELRATLPGAIEAARAAYENGTAAIPSRITECCRSYPLYR	659
PAL Zea2	ANGAAEFNADTSVFAKVAQFEEDLRAALPKAVEAARAAYENGTAGIPNRIECCRSYPLYR	661
PAL Brachiaria	-----	
PAL Saccharum1	SSG-DAGTGALRVLQDHQFRGGAPRGAGPGGRRPASPWAEGTAPGRNRRNWDSSRSFPLYR	705
PAL Zea1	SSG-DAER-EPSVFSKITRFEELRVLQPEVEAARAAYENGTAPVANRITADSSRSFPLYR	683
PAL_Orzya3	TSG-DRRARGRLVLQDHQVRGGAPLCAAPGDRGRPRRRRQR-TAPVANRIVESRSFPLYR	647
PAL Solanum2	-----	
PAL Lithospermum	FVREELGTELLTGEKVRSPGEEELDKVFTAMCEGKLVDPDLLACLEAWNGAPLPIC---	710

PAL_Lycoris	FVREEIGTSLLTGKVKRSPGEEFDKVFNAICKGKLVDPLECLEWDNGAPLPIC---	708
PAL_Narcissus	FVREEI GTGLLTGENVQSPGEEFDKVFQAICEGKLVDPLECLE DNWGA PLPIC---	586
PAL_Allium_sativum	LVREELGAGYLTGEEGTSPGEVFEKVFVAVCCKGVVDPLECLEQEWGAPVPIC---	708
PAL_Allium_cepae2	LVREELGAGYLAGEEGTSPGEVFEKVFVAVCNGKVVDPLECLEQEWGAPLPIC---	708
PAL_Allium_cepae1	FIREELGTGFLTGERTTSPERSLTKYLSVFKGRL-----	685
PAL_Coffea	-----	
PAL_Solanum1	LVRQELGSELLTGKVKRSPGEEIDKVFAMCNGQIIDPLECLEKSWNGAPLPIC---	71
PAL1_Arabidopsis	FVREELGTELLTGKVKTSPEGEEFDKVFQAICEGKIIDPMMECLNEWNGAPIPIC---	725
PAL1_Lotus2	FVREELGTELLTGKVKTSPEGEECDKLFQAICQGGKIIDPLECLEGEWNGAPLPIC---	730
PAL4_Lotus3	FVREELGTELLTGKVKTSPEGEECDKLFQAICQGGKIIDPLECLEGEWNGAPLPIC---	704
PAL6_Lotus5	FVREELGTELLTGKVKRSPGEECDKLFQAICEGKIIDPLECLEGEWNGAPLPIC---	700
PAL_oryza2	FVREELGTYLTGKTRSPGEEELNKVLVAINEGKHIDPLECLEKEWNGEPLPIC---	713
PAL_Zea2	FVREELGAVYLTGKTRSPGEEELNKVLVAINQGGKHIDPLECLEKEWNGEPLPIC---	715
PAL_Brachiararia	-----FLTGKELKSPGEECNKVFIGISQGLIDPMLECLEKEWDGKPLPIN---	45
PAL_Saccharum1	FVREELGCVFLTGEKLSPEGEECKVFNQISQGLVDPMLECLEKEWDGKPLPINVVN	762
PAL_Zea1	FVREELGCVFLTGERLKSPEGEECNKVFVGISQGLVDPMLECLEKEWDGKPLPINVK-	739
PAL_Oryza3	FVREELGCVFLTGEKLSPEGEECNKVFVGISQGLIDPMLDCLKEWNGEPLPIN---	701

Figura 22. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima TYDC. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment		
TYDC4_Setaria	-----MGSLPLDAPVQPLDPEAFAGDSRAVVDFLAEYY	33
TYDC_Zea	-----MGSLPLDASLRPLDPEAFAGDSRAIVDFLAEYY	33
TYDC_Oryza4	-----MG SLPLDA -LQPLDPTFAADSSAVVDFLAGYY	32
TYDC/DOFA_Aegilops	-----MGSVAPEA-LLPLDPEFPAESREVVDFLDGYY	32
TYDC_Oryza2	MAP-PSHCHTINNGGAPRNGAIPVETTTSTPAASDTALLDADEFRRLGHQVVDIADYY	59
TYDC_Oryza3	MAPAPSHCHATNG---NNGAIAASDTPVKT---QHCARLLDADEFRRQGRVLDIADYY	54
TYDC_Oryzal	-----MEGVGGGGEEWLRPMDAEQLRECGHRMVDVADYY	37
	. : * : : . : * : : *	
TYDC4_Setaria	RDVDKYPVRAADLEPGRRLKLLPDSAPEHGEF--LEDVLEDDRDIPLGLTHWQSPSFFA	91
TYDC_Zea	RDVDKYPVRAADLEPGRRLKLLPEAAPEHGEF--MEDILEDDRDIPLGLTHWQSPSFFA	91
TYDC_Oryza4	RDVDKYPVRAADLEPGRRLRLLPEAAPEFGEF--AERILADVRRDVL EGLTHWQ SPSFFA	90
TYDC/DOFA_Aegilops	RNVERYPVR-SDVEPGRRLRLLPKAAPKNGEP--MDAILEDVQRHIVPGLTHWQSPNFFA	89
TYDC_Oryza2	AGLGDYFVH-PSVTPGFLRRQLPADAFSRPEPEAFAAALRDVRDLILPGVTHWQSPRHFA	118
TYDC_Oryza3	AGMGEYFVH-PTVSPGFLRHLPAEPFSRREPDFAFAAMQDVRDVLILPGLTHWQSPRHFA	113
TYDC_Oryzal	KSIEAFPVVLSQVQPGYLKEVLPDSAPRQPD--LDSLFDDIQQKIIPGVTHWQSPNYFA	94
	. : * : * . : * * : * * . * : . : * : : * : * : * * * * * . * *	
TYDC4_Setaria	YFPMNASTAGFAGEMLSVGLNVVFLWAASPAAAELEGVVVDDWGRLLGLPSRLLFSG--	149
TYDC_Zea	YFPMNGSAAGFAGEMLSAGLNVAFFVWVWASPAAAELESVVDDWMTLLGLPQRLLFSG--	149
TYDC_Oryza4	YFPMNASTAGFAGEMLSVGLNVVFPFVWVWASPAAVELEAVVDDWMMARLVGLPDRFLFSG	150
TYDC/DOFA_Aegilops	YYPGNASTAGFAGEMLSAGLNVPFTWAASPAATELEGIVVDDWMAKLVGLPERFLFSG--	147
TYDC_Oryza2	HFPASSSTVAGALGEAALAGNVVFPFTWAASPAATELEMVVDDWLGRLHLPESLLFAG--	176
TYDC_Oryza3	HFPASSSTAGALGEAALAGNVVFPFTWAASPAATELEMVVDDWLGKALHLPERLLFAG--	171
TYDC_Oryzal	YYPNSSTAGFLGEMLSAANFVGFVSWITSPAATELEVIVLDWFAKMLQLPSQFLSTA--	152
	: * . * : * * * : * : * : * * * * * * : * : * : * : * : * : *	
TYDC4_Setaria	-----GGGGVLQGSTCEAVVCTLAAARDRALAKLG-HEAIMKLVVYTSDQTHATFQKGAR	203
TYDC_Zea	-----GGGGVLQGSTCEAVVCTLAAARDRALARLG-HESIVKLVVYASDQTHATFQKGAR	203
TYDC_Oryza4	GGGGGGGGVLQGSTCEAVVCTLAAARDRALGRIG-HEGIVKLVVYASDQTHATFQKGAR	209
TYDC/DOFA_Aegilops	-----GGGGVLHGSTCEAVVCTLAAARDRLSRLDGHEGILRLVVYASDQSHSTFQKGAR	202
TYDC_Oryza2	-----GGGGTILGTSCAEVLCALVAARDRKLAEIG-ARRIGDLVVYCSQDTHAFRKAAR	230
TYDC_Oryza3	-----GGGGTILGTSCAEVLCALVAARDRKLAAIG-EGRIGDLVVYCSQDTHAFRKAAR	225
TYDC_Oryzal	-----LGGGVIGTASEAVLVALAARDRALKKHG-KHSLEKLVVYASDQTHSALQKACQ	206
	* * : * : * : * : * * * * * . : * * * * * * * : * : * : *	
TYDC4_Setaria	LVGIPPSNFRV IPTSASGYLTDADVRAAVDRDVASGLVPLYLCAATVGT TGLGAVDPVR	263
TYDC_Zea	LVGIPPSNFRV IRTSASGYLTDADVRAAVDRDVARGVPLYLCAATVGT TGLGAVDPVR	263
TYDC_Oryza4	LVGITPANFRV VPTAASGYALTGAAVRAAVEGDVARGVPLYLCAATVGT TGLGAVDPVR	269
TYDC/DOFA_Aegilops	IVGIPPSNFRV IPTSVASGYLTDGVRDAVEADIASGLVPLYLCAATVGT TGLGAVDSVR	262
TYDC_Oryza2	IAGIPREHCRE IPTCRDDVFALSPTALHAAMQADVAGLVPLFLCAATVGT TQTAVDPVR	290
TYDC_Oryza3	IAGIRREHCRE IPTYRDDAFALS PAALRAAMRRDADAGLVPLFCATVGT TQTAVDPVG	285
TYDC_Oryzal	IAGIFSENVRV IADCNKNYAVAPEAVSEALSIDLSSGLIPFFICATVGT TSSAVDPLP	266
	: * * : * : : . : : : : * : * * * : * : * * * * * * * * * * * *	
TYDC4_Setaria	ELGEEARRHG-MWLHVDAAYAGSAAICPEFQGYLDG-AELADSVSMNPHKWFLTNMDCCC	321
TYDC_Zea	ELGEEARRHG-MWLHVDAAYAGSAAICPEFQGTLDG-AELADSVSMNPHKWFLTNADCC	321
TYDC_Oryza4	ELGEVARRHG-MWLHVDAAYAGSAAICPEYQGYLDG-AELADSVSMNPHKWFLTNMDCCC	327
TYDC/DOFA_Aegilops	DLGEVARYR-MWLHVDAAYGGSALICPEFKCDFG-IEFADSVSMNPHKWFLTNMDCCC	320
TYDC_Oryza2	ELCAVAARHGGV VHVDAAYAGSALVCEFRDVIAG-AEAVDSLMSNAHKWLLANNDCCA	349

TYDC_Oryza3	ELCAAAAPHG-AWVHVDAAYAGSAMVCPPELRGAVAGGVEAVDSFSMNAHKWLLANNDCCV	344
TYDC_Oryzal	ELGQIAKSNM-MWFHIDAAYAGSACICPEYRHLNG-VEEADSFNMNAHKWFLTNFDCSL	324
	:* * * * .:****.*** :*** : . * * .**.*.***:***:***	
TYDC4 Setaria	LWVASPRDLTSALSTDPEY-LKNVG---TNGTGKPAIDYKDWQISLSRRFRAIKLWVVL	377
TYDC Zea	LWVASPGALTSALSTDPEY-LKNVG---TDGTGKPAIDYKDWQISLSRRFRAIKLWVVL	377
TYDC Oryza4	LWVASPAALTAALSTDPEY-LKNAGGKPKQAAAGAGAI DYKDWQ ISLSRRFRAMKLVFL	386
TYDC/DOFA Aegilops	LWVASPAALTSALSSNPEY-LNNVT----EKSATEVVYKDWQMALSRPFRAMKLVVL	374
TYDC Oryza2	VWVAAPSALVAALGTEQEYILRDAAAEE-----GHDVVYKDWGTTLRFRFRALKVWLVL	403
TYDC Oryza3	MWVRTPSALVAALGTEQEYILKDAEAETAADGEGEVVYKDWGITLRFRFRALKVWLVL	404
TYDC Oryzal	LWVKDRSFLIQSLSTNPEFLKKNAS-----QANSVVDFKDWQIPLGRRFRSLKLVWVL	377
	:** * * :*: : * * :*:*** . * * **::*:**	
TYDC4 Setaria	RRYGAVGLRAHIRRHVTAAKWFERAVADELFEVVVPRRFSLVCFLRLRERFV-----	429
TYDC Zea	RRYGAVGLRAHIRRHVTAKWFERTVAADERFEVVVPRKFSLVCFLRLRERFA-----	429
TYDC Oryza4	RRYGAGMRAHIRRHVAMAEWFERAVSADERFEVVAKRRFS LVCFRLRG -----	435
TYDC/DOFA Aegilops	RRYGAVGMRAYIRRHVDMARWFEQQLEGDERFEVVVPRRFSLVTFRLRPRHK-----	426
TYDC Oryza2	RCYGVGLRSHVRSVHMAAAFEAMVRGDARFEVVAPRRFALVCFRLRSPERLGVGVGV	463
TYDC Oryza3	RCYGVGLREHIRSHVMAAAFEAMVRADARFEVVTPRRFALVCFRLRSP-----	454
TYDC Oryzal	RLYGVDNLQSYIRKHIHLAEHFQQLLSDSRFEVVTPRTFSLVCFRLVPTPS-----	429
	* ** . : : * * * : * * * : * * * * * . * * * * * * * * * * * *	
TYDC4 Setaria	-GDDAVDDVNRELLAAVNESGR-AFMTHFVVDGKVFIRLAIGGASTELRHVMDVWELLQA	487
TYDC Zea	-GDDAADELNRELLTAVNASGR-AFVTHFVVDGKVFIRLAVGGAMTEMRHMDVWELLQA	487
TYDC Oryza4	-GGGGGDAMNRELLAAVNASGR-AFMTHFVVEGKVFIRLAVGGAM TEMHRV GDWELVLR-	492
TYDC/DOFA Aegilops	-GDDAAEALSRKVLMAINSSGR-AFMTHFIVDNKVFIRMAVGGAMTEMRHVRDAWELVQE	484
TYDC Oryza2	GGKAAANLNRRLLLEVNAASSGPFYMSAMVGGVYMLRCAIGSTLTEERHVREAWKVVQ	523
TYDC Oryza3	-NKTANELNRRLLLEVNAASSGPFYMSANVGGVYMLRCAVGSSTLTEERHVREAWKVVQ	513
TYDC Oryzal	-DHENGRKLNMDMDGVNNSGK-IFLSHTVLSGKFLVFAVGAPLTEERHVDAWKLRLD	487
	. . . : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
TYDC4 Setaria	KAEV-----LQRYQL--	498
TYDC Zea	SADHV-----LRRYSY--	498
TYDC Oryza4	-----	
TYDC/DOFA Aegilops	KTREVGIPLVTKKHAL--	501
TYDC Oryza2	RATSI-----LRKRG--	533
TYDC Oryza3	RATSI-----LSKMEIIM	526
TYDC Oryzal	EATKV-----LGKMV--	497

Figura 23. Alineamiento múltiple de secuencias de ARNm de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima OMT. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment	
COMT_Zeal_mRNA	-----AGCAGCTAGCGCCTCCTCAGCCACCATAGAAAGCCGGCCTACCCACTCT 53
OMT_Oryzal_mRNA	-----GATTGCTAGC-----TAGGA----- 15
OMT_Sorghum1_mRNA	GGCAGGAGAACACTTGCCAAGCTCTCGCGTCG--CTCAGCGCTAGCTCCTAGCTAGTATC 58
CCOMT_Narcissus_mRNA	-----
COMT_Zeal_mRNA	CTCTCTCTCTCTCCTCCAGTCT---CCACCGCAGCGCTAATCGTAATAGCCATGGGGCTCC 110
OMT_Oryzal_mRNA	-----TGGGTTCT 23
OMT_Sorghum1_mRNA	TTCTTCCACCGGGCACCGGCCGGCCAGCCGTCGTCAGCTAGCTAGCTAGCCATGGGGCTCG 118
CCOMT_Narcissus_mRNA	-----ATGGGATC- 8
	**** *
COMT_Zeal_mRNA	ACCGCCGGCAGCTGGCCGGGTTGGTGACGAGGAGCGTGCATGTACGCGATGCAGCTG 170
OMT_Oryzal_mRNA	ACAGCCGCCGACATGGCCGGCGGGCCGACGAGGAGCGTGCATGTACGCGTGCAGCTG 83
OMT_Sorghum1_mRNA	ACGGCGGAGGACGTGGCCGGGTTGGCCGACGAGGAGCGTGCATGTACGCGATGCAGCTG 178
CCOMT_Narcissus_mRNA	-----GTG-CAATATTAAT-GACGATGAGGCATTACATATGCAGCTCAACTT 54
	** * ***** * * * * * * * * * *
COMT_Zeal_mRNA	G-CGTCGTCGTCCTCCTGCCATGACGCTGAAGAAGCCATCGAGCTGGGCCTGCTGGA 229
OMT_Oryzal_mRNA	G-CGTCGTCGTCGATCCTGCCATGACGCTCAAGAAGCCATCGAGCTGGGCCTGCTCGA 142
OMT_Sorghum1_mRNA	G-CGTCGTCGTCGATCCTCCTGCCATGACGCTGAAGAAGCCGCTGGAGCTGGGCCTGCTGGA 237
CCOMT_Narcissus_mRNA	CTCAGCCTC-TCTGCGCTCCCATGACTCTCGCTGCTGCCGTCGAGCTCAATCTTTTGA 113
	* *
COMT_Zeal_mRNA	GGTGCTGCAGAAGGAGCGCGCGCGC-----AAGCGCGCTG---GCGCCGA 277
OMT_Oryzal_mRNA	GAGCTGCAGTCCGCCGCTCGCCGAGGAGGGGGAAAGCGCGCTGCTGACGCCGC 202
OMT_Sorghum1_mRNA	GGTGCTGCAGAAGGAGCGCGCGC-----AAGCGC---CTG---GCGCGGA 276
CCOMT_Narcissus_mRNA	TATAAT-CA---CCAAGGCAGGCC-----AATGCATACTTACCCGTGTCGGA 158
	* *

COMT_Zeal_mRNA	GGAGGTGGTGGCGCGATGCCCGCGCGCCCGCGACCCCGCCCGCGCGCGCATGGT	337
OMT_Oryza1_mRNA	GGAGGTGGC---CGACAAGCTCCCGTCCAAGGCGAACCCG--GCGGCGCGGACATGGT	256
OMT_Sorghum1_mRNA	GGAGGTGGTGGCGCGGTTGCCCGTGGCGCC-GACGAACCC--GCCGCGCGGACATGGT	333
CCOMT_Narcissus_mRNA	GATTGTGGCGA---AATTACCTAC-----GGAGAACCAC--AAGCATCAGAAATGTT	206
	* * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	GGACCCGATGCTCCGCCTGCTCGCCTCTACGAGTCGTCCGGTGCCA-----GATGGA	391
OMT_Oryza1_mRNA	GGACCCGATGCTCCGCCTGCTCGCCTCTTACAACGTCGTCCGGTGCCA-----GATGGA	310
OMT_Sorghum1_mRNA	GGACCCGATGCTCCGCCTCTCGCCTCTACGAGTCGTGAAGTGCCA-----GATGGA	387
CCOMT_Narcissus_mRNA	TGATAGGATGCTGAGGTTGCTTGGTGGCTTCGAGTCGTGACGTTTAAATCGGTGACGAT	266
	** * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	GGACCCGGG---ACGGCCGTTACGAGCGCCGCTACTCCGCGCGCCGCTGTCAAGTGGCT	448
OMT_Oryza1_mRNA	GGAGGGCGCCGACGGCAAGCTCTCCCGCCGCTACGCGCGCGCCGCTGTCAAGTGGCT	370
OMT_Sorghum1_mRNA	GGACAAGG---ACGGCAAGTACGAGCGTCGGTACTCCGCGCCCGCCGCTCGCAAGTGGCT	444
CCOMT_Narcissus_mRNA	GGATGAGACTAGTGAAGGATGGAAGGCGATATGGAGCAAAATATGTCACAAAGTATTT	326
	*** ** * * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	CACCCCAACGAGGACGGCGTCCCAATGGCCGCTCGCCTCATG-----AA-----C	497
OMT_Oryza1_mRNA	GACGCCAACGAGGACGGCGTCTCCATGGCCGCTCGCCTCATG-----AA-----C	419
OMT_Sorghum1_mRNA	CACCCCAACGAGGACGGCGTCCCAATGGCCGCTCGCCTCATG-----AA-----C	493
CCOMT_Narcissus_mRNA	CTGCAAGGATGAGGTTGGG---ATGGTGTCTCCCTTGTCTCCGGCTCAAGTTATTC	381
	* * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	CAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTATCTCAAGGACGCGGTGCTGGACGCGGG	557
OMT_Oryza1_mRNA	CAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTACTTAAGGACGAGTCCGAGGCGGG	479
OMT_Sorghum1_mRNA	CAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTACTTAAGGACGCGGTGCTGGACGCGGG	553
CCOMT_Narcissus_mRNA	CATGATCATACTACCATGGAGGCTGGTACAATTTAAAAAACGCAGTGTAGACGGAGGA	441
	** * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	ATCCCGTTCAACAAGGCGTACGGGATGACGGCGTTCGAGTACCACGGCA-CGGACTCGG	616
OMT_Oryza1_mRNA	ATCCCGTTCAACAAGGCGTACGGGATGACGGCGTTCGAGTACCACGGCA-CGGACGCCG	538
OMT_Sorghum1_mRNA	ATCCCGTTCAACAAGGCGTACGGGATGACGGCGTTCGAGTACCACGGCA-CGGACGCCG	612
CCOMT_Narcissus_mRNA	GACCCATTCAGCAAGCCATGGAATGAATATATTTGAGT-TTGCAAAAGCTAATCCGAG	500
	* * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	CTTCAACCGCGTGTCAACGAGGGCATGAAGAACCCTCGGTGATCATCACCAAGAAGCT	676
OMT_Oryza1_mRNA	CTTCAACCGCGTGTCAACGAGGGCATGAAGAACCCTCGGTGATCATCACCAAGAAGCT	598
OMT_Sorghum1_mRNA	CTTCAACCGCGTGTCAACGAGGGCATGAAGAACCCTCGGTGATCATCACCAAGAAGCT	672
CCOMT_Narcissus_mRNA	ATTCATTCCTTGTTCACGAGGGAATGAAGGATGATCTTGCATCATTAAGAAGGTT	560
	***** * * *****	
COMT_Zeal_mRNA	GCTGGACTTCTACACGGGCTTCGAGG---GCGTGTGACG--CTGGTGGACGTTGGGCGG	731
OMT_Oryza1_mRNA	GCTCGACCTTACACGGGCTTCGAGG---CCGCCTCCACC--GTCGTCGACGTTGGGCGG	653
OMT_Sorghum1_mRNA	CCTCGAGTCTACACGGGCTTCGAGGAGTCCGCTTCGAGG---CTCGTCGACGTTGGGCGG	730
CCOMT_Narcissus_mRNA	CCTTGATGTGACTACGATTTGATG----ACCTAAATGTGCTTGTGATGTTGAGGTT	615
	* * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	GGCGTGGGCGCCACGCTGCACGCCATCACGTCCCGCCACCCGACATCTCCGGGTTCAAC	791
OMT_Oryza1_mRNA	GGCGTGGGCGCCACGCTGTGGCCGCGTCTCCCGCCACCCGACATCTCCGGGTTCAAC	713
OMT_Sorghum1_mRNA	GGCATGGGCGCCACCTTACACGCCATCACCTCCACCCTCCACATCAGGGGCGTCAAC	790
CCOMT_Narcissus_mRNA	GGTACCGGAGAAACATTTGGCGCGATATCGCAAGGCATCCTCATATCAAAGGAATCAAC	675
	** * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	TTCGACCTGCCGACGTCATCTCCGAGGCGCCGCTTCCCGGCGTGCAGCACGTTGGG	851
OMT_Oryza1_mRNA	TACGACCTCCCCACGTCATCTCCGAGGCGCCGCTTCCCGGCGTGGAGCACGTCGGC	773
OMT_Sorghum1_mRNA	TTCGACCTCCCCACGTCATCTCCGAGGCGCCGCTTCCCGGCGTGCAGCACGTCGGC	850
CCOMT_Narcissus_mRNA	TATGATCTACCTCATGTATGAGAGAAGCACCATCTTTTCCGGGAAATGAGCATATTTGGT	735
	* * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	GGGACATGTTGCGTCCGTTGCC---GCCGGGACGCCATCTCATGAAGTGGATCCTC	908
OMT_Oryza1_mRNA	GGCGACATGTTGCGTCCGTTGCCCGCCGCGGCGAGGCCATCTCATGAAGTGGATCCTC	833
OMT_Sorghum1_mRNA	GGGACATGTTCAAGTCGTTGCC---GCCGGGACGCCATCTCATGAAGTGGATCCTC	907
CCOMT_Narcissus_mRNA	GGGGATATGTTTAAGAGCATCCCA---AGTGGAGACGCTATTCTTGAAGACTCTTTGC	792
	** * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	CACGACTGGAGCGACGCGCACTGCGCC-ACGCTGCTCAAGAACTGTTACGACGCGCTGCC	967
OMT_Oryza1_mRNA	CACGACTGGAGCGACGCGCACTGCGCC-CGGCTGCTCAAGAACTGTTACGACGCGCTGCC	892
OMT_Sorghum1_mRNA	CACGACTGGAGCGACGCGCACTGCGCC-ACGCTGCTCAAGAACTGTTACGACGCGCTGCC	966
CCOMT_Narcissus_mRNA	TGTGACTGGGATGACGAGCA-TGTATTGAAGTCTTAAAGAACTGTTGAAGCTTTGCG	851
	***** * * * * *	
COMT_Zeal_mRNA	GGAAAA---TGGAAGTGCATCGTTCGAGTGCCTGCTGCGGTTCAACACGGAGGCCA-	1023
OMT_Oryza1_mRNA	GGAGCA---CGGAAGTGGTGGTGGTGGAGTGCCTGCTGCCGGAGAGCTCCGACGCGA-	948
OMT_Sorghum1_mRNA	GGAGAAGGGCGCAAGTGCCTGCTGAGTGCCTGCTGCCGGTACCACCGACGCGC-	1025
CCOMT_Narcissus_mRNA	TGACAA---TGGAAGTGCATATAATTGATGATATCTTTCCGATGATCGTTGAAGAAGA	908
	** * * * *	

```

COMT_Zeal_mRNA      --CCCCAA-----GGCGCAGGGCGTCTTCCACGTGACATGATCATGCTCGGCACAA 1075
OMT_Oryzal_mRNA    --CGGCAG-----GGAGCAGGGGGTGTCCACGTGACATGATCATGCTCGCCACAA 1000
OMT_Sorghum1_mRNA  --TCCCCA-----GGCGCAGGGCGTGTCCATGTGACATGATCATGCTCGGCATAA 1077
CCOMT_Narcissus_mRNA ATCCACGAATCTTTAGAAAAATTCGCATTGCTCATAGACCTTATAACTCTGGTTACGT 968
                    * * * * *
COMT_Zeal_mRNA      CCCCAGCGCAAGGAGCGGTACGAGCGGAGTTCGCGAGCTCGCAAAGGGCGCCGGCTT 1135
OMT_Oryzal_mRNA    CCCCAGCGCAAGGAGCGGTACGAGCGGAGTTCGCGAGCTCGCCAGCGCCGGGATT 1060
OMT_Sorghum1_mRNA  CCCCAGCGCAAGGAGCGGTACGAGCGGAGTTCGCGAGCTCGCCAGCGCCGGGATT 1137
CCOMT_Narcissus_mRNA ACCAAGCGGAAAAGAGAGGCCAGGAGGAGTTTGGAAATTGCAAAGTCAGCTGGTTT 1028
                    ** * * * * *
COMT_Zeal_mRNA      CTCGGGTTCAAGGCCACCTACATTTACGCCAACGCCTGGGCCATCGAGTTCATCAAGT 1195
OMT_Oryzal_mRNA    CACCGGTTCAAGGCCACCTACATTTACGCCAACGCCTGGGCCATCGAGTTCATCAAGT 1120
OMT_Sorghum1_mRNA  CTCTGGTTCAAGGCCACCTACATTTACGCCAACGCCTGGGCCATCGAGTTCATCAAGT 1197
CCOMT_Narcissus_mRNA CTCAAGTTTCGGAAGAGTGGGCAATTGCGCGTGTGTCACGATTATGGAGTTTACAAGT 1088
                    * * * * *
COMT_Zeal_mRNA      AA-----CCACCGTCGCGCGATGAGATGGCATGGTGCAC 1233
OMT_Oryzal_mRNA    G-----GCGAT----- 1126
OMT_Sorghum1_mRNA  AAAATGCGACAGAGTCCCTCCGTACGTCGCTCGCATGAGATGGCA----- 1246
CCOMT_Narcissus_mRNA G----- 1089
COMT_Zeal_mRNA      TGCTTTGCTTGCTTGGTCCGTCGATCG-----TACGTCGCGCTCGTCTCTTCTCTG 1286
OMT_Oryzal_mRNA    -----TGGTGCATCG-----ATCGCCATTGT----- 1146
OMT_Sorghum1_mRNA  --CATGTCATGGATGGTCCATCGCCGCGGCTCCATCGCCGCGCTCTTCTTCTCTG 1304
CCOMT_Narcissus_mRNA -----
COMT_Zeal_mRNA      GTTATTGC-GCTGCTACCTCGCTGCTCTCGCGTATGCATGTACTTTTGCTTAATTTCTT 1345
OMT_Oryzal_mRNA    ---TGA-GCT----- 1152
OMT_Sorghum1_mRNA  GTTGCTGCTGCT-----ACTGCTGTCGCACATGCATCTACTTTTGCTTACTTTGCTT 1356
CCOMT_Narcissus_mRNA -----
COMT_Zeal_mRNA      TCTTCATATCATGCACCTCTGGCTGGCCTAGACTGCCCCCGATCCATGG--TGGCCGGTAC 1403
OMT_Oryzal_mRNA    -----CGATC-AAGG--TGTTCGA--- 1168
OMT_Sorghum1_mRNA  TCTTCAT-TCATCGATCCTGCATTA-----TAATTAATGGCCTAGCCTGCCT 1402
CCOMT_Narcissus_mRNA -----
COMT_Zeal_mRNA      GTCTTGTCGAGCTCTTGATGTCGTTGGATTCTAAATCTTCTTCTGCGTCGAAAAAAAAA 1463
OMT_Oryzal_mRNA    ---CCATCGAATCACTA-----GTGAATTC----- 1190
OMT_Sorghum1_mRNA  CCGATGTCGGATCCATACATG--GTGG-CCATATATATCTTTGGTTCTGCTAAAAAAAA- 1458
CCOMT_Narcissus_mRNA -----
COMT_Zeal_mRNA      AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1482
OMT_Oryzal_mRNA    -----
OMT_Sorghum1_mRNA  -----
CCOMT_Narcissus_mRNA -----

```

Figura 24. Alineamiento múltiple de secuencias de ARNm de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima PAL. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
PAL_Lycoris_mRNA      ATTCGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATGGAAAAAAAAATTCT 50
PAL_Narcissus_mRNA   -----
PAL2_Allium_cepae1_mRNA -----GAAAAGGA----- 8
PAL_Allium_sativum_mRNA -----
PAL1_Allium_cepae2_mRNA -----GAAAAGGAAAATTTTC 17
PAL_Galtonia_mRNA    -----
PAL_Oryza3_mRNA      -----AAGAAGAGCT--C 11
PAL_Lycoris_mRNA      ACGTTTCCTTTATTCATATTCAGCACTCTCTCATCTCCTCTCTATAATT 100
PAL_Narcissus_mRNA   -----
PAL2_Allium_cepae1_mRNA AAGGCCAATTTGTTTCATAT-----ACTCCTTTCTTATTATT 44
PAL_Allium_sativum_mRNA -----
PAL1_Allium_cepae2_mRNA ATTAACTACTACCTCTAATTCA-----TTTCCTTTGCACACAATC 57
PAL_Galtonia_mRNA    -----
PAL_Oryza3_mRNA      ACTACCTCTCCTCCGG-----CTCTTCTCAGTATC 43

```


PAL_Oryza3_mRNA	GCACCAAGGACGGCCCCGCCTCCAAGTCGAGTCCTCAGGCATCTCAAC 460 ***** **
PAL_Lycoris_mRNA	GCTGGAATCTTCGAATCTGGTCACAACCTCAAGCAACACGTTGCCAGCATC 578
PAL_Narcissus_mRNA	GCTGGGATATTCGGAGCAGGTCGGGACTCATGCAACACATTCGCAGCATC 71
PAL2_Allium_cepai_mRNA	GCTGGAATATTCGGGTCGGTAAACTCTGGAACACACTGCCAACCCAC 519
PAL_Allium_sativum_mRNA	GCAGGAATATTCGG---CAGCCCCAACTCCGGGAACCTCCATCATCAAC 458
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	GCTGGAATATTTGG---CAGCCCCAACTCCGGGAACCTCTCTACCATCAAC 534
PAL_Galtonia_mRNA	GCGGGATATTCGGCTCCGGCCGGAATCTGGCTGCACGCTGCCGGCGAC 440
PAL_Oryza3_mRNA	GCCGGAATCTTCGGCACTGGCTCCGA---TGGCCACACGCTGCCGTCGGA 507 *****
PAL_Lycoris_mRNA	CACGACCAGAGCAGCATGTTGGTCCGTATCAACACGCTCCTCCAGGGCT 628
PAL_Narcissus_mRNA	CACGACAAGAGCAGCATGTTGGTCCGATCAACACCCCTCCTCCAGGGTT 121
PAL2_Allium_cepai_mRNA	CACCACTAGAGCTGCAATGCTTGTAAAGTAACACTCTCTCCAAAGGT 569
PAL_Allium_sativum_mRNA	CACAAGCCGTGCCGCAATGCTAGTCAAGTCAACACCCCTCCTCCAGGGAT 508
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	CACATCCCGTGCTGCCATGCTAGTCAAGTCAACACCCCTCCTCCAAAGGT 584
PAL_Galtonia_mRNA	GCGCACAGCGGCGCATGCTGGTTCAGAATCAACACTCTCTCCAGGGCT 490
PAL_Oryza3_mRNA	GACGGTCCGGCGGCAATGCTGTCGATCAACACCCCTCCTCCAGGGCT 557 *****
PAL_Lycoris_mRNA	ATTCTGGCATCCGCTTCGAAATCCTCGAAGTCATCACTCGCTCCTC-AA 677
PAL_Narcissus_mRNA	ACTCCGGCATCCGCTTCGAGATCCTCGAAGCCATAACTCGCTCCTC-AA 170
PAL2_Allium_cepai_mRNA	ACTCTGGAATCCACTTTGAGATTTCTAGAAGCAATTCG-CGCTTCTTGAA 618
PAL_Allium_sativum_mRNA	ATTCTGGTATCCGCTTCGAGATCCTAGAATCCATAACTCGTTACTA-AA 557
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	ATTCCGGTATCCGCTTCGAGATCCTAGAATCCATAACCCGTTACTA-AA 633
PAL_Galtonia_mRNA	ACTCCGGATCCGATTCGAGATTCCTCGAGGCGATCACCAGCCTCCTC-AA 539
PAL_Oryza3_mRNA	ACTCCGGCATCCGCTTCGAGATCCTCGAGGCCATCACCAGCTGCTC-AA 606 *****
PAL_Lycoris_mRNA	CAACAACATCACTCCGTGCCTTCCTCCTCCGGGGCACAATCACCGCCTCCG 727
PAL_Narcissus_mRNA	CAGCAACGTCACCCGTCCTTCCCTCCGGGGACGATCACCGCCTCCG 220
PAL2_Allium_cepai_mRNA	CAGCGACATCACTCCATGCTTCCCTTTACGAGGGACCGTCACTGCATCAG 668
PAL_Allium_sativum_mRNA	CGCAAACATCACCCTTGCCTACCTCTTCGCGGTACAATCACTGCCTCAG 607
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	TGCAAACATCACACCCTGCCTACCTCTTCGTGGCACCATCACTGCCTTG 683
PAL_Galtonia_mRNA	CGGCAAGATCACCCCGTGCCTCCTCCTCCGGCGCACGATCACCGCCTCCG 589
PAL_Oryza3_mRNA	CACCGGCTCACGCCGTGCCTGCCTCCGTCGGTGGCACCATCACCGCCTCCG 656 *****
PAL_Lycoris_mRNA	GCGACCTAGTCCCCTGTCTATATTCGCCGCATCCTCACCGGTCCGCCCT 777
PAL_Narcissus_mRNA	GCGACCTAGTCCCCTGTCTATATTCGCCGCATCCTCACCGGTCCGCCCT 270
PAL2_Allium_cepai_mRNA	GCGATCTGTCCCCTGTCTATATTCAGGGAATCCTCACCGGTCCGCCCT 718
PAL_Allium_sativum_mRNA	GTGATCTGGTCCCCTGTCTATATTCGCCGCATCCTCACCGGTCCGCCCT 657
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	GCGATCTGGTCCCCTGTCTATATTCAGGGAATCCTCACCGGTCCGCCCT 733
PAL_Galtonia_mRNA	GCGACCTGTCCCCTGTCTATATTCGCCGCATCCTCACCGGTCCGCCCT 639
PAL_Oryza3_mRNA	GTGACCTGGTCCCCTGTCTATATTCGCCGCATCCTCACCGGTCCGCCCT 706 *****
PAL_Lycoris_mRNA	AATTCGAAAGCCATCACACCTGATGGCAACAAATCGATGCATCCGAAGC 827
PAL_Narcissus_mRNA	AACTCGAAAGCCACCCGTCGCCGCGGACGCATATCGATGCGTCCGAAGC 320
PAL2_Allium_cepai_mRNA	AACTCTAAAGCCATCACCTCTGATGGATCCACATAGATGCTACAGAAGC 768
PAL_Allium_sativum_mRNA	AACTCAAATAGTCACTTCCGACAAACACTCTCTCTACTGCTTCTGAAAGC 707
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	AACTCAAATCAGTCACTTCCGACAAACACTCTCTCTACTGCTTCTGAAAGC 783
PAL_Galtonia_mRNA	AATTCGAAAGCCGTCGCCCGACGGCCGACCGTCAAGCCTCCGAGGC 689
PAL_Oryza3_mRNA	AACGCGCAGGCCATCTCGCCCGACGGCAGGAAGTGGACCGCCGAGGC 756 *****
PAL_Lycoris_mRNA	CTTCAAGCTCGCGGAATCACCGACGGGTCTTCCAATTGCAGCCAAAAG 877
PAL_Narcissus_mRNA	CTTCAAGCTCGCGGAATCACCGACGGGTCTTCCAATTGCAGCCAAAAG 370
PAL2_Allium_cepai_mRNA	ATTCAAGCTTGCAAAATATCTTAGCACTTTCTTGAAGTCAACCAAAG 818
PAL_Allium_sativum_mRNA	CTTCAAGCTTGCGGATCACTTCCGGATTTCTTCCGGCTTCAACCTAAAG 757
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	CTTCAAGCTTGCGGATCACTTCCGGATTTCTTCCGGCTTCAACCTAAAG 833
PAL_Galtonia_mRNA	CTTCAAGCTTGCGGATCACTTCCGGATTTCTTCCAATTGAGCCAAAG 739
PAL_Oryza3_mRNA	GTTCAAGCTCGCGGATCGAGGGTGGTTCTTCAAGTGAACCCAAAG 806 *****
PAL_Lycoris_mRNA	AAGGCTTAGCACTTGTGAACGGCAGGCGGTCGGATCAGGGTTAGCCTCA 927
PAL_Narcissus_mRNA	AAGGCTTAGCACTTGTGAACGGCAGGCGGTCGGATCAGGGTTAGCCTCA 420
PAL2_Allium_cepai_mRNA	AAGGCTTAGCACTTGTGAACGGCAGGCGGTCGGATCAGGGTTAGCCTCA 868
PAL_Allium_sativum_mRNA	AAGGCTTAGCACTTGTGAACGGCAGGCGGTCGGATCAGGGTTAGCCTCA 807
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	AAGGCTTAGCACTTGTGAACGGCAGGCGGTCGGATCAGGGTTAGCCTCA 883
PAL_Galtonia_mRNA	AGGGCTTAGCACTTGTGAACGGCAGGCGGTCGGATCAGGGTTAGCCTCA 789
PAL_Oryza3_mRNA	AAGGCTTAGCACTTGTGAACGGCAGGCGGTCGGATCAGGGTTAGCCTCA 856 *****
PAL_Lycoris_mRNA	ACGGTCTTTTACGACACCAATATCCTCGCAGTTTGTAGTGAAGTCTTGTTC 977
PAL_Narcissus_mRNA	ACGGTCTTTTACGACACCAATATCCTCGCAGTTTGTAGTGAAGTCTTGTTC 470
PAL2_Allium_cepai_mRNA	ATAGTTTTGTTGAGGCAATGTTCTTGCAGTCTTTCTGAAATCATCTC 918

PAL_Allium_sativum_mRNA	ATCGTCTCTATGAACTAATGTGCTTGCCTTGCCTTGCCTGAGTCATGTC	857
PAL1_Allium_cep2_mRNA	ATTGTCTCTTATGAACTAATGTGCTTGCCTTGCCTGAGTCATGTC	933
PAL_Galtonia_mRNA	ATGGTCTCTACGAGGCTAACATCTCGCCGTGCTGGCCGAGGTGATGTC	839
PAL_Oryza3_mRNA	ACCGTGATGTTGACGCAACATCTCGCCGTCTGTCGAGGTGCTCTC	906
	* * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	GGCAATTTTTGCGAGGTGATGCAAGGGAAACCTGAATTCACCGACT	1027
PAL_Narcissus_mRNA	GGCGATCTTCTGCGAGGTGATGCAAGGGAAACCTGAATTCACCGACT	520
PAL2_Allium_cep1_mRNA	TGCGGTATTTTGTGAAGTAAATGCAAGGAAAGCAGAGTTTACTGATCATT	968
PAL_Allium_sativum_mRNA	TGCCCTTTTCTGCGAAGTCATGCAAGGAAAGCCGAATTCACCGACT	907
PAL1_Allium_cep2_mRNA	TGCCCTATTTTGTGAAGTCATGCAAGGAAAGCCGAATTCACCGACT	983
PAL_Galtonia_mRNA	CGCGGTGTTCTGCGAGGTGATGCAAGGGAAAGCCGAGTACACCGACT	889
PAL_Oryza3_mRNA	GGCGGTGTTCTGCGAGGTGATGCAAGGGAAAGCCGAGTACACCGACT	956
	** * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	TGACTCACAATTTGAAGCACCATCCAGGCCAAATTTGAAGCTGCTGCGATT	1077
PAL_Narcissus_mRNA	TGACTCACAAGCTGAAGCACCATCCAGGCCAAATTTGAGCCCGCCGAGTT	570
PAL2_Allium_cep1_mRNA	TGACTCACAAGCTGAAGCACCATCCAGGCCAAATTTGAGCCCGCCGAGTT	1018
PAL_Allium_sativum_mRNA	TAACCCACAAGTTAAAACATCACCTGGCCAAATTCGAAGTTGCCGCCATC	957
PAL1_Allium_cep2_mRNA	TAACCCACAAGCTAAAACACCACCCCGGTCAAATTCGAAGCCGCGACT	1033
PAL_Galtonia_mRNA	TGACGCATAAGCTCAAGCACCATCCGGGTGAGTACAGGGCCGCGGATA	939
PAL_Oryza3_mRNA	TGACCCACAAGCTGAAGCACCACCTGGGTGATCGAGGGCCGCGCATC	1006
	* * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	ATGGAACACATTTTGGAGGGAAGCTCATATATGAAAATGGCCAAGAAAT	1127
PAL_Narcissus_mRNA	ATGGAACATATTTTGGCGGGAAGCTCGTATATGAAAATGGCCGAGAAAT	620
PAL2_Allium_cep1_mRNA	ATGGAGCATATATTTGGAAGGGAGCTCGTACATGAAAATGGCTAAAGAGAT	1068
PAL_Allium_sativum_mRNA	ATGGAGCACATTTAGAAAGCTCCTCCTACATGAAAATGGCTAAAGAGAT	1007
PAL1_Allium_cep2_mRNA	ATGGAGCACATTTAGAAAGTTCTCCTACATGAAAATGGCAAGAAGT	1083
PAL_Galtonia_mRNA	ATGGAGCATGTTCTCGAAGGGAGCTCGTACATGAAATGGCCAAAGAGTT	989
PAL_Oryza3_mRNA	ATGGAGCACATCTCGCGGGAGCTCGTTCATGACCCAGCCAAAGAGTT	1056

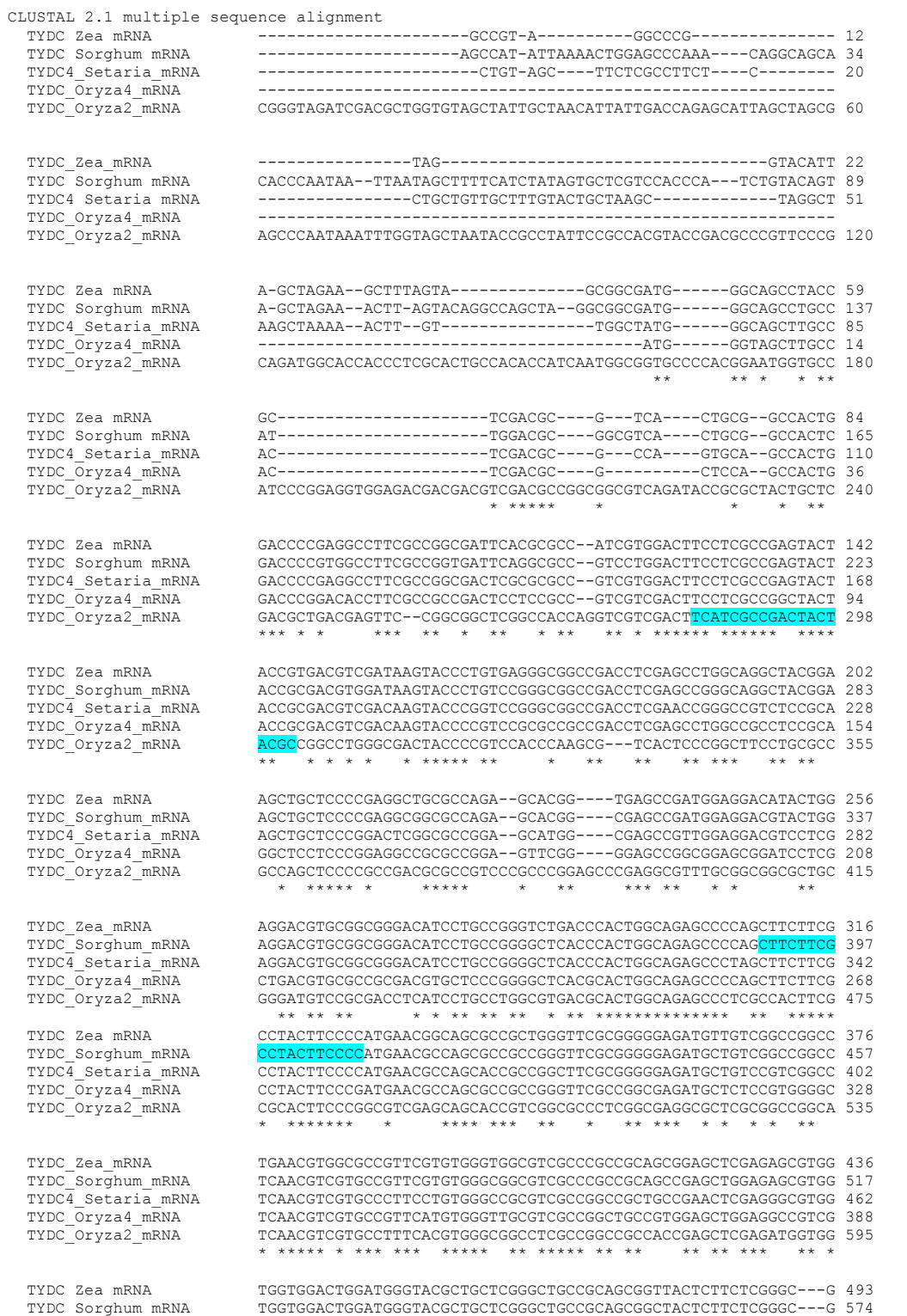
PAL_Lycoris_mRNA	GCATGAGCATGACCCATTGCAAAAAGCCCAAACAGGACCGATACGCGTAC	1177
PAL_Narcissus_mRNA	ACACGAGCTCGACCCGTTGCAGAAGCCCAAACAGGACCGATACGCCCTGC	670
PAL2_Allium_cep1_mRNA	TCATGAACTTGATCCATTACAAAACCAAAGCAAGATCGTTATGCATTAA	1118
PAL_Allium_sativum_mRNA	ACATGACATGGACCCACTCCAGAAGCCAAAGCAGGACAGATACGCCCTCC	1057
PAL1_Allium_cep2_mRNA	CCACGACACGGATCCTCTCCAAAAGCCGAAGCAGGACCCGTTACGCCCTCC	1133
PAL_Galtonia_mRNA	GCACGAGCTGGACCCCTGCAGAAGCCGAAGCAGGACCCGTTACGCCCTCC	1039
PAL_Oryza3_mRNA	GAACGAGATGGACCCGCTGCTGAAGCCGAAGCAGGACAGGTACGCGCTCC	1106
	* * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	GAACTTACCACAATGGCTAGGCCCAAAATTTGAAGTATCCGATCTGCA	1227
PAL_Narcissus_mRNA	GAACGTGCGCCGAGTGGCTAGGCCCGCAGATCGAAGTATCCGATCCGCG	720
PAL2_Allium_cep1_mRNA	GGACCTCACCTCAATGGTTGGGTCTCAGATTGAAGTTATTCGTGCATCA	1168
PAL_Allium_sativum_mRNA	GAACGTCCCCACAGTGGCTCGGCCCAAGATCGAGGTGATGAGCAGCC	1107
PAL1_Allium_cep2_mRNA	GAACGTCCCCACAGTGGCTTGGCCCTCAGATCGAGGTGATGAGCAGCC	1183
PAL_Galtonia_mRNA	GGACCTCCCGCAGTGGCTCGGCCCGCAGATCGAGGTGATCCGCTCGCG	1089
PAL_Oryza3_mRNA	GCACGTGCGCCGAGTGGCTCGGCCCGCAGATCGAGGTGATCCGCGCCG	1156
	* * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	ACAAAATCGATCGAAAAGAGAGATCAGTTCGGTGAATGATAATCCATTGAT	1277
PAL_Narcissus_mRNA	ACAAAATCGATCGAAAAGAGAGATCAATTCGGTGAATGATAATCCATTGAT	770
PAL2_Allium_cep1_mRNA	ACTAAGTCTATTGAACGTGAGATTAACCTCAGTGAATGATAATCCATTGAT	1218
PAL_Allium_sativum_mRNA	ACTAATTCGATCGAACGTGAAATAAATCCGTTGAAACGACAAACCCATTGAT	1157
PAL1_Allium_cep2_mRNA	ACCAAATCAATTTGAGCGGAGATAAACTCTGTGACGACAAACCCATTGAT	1233
PAL_Galtonia_mRNA	ACCAAGTTCGATCGAAGGGAGATCAACTCGGTGAACGACAAACCCATTGAT	1139
PAL_Oryza3_mRNA	ACCAAGTCCATCGAGCGCAGGTCAACTCCGTGAACGACAAACCCATTGAT	1206
	** * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	TGATGTTTCGAGGAATAAAGCTCTACATGGAGGTAATTTCCAAGGAACAC	1327
PAL_Narcissus_mRNA	CGACGTCTCGAGGAATAAAGCTCTTTCATGGAGGTAATTTCCAAGGGACGC	820
PAL2_Allium_cep1_mRNA	CGACGTCTCGAAGGAAGAAAGCTATTCATGGAGGTAATTTCCAAGGGACGC	1268
PAL_Allium_sativum_mRNA	CGACGTCTCAAGGAACAAGCCGTCACCGGTGGAAGTTCACAGGGACCC	1207
PAL1_Allium_cep2_mRNA	CGACGTCTCAAGGAACAAGCCGTCATGGCGGAAACTTCACAGGGACCC	1283
PAL_Galtonia_mRNA	CGACGTCTCAAGGAACAAGCCCTACACGGGGGAAATTTCCAGGGACCC	1189
PAL_Oryza3_mRNA	CGACGTCCACCGGGCAAGGCGCTCCACGGCGGCAACTTCACAGGGACCC	1256
	** * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	CGATTGGCGTATCAATGGATAAACAAGCTTGCATTTGCGTCAATTAGT	1377
PAL_Narcissus_mRNA	CGATTGGCGTATCGATGGATAAACAAGCTTGCATTCGCATCGATCGGT	870
PAL2_Allium_cep1_mRNA	CTATTGGGGTGTCCATGGATAAACAAGCTTGCATTTGCGTCAATTAGT	1318
PAL_Allium_sativum_mRNA	CCATCGCGCTCCATGGACAACAAGCTAGACTAGCCGTCGCGCCATCGGT	1257
PAL1_Allium_cep2_mRNA	CCATTGGCGTCTCCATGGACAACAAGATTAGCCGTCGCGCCATTTGGT	1333
PAL_Galtonia_mRNA	CTATCGGGTGTGATGGACAACAAGCTTGCATTCGCATCGATCGGT	1239
PAL_Oryza3_mRNA	CCATCGGTGTTCCATGGACAACAAGCTTGCATTCGCATCGCAACATCGGC	1306
	* * * * *	

PAL_Lycoris_mRNA	AAGCTCATGTTTCGCTCAATTTTCGGAACCTG	TCAACGATTCTACAACAA	1427	
PAL_Narcissus_mRNA	AAGCTCGTGTTCGCTCAATTCGCGAGCTCGTCAACGACTTCTACAACAA		920	
PAL2_Allium_cepai_mRNA	AAGCTTTTGTTCGACAGATGTCTGAGCTGGTTAATGATTCTACAACAA		1368	
PAL_Allium_sativum_mRNA	AAACTGATGTTTCGACAGTTCCTCGAGCTGGTGAACGACTTCTACAACAA		1307	
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	AAATTGATGTTTCGACAGTTCCTCGAGCTGGTGAACGACTTCTACAACAA		1383	
PAL_Galtonia_mRNA	AAGCTCATGTTTCGCGCAGTTCTCCGAGCTCGTCAACGATTCTACAACAA		1289	
PAL_Oryza3_mRNA	AAGCTCATGTTTCGCGCAGTTCTCCGAGCTCGTGAACGATTCTACAACAA		1356	
	** * ** * * * * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *			
PAL_Lycoris_mRNA	CGG ACTTCCTTCGAACTTATTGGTGGGC	GAACCCCAAGCTTGGATTA TG	1477	
PAL_Narcissus_mRNA	CGGGCTTCCTTCAAACCTATCGGGCGGGC	GAACCCCGAGCTTGGATTATG	970	
PAL2_Allium_cepai_mRNA	CGGGCTTCATCTAATTTATCAGGTGGAAGAAACCC	TAGCTTGGATTATG	1418	
PAL_Allium_sativum_mRNA	CGGGCTACCGTCCAATTTAACCGGCGGGCGTAA	CCCGAGCCTGGACTACG	1357	
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	TGGCTACCATCCAATTTAACTGGAGGACGTA	ACCCGAGCCTGGACTACG	1433	
PAL_Galtonia_mRNA	CGGATTCGCTTCCAATTTGTCCGGTGGCGGA	ACCCGAGCTTGGACTACG	1339	
PAL_Oryza3_mRNA	CGGGCTGACCTCCAACCTGGCCGCGAGCCGCA	ACCCGAGCTTGGACTACG	1406	
	** * * * * * * * * * ** * * * * * * * * * * * * * * *			
PAL_Lycoris_mRNA	GATTCAAAGGAGCAGAGATCGCGATGGCGAGT	TATTGTTGAGATTGCAA	1527	
PAL_Narcissus_mRNA	GATTCAAAGGAGCAGAGATCGCCATGGCGAGCT	ACTGTTCCGAGTTGCAA	1020	
PAL2_Allium_cepai_mRNA	GGTTTAAAGGGGAGAAATCGCCATGGCTGCTT	ACTGTTCTGAGATACAG	1468	
PAL_Allium_sativum_mRNA	GGTTCAGGGTTCGGGAGATCGCCATGGCCTCG	TACTGCTCGACTTCAG	1407	
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	GGTTCAAGGGGCGGAGATCGCCATGGCCTC	TACTGCTCGAGCTTCAG	1483	
PAL_Galtonia_mRNA	GGTTCAGGGGCGGAGATCGCGATGGCGTCT	GTTCTGTTGAGCTTCAG	1389	
PAL_Oryza3_mRNA	GGTTCAGGGCACCGAGATCGCCATGGCCTCT	TACTGCTCGACTTCAG	1456	
	* *			
PAL_Lycoris_mRNA	TTTCTAGCTAATCCAGTCACTAATCATGTGC	AAAGTGCAGAGCAACATAA	1577	
PAL_Narcissus_mRNA	TTTTTGTACTAATCCAGTCACTAATCACGTC	GAGAGTGCAGAGCAACATAA	1070	
PAL2_Allium_cepai_mRNA	TATCTGGCCAACCCGTAACCTAACCATGTT	GAAAGTGCAGAGCAACATAA	1518	
PAL_Allium_sativum_mRNA	TTTTCTCGCAATCCCGTGCACAAACCGTGC	AGAGCGTGCAGAGCAACATAA	1457	
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	TTTTCTGGCAATCCCGTGCACAAACCGTGC	AGAGCGTGCAGAGCAACATAA	1533	
PAL_Galtonia_mRNA	TTTTCTAGGAAACCCGTTACAAACCATGTA	CAAAAGCGGAGCAACATAA	1439	
PAL_Oryza3_mRNA	TACCTCGCCAACCCCATACCAACCATGTC	CAAGAGCGGAGCAACATAA	1506	
	* *			
PAL_Lycoris_mRNA	TCAAGATGTGAACCTATGCGCTTAATCTCT	GCTAGAAAAGACTGAAGAGG	1627	
PAL_Narcissus_mRNA	TCAAGATGTGAACCTCGCTGGCC	TAATCTCTGCTAGAAAAGACC	GAAGAGG	1120
PAL2_Allium_cepai_mRNA	TCAAGATGTCAATTCATTTGGGACTCATCT	CTTCTAGAAAAGACTGCTGAGG	1568	
PAL_Allium_sativum_mRNA	CCAGGACGTCAACTCCCTCGGCTCATCTCC	GCCAGAAAAGACC	GAGGAGG	1507
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	CCAGGACGTCAACTCCCTCGGCTCATCTCC	GCCAGAAAAGACC	GAGGAGG	1583
PAL_Galtonia_mRNA	TCAGGATGTGAACCTCGCTGGTCTCATCT	CGGCCAGAAAAGACC	GCGGAGG	1489
PAL_Oryza3_mRNA	CCAGGACGTCAACTCGCTGGTCTCGTCT	CGGCCAGGAAGACC	CCTGGAGG	1556
	** *			
PAL_Lycoris_mRNA	CTGTGCAAATTTGAACTAATGTCAACCAC	ATTTTTGTTGGTGGCTATGC	1677	
PAL_Narcissus_mRNA	CTGTGCAAATTTGAACTCATGTGCGCC	ACATTTTTGTTGGTGGCTATGC	1170	
PAL2_Allium_cepai_mRNA	CTGTAGAGTACTGAACTCATGGTCTCTACT	TTCCTAGTGCATTATGT	1618	
PAL_Allium_sativum_mRNA	CCGTCACCATCCTAAGCTCATGTCGACC	ACATTTCTTGGTCGCCCTCTGC	1557	
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	CCGTCACCATCCTGAACTCATGTCGACC	ACATTTCTTGGTCGCCCTCTGC	1633	
PAL_Galtonia_mRNA	CCGTCGAAATCCTGAACTCATGTCGTC	CGACGTTCTTGGTGGGCTCTGC	1539	
PAL_Oryza3_mRNA	CGGTGGACATCCTCAAGCTCATGACCT	CACCTACATCGTCCGCTCTGC	1606	
	* *			
PAL_Lycoris_mRNA	CAAGCTATAGATTTGAGGCATTTGGAGG	AGAATTTGAAAGACTGTTGAA	1727	
PAL_Narcissus_mRNA	CAAGCTATAGATTTGAGGCATTTGGAGG	AGAATCTGAAGACTGTTGAA	1220	
PAL2_Allium_cepai_mRNA	CAAGCTATTGACTTAAGGCACCTAGA	AGAAAATTTGAAATGTGCGATTAA	1668	
PAL_Allium_sativum_mRNA	CAGGCGTCGATTTAAGGCATCTGGAGG	AGAATTTGAGGCAGTTGTTGAA	1607	
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	CAGGCTATCGATTTACGACATCTGGAGG	AGAATTTGAGGCAGGTTGTTGAA	1683	
PAL_Galtonia_mRNA	CAGGCAATCGATCTGAGGCATTTGGAGG	AGAATTTGAGGCAGCAGTTCAA	1589	
PAL_Oryza3_mRNA	CAGGCGTCGACCTTCGCCACCTCGAGG	AGAATCTGAAGACTCCTGCAA	1656	
	** *			
PAL_Lycoris_mRNA	AACCACATTAGCCAAAGT-TGCGAAAAG	AGTGGTGAACATGGGCGCCAAAG	1776	
PAL_Narcissus_mRNA	AGCCACCATCAGCCAAAGT-CGCGAAAAG	AGCGTTGACTTCCGGCGTCAAT	1269	
PAL2_Allium_cepai_mRNA	AAACACTGTTAGTCAAGTATGT- AAG AT	GGTTTTTAACCACTGGGGTCAAT	1717	
PAL_Allium_sativum_mRNA	GGGCGTAGTCAGTCAGGC-GGTGAAG	AGGGTGCTGACGGTGGGGGCCAAAC	1656	
PAL1_Allium_cepai2_mRNA	GAACGCTGTGAGTCAGGC-GGCGAAG	AGGGTGCTGACGGTGGGGGCCAAAC	1732	
PAL_Galtonia_mRNA	GAACACGGTTGGTCAAGT-TGCGAAG	AGGGTGCTGACCGTGGGGGCCAAAC	1638	
PAL_Oryza3_mRNA	GAACTGCGTCAACCAGGT-GGCCAAG	AGGGTGCTACCATGAACCCACC	1705	
	* *			
PAL_Lycoris_mRNA	GGTGTAGCTTCATCCTTCGAGGTTTGTG	GAGAAGGATTGATCAAAGTTGT	1826	
PAL_Narcissus_mRNA	GGCGAGCTTCATCCTTCGAGGTTCTGC	GAGAAGGATTGATCAAAGTTGT	1319	
PAL2_Allium_cepai_mRNA	GGAGAACCCTCCTCGAGGTTTGTGAGG	TTGAACTGACTAAGTTGAT	1767	
PAL_Allium_sativum_mRNA	GGGAGGCTCACCTTCGAGGTTCTGC	GAGAAGGATTGATCAAAGTTGT	1706	

PAL1_Allium_cepae2_mRNA	GGGAGCCCCACCCATCGAGTTCTGCGAGAAGGACCTAATAAAGATGAT	1782
PAL_Galtonia_mRNA	GGCGAGCTCCACCCGTCGAGTTCTGCGAGAAGGATTTGATTAAGGTGAT	1688
PAL_Oryza3_mRNA	GGCGACCTCTCCAGCGCGCGCTTTCAGCGAGAAGAACCTCCTCACCGCCAT	1755
	** * * * * * * * * * * * * * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	CGATCGCGAGTATGTGTTTTCTACATTGATGACCCCTGTAGCAGACTT	1876
PAL_Narcissus_mRNA	CGATCGCGAGCAGCTGTCTCTACGTCGACGACCCCTGCAGCGGACTT	1369
PAL2_Allium_cepae1_mRNA	TGATAGAGAGTATGTATTTGCATACATTGATGACCCATGCAGCCAGACAT	1817
PAL_Allium_sativum_mRNA	CGAAAGGGAGTACGTGTTCACGTACGCGGACGACGCTGCAGCGCAGGGT	1756
PAL1_Allium_cepae2_mRNA	CGACAGGGAGTACGTGTTCATATGCTGACGATGCTGCAGTGCAGCGCAT	1832
PAL_Galtonia_mRNA	CGACAGGGAGTATGTGTTTTGCATACATCGATGACCCCTGCAGCGGACGT	1738
PAL_Oryza3_mRNA	CGACCGGAGGCGGTGTTCAGCTATGCCGACGACCCGTCGAGCGCCAACT	1805
	** * * * * * * * * * * * * * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	ACCCTTTAATGCAAAAATTGAGACAAATACTAGTCGAGCAGCATTGAAC	1926
PAL_Narcissus_mRNA	ACCCTTTAATGCAAAAGACTGAGACAAAGTACTGGTCGAGCAGCGCTGAGC	1419
PAL2_Allium_cepae1_mRNA	ATCCATTGATGGAGAACTGAGACAAAGTCTTGTACAGCATGCACTGAAC	1867
PAL_Allium_sativum_mRNA	ACCCTCTGATGCGAAGGTGAGGCAGGTGCTCGTCGACCATGCTCTGGGC	1806
PAL1_Allium_cepae2_mRNA	ACCCTTGTATGCGAAGGTGAGGCAGGTGCTCGTCGACCATGCGCTAGGC	1882
PAL_Galtonia_mRNA	ACCCTTGTATGCGAAGGTGAGGCAGGTGCTCGTCGAGCATGCGCTCGGC	1788
PAL_Oryza3_mRNA	ACCCTCTATGCGAAGCTCCGCGCGCTGCTCGTCGAGCAGCCCTCACC	1855
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	AATGGTGAGAAGGAAAAGGATGCAAACTTCGATTTTTTCAGAAGATCTC	1976
PAL_Narcissus_mRNA	AATGGCGAGAAGGAAAAGATGCAAACTTCGATCTTCGGAAGATCTC	1469
PAL2_Allium_cepae1_mRNA	AATGGAGAAAATGAAAAGGACTTCAACACCTCAATCTTCAAAGATTGC	1917
PAL_Allium_sativum_mRNA	AATGTAGAGAGGAGAAGGATGCGGAGACCTCGATATTTCAAGAAGATCGG	1856
PAL1_Allium_cepae2_mRNA	AACGGGAGAGAGAGAAGGATTCAGAGACCTCGATATTTCAAGAAGATCGG	1932
PAL_Galtonia_mRNA	AATGGGACAAAAGAGAAGGACCAACACGCGCATCTTTCACAAGATTGC	1838
PAL_Oryza3_mRNA	AGCGGCGACGCGGAG-----CCGAGGCGCTCCGTGTTCTCCAAGATCAC	1899
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	TGCTTTTGAGGAGGAGTTGAACGTAGTTCTGCCGAAAAGAGTCGAAAACG	2026
PAL_Narcissus_mRNA	TGCTTTTGAGGACGAGTTGAAGGTGGTTCTGCCGAAAAGAGTCGAAAACG	1519
PAL2_Allium_cepae1_mRNA	AGCTTTTGAGACGAACTGAAGGCAAAGCTTCTAAAGAAGTAGAGGCCG	1967
PAL_Allium_sativum_mRNA	GGCGTTTCGAGGAGGAGTTGAAGGAGACATTGCCGAAAAGGTTGGAGGCAG	1906
PAL1_Allium_cepae2_mRNA	GGCGTTTCGAGGAGGAGTTGAAGGAGACATTGCCGAAAAGGTTGGAGGTTG	1982
PAL_Galtonia_mRNA	GGTGTTCGAGGAGGAGCTGAAGGCGGCGCTGCCGAAAGGAGTTGGAGGCG	1888
PAL_Oryza3_mRNA	CAAGTTTCGAGGAGGAGCTCCGCTCTGCGCTGCCCGGGAGATCGAGGCCG	1949
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	CCTGGGTGCTTACGAGAATGGAACCTTCAGCCATTAAGAACAGGATTGAG	2076
PAL_Narcissus_mRNA	CCAGGGTAGCTTACGAGAATGGAACCTTCGCGCCATTAAGAACAGGATCAAG	1569
PAL2_Allium_cepae1_mRNA	CTAGGCTTTCAGTAGAGAATGGGAGTGCAGTGGTTCTCAATAGAAATAAAA	2017
PAL_Allium_sativum_mRNA	TAAGGGTGGCATTGATAATGGAAGTGCAGGTTACCGAACAGGATAAAG	1956
PAL1_Allium_cepae2_mRNA	TAAGGGCGCGCTTGAATAATGGAAGTGCAGGTTACCGAACAGGATAAAG	2032
PAL_Galtonia_mRNA	CGAGAGTGGCGTTTCGAGAGCGGAGCTCGGCGATTCCGAAACAGAAATCAAG	1938
PAL_Oryza3_mRNA	CCCCGTCGCGCTGCCAACGGCACCCCGCCCGTCGCCAACCGGATCGTC	1999
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	GACTGCAGGTCTATCCTTTGTATAGTTTGTAAAGGAGGAGATTGGGAC	2126
PAL_Narcissus_mRNA	GAGTGCAGGTCTATCCTTTGTACAGTTTCGTCAGGGAGGAGATCGGGAC	1619
PAL2_Allium_cepae1_mRNA	GAATGCAGGTCTATCCTTTGTATAGTTTGTAAAGGAGGAGATTGGAAC	2067
PAL_Allium_sativum_mRNA	GAGTGCAGGTCTATCCTTTGTATAGTTTGTAAAGGAGGAGATTGGGAC	2006
PAL1_Allium_cepae2_mRNA	GAGTGCAGGTCTATCCTTTGTATAGTTTGTAAAGGAGGAGATTGGGAC	2082
PAL_Galtonia_mRNA	GAATGCAGGTCTATCCTTTGTATAGTTTGTAAAGGAGGAGATTGGGAC	1988
PAL_Oryza3_mRNA	GAGAGCCGTCGTTCCGCTCTACCGCTTCGTCGCGAGGAGCTCGGCTG	2049
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	TAGTTTGCTTACAGGCGAAAAGTTTCGATCGCTGGAGAGGAGTTTGACA	2176
PAL_Narcissus_mRNA	TGGTTTGCTTACGGGCGAGAATGTTCAATCGCTGGAGAGGAGTTTGACA	1669
PAL2_Allium_cepae1_mRNA	AGGCTTTGTCAGGGGAGAGAACAACATCACCTG-AGAGGAGTTTGACA	2116
PAL_Allium_sativum_mRNA	GGGTATCTGACTGGGAGGAGGAAACGAGTCTGGGGAGGTGTTTCGAGA	2056
PAL1_Allium_cepae2_mRNA	GGGTATCTGACTGGGAGGAGGAAACGAGTCTGGGGAGGTGTTTCGAGA	2132
PAL_Galtonia_mRNA	TGGTATTTGACCGGAGAGAAGTTTCGCTCGCGGAGAGGAGTTTAAACA	2038
PAL_Oryza3_mRNA	CGTATTCCTACCGGCGAGAAGTCAAGTCCCCGCGAGGAGTGCACA	2099
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	AGGTTTCAATGCGATTGCAAGGGAAGTTGGTTGATCCTCTCTTTGAG	2226
PAL_Narcissus_mRNA	AGGTTTACCAAGCGATTGCGAGGGGAAGTTGGTTGATCCTCTCTTTGAG	1719
PAL2_Allium_cepae1_mRNA	AAGTATTTGTCGGTATTTGTCAAGGGGAAGATTATAGATCCAATGCTTGA	2166
PAL_Allium_sativum_mRNA	AGGTGTTTCGAGGCGGTTGCAAGGGGAAGTTCGTCGACCCACTGCTAGAG	2106
PAL1_Allium_cepae2_mRNA	AGGTGTTTCGAGGCGGTTGCAATGGAAGGTCGTTGATCCGCTGCTCGAG	2182
PAL_Galtonia_mRNA	AGGTGTTTCGACGATTTGTCAAGGGGAAGTTGATCGATCCGCTGCTTGA	2088
PAL_Oryza3_mRNA	AGGTGTTCTCGGCATCAGCCAGGGCAAGCTCATCGACCCCATGCTCGAC	2149
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
PAL_Lycoris_mRNA	TGCTTGGAGGATTGGAATGGTGTCTCTCTTCTATATGCTAGAGCTGATT	2276

PAL_Narcissus_mRNA	TGCTTGGAGGATTGGAATGGTGCCTCTTCCCATATGCTAGAG-----	1763
PAL2_Allium_cepai_mRNA	TGCTTGAAGGAATGGAATGGTGAGCCTCTTCCCATATGCTG-----	2207
PAL_Allium_sativum_mRNA	TGCTTGCAGGAGTGGGATGGTGCACCTGTGCCCATTTGTTA-----	2147
PAL1_Allium_cepai_mRNA	TGCTTGCAGGAGTGGGATGGTGCACCTTTGCCCATTTGTTAA-----	2224
PAL_Galtonia_mRNA	TGCTTGTCCGAGTGGAAACGGAGCTCCCTGCCCATTGCTAG-----	2130
PAL_Oryza3_mRNA	TGCCTCAAGGAGTGGAAACGGCGAGCCCTTCCCATCAACTAAGCCAAGAT	2199
	*** * *** *	
PAL_Lycoris_mRNA	CAAGTG-AAGTTGTGATT-----	2293
PAL_Narcissus_mRNA	-AAGTGAAGCTGTGATT-----	1780
PAL2_Allium_cepai_mRNA	-AAATC---ACCGCCGT-----	2221
PAL_Allium_sativum_mRNA	-GAGTT---ACAGTGTGT-----	2161
PAL1_Allium_cepai_mRNA	-GAGTT---ACAGTGTGT-----	2238
PAL_Galtonia_mRNA	-----	
PAL_Oryza3_mRNA	CCCATCGCCATTGCCATTGCCATACACCCATCATCGAGGAGGAGGAGA	2249
PAL_Lycoris_mRNA	-----CATTCTCAGCTTC-----	2306
PAL_Narcissus_mRNA	-----CATTCTTGATGA-----	1793
PAL2_Allium_cepai_mRNA	-----TAACCTTAAAAACAA-----	2236
PAL_Allium_sativum_mRNA	-----GA---AAA-----	2166
PAL1_Allium_cepai_mRNA	-----GA---AAA-----	2243
PAL_Galtonia_mRNA	-----	
PAL_Oryza3_mRNA	CTAAAAATAAAAGAAAACGAACCGCTTCGTGTATCTTCAGACAAAAAGA	2299
PAL_Lycoris_mRNA	--TTGTACTTA-ATTGTT-----GTTTG--TTAAGGTTGTAATGTGTA	2344
PAL_Narcissus_mRNA	--TTGTACTTG-ATTGTT-----GTTTG--TTAAGGTTGTAATGTCTA	1831
PAL2_Allium_cepai_mRNA	-TTTGAATCTGCAAAAAT-----GTTTG--TTAAA-----AGCGTATA	2271
PAL_Allium_sativum_mRNA	---TTTATTC-----TG-----GTTTG--TGAAA-----TA	2187
PAL1_Allium_cepai_mRNA	---TGGATTC-----TT-----GCATG--TGAAA-----TA	2264
PAL_Galtonia_mRNA	-----	
PAL_Oryza3_mRNA	CCCTGTATTTCTTCGTTTCGTTGCCGTTGGTATTATAGTGATCTCGTGTT	2349
PAL_Lycoris_mRNA	ATGAGTATTTGTT--TCTTCTTTCTTTGAC--TTGATTGTTCTCTTATTTT	2391
PAL_Narcissus_mRNA	ATTGTATTTATT--TCTTCTTTCTTTGCCATTTCGTAAGCAAGCATCTT	1879
PAL2_Allium_cepai_mRNA	ACTATTATT-ATT--TATTGTAA-TTTGTTTTTTAT-----	2303
PAL_Allium_sativum_mRNA	GT-AATGTTA-----	2196
PAL1_Allium_cepai_mRNA	GT-AATGTTTATT--TGCCGTGTGATTATG-TTTTTAATGATTGAAAGCT	2310
PAL_Galtonia_mRNA	-----	
PAL_Oryza3_mRNA	CTTTGTGTTAGCTGCTCTGCTCAGCTTGCCAGCCATGGCGCAAGCAAG	2399
PAL_Lycoris_mRNA	GTG--AATGCAG-AGGATTATCT-TGA--TGTATTTA--CC---ATTCA	2429
PAL_Narcissus_mRNA	GAGTTAAT-CA--AGCACCATGAATAA--TGCATTGAAACCCCGAAGTTG	1924
PAL2_Allium_cepai_mRNA	-----ATAGAA-AAAATTGTTG-TAA--TGTTT-----CC-----	2329
PAL_Allium_sativum_mRNA	-----	
PAL1_Allium_cepai_mRNA	AAGAGCATATATTTGAATGAAAGTTA--TACATTTA-----	2345
PAL_Galtonia_mRNA	-----	
PAL_Oryza3_mRNA	CGGCTTTCTAA-GATATTGTCGCTAAACTGTATTTTGGGGTGAAAGTAT	2448
PAL_Lycoris_mRNA	TGA-AT-CAA-GCAT-----CTTGAATTA-----AAAAAA	2461
PAL_Narcissus_mRNA	TAATATGCAATGCATGTCTATTTCTTTATCAAAAA-----AAAAAA	1966
PAL2_Allium_cepai_mRNA	-----TTTTCCCAAAAA-----AAAAAA	2349
PAL_Allium_sativum_mRNA	-----	
PAL1_Allium_cepai_mRNA	-----TTGCGAAAAA-----AAAAAA	2363
PAL_Galtonia_mRNA	-----	
PAL_Oryza3_mRNA	TGCTACTCGA-----TTCCATCTTAAAAAGTTGTGTAATAGAA	2488
PAL_Lycoris_mRNA	AA-----	2463
PAL_Narcissus_mRNA	AAAA-----	1970
PAL2_Allium_cepai_mRNA	-----	
PAL_Allium_sativum_mRNA	-----	
PAL1_Allium_cepai_mRNA	-----	
PAL_Galtonia_mRNA	-----	
PAL_Oryza3_mRNA	ATGTTTTGATCCT	2501

Figura 25. Alineamiento múltiple de secuencias de ARNm de especies reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias corresponden a la enzima TYDC. Las regiones resaltadas corresponden a las regiones de referencia para el diseño de cebadores



TYDC4_Setaria_mRNA	TGGTGGACTGGATGGGCGGCTGCTCGGCTGCCAAGCCGGCTACTCTTCTCGGGC---G	519
TYDC_Oryza4_mRNA	TGGTGGACTGGATGGCTAGGCTGGTGGGGCTTGCTGATCGCTTCCCTTTCTCCGGTCCG	448
TYDC_Oryza2_mRNA	TCTGGACTGGCTCGGCAGGGCGCTGCACCTGCCGAGAGCCCTTCTGTTCGCGGC---G	652
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	GCGGCGGCGGCG---TGCTACAGGGGAGCACGTGCGAGGCGGTGG	535
TYDC_Sorghum_mRNA	GCGGCGGCGGCG---TGCTGCAGGGGAGCACGTGCGAGGCGGTGG	616
TYDC4_Setaria_mRNA	GCGGTGGTGGCG---TCCTGCAGGGGAGCACGTGCGAGGCGGTGG	561
TYDC_Oryza4_mRNA	GCGGCGGCGGCGGCGGTGCGCGTGGTGTCTGACAGGGGAGCACCTGCGAGGCGGTGG	508
TYDC_Oryza2_mRNA	GAGGCGGCGGCA---CGATCTTGGGCACGTCGTGCGAGGCGGTCC	694
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	TGTGCACGCTCGCCGCGGCGGGACCGCGCGTGGCTAGGCTGGGGCAGCAG-AGCATC	594
TYDC_Sorghum_mRNA	TGTGCACGCTCGCCGCGGCGGGACCGCGCGTGCACAGGCTCGGGCAGCAG-AGCATC	675
TYDC4_Setaria_mRNA	TCTGCACGCTCGCCGCGGCGGGACCGCGCGTGGCCAAGTGGGACACGAG-GCCATC	620
TYDC_Oryza4_mRNA	TGTGCACGCTCGCCGCGGCGGGACCGCGCGTGGGGAGGATTGGGCACGAG-GGCATC	567
TYDC_Oryza2_mRNA	TCTGCAGGCTCGTCCGCGGAGGACCGAAGCTGGCGGAGATCGG-CGCGAGGAGGATC	753
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	GTGAAGCTGGTGGTCTACGCCTCGGACCAGACGCACGCCACCTTCCAGAAGGGCGCGGG	654
TYDC_Sorghum_mRNA	ATCAAGCTGGTGGTCTACGCCTCCGACCAGACGCACGTCACCTTCCAGAAGGGCGCGGG	735
TYDC4_Setaria_mRNA	ATGAAGCTGGTGGTCTACGCCTCCGACCAGACGCACGCCACATTCAGAAAGGGCGCGGG	680
TYDC_Oryza4_mRNA	GTGAAGCTGGTGGTCTACGCCTCCGACCAGACGCACGCCACGTTCCAGAAGGGCGCGGG	627
TYDC_Oryza2_mRNA	GCGACCTCGTCTACTGCTCCGATCAGACCCACTTCCGCTTCCGAAAGGGCGCGGGC	813
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	CTGGTGGGCATCCCGCGTCCAACCTTCGCGTCAATCCGGACG-ACGTCCGCTCCGGTA	713
TYDC_Sorghum_mRNA	CTCGTGGGCATCCCGCGTCCAACCTTCGCGTCAATCCAGACG-ACGCCGGCTCCGGTA	794
TYDC4_Setaria_mRNA	CTCGTGGGCATCCCGCGTCCAACCTTCGCGTCAATCCGACG-TCGGCGCTCCGGTA	739
TYDC_Oryza4_mRNA	CTGGTGGGCATCCCGCGTCCAACCTTCGCGTCAATCCGACG-GCGGCGGCTCCGGTA	686
TYDC_Oryza2_mRNA	ATCGCCGGGATACCGGGGACTGCGCGGATACCGACGTCGCCGACGAC-GTGTT	872
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	GCGCCTGACGGCCGAGGAGC-TCCGCGCGGTCGATCGGACGTCGCACGCGGCCTGG	772
TYDC_Sorghum_mRNA	GCGCCTGACGGCCGAGGAGC-TCCGCGCGGTCGATCGGACGTCGCCCGCGGCCTGG	853
TYDC4_Setaria_mRNA	GCGCCTTACCGCCGAGGAGC-TCCGCGCGGTCGATCGGACGTCGCAGCGGCTGG	798
TYDC_Oryza4_mRNA	GCGCCTGACGGCCGAGGAGC-TCCGCGCGGTCGAGGCGGACGTCGCCCGGCGCTGG	745
TYDC_Oryza2_mRNA	GCGCCTC-TCCGCGCGGTCGATCGGACGTCGAGGCGGACGTCGAGCCCGGCTGG	931
	** ** *	
TYDC_Zea_mRNA	TGCCGCTGTACCTCTGCGCCACGGTGGGCACCGGGGTCGGCGGCTCGACCCCGTTC	832
TYDC_Sorghum_mRNA	TGCCGCTGTACCTCTGCGCCACGGTGGGCACCGGGGTCGGCGGTCGACCCCGTTC	913
TYDC4_Setaria_mRNA	TGCCCTGTACCTCTGCGCCACGGTGGGCACCGGGGTCGGCGGTCGACCCCGTTC	858
TYDC_Oryza4_mRNA	TCCCGCTGTACCTCTGCGCCACTGTGGGCACCGGGGTCGGCGGCTCGACCCCGTTC	805
TYDC_Oryza2_mRNA	TCCCTTGTTCTGTCGCGCCGTCGAGTGGGCACCGGTCGAGTACCGCGTGGACCCGTC	991
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	GCGAGCTCGGAGAGGA---GGCGCGGCGCACGGCATGTGGCTGCACGTGGACGCGGCGT	889
TYDC_Sorghum_mRNA	GCGAGCTCGGAGAGGA---GGCGCGGCGCACGGCATGTGGCTGCACGTGGACGCGGCGT	970
TYDC4_Setaria_mRNA	GCGAGCTCGGAGAGGA---GGCGCGGCGCACGGAATGTGGCTGCACGTAGACGCGGCGT	915
TYDC_Oryza4_mRNA	GCGAGCTCGGAGAGGT---GGCGCGGCGCACGGCATGTGGCTGCACGTGGACGCGGCGT	862
TYDC_Oryza2_mRNA	GCGAGCTCTGCGGCGTCCGCGGCGCACGGCGGCGTGTGGTGCACGTGGACGCGGCGT	1051
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	ACGCCG--CAGCGGCGCATCTGCCCTGAGTTCAGGGCACTTCGATGGCGCGGAGCT	947
TYDC_Sorghum_mRNA	ACGCCG--CAGCGGCGCATCTGCCCTGAGTTCAGGGCACTTCGATGGCGCGGAGCT	1028
TYDC4_Setaria_mRNA	ACGCCG--CAGCGGCGCATCTGCCCTGAGTTCAGGGCACTTCGATGGCGCGGAGCT	973
TYDC_Oryza4_mRNA	ACGCCG--CAGCGGCGCATCTGCCCTGAGTTCAGGGCACTTCGATGGCGCGGAGCT	920
TYDC_Oryza2_mRNA	ACGCCGGTCGCGGCTG--GTGTGCCCGAGTTCGCGAGCGTTCGCGGCGCGCGAGGC	1109
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	CGCCGACTCGTGTAGCATGAACCCGCACAAGTGGTCTCTCACAACGCGGACTGCTGCTG	1007
TYDC_Sorghum_mRNA	CGCCGACTCGTGTAGCATGAACCCGCACAAGTGGTCTCTCACAACGCGGACTGCTGCTG	1088
TYDC4_Setaria_mRNA	CGCCGACTCAGTGTAGCATGAACCCGCACAAGTGGTCTCTCACAACATGACTGCTGCTG	1033
TYDC_Oryza4_mRNA	CGCCGACTCGTGTAGCATGAACCCGCACAAGTGGTCTCTCACAACATGACTGCTGCTG	980
TYDC_Oryza2_mRNA	CGTCGACTCGTGTAGCATGAACCCGCACAAGTGGTCTCTCACAACATGACTGCTGCTG	1169
	** *	
TYDC_Zea_mRNA	TCTGTGGTGGCAAGCCGAGGTGCCCTGACCTCCGCGCTTCCACCGACCCGGAGTAC--	1065
TYDC_Sorghum_mRNA	TCTGTGGTGGCAAGCCGAGGTGCCCTGACCTCCGCGCTTCCACCGACCCGGAGTAC--	1146
TYDC4_Setaria_mRNA	CCTGTGGTGGCAAGCCGAGGTGCCCTGACCTCCGCGCTTCCACCGACCCGGAGTAC--	1091
TYDC_Oryza4_mRNA	CCTGTGGTGGCGAGCCCGCGCGCTCACCAGCCGCTTCCACCGACCCGGAGTAC--	1038
TYDC_Oryza2_mRNA	GGTGTGGTGGCGGCGGTCGGCGTGGTGGCGGCGTGGGCACGGAGCAGGATACAT	1229
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	-CTCAAGAAGCTCGGCA-CGGACGGCACGGGAAGCCGGC-----CGCCATAGACTA	1115
TYDC_Sorghum_mRNA	-CTCAAGAAGCTCGGCA-CGGAGGG---GAAGAAGCCGGC-----CGCCATAGACTA	1193
TYDC4_Setaria_mRNA	-CTCAAGAAGCTCGGCA-CAAACGGCACGGGAAGCCGGC-----CGCCATAGACTA	1141
TYDC_Oryza4_mRNA	-CTCAAGAAGCTCGGCA-CGGAGGGCAAGCCCGCAGCGCGCCGCGCAGCAGACT	1097
TYDC_Oryza2_mRNA	CCTCAGGACG-CGGCGGCGAGGGCC-----ACGAC-----GTCGTGCGACTA	1271
	* *	

TYDC_Zea_mRNA	CAAGGACTGGCAGATCTCCCTGTACGCGCGGTTCCGCGCCATCAAGCTCTGGGTGGTGTCT	1175
TYDC_Sorghum_mRNA	CAAGGACTGGCAGATCTCCCTGTACGCGAGGTTCCGCGCCATCAAGCTCTGGGTGGTGTCT	1253
TYDC4_Setaria_mRNA	CAAGGACTGGCAGATCTCCCTATCGCGCCGATTCGCGCCATCAAGCTCTGGGTCTGTCT	1201
TYDC_Oryza4_mRNA	CAAGGACTGGCAGATCTCGCTGTGCGGGCGGTTCCGCGCCATGAAGCTCTGGTCTGTCT	1157
TYDC_Oryza2_mRNA	CAAGGACTGGGGCACACGCTGACGCGGGCGGTTCCGCGCGCTCAAGGTGTGGCTCGTGTCT	1331
	***** *	
TYDC_Zea_mRNA	GCGGCGCTACGGTGCCTCGGCCTGCGCGCGCACATCCGCGCACAGTCCACACAGCAA	1235
TYDC_Sorghum_mRNA	ACGGCGCTACGGCGCGCTCGGCCTGCGCGCGCACGTCGCGCGCACGTCGCGCGAGCCAA	1313
TYDC4_Setaria_mRNA	GCGACGATACGGTGCCTCGGCCTGCGCGCGCACATCCGCGCGCACGTCACGGCAGCCAA	1261
TYDC_Oryza4_mRNA	GCGGCGGTACGGCGCTGCGGGCATGCGCGCGCACATCCGCGCGCACGTCGCGCATGGCCGA	1217
TYDC_Oryza2_mRNA	CCGCTGTACGGCGTGGAGGCCCTCCGCTCCACGTCGCTCCACGTCGCGCATGGCCGC	1391
	** *	
TYDC_Zea_mRNA	GTGGTTCGAGCGGACAGTGGCGGCGGACGAACGCTTCGAGGTTGTGGTGCCGAGGAAGTT	1295
TYDC_Sorghum_mRNA	GTGGTTCGAGCGGACAGTGGCGGCGGACGAACGCTTCGAGGTTGTGGTGCCGAGGAAGTT	1373
TYDC4_Setaria_mRNA	ATGGTTTGAGCGGGCGGTGGCGGCGGACGAGCTTCGAGGTTGGTGGTTCCGAGAAGGTT	1321
TYDC_Oryza4_mRNA	GTGGTTCGAGCGCGGTTGAGCGCGGACGAGCGGTTTCGAGGTTGGTGGCGAAGAGGAGGT	1277
TYDC_Oryza2_mRNA	GGCGTTCGAGGCCATGGTGAAGGGCGGACGCGAGGTTTCGAGGTTGGTGGCGCGGAGGCGGTT	1451
	** *	
TYDC_Zea_mRNA	CTCGCTGGTATGTTCCGCCTCCGG-----GAGAGGTT-----CGC	1331
TYDC_Sorghum_mRNA	CTCGCTGGTATGTTCCGCCTCCGG-----GCGGGTTT-----CGT	1409
TYDC4_Setaria_mRNA	CTCTCTCGTGTGCTTCCGCCTCCGG-----GAAAGGTT-----CGT	1357
TYDC_Oryza4_mRNA	CTCCCTCGTGTGCTTCCGCCTCCGG-----CGG	1304
TYDC_Oryza2_mRNA	CGCGCTGGTGTGCTTCCGCCTCCGGTCCGCGCGGAGAGACTCGGCGTCCGCGTCCGCGT	1511
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	AGGGGACGACGCGGCGG---ACGAGTTGAACCGGAGCTCCTCACGGCGGTGAACCGCAG	1388
TYDC_Sorghum_mRNA	AGGGGACGACGAGGTTGG---ACGAGTTGAACCGGAGCTCCTCACGGCGGTGAACCGCAG	1466
TYDC4_Setaria_mRNA	GGGGATGACGCGGTTGG---ACGAGTTGAACCGGAGCTCCTCACGGCGGTGAACCGCAG	1414
TYDC_Oryza4_mRNA	CGGCGCGCGGCGGCGG---ACGCGATGAACCGCGAGCTCCTGGCGCGGTGAACCGCAG	1361
TYDC_Oryza2_mRNA	CGGAGCGGAGAGGCGGCAACGAGCTCAACAGGAGGCTCCTGGAGGAGGTGAACCGCG-G	1570
	** *	
TYDC_Zea_mRNA	CGGGC---GGGCGTTCGTGACGCACTTCGTGGTGGACGGCAAGTTTCGTGATCCGCCTCG	1444
TYDC_Sorghum_mRNA	CGGCC---GGGCGTTCGTGACGCACTTCGTGGTGGACGGCAAGTTTCGTGATCCGCCTCG	1522
TYDC4_Setaria_mRNA	CGGGC---GCGCGTTCATGACCCACTTCGTGGTGGACGGCAAGTTTCGTGATCCGCCTCG	1470
TYDC_Oryza4_mRNA	CGGGC---GGGCGTTCGTGACGCACTTCGTGGTGGAGGGCAAGTTTCGTGATCCGCCTCG	1417
TYDC_Oryza2_mRNA	CGAGCTCGGGCCGTACATGAGCTCCGCCATGGTGGTGGCGTGTACATGCTCAGGTGCG	1630
	** *	
TYDC_Zea_mRNA	CGGTTCGGCGGTGCTATGACGGAGATGCGGCATGTCATGGACGTGTGGGAAGTGTGCAGG	1504
TYDC_Sorghum_mRNA	CGGTTCGGCGGTGCCATGACGGAGATGCGCACGTCATGGACGTGTGGGACGTGTGCAGG	1582
TYDC4_Setaria_mRNA	CCATTGGCGCGCCTCGACGGAGCTCCGGCACGTCATGGACGTGTGGGAGCTGTGCAGG	1530
TYDC_Oryza4_mRNA	CCGTTCGGCGGCCATGACGGAGATGAGGCATGTCGGCGACGCGTGGGAGCTG-----	1470
TYDC_Oryza2_mRNA	CCATCGGGAGCACGCTCACCAGGAGCGCCATGTCGCGGAAGCGTGAAGGTTGTCCAGG	1690
	* *	
TYDC_Zea_mRNA	CCAGCGCCGACCAGTTC-TACGCGCTACTCCTACTAGTG-----TATT----C	1549
TYDC_Sorghum_mRNA	CCAACGCCCAGGAGTTC-TACGCGGTATCAACTCTAAGG-----CGTTG--TT	1629
TYDC4_Setaria_mRNA	CCAAGCGCGAGGAGTTC-TACAGCGTTATCAGCTCTAATAATGGGCTCTTCACTC--TC	1587
TYDC_Oryza4_mRNA	-----GTT-----CGTAA-----	1479
TYDC_Oryza2_mRNA	----AGCGGCCACGTCAATCCTTCGTAAACGTGGCTAAAA-----CATCTCGGTAGGTT	1741
	** *	
TYDC_Zea_mRNA	TGCTGCACGT-ATACGTACA-CT-TTTACGC-----GC--ACATGTAC-----C---AA	1590
TYDC_Sorghum_mRNA	TGGCACACCT-GAAGCTAAAAGCTGTCTAGACAAA--GCTGACCTGTGT-----TTTGGGA	1680
TYDC4_Setaria_mRNA	CAGCGTTTGC-GAGCAGTGAGCG--ACAAGCAT---GCATGCTTGTATGCCGCGCTTTCAC	1641
TYDC_Oryza4_mRNA	-----	
TYDC_Oryza2_mRNA	TGATCCAAATTAAGCATGGTTTTCTCCAAGCAGATTGATAAACTATGC-----TTTTCGG	1796

TYDC_Zea_mRNA	AAAAAT-----AAAGTA--TACACC--TACT-----	1612
TYDC_Sorghum_mRNA	AAAAATGTTTGACAAAAATAGTTTACC--AACTACTTCATGCATAGTTGAGAGAGAAAT	1737
TYDC4_Setaria_mRNA	ATTATTTCTCTTATTGAAGTGTTC-CT--TATT-----GAACT	1676
TYDC_Oryza4_mRNA	-----	
TYDC_Oryza2_mRNA	ATTGACA--CGGCAAAATAATCTGTGCTATTA-----	1829

TYDC_Zea_mRNA	-----CTCCTA-----	1618
TYDC_Sorghum_mRNA	GAGGAAGAAGCTGCAATAAACTATTTTTTTTCTAGCTTCATCCAACTTATGTCTTTGTG	1797
TYDC4_Setaria_mRNA	G-----TTCCGGCGCTAGGCCAT-----	1695
TYDC_Oryza4_mRNA	-----	
TYDC_Oryza2_mRNA	-----TATTCTTCACTTAATCTCTT-----	1849

TYDC_Zea_mRNA	-----AAAA-----	1627
TYDC_Sorghum_mRNA	AGAGGAAGAGAAAAACAGCTTCACCCATGAAGCGGTTTTGGAAATAAGTGTTCGTAATA	1857

```

TYDC4_Setaria_mRNA -----AAAAG-----ATTATGCTGGGGCT-----ACAA 1719
TYDC_Oryza4_mRNA -----
TYDC_Oryza2_mRNA -----GACTAA-----ATTAGT-----AGA 1864

TYDC_Zea_mRNA AAAAC----- 1632
TYDC_Sorghum_mRNA AAAACAGCTCACACAGCTCGGTCTAAGTCTTACCGGAGCTAGTGGACAACCTTGCACG 1917
TYDC4_Setaria_mRNA GTGGTCACCCGT--CAG--CAATCTTGAG--CTAGCACAAATACCATATGTCTTGACGGG 1773
TYDC_Oryza4_mRNA -----
TYDC_Oryza2_mRNA GAGATTAATTGTG-TTGATTATTTAAA-----AAAAGAATTATAGAATAATTT-ATAAA 1917

TYDC_Zea_mRNA -----
TYDC_Sorghum_mRNA T----- 1918
TYDC4_Setaria_mRNA CGTCTG 1779
TYDC_Oryza4_mRNA -----
TYDC_Oryza2_mRNA TAAGT- 1922

```

Figura 26. Alineamiento múltiple de secuencias de ADNc correspondientes al inserto para la enzima OMT en plásmidos recombinantes. Transformación proveniente de amplificadores de ADNc obtenidos a partir de muestras de *Z. carinata*.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
IA-025iv_OMT_Colonia2      TTGCTCGTCGTCCTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAAATGGCATCTC 50
IA-025iv_OMT_Colonia7      TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAAATGGCATCTC 50
IA-036_OMT_Colonia10       TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAAATGGCATCTC 50
IA-021iv_OMT_Colonia4      TTGCTCGTCGTCCTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAAATGGCATCTC 50
IA-100_OMT_Colonia1        TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAAATGGCATCTC 50
IA-025iv_OMT_Colonia17     TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAAATGGCATCTC 50
IA-036_OMT_Colonia17       TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAAATGGCATCTC 50
IA-021iv_OMT_Colonia9      TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAAATGGCATCTC 50
IA-036_OMT_Colonia19       TTGCTCGTCGTTCCAGTCATGCATAATCCACTTCATGAAAAATAGCATCTC 50
IA-025iv_OMT_Colonia8      TTGCGCGTCACCCAGTCGTGCATAATCCACTTCATGAAAAATAGCATCTC 50
IA-021iv_OMT_Colonia20     TTGCGCGTCGTTCCAGTCATGCATAATCCACTTCATGAAAAATAGCATATC 50
***** **
.
.
.
IA-025iv_OMT_Colonia2      AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
IA-025iv_OMT_Colonia7      AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
IA-036_OMT_Colonia10       AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
IA-021iv_OMT_Colonia4      AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
IA-100_OMT_Colonia1        AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
IA-025iv_OMT_Colonia17     AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
IA-036_OMT_Colonia17       AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
IA-021iv_OMT_Colonia9      AGAATCTTCTGGGTGAAAGTGGTGGAGTGAAGTAACTCTAAACCTTACACCCT 300
IA-036_OMT_Colonia19       AGGATCTTTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
IA-025iv_OMT_Colonia8      AGGATCTTTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
IA-021iv_OMT_Colonia20     AGGATCTTTTGGTGATGATGGTGGAGTGA----- 280
** ***** * ***** *****

IA-025iv_OMT_Colonia2      -----
IA-025iv_OMT_Colonia7      -----
IA-036_OMT_Colonia10       -----
IA-021iv_OMT_Colonia4      -----
IA-100_OMT_Colonia1        -----
IA-025iv_OMT_Colonia17     -----
IA-036_OMT_Colonia17       -----
IA-021iv_OMT_Colonia9      ACAACCAAGTTAAACTCGCGGCCGTAGCCATCAATGTCCAAGGCGACACG 350
IA-036_OMT_Colonia19       -----
IA-025iv_OMT_Colonia8      -----
IA-021iv_OMT_Colonia20     -----

IA-025iv_OMT_Colonia2      -----TTC----- 283
IA-025iv_OMT_Colonia7      -----TTC----- 283
IA-036_OMT_Colonia10       -----TTC----- 283
IA-021iv_OMT_Colonia4      -----TTC----- 283
IA-100_OMT_Colonia1        -----TTC----- 283
IA-025iv_OMT_Colonia17     -----TTC----- 283
IA-036_OMT_Colonia17       -----TTC----- 283
IA-021iv_OMT_Colonia9      CGAATATAATTTAATAATAGGTATGCGCCTATTCAACAACCGACCTCAA 400
IA-036_OMT_Colonia19       -----TTC----- 283
IA-025iv_OMT_Colonia8      -----TTC----- 283
IA-021iv_OMT_Colonia20     -----TTC----- 283

```

```

IA-025iv_OMT_Colonia2 -----
IA-025iv_OMT_Colonia7 -----
IA-036_OMT_Colonia10 -----
IA-021iv_OMT_Colonia4 -----
IA-100_OMT_Colonia1 -----
IA-025iv_OMT_Colonia17 -----
IA-036_OMT_Colonia7 -----
IA-021iv_OMT_Colonia9 CCACTAATTCTACTGCGAAAAGAATCAAGATCTCTAAAATAACATCAC 450
IA-036_OMT_Colonia9 -----
IA-025iv_OMT_Colonia8 -----
IA-021iv_OMT_Colonia20 -----

IA-025iv_OMT_Colonia2 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
IA-025iv_OMT_Colonia7 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
IA-036_OMT_Colonia10 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
IA-021iv_OMT_Colonia4 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
IA-100_OMT_Colonia1 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
IA-025iv_OMT_Colonia17 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
IA-036_OMT_Colonia7 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
IA-021iv_OMT_Colonia9 CAGTATCTCACCAGCCTGCTCATCACCAAATCATTCGATTACGCAAGAAT 500
IA-036_OMT_Colonia9 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
IA-025iv_OMT_Colonia8 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
IA-021iv_OMT_Colonia20 -----CTCATCCC-----TTCG-TTG----- 298
                        ***** *          *** **

IA-025iv_OMT_Colonia2 -----A 299
IA-025iv_OMT_Colonia7 -----A 299
IA-036_OMT_Colonia10 -----A 299
IA-021iv_OMT_Colonia4 -----A 299
IA-100_OMT_Colonia1 -----A 299
IA-025iv_OMT_Colonia17 -----A 299
IA-036_OMT_Colonia7 -----A 299
IA-021iv_OMT_Colonia9 GATACAGATAGCAAATACTCAGACACCCTATAACACACCACAGGAACATA 550
IA-036_OMT_Colonia9 -----A 299
IA-025iv_OMT_Colonia8 -----A 299
IA-021iv_OMT_Colonia20 -----A 299
                        *

IA-025iv_OMT_Colonia2 AAACCTTGTTGAAT----CTTGGGTC-----CGTGC 326
IA-025iv_OMT_Colonia7 AAACCTTGTTGAAT----CTTGGGTC-----CGTGC 326
IA-036_OMT_Colonia10 AAACCTTGTTGAAT----CTTGGGTC-----CGTGC 326
IA-021iv_OMT_Colonia4 AAACCTTGTTGAAT----CTTGGGTC-----CGTGC 326
IA-100_OMT_Colonia1 AAACCTTGTTGAAT----CTTGGGTC-----CGTGC 326
IA-025iv_OMT_Colonia17 AAACCTTGTTGAAT----CTTGGGTC-----CGTGC 326
IA-036_OMT_Colonia7 AAACCTTGTTGAAT----CTTGGGTC-----CGTGC 326
IA-021iv_OMT_Colonia9 AAAACCCAGCTCAATAAAACACTTAAATCGATGAGACCAAACCTCCATGTGC 600
IA-036_OMT_Colonia9 ACACCCCTGTTGAAC----CTCGGGTCA-----GTGC 326
IA-025iv_OMT_Colonia8 ACACCCCTGTTGAAC----CTCGGGTCA-----GTGC 326
IA-021iv_OMT_Colonia20 ACACCCCTGTTGAAC----CTCGGGTCA-----GTGC 326
                        * * * * *          ** **          ****

IA-025iv_OMT_Colonia2 CG---TGGTA-----TTC----- 336
IA-025iv_OMT_Colonia7 CG---TGGTA-----TTC----- 336
IA-036_OMT_Colonia10 CG---TGGTA-----TTC----- 336
IA-021iv_OMT_Colonia4 CG---TGGTA-----TTC----- 336
IA-100_OMT_Colonia1 CG---TGGTA-----TTC----- 336
IA-025iv_OMT_Colonia17 CG---TGGTA-----TTC----- 336
IA-036_OMT_Colonia7 CG---TGGTA-----TTC----- 336
IA-021iv_OMT_Colonia9 TAGATTGGTAAAAAACCTAATATGCCCACTTCCAAAACCTCCCCAATTT 650
IA-036_OMT_Colonia9 CA---TGGTA-----CTG----- 336
IA-025iv_OMT_Colonia8 CA---TGGTA-----CTG----- 336
IA-021iv_OMT_Colonia20 CA---TGGTA-----CTG----- 336
                        *****          *

IA-025iv_OMT_Colonia2 -----
IA-025iv_OMT_Colonia7 -----
IA-036_OMT_Colonia10 -----
IA-021iv_OMT_Colonia4 -----
IA-100_OMT_Colonia1 -----
IA-025iv_OMT_Colonia17 -----
IA-036_OMT_Colonia7 -----
IA-021iv_OMT_Colonia9 CCACCTCACACTGAAGAGAAAAACAGAACTGGATGAAAAATATATATCACA 700
IA-036_OMT_Colonia9 -----
IA-025iv_OMT_Colonia8 -----
IA-021iv_OMT_Colonia20 -----

```

```

IA-025iv_OMT_Colonia2      --GAACGCGGT-----CATTCCAT----- 353
IA-025iv_OMT_Colonia7      --GAACGCGGT-----CATTCCAT----- 353
IA-036_OMT_Colonia10       --GAACGCGGT-----CATTCCAT----- 353
IA-021iv_OMT_Colonia4      --GAACGCGGT-----CATTCCAT----- 353
IA-100_OMT_Colonia1        --GAACGCGGT-----CATTCCAT----- 353
IA-025iv_OMT_Colonia17     --GAACGCGGT-----CATTCCAT----- 353
IA-036_OMT_Colonia17       --GAACGCGGT-----CATTCCAT----- 353
IA-021iv_OMT_Colonia9      AAAAACGCGGTAAATCTTTTCTACGTCATCTCATTATCACACACAAAAA 750
IA-036_OMT_Colonia19       --GAATGCACT-----CATTCCGT----- 353
IA-025iv_OMT_Colonia8      --GAATGCACT-----CATTCCGT----- 353
IA-021iv_OMT_Colonia20     --GAATGCACT-----CATTCCGT----- 353
                             ** * * *
                             * * * * *

IA-025iv_OMT_Colonia2      --AGGCTTTG-----TTG 364
IA-025iv_OMT_Colonia7      --AGGCTTTG-----TTG 364
IA-036_OMT_Colonia10       --AGGCTTTG-----TTG 364
IA-021iv_OMT_Colonia4      --AGGCTTTG-----TTG 364
IA-100_OMT_Colonia1        --AGGCTTTG-----TTG 364
IA-025iv_OMT_Colonia17     --AGGCTTTG-----TTG 364
IA-036_OMT_Colonia17       --AGGCTTTG-----TTG 364
IA-021iv_OMT_Colonia9      ACCAAACTCTAAAAAACCAATATAAAAAAAAAAAAAATAAACCAAAATTA 800
IA-036_OMT_Colonia19       --AAGCCTTG-----TTG 364
IA-025iv_OMT_Colonia8      --AAGCCTTG-----TTG 364
IA-021iv_OMT_Colonia20     --AAGCCTTG-----TTG 364
                             * * *
                             * *

IA-025iv_OMT_Colonia2      -----AATG-----GGATGCCTCCATCTAAGACGG 389
IA-025iv_OMT_Colonia7      -----AATG-----GGATGCCTCCATCTAAGACGG 389
IA-036_OMT_Colonia10       -----AATG-----GGATGCCTCCATCTAAGACGG 389
IA-021iv_OMT_Colonia4      -----AATG-----GGATGCCTCCATCTAAGACGG 389
IA-100_OMT_Colonia1        -----AATG-----GGATGCCTCCATCTAAGACGG 389
IA-025iv_OMT_Colonia17     -----AATG-----GGATGCCTCCATCTAAGACGG 389
IA-036_OMT_Colonia17       -----AATG-----GGATGCCTCCATCTAAGACGG 389
IA-021iv_OMT_Colonia9      TCAAAGAAATGTACTCAAGCTCCAACAGAAGATCCCCCATTA AAAAACC 850
IA-036_OMT_Colonia19       -----AATG-----GAATGCCCCATCCAAGACGG 389
IA-025iv_OMT_Colonia8      -----AATG-----GAATGCCCCATCCAAGACGG 389
IA-021iv_OMT_Colonia20     -----AATG-----GAATGCCCCATCCAAGACGG 389
                             ****
                             * * * * * * * *

IA-025iv_OMT_Colonia2      -----CATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCTATGA-----GGATCTT 426
IA-025iv_OMT_Colonia7      -----CATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCTATGA-----GGATCTT 426
IA-036_OMT_Colonia10       -----CATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCTATGA-----GGATCTT 426
IA-021iv_OMT_Colonia4      -----CATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCTATGA-----GGATCTT 426
IA-100_OMT_Colonia1        -----CATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCTATGA-----GGATCTT 426
IA-025iv_OMT_Colonia17     -----CATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCTATGA-----GGATCTT 426
IA-036_OMT_Colonia17       -----CATCCTTCGAGTGGTACCAGCTCTCTATGA-----GGATCTT 426
IA-021iv_OMT_Colonia9      GCCCCCATCCCCAAAGGAAACACCTCTTTATCAAAGGCCTGGGCCTT 900
IA-036_OMT_Colonia19       -----CATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCCATGA-----GGACCTT 426
IA-025iv_OMT_Colonia8      -----CATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCCATGA-----GGACCTT 426
IA-021iv_OMT_Colonia20     -----CATCCTTCAAATGGTACCAGCTCTCCATGA-----GGACCTT 426
                             *****
                             * * * * * * * * * * * * * *

IA-025iv_OMT_Colonia2      -----
IA-025iv_OMT_Colonia7      -----
IA-036_OMT_Colonia10       -----
IA-021iv_OMT_Colonia4      -----
IA-100_OMT_Colonia1        -----
IA-025iv_OMT_Colonia17     -----
IA-036_OMT_Colonia17       -----
IA-021iv_OMT_Colonia9      TCACATAAGTCGAAAACCTAAAAAAATGTTTTTTGGAGAATAATCAGC 950
IA-036_OMT_Colonia19       -----
IA-025iv_OMT_Colonia8      -----
IA-021iv_OMT_Colonia20     -----

IA-025iv_OMT_Colonia2      -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445
IA-025iv_OMT_Colonia7      -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445
IA-036_OMT_Colonia10       -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445
IA-021iv_OMT_Colonia4      -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445
IA-100_OMT_Colonia1        -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445
IA-025iv_OMT_Colonia17     -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445
IA-036_OMT_Colonia17       -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445
IA-021iv_OMT_Colonia9      CTAAACAAAAACCAAGCCAAACCAAGCCCAATTTAAAAACCCA 1000
IA-036_OMT_Colonia19       -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445
IA-025iv_OMT_Colonia8      -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445
IA-021iv_OMT_Colonia20     -----GTCCTGGTTCATGAGCCCA 445

```

```

* * * * *
IA-025iv_OMT_Colonia2 -----AGAGC----- 450
IA-025iv_OMT_Colonia7 -----AGAGC----- 450
IA-036_OMT_Colonia10 -----AGAGC----- 450
IA-021iv_OMT_Colonia4 -----AGAGC----- 450
IA-100_OMT_Colonia1 -----AGAGC----- 450
IA-025iv_OMT_Colonia17 -----AGAGC----- 450
IA-036_OMT_Colonia7 -----AGAGC----- 450
IA-021iv_OMT_Colonia9 CACCCCAAACCCACCCACACTATTACAAAAAGAAAAAGAACAAAAC 1050
IA-036_OMT_Colonia9 -----AGAGC----- 450
IA-025iv_OMT_Colonia8 -----AGAGC----- 450
IA-021iv_OMT_Colonia20 -----AGAGC----- 450
* * * * *

IA-025iv_OMT_Colonia2 -----GGCCAT--GGACA----- 461
IA-025iv_OMT_Colonia7 -----GGCCAT--GGACA----- 461
IA-036_OMT_Colonia10 -----GGCCAT--GGAGA----- 461
IA-021iv_OMT_Colonia4 -----GGCCAT--GGAGA----- 461
IA-100_OMT_Colonia1 -----GGCCAT--GGACA----- 461
IA-025iv_OMT_Colonia17 -----GGCCAT--GGACA----- 461
IA-036_OMT_Colonia7 -----GGCCAT--GGACA----- 461
IA-021iv_OMT_Colonia9 CCAAAAACGAGACAAGAGACAAAAGGCCATTTGAAAAAATCTTAACAGCA 1100
IA-036_OMT_Colonia9 -----AGCCAT--GGACA----- 461
IA-025iv_OMT_Colonia8 -----AGCCAT--GGACA----- 461
IA-021iv_OMT_Colonia20 -----AGCCAT--GGACA----- 461
* * * * *

IA-025iv_OMT_Colonia2 -----
IA-025iv_OMT_Colonia7 -----
IA-036_OMT_Colonia10 -----
IA-021iv_OMT_Colonia4 -----
IA-100_OMT_Colonia1 -----
IA-025iv_OMT_Colonia17 -----
IA-036_OMT_Colonia7 -----
IA-021iv_OMT_Colonia9 ACCCCTTTTAAAGCCTATAAACACACCACCCCCCTAAAAAAATCA 1150
IA-036_OMT_Colonia9 -----
IA-025iv_OMT_Colonia8 -----
IA-021iv_OMT_Colonia20 -----

IA-025iv_OMT_Colonia2 -----CCCCACCCTCGTA--- 474
IA-025iv_OMT_Colonia7 -----CCCCACCCTCGTA--- 474
IA-036_OMT_Colonia10 -----CCCCACCCTCGTA--- 474
IA-021iv_OMT_Colonia4 -----CCCCACCCTCATA--- 474
IA-100_OMT_Colonia1 -----CCCCACCCTCATA--- 474
IA-025iv_OMT_Colonia17 -----CCCCGCCCTCATA--- 474
IA-036_OMT_Colonia7 -----CCCCGCCTCATA--- 474
IA-021iv_OMT_Colonia9 TTATAACTCCCCCTCTCATAATG 1174
IA-036_OMT_Colonia9 -----CCCCACCCTCATA--- 474
IA-025iv_OMT_Colonia8 -----CCCCACCCTCATA--- 474
IA-021iv_OMT_Colonia20 -----CCCCATCCTCATA--- 474
* * * * *

```

Figura 27. Alineamiento múltiple de secuencias de ADNc correspondientes al inserto para la enzima OMT en plásmidos recombinantes. Transformación proveniente de amplificadores de ADNc obtenidos a partir de muestras de *Z. carinata*. No se ha incluido la secuencia del individuo IA-021iv_OMT_Colonia9.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
IA-100_OMT_Colonia1 TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-100_OMT_Colonia2 TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-036_OMT_Colonia10 TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-025iv_OMT_Colonia7 TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-025iv_OMT_Colonia2 TTGCTCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-021iv_OMT_Colonia4 TTGCTCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-025iv_OMT_Colonia17 TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-036_OMT_Colonia7 TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-036_OMT_Colonia9 TTGCTCGTCGTTCCAGTCATGCATAATCCACTTCATGAAAATAGCATCTC 50
IA-021iv_OMT_Colonia20 TTGCGCGTCGTTCCAGTCATGCATAATCCACTTCATGAAAATAGCATATC 50
IA-025iv_OMT_Colonia8 TTGCGCGTCACCCAGTCGTGCATAATCCACTTCATGAAAATAGCATCTC 50
* * * * *
IA-100_OMT_Colonia1 CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-100_OMT_Colonia2 CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100

```

```

IA-036_OMT_Colonial0 CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-025iv_OMT_Colonial7 CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-025iv_OMT_Colonial2 CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-021iv_OMT_Colonial4 CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-025iv_OMT_Colonial7 CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-036_OMT_Colonial7 CACTGGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-036_OMT_Colonial9 CACTCGAACGCTCACAAACATATCTCCACCAATGAATCCACTCCAGAG 100
IA-021iv_OMT_Colonial20 CACTCGAACGCTCACAAACATATCTCCACCAATGAATCCACTCCAGAG 100
IA-025iv_OMT_Colonial8 CACTCGAACGCTCACAAACATATCTCCACCAATGAACGCCACTCCAGAG 100
*****
IA-100_OMT_Colonial ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-100_OMT_Colonial2 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-036_OMT_Colonial0 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-025iv_OMT_Colonial7 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-025iv_OMT_Colonial2 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-021iv_OMT_Colonial4 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-021iv_OMT_Colonial7 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-036_OMT_Colonial7 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-036_OMT_Colonial9 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-021iv_OMT_Colonial20 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-025iv_OMT_Colonial8 ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
*****
IA-100_OMT_Colonial CAGGTGAGGATGTTTCTTGTATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-100_OMT_Colonial2 CAGGTGAGGATGTTTCTTGTATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-036_OMT_Colonial0 CAGGTGAGGATGTTTCTTGTATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-025iv_OMT_Colonial7 CAGGTGAGGATGTTTCTTGTATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-025iv_OMT_Colonial2 CAGGTGAGGATGTTTCTTGTATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-021iv_OMT_Colonial4 CAGGTGAGGATGTTTCTTGTATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-025iv_OMT_Colonial7 CAGGTGAGGATGTTTCTTGTATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-036_OMT_Colonial7 CAGGTGAGGATGTTTCTTGTATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-036_OMT_Colonial9 CAAGTGAGGATGCTTCTTGACTATCATGTTTATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-021iv_OMT_Colonial20 CAAGTGAGGATGCTTCTTGACTATCATGTTTATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-025iv_OMT_Colonial8 CAAGTGAGGATGCTTCTTGACTATCATGTTTATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
*****
IA-100_OMT_Colonial CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-100_OMT_Colonial2 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-036_OMT_Colonial0 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-025iv_OMT_Colonial7 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-025iv_OMT_Colonial2 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-021iv_OMT_Colonial4 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-025iv_OMT_Colonial7 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-036_OMT_Colonial7 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-036_OMT_Colonial9 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-021iv_OMT_Colonial20 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-025iv_OMT_Colonial8 CTCCGACATCGACGAGAAGCTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
*****
IA-100_OMT_Colonial AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCGTTGAA 300
IA-100_OMT_Colonial2 AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCGTTGAA 300
IA-036_OMT_Colonial0 AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCGTTGAA 300
IA-025iv_OMT_Colonial7 AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCGTTGAA 300
IA-025iv_OMT_Colonial2 AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCGTTGAA 300
IA-021iv_OMT_Colonial4 AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCGTTGAA 300
IA-025iv_OMT_Colonial7 AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCGTTGAA 300
IA-036_OMT_Colonial7 AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCGTTGAA 300
IA-036_OMT_Colonial9 AGGATCTTTTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCATTGAA 300
IA-021iv_OMT_Colonial20 AGGATCTTTTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCATTGAA 300
IA-025iv_OMT_Colonial8 AGGATCTTTTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCCTTCATTGAA 300
*****
IA-100_OMT_Colonial AACCTTGTTGAATCTTGGGTCGGTCCGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-100_OMT_Colonial2 AACCTTGTTGAATCTTGGGTCGGTCCGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-036_OMT_Colonial0 AACCTTGTTGAATCTTGGGTCGGTCCGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-025iv_OMT_Colonial7 AACCTTGTTGAATCTTGGGTCGGTCCGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-025iv_OMT_Colonial2 AACCTTGTTGAATCTTGGGTCGGTCCGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-021iv_OMT_Colonial4 AACCTTGTTGAATCTTGGGTCGGTCCGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-025iv_OMT_Colonial7 AACCTTGTTGAATCTTGGGTCGGTCCGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-036_OMT_Colonial7 CACCCTGTTGAACTTCGGGTGCGGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-036_OMT_Colonial9 CACCCTGTTGAACTTCGGGTGCGGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-021iv_OMT_Colonial20 CACCCTGTTGAACTTCGGGTGCGGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
IA-025iv_OMT_Colonial8 CACCCTGTTGAACTTCGGGTGCGGTGCGGTGATTCGAAACGCGGCATT 350
*****
IA-100_OMT_Colonial CATAGGCTTTGTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAA 400
IA-100_OMT_Colonial2 CATAGGCTTTGTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAA 400
IA-036_OMT_Colonial0 CATAGGCTTTGTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAA 400
IA-025iv_OMT_Colonial7 CATAGGCTTTGTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAA 400
IA-025iv_OMT_Colonial2 CATAGGCTTTGTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAA 400
IA-021iv_OMT_Colonial4 CATAGGCTTTGTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAA 400
IA-025iv_OMT_Colonial7 CATAGGCTTTGTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAA 400

```

```

IA-036_OMT_Colonia17      CATAGGCTTTGTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCGAG 400
IA-036_OMT_Colonia19      CGTAAGCCTTGTGAATGGAATGCCCCATCCAAGACCGCATCCTTCAAG 400
IA-021liv_OMT_Colonia20   CGTAAGCCTTGTGAATGGAATGCCCCATCCAAGACCGCATCCTTCAAG 400
IA-025iv_OMT_Colonia8     CGTAAGCCTTGTGAATGGAATGCCCCATCCAAGACCGCATCCTTCAAG 400
* * * * *
IA-100_OMT_Colonia1       TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-100_OMT_Colonia2       TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-036_OMT_Colonia10      TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-025iv_OMT_Colonia7     TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-025iv_OMT_Colonia2     TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-021liv_OMT_Colonia4    TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-025iv_OMT_Colonia17   TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-036_OMT_Colonia17      TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-036_OMT_Colonia19      TGGTACCAGCTCTCCATGAGGACCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-021liv_OMT_Colonia20   TGGTACCAGCTCTCCATGAGGACCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-025iv_OMT_Colonia8     TGGTACCAGCTCTCCATGAGGACCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
* * * * *
IA-100_OMT_Colonia1       GGCCATGGACACCCACCCCTCATA 474
IA-100_OMT_Colonia2       GGCCATGGACACCCACCCCTCATA 474
IA-036_OMT_Colonia10      GGCCATGGACACCCACCCCTCGTA 474
IA-025iv_OMT_Colonia7     GGCCATGGACACCCACCCCTCGTA 474
IA-025iv_OMT_Colonia2     GGCCATGGACACCCACCCCTCGTA 474
IA-021liv_OMT_Colonia4    GGCCATGGACACCCACCCCTCATA 474
IA-025iv_OMT_Colonia17   GGCCATGGACACCCCGCCCTCATA 474
IA-036_OMT_Colonia17      GGCCATGGACACCCCGTCTCATA 474
IA-036_OMT_Colonia19      AGCCATGGACACCCACCCCTCATA 474
IA-021liv_OMT_Colonia20   AGCCATGGACACCCACCCCTCATA 474
IA-025iv_OMT_Colonia8     AGCCATGGACACCCACCCCTCATA 474
* * * * *

```

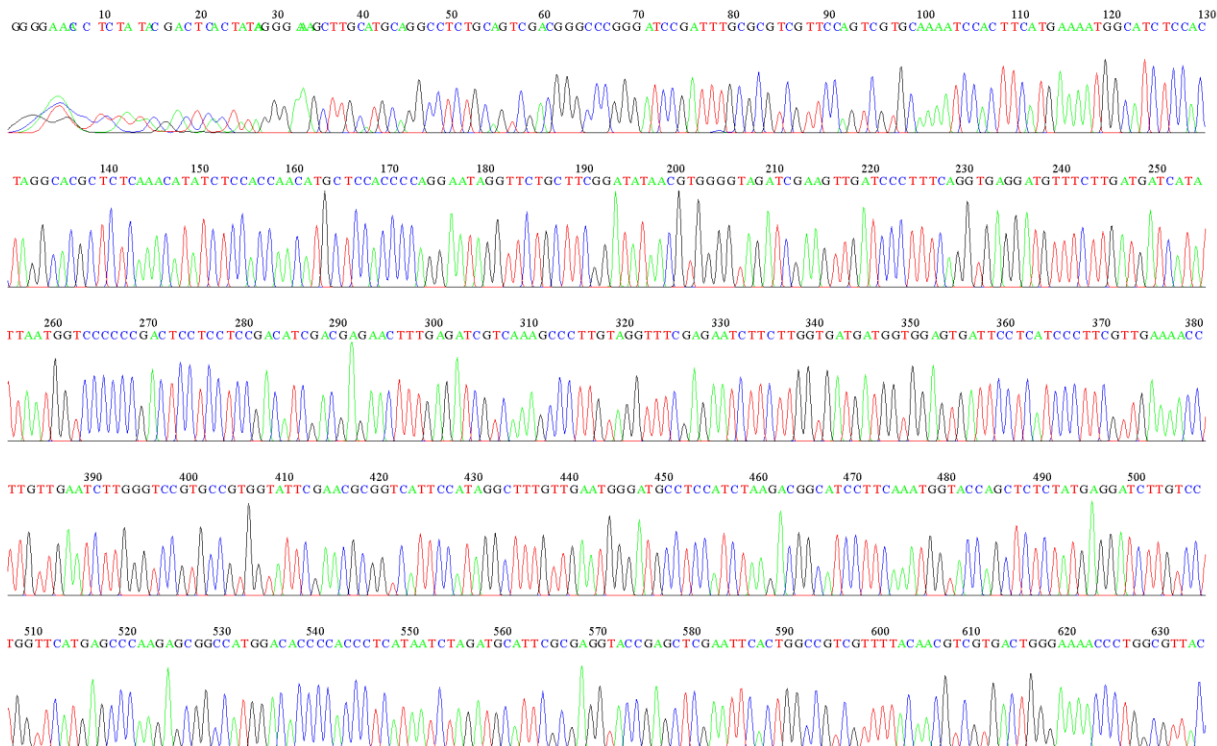


Figura 28. Cromatograma correspondiente a la secuenciación del inserto del amplificado de la enzima OMT en plásmidos recombinantes. La secuencia pertenece a la muestra de IA-036_OMT_Colonia19. Macrogen Korea es el proveedor del servicio de secuenciación.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
IA-100_OMT_Colonia1      TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTCCACTAGGCAC 60
IA-100_OMT_Colonia2      TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTCCACTAGGCAC 60
*****
IA-100_OMT_Colonia1      GCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGAATAGGTTCTGCTTCGGATAT 120
IA-100_OMT_Colonia2      GCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGAATAGGTTCTGCTTCGGATAT 120
*****
IA-100_OMT_Colonia1      AACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTTCAGGTGAGGATGTTCTTGATGATCATATT 180
IA-100_OMT_Colonia2      AACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTTCAGGTGAGGATGTTCTTGATGATCATATT 180
*****
IA-100_OMT_Colonia1      AATGGTCCCCCGACTCCTCCTCCGACATCGACGAGAACTTTGAGATCGTCAAAGCCCTT 240
IA-100_OMT_Colonia2      AATGGTCCCCCGACTCCTCCTCCGACATCGACGAGAACTTTGAGATCGTCAAAGCCCTT 240
*****
IA-100_OMT_Colonia1      GTAGGTTTCGAGAATCTTCTTGTTGATGATGGTGGAGTGATTCCCTCATCCCTTCGTTGAA 300
IA-100_OMT_Colonia2      GTAGGTTTCGAGAATCTTCTTGTTGATGATGGTGGAGTGATTCCCTCATCCCTTCGTTGAA 300
*****
IA-100_OMT_Colonia1      AACCTTGTTGAATCTTGGGTCCGTGCCGTGGTATTCGAACGCGGTCAATCCATAGGCTTT 360
IA-100_OMT_Colonia2      AACCTTGTTGAATCTTGGGTCCGTGCCGTGGTATTCGAACGCGGTCAATCCATAGGCTTT 360
*****
IA-100_OMT_Colonia1      GTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAAATGGTACCAGTCTCTATGAG 420
IA-100_OMT_Colonia2      GTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAAATGGTACCAGTCTCTATGAG 420
*****
IA-100_OMT_Colonia1      GATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGCGGCCATGGACACCCACCCCTCATA 474
IA-100_OMT_Colonia2      GATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGCGGCCATGGACACCCACCCCTCATA 474
*****

```

Figura 29. Alineamiento múltiple de las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los insertos correspondientes a un fragmento de la enzima OMT para el individuo IA-100

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
IA-036_OMT_Colonia10     TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTCCACTAGGCAC 60
IA-036_OMT_Colonia17     TTGCGCGTCGTTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTCCACTAGGCAC 60
IA-036_OMT_Colonia19     TTGTCGTCGTTCCAGTCATGCATAATCCACTTCATGAAAATAGCATCTCCACTCGAAC 60
**** *
IA-036_OMT_Colonia10     GCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGAATGGGTTCTGCTTCGGATAT 120
IA-036_OMT_Colonia17     GCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCTAGGAATAGGTTCTGCTTCGGATAT 120
IA-036_OMT_Colonia19     GCTCACAACATATCTCCACCAATGAATCCACTCCAGAGATTGGTTTTGCTTCGGATAT 120
**** *
IA-036_OMT_Colonia10     AACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTTCAGGTGAGGATGTTCTTGATGATCATATT 180
IA-036_OMT_Colonia17     AACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTTCAGGTGAGGATGTTCTTGATGATCATATT 180
IA-036_OMT_Colonia19     GACATGAGACAAGTCAAAGACAATCCCTTTCAGGTGAGGATGCTTCTTGACTATCATGTT 180
** * *
IA-036_OMT_Colonia10     AATGGTCCCCCGACTCCTCCTCCGACATCGACGAGAACTTTGAGATCGTCAAAGCCCTT 240
IA-036_OMT_Colonia17     AATGGTCCCCCGACTCCTCCTCCGACATCGACGAGAACTTTGAGATCGTCAAAGCCCTT 240
IA-036_OMT_Colonia19     CATGGTCCCTCCGACTCCTCCTACATCGACAAGCACATCGAGATCATCAAAGCCCTT 240
*****
IA-036_OMT_Colonia10     GTAGGTTTCGAGAATCTTCTTGTTGATGATGGTGGAGTGATTCCCTCATCCCTTCGTTGAA 300
IA-036_OMT_Colonia17     GTAGGTTTCGAGAATCTTCTTGTTGATGATGGTGGAGTGATTCCCTCATCCCTTCGTTGAA 300
IA-036_OMT_Colonia19     ATAGGTTTCGAGGATCTTTTGGTGGATGATGGTGGAGTGATTCCCTCATCCCTTCATTGAA 300
*****
IA-036_OMT_Colonia10     AACCTTGTTGAATCTTGGGTCCGTGCCGTGGTATTCGAACGCGGTCAATCCATAGGCTTT 360
IA-036_OMT_Colonia17     AACCTTGTTGAATCTTGGGTCCGTGCCGTGGTATTCGAACGCGGTCAATCCATAGGCTTT 360
IA-036_OMT_Colonia19     CACCTTGTTGAACCTCGGGTCAGTGCCATGGTACTGGAATGCACTCATTCGTAAGCCTT 360
*****
IA-036_OMT_Colonia10     GTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAAATGGTACCAGTCTCTATGAG 420
IA-036_OMT_Colonia17     GTTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAAATGGTACCAGTCTCTATGAG 420
IA-036_OMT_Colonia19     GTTGAATGGAATGCCCCATCCAAGACCGCATCCTTCAAATGGTACCAGTCTCTATGAG 420
*****
IA-036_OMT_Colonia10     GATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGCGGCCATGGAGACCCACCCCTCGTA 474
IA-036_OMT_Colonia17     GATCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGCGGCCATGGAGACCCACCCCTCGTA 474
IA-036_OMT_Colonia19     GACCTTGTCCTGGTTCATGAGCCCAAGAGCGGCCATGGAGACCCACCCCTCGTA 474
** *

```

Figura 30. Alineamiento múltiple de las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los insertos correspondientes a un fragmento de la enzima OMT para el individuo IA-036.


```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
IA-021iv_OMT_Colonia4      TTGCTCGTCCGCTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-021iv_OMT_Colonia20    TTGCGCGTCCGTTCCAGTCCAGTATGATAATCCACTTCATGAAAATAGCATATC 50
*****
IA-021iv_OMT_Colonia4      CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-021iv_OMT_Colonia20    CACTCGGAACGCTCACAACATATCTCCACCAATGAACTCCACTCCAGAG 100
*****
IA-021iv_OMT_Colonia4      ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-021iv_OMT_Colonia20    ATTGGTTTTGCTTCGGATACGACATGAGACAAGTCAAAGACAATCCCTTT 150
*****
IA-021iv_OMT_Colonia4      CAGGTGAGGATGTTTCTTGATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-021iv_OMT_Colonia20    CAAGTGAGGATGCTTCTTGACTATCATGTTCATGGTCCCTCCGACTCCCTC 200
*****
IA-021iv_OMT_Colonia4      CTCCGACATCGACGAGAACTTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-021iv_OMT_Colonia20    CTCCACATCGACAAGCACTTGAGATCATCAAAGCCCTTATAGGTTTCG 250
*****
IA-021iv_OMT_Colonia4      AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCTTCGTTGAA 300
IA-021iv_OMT_Colonia20    AGGATCTTTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCTTCATGAA 300
*****
IA-021iv_OMT_Colonia4      AACCTTGTGAATCTTGGGTCCGTGCCGTGGTATTCGAACGCGGTCAATC 350
IA-021iv_OMT_Colonia20    CACCCTGTTGAACCTCGGGTCACTGCCATGGTACTGGAATGCACACTC 350
*****
IA-021iv_OMT_Colonia4      CATAGGCTTGTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCCTCAA 400
IA-021iv_OMT_Colonia20    CGTAAGCCTTGTGAATGGGATGCCCCATCCAAGACGGCATCCCTCAA 400
*****
IA-021iv_OMT_Colonia4      TGGTACCAGCTCTCATGAGGATCTTGTCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-021iv_OMT_Colonia20    TGGTACCAGCTCTCCATGAGGACCTTGTCTGGTTCATGAGCCCAAGAGC 450
*****
IA-021iv_OMT_Colonia4      GGCCATGGAGACCCACCTCATA 474
IA-021iv_OMT_Colonia20    AGCCATGGACACCCATCCTCATA 474
*****

```

Figura 31. Alineamiento múltiple de las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los insertos correspondientes a un fragmento de la enzima OMT para el individuo IA-021 obtenido de cultivo *In vitro*.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
IA-025iv_OMT_Colonia2      TTGCTCGTCCGCTCCAGTCGTGCAAAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-025iv_OMT_Colonia7      TTGCGCGTCCGTTCCAGTCCAGTATGATAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-025iv_OMT_Colonia17     TTGCGCGTCCGTTCCAGTCCAGTATGATAATCCACTTCATGAAAATGGCATCTC 50
IA-025iv_OMT_Colonia8      TTGCGCGTCCGTTCCAGTCCAGTATGATAATCCACTTCATGAAAATAGCATATC 50
*****
IA-025iv_OMT_Colonia2      CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-025iv_OMT_Colonia7      CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-025iv_OMT_Colonia17     CACTAGGCACGCTCTCAAACATATCTCCACCAACATGCTCCACCCAGGA 100
IA-025iv_OMT_Colonia8      CACTCGGAACGCTCACAACATATCTCCACCAATGAACTCCACTCCAGAG 100
*****
IA-025iv_OMT_Colonia2      ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-025iv_OMT_Colonia7      ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-025iv_OMT_Colonia17     ATAGGTTCTGCTTCGGATATAACGTGGGGTAGATCGAAGTTGATCCCTTT 150
IA-025iv_OMT_Colonia8      ATTGGTTTTGCTTCGGATACGACATGAGACAAGTCAAAGACAATCCCTTT 150
*****
IA-025iv_OMT_Colonia2      CAGGTGAGGATGTTTCTTGATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-025iv_OMT_Colonia7      CAGGTGAGGATGTTTCTTGATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-025iv_OMT_Colonia17     CAGGTGAGGATGTTTCTTGATGATCATATTAATGGTCCCCCGACTCCCTC 200
IA-025iv_OMT_Colonia8      CAAGTGAGGATGCTTCTTGACTATCATGTTCATGGTCCCTCCGACTCCCTC 200
*****
IA-025iv_OMT_Colonia2      CTCCGACATCGACGAGAACTTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-025iv_OMT_Colonia7      CTCCGACATCGACGAGAACTTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-025iv_OMT_Colonia17     CTCCGACATCGACGAGAACTTTGAGATCGTCAAAGCCCTTGTAGGTTTCG 250
IA-025iv_OMT_Colonia8      CTCCACATCGACAAGCACTTGAGATCATCAAAGCCCTTATAGGTTTCG 250
*****
IA-025iv_OMT_Colonia2      AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCTTCGTTGAA 300
IA-025iv_OMT_Colonia7      AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCTTCGTTGAA 300
IA-025iv_OMT_Colonia17     AGAATCTTCTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCTTCGTTGAA 300
IA-025iv_OMT_Colonia8      AGGATCTTTTGGTGATGATGGTGGAGTGATTCCTCATCCCTTCATGAA 300
*****
IA-025iv_OMT_Colonia2      AACCTTGTGAATCTTGGGTCCGTGCCGTGGTATTCGAACGCGGTCAATC 350
IA-025iv_OMT_Colonia7      AACCTTGTGAATCTTGGGTCCGTGCCGTGGTATTCGAACGCGGTCAATC 350
IA-025iv_OMT_Colonia17     AACCTTGTGAATCTTGGGTCCGTGCCGTGGTATTCGAACGCGGTCAATC 350
IA-025iv_OMT_Colonia8      CACCCTGTTGAACCTCGGGTCACTGCCATGGTACTGGAATGCACACTC 350
*****
IA-025iv_OMT_Colonia2      CATAGGCTTGTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCCTCAA 400
IA-025iv_OMT_Colonia7      CATAGGCTTGTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCCTCAA 400
*****

```

```

IA-025iv_OMT_Colonia17    CATAGGCTTGTGAATGGGATGCCTCCATCTAAGACGGCATCCTTCAA 400
IA-025iv_OMT_Colonia8    CGTAAGCCTTGTGAATGGAATGCCCCATCCAAGACCGCATCCTTCAAG 400
* * * * *
IA-025iv_OMT_Colonia2    TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCTGTTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-025iv_OMT_Colonia7    TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCTGTTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-025iv_OMT_Colonia17    TGGTACCAGCTCTCTATGAGGATCTTGTCTGTTTCATGAGCCCAAGAGC 450
IA-025iv_OMT_Colonia8    TGGTACCAGCTCTCCATGAGGACCTTGTCTGTTTCATGAGCCCAAGAGC 450
* * * * *
IA-025iv_OMT_Colonia2    GGCCATGGACACCCACCCCTCGTA 474
IA-025iv_OMT_Colonia7    GGCCATGGACACCCACCCCTCGTA 474
IA-025iv_OMT_Colonia17    GGCCATGGACACCCACCCCTCGTA 474
IA-025iv_OMT_Colonia8    AGCCATGGACACCCACCCCTCGTA 474
* * * * *

```

Figura 32. Alineamiento múltiple de las secuencias de ADNc obtenidas a partir de los insertos correspondientes a un fragmento de la enzima OMT para el individuo IA-025 obtenido de cultivo *In vitro*.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
IA-100_OMT_Colonia1      YEGGVSM AALGLMNQDKILIESWYHLKDAVLDGGIPFNKAYGMTAF EYHG 50
IA-036_OMT_Colonia10    YEGGVSM AALGLMNQDKILIESWYHLKDAVLDGGIPFNKAYGMTAF EYHG 50
IA-025iv_OMT_Colonia7   YEGGVSM AALGLMNQDKILIESWYHLKDAVLDGGIPFNKAYGMTAF EYHG 50
IA-025iv_OMT_Colonia17  YEGGVSM AALGLMNQDKILIESWYHLKDAVLDGGIPFNKAYGMTAF EYHG 50
* * * * *
IA-100 OMT Colonia1     TDPRFNKVFNEGMRNHSTIITKKILETYKGFDDLKVLVDVGGGVGGTINM 100
IA-036 OMT Colonia10    TDPRFNKVFNEGMRNHSTIITKKILETYKGFDDLKVLVDVGGGVGGTINM 100
IA-025iv_OMT Colonia7   TDPRFNKVFNEGMRNHSTIITKKILETYKGFDDLKVLVDVGGGVGGTINM 100
IA-025iv_OMT Colonia17  TDPRFNKVFNEGMRNHSTIITKKILETYKGFDDLKVLVDVGGGVGGTINM 100
* * * * *
IA-100 OMT Colonia1     IIKKH PHLKGINFDLPHVISEAEPIPGVEHVGGDMFESVPSGDAIFMKWI 150
IA-036 OMT Colonia10    IIKKH PHLKGINFDLPHVISEAEPIPGVEHVGGDMFESVPSGDAIFMKWI 150
IA-025iv_OMT Colonia7   IIKKH PHLKGINFDLPHVISEAEPIPGVEHVGGDMFESVPSGDAIFMKWI 150
IA-025iv_OMT Colonia17  IIKKH PHLKGINFDLPHVISEAEPIPGVEHVGGDMFESVPSGDAIFMKWI 150
* * * * *
IA-100 OMT Colonia1     LHDW NDAQX 159
IA-036 OMT Colonia10    LHDW NDAQX 159
IA-025iv_OMT Colonia7   LHDW NDAQX 159
IA-025iv_OMT Colonia17  LHDW NDAQX 159
* * * * *

```

Figura 33. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos obtenidas del proceso de traducción. Se obtiene la misma secuencia de aminoácidos para los 4 insertos descritos en el alineamiento, los cuales provienen de los individuos IA-100, IA-036 e IA-025iv.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
IA-036_OMT_Colonial9      YEGGVSM AALGLMNQDKVLMESWYHLKDAVL DGGIPFNKAYGMSAFQYHG 50
IA-025iv_OMT_Colonial8   YEGGVSM AALGLMNQDKVLMESWYHLKDAVL DGGIPFNKAYGMSAFQYHG 50
IA-021liv_OMT_Colonial20 YEDGVSM AALGLMNQDKVLMESWYHLKDAVL DGGIPFNKAYGMSAFQYHG 50
IA-021liv_OMT_Colonial4  YEGGVSM AALGLMNQDKILIESWYHLKDAVL DGGIPFNKAYGMTAFEYHG 50
IA-025iv_OMT_Colonial2   YEGGVSM AALGLMNQDKILIESWYHLKDAVL DGGIPFNKAYGMTAFEYHG 50
IA-036_OMT_Colonial7     YEDGVSM AALGLMNQDKILIESWYHLSKDAVL DGGIPFNKAYGMTAFEYHG 50
**.*.....*.*:***** ..*.....*.*:***

IA-036_OMT_Colonial9      TDPFRN RVFN EGM RNHSTII TKKILE TYKGFDDLDVLDV DVG GVG GTMNM 100
IA-025iv_OMT_Colonial8   TDPFRN RVFN EGM RNHSTII TKKILE TYKGFDDLDVLDV DVG GVG GTMNM 100
IA-021liv_OMT_Colonial20 TDPFRN RVFN EGM RNHSTII TKKILE TYKGFDDLDVLDV DVG GVG GTMNM 100
IA-021liv_OMT_Colonial4  TDPFRN KVFNE GM RNHSTII TKKILE TYKGFDDLDKVLVDV GGGV GGTINM 100
IA-025iv_OMT_Colonial2   TDPFRN KVFNE GM RNHSTII TKKILE TYKGFDDLDKVLVDV GGGV GGTINM 100
IA-036_OMT_Colonial7     TDPFRN KVFNE GM RNHSTII TKKILE TYKGFDDLDKVLVDV GGGV GGTINM 100
*****:***** ..*.....*.*:***

IA-036_OMT_Colonial9      IVKKHPHL KGIVFDLSHV VSEAKPISGV EFIGGDMFVSVPSGDAIFMKWI 150
IA-025iv_OMT_Colonial8   IVKKHPHL KGIVFDLSHV VSEAKPISGV EFIGGDMFVSVPSGDAIFMKWI 150
IA-021liv_OMT_Colonial20 IVKKHPHL KGIVFDLSHV VSEAKPISGV EFIGGDMFVSVPSGYAIFMKWI 150
IA-021liv_OMT_Colonial4  I I K K H P H L K G I N F D L P H V I S E A E P I P G V E H V G G D M F E S V P S G D A I F M K W I 150
IA-025iv_OMT_Colonial2   I I K K H P H L K G I N F D L P H V I S E A E P I P G V E H V G G D M F E S V P S G D A I F M K W I 150
IA-036_OMT_Colonial7     I I K K H P H L K G I N F D L P H V I S E A E P I P R V E H V G G D M F E S V P S G D A I F M E W I 150
*:*.....* *..*:*:*:* * * .:***** ..*.....*.*:***

IA-036_OMT_Colonial9      MHDWNDEQX 159
IA-025iv_OMT_Colonial8   MHDWGDAQX 159
IA-021liv_OMT_Colonial20 MHDWNDAQX 159
IA-021liv_OMT_Colonial4  LHDWSDEQX 159
IA-025iv_OMT_Colonial2   LHDWDDEQX 159
IA-036_OMT_Colonial7     LHDWNDAQX 159
:***.* **

```

Figura 34. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos obtenidas del proceso de traducción, a partir del cual se identifican 6 secuencias diferentes.