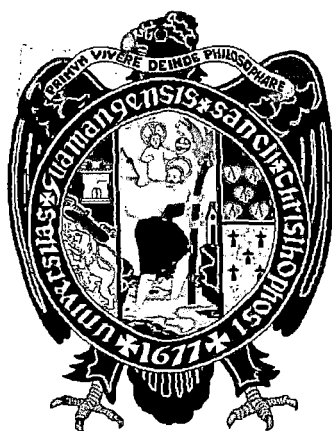


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**EVALUACIÓN DE SECUENCIAS DEL GEN ITS DE ROYA AMARILLA
(*Puccinia striiformis f. sp. hordei*) MONOPUSTULAR EN CEBADA
(*Hordeum vulgare*) Y PASTO OVILLO (*Dactylis glomerata*).**

**Tesis para obtener el título profesional de
INGENIERA AGRÓNOMA**

**Presentado por:
EUGENIA ROCÍO QUISPE MEDINA**

AYACUCHO – PERÚ

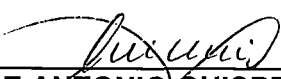
2014

Tesis
Ag 1138
Qui
Ej. 1

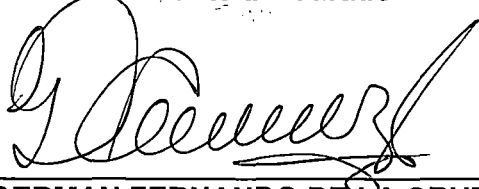
**"EVALUACIÓN DE SECUENCIAS DEL GEN ITS DE ROYA AMARILLA
(Puccinia striiformis f. sp. hordei) , MONOPUSTULAR EN CEBADA
(Hordeum vulgare) Y PASTO OVILLO (Dactylis glomerata).**

Recomendado : 10 de diciembre del 2014

Aprobado : 18 de diciembre del 2014



M.Sc. JOSE ANTONIO QUISPE TENORIO
Presidente del Jurado



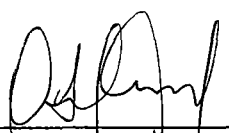
M.Sc. GERMAN FERNANDO DE LA CRUZ LAPA
Miembro del Jurado



Ing. WILFREDO DANIEL GONZALES GUZMAN
Miembro del Jurado



Ing. EDUARDO ROBLES GARCÍA
Miembro del Jurado



Dr. ROMULO AGUSTIN SOLANO RAMOS
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

DEDICATORIA

*A Dios que me ha dado la vida,
fortaleza y salud para terminar
este proyecto de investigación.*

*A mis padres Esteban Quispe y
Adriana Medina, mis hermanos
Vanessa y Carlos. A ellos que me
enseñaron a ser perseverante,
afrontando los retos y a vencer los
obstáculos que se presentan en
cada etapa de la vida.*

*A mis maestros, por los
conocimientos aportados para
mi formación profesional.*

Eugenia Rocío

AGRADECIMIENTOS

- A la universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Alma Mater de mi formación profesional. A mis profesores de la Facultad de Ciencias Agrarias, quienes impartieron conocimientos y experiencias en mi formación profesional.
- A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por permitir que desarrolle la presente investigación en la Unidad de Genómica; mediante el PROYECTO: CRP/PER11-01 "*Races of rust affecting barley production of andean farmers*" INTERNATIONAL CENTER FOR GENETIC ENGINEERING.
- Al M.Sc. Germán De La Cruz Lapa, gestor y asesor del presente trabajo de investigación, por sus sugerencias impartidas en la ejecución y culminación de este trabajo de investigación.
- Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- A mis amigos y compañeros tesisistas de Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal por su apoyo incondicional durante la ejecución del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice	iv
INTRODUCCIÓN	01
CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	03
1.1 CEBADA (<i>Hordeum vulgare</i>)	
1.1.1 Origen	03
1.1.2 Morfología y Taxonomía	03
1.1.3 Importancia económica y distribución geográfica	05
1.1.4 Mejora genética	06
1.1.5 Importancia de la roya amarilla en cebada	07
1.2 PASTO OVILLO (<i>Dactylis glomerata</i>)	
1.2.1 Distribución y adaptación	08
1.2.2 Clasificación taxonómica	08
1.2.3 Características y manejo	09
1.2.4 Importancia agronómica	10
1.3 PATÓGENO (<i>Puccinia striiformis</i> f.sp.hordei)	
1.3.1 Características del patógeno	11
1.3.2 Epidemiología	11
1.3.3 Hospedante	11
1.3.4 Ciclo de vida del patógeno	12
1.3.5 Características de la estructura del patógeno	14
1.3.6 Distribución de la roya y sus hospederos	15
1.3.7 Diferencias comparativas entre las principales royas que atacan a la cebada	18
1.3.8 Cultivo monopustular de royas	18

1.4ADN (ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO)	
1.4.1 Cromosoma	20
1.4.2 ADN Ribosómico	21
1.4.3 Extracción de ADN	21
1.4.4 Protocolos de extracción de ADN	23
1.5REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	
1.5.1 Ciclos térmicos	27
1.5.2 DNA patrón	29
1.5.3 Iniciadores	31
1.5.4 Trifosfatos de Desoxinucleosidos (dNTPs)	33
1.5.5 Promotores e inhibidores de PCR	33
1.6ELECTROFORESIS	34
1.7PROGRAMAS BIOINFORMATICOS	
1.7.1 Programa BLAST	36
1.7.2 Programa CLUSTAL	37
 CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 LUGAR DEL EXPERIMENTO	
2.1.1 Ubicación	39
 2.2 MATERIALES	39
 2.3 MÉTODOS	
2.3.1 Colección del inóculo	41
2.3.2 Cultivo monopustular de roya amarilla	43
2.3.3 Extracción de DNA con el método CTAB	48
2.3.4 Protocolo de amplificación del gen ITS mediante PCR	53
2.3.5 Elución de la banda del ADN Ribosomal	57
2.3.6 Evaluación de secuencias mediante programas bioinformáticos	59

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DE LA METODOLOGIA PARA CULTIVOS MONOPUSTULARES

3.1.1 Evaluación de la inoculación en pasto ovillo	60
3.1.2 Evaluación de la inoculación en cebada	67
3.1.3 Descripción biométrica y morfológica de esporas	70

3.2 DE LA ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO.

3.2.1 De la evaluación y uso de proteinasa "K" en la extracción DNA	74
3.2.2 De la extracción de DNA para PCR	77
3.2.3 De la estandarización del PCR	79

3.3 DE LA COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DEL GEN ITS DEL ADN RIBOSOMAL

3.3.1 De los resultados del secuenciamiento del gen ITS del ADN ribosomal	82
3.3.2 Análisis bioinformático de secuencias del gen ITS del ADN ribosomal mediante el programa BLAST	84
3.3.3 Alineamiento de secuencias del gen ITS del ADN Ribosomal mediante el programa CLUSTAL	93

CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES	98
4.2 RECOMENDACIONES	100
RESUMEN	101
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	103
ANEXOS	109

INTRODUCCIÓN

Se mencionan que las royas de los cereales son las enfermedades más distribuidas y económicamente importantes a nivel mundial. Tres distintas royas, la roya de la hoja, la roya amarilla o roya rayada, y la roya del tallo, se manifiestan en trigo y cebada. Se menciona muy poca o nula referencia bibliográfica acerca del posible hospedero de la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f.sp. *hordei*) en cebada, el cual es un patógeno importante en las zonas donde se cultiva cebada para la elaboración de la malta.

Los resultados del presente trabajo de investigación mediante biología molecular permiten la identificación y comparación mediante biología molecular, de secuencias del gen ITS del ADN ribosomal de la roya amarilla (*Puccinia striiformis*) en cebada y pasto ovillo.

La existencia de un posible hospedero de roya amarilla del cultivo de cebada, y la aplicación de métodos moleculares en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal permite desarrollar los siguientes objetivos:

- Implementar métodos moleculares en la Unidad de Genómica – Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal – FCA-UNSCH para la comparación de secuencias de ADN ribosomal (ADNr) e identificación molecular de la roya amarilla de cebada y pasto ovillo.
- Desarrollar una metodología para cultivos monospustular de roya amarilla en cebada y pasto ovillo.
- Estandarizar el protocolo de extracción de ADN genómico de roya amarilla en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal – FCA-UNSCH.
- Comparar las secuencias del gen ITS del ADN ribosomal (ADNr) de roya amarilla de cebada y pasto ovillo.

CAPITULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 LA CEBADA (*Hordeum vulgare*)

1.1.1 ORIGEN

Su cultivo se conoce desde tiempos remotos y se supone que procede de dos centros de origen situados en el Sudeste de Asia y África septentrional. Se cree que fue una de las primeras plantas domesticadas al comienzo de la agricultura. En excavaciones arqueológicas realizadas en el valle del Nilo se descubrieron restos de cebada, en torno a los 15.000 años de antigüedad. Instituto de Investigaciones Agrícolas (1980).

1.1.2 MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA.

La cebada pertenece a la familia *Poaceae*. Las cebadas cultivadas se distinguen por el número de espiguillas que quedan en cada diente del raquis. Si queda solamente la espiguilla intermedia, mientras abortan las laterales, tendremos la cebada de dos carreras (*Hordeum distichum*); si

aborta la espiguilla central, quedando las dos espiguillas laterales, tendremos la cebada de cuatro carreras (*Hordeum tetrastichum*); si se desarrollan las tres espiguillas tendremos la cebada de seis carreras (*Hordeum hexastichum*), Molina (1989), también menciona que las características morfológicas de la cebada son las siguientes:

Hojas: La planta de cebada suele tener un color verde más claro que el del trigo y en los primeros estadios de su desarrollo la planta de trigo suele ser más erguida.

Tallo: El tallo es erecto, grueso, formado por unos seis u ocho entrenudos, los cuales son más anchos en la parte central que en los extremos junto a los nudos.

Flores: las flores tienen tres estambres y un pistilo de dos estigmas. Es autógama, las flores abren después de haberse realizado la fecundación, lo que tiene importancia para la conservación de los caracteres de una variedad determinada.

Fruto: el fruto es en cariósipide, con las glumillas adheridas, salvo en el caso de la cebada desnuda.



FIGURA N° 01: Cebada (*Hordeum vulgare*) en espigamiento.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA: Según Molina (1989).

REINO :Plantae

DIVISIÓN :Magnoliophyta

CLASE :Liliopsida

ORDEN :Poales

FAMILIA :Poaceae

SUBFAMILIA:Pooideae

TRIBU :Triticeae

GÉNERO :Hordeum

ESPECIE :*Hordeum vulgare* L.

1.1.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Según, Quispe (2012), la cebada ocupa el cuarto lugar en importancia entre los cereales después del trigo, maíz y arroz. La razón de su importancia se debe a su amplia adaptación ecológica y la diversidad de aplicaciones. A continuación se muestran los principales países productores a nivel mundial.

CUADRO N° 01: Principales países productores de cebada. Quispe (2012).

Cuadro 2. Producción de cebada por países. Campañas 2005/06 a 2008/09 (millones de t)				
	2005/06	2006/07	2007/08 (estimaciones)	2008/09 (previsiones)
UE	54,9	56,1	57,7	61,9
Rusia	15,8	18,2	15,6	18,0
Canadá	12,5	9,6	11,0	10,5
Australia	9,6	4,2	5,9	9,2
Ucrania	9,0	11,3	6,7	9,2
EEUU	4,6	3,9	4,6	4,8
China	3,4	3,6	3,6	3,7
Kazajstán	2,1	2,3	2,5	2,5
Marruecos	1,1	2,5	0,8	1,5
Argentina	1,3	1,2	1,1	1,1
Otros	25,3	25,6	26,0	26,2
Total	139,0	138,5	135,5	148,6

La superficie sembrada de cebada grano en la región de acuerdo a la estadística agraria de las últimas 10 campañas agrícolas, reporta un incremento de 44.24% en el ámbito de la Región Ayacucho. Dicha superficie durante la campaña agrícola 2003-2004 fue de 10,546 hectáreas, mientras que en la campaña 2012-2013 fue de 15,212 ha, mostrando una tasa de crecimiento anual de 4.15%. En la región Ayacucho en la última década de acuerdo al análisis estadístico de Información Agraria se puede observar que su principal productor del cultivo de cebada grano es la provincia de Huamanga. (AGENCIAS AGRARIAS DRA-AYACUCHO, 2015)

CUADRO N° 02: Distribución del consumo de cebada. (IMPACTO AGRARIO, 2015)

PROVINCIA/AÑOS	CCCC	2011	2012	2013	TOTAL	%
Huamanga	5943	1310	5168	7219	44118	37
Cangallo	1697	975	1593	2050	15956	14
Huanta	636	473	710	674	6452	5
La Mar	562	374	386	575	4784	4
Victor Fajardo	1036	689	942	1052	9748	8
Vilcas Huaman	747	424	672	695	5922	5
Huanca Sancos	302	212	310	256	2386	2
Sucre	315	205	232	226	2936	2
Lucanas	1240	1611	1829	1955	13735	12
Parinacochas	863	908	699	867	9540	8
Paucar del Sara Sara	126	215	301	330	2407	2
Fuente: Agencias Agrarias: - DRA - Ayacucho					117984	100

1.1.4 MEJORA GENÉTICA.

Según, Cuidad (2006), la cebada tiene siete cromosomas con más de cien genes que se encuentran localizados, también menciona que la mejora genética se basa en obtener nuevas variedades que sean más

productivas, con unos rendimientos más estables y de mejor calidad, pero el objetivo prioritario es el incremento del rendimiento en grano. Para lograrlo hay que actuar sobre la adaptación ecológica y la resistencia a plagas y enfermedades. La resistencia al encamado repercute directamente sobre el rendimiento a través de una mejor granazón.

La resistencia a plagas y enfermedades se considera un factor determinante en la estabilidad de los rendimientos del cultivo, al poder alterarlos cuando se dan las condiciones ambientales para el desarrollo del patógeno.

(Rodríguez, 2010), menciona que la cebada destinada para alimentación animal el criterio de calidad más importante, es el alto contenido de proteínas y bajo contenido en fibra. Existen programas de mejora genética en cuanto al incremento del contenido de lisina del grano. Muchas variedades actuales de cervecería están siendo empleadas en la alimentación animal, por su alto contenido de proteínas y carbohidratos solubles, y por la proporción relativamente baja de fibra que poseen.

1.1.5 IMPORTANCIA DE LA ROYA AMARILLA EN CEBADA.

(Gilchrist et al, 1982), mencionan que las royas de los cereales son las enfermedades más distribuidas y económicamente importantes a nivel mundial. Tres distintas royas, la roya de la hoja, la roya amarilla o roya rayada, y la roya del tallo, se manifiestan en trigo y cebada. También mencionan que los hongos que causan estas enfermedades son notorios por su habilidad de incrementarse rápidamente y sobrellevar o

contrarrestar la resistencia en las variedades de trigo y cebada. Las pérdidas en cosecha causadas por estas enfermedades dependen de la susceptibilidad del hospedero y las condiciones climáticas, pero las pérdidas también son influenciadas por la fecha de manifestación y severidad de los brotes de la enfermedad relativos a la etapa de crecimiento del cultivo.

1.2 PASTO OVILLO (*Dactylis glomerata*)

1.2.1 DISTRIBUCIÓN Y ADAPTACIÓN

(Muslera y Ratera, 1991), mencionan que este pasto se encuentra en gran parte de las regiones de clima templado del hemisferio norte: Europa (es nativo del oeste y centro de Europa), Asia y norte de África. En América del Norte se encuentra en Canadá y Estados Unidos. En el Hemisferio Sur destaca su presencia en Nueva Zelanda y América del Sur (Chile, Argentina). No crece a temperaturas menores de 5°C y en primavera tiene un gran desarrollo pero lento al principio.

1.2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA: Según, (Hughes et al, 1966).

REINO	:Plantae
DIVISION	:Magnoliophyta
CLASE	:Liliopsida
ORDEN	:Poales
FAMILIA	:Poaceae
SUB-FAMILIA	:Pooideae

TRIBU :Poeae
GENERO :Dactylis
ESPECIE :*Dactylis glomerata*

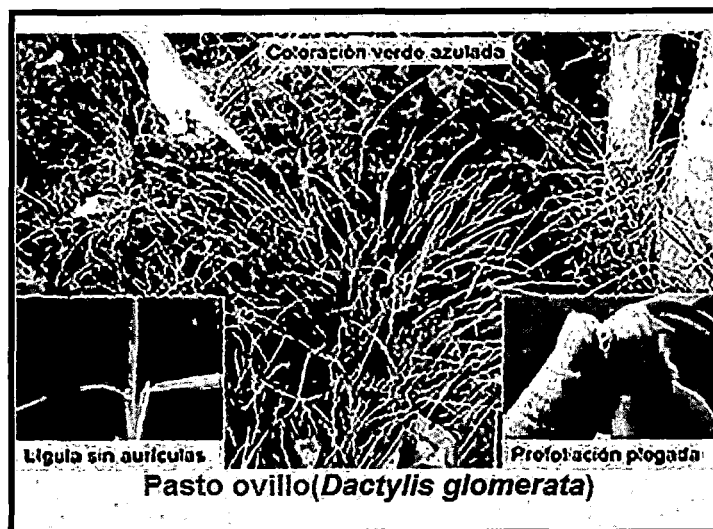


FIGURA N° 02: Descripción botánica del pasto ovillo.

1.2.3 CARACTERÍSTICAS Y MANEJO

(Hughes et al, 1966), mencionan que la siembra es preferible en primavera, época en la que tiene un gran crecimiento, pero en el norte de España puede haber problemas debido a las sequías de verano. Sembrar a finales de verano y en otoño da buenos resultados si se deja el tiempo suficiente para que se establezcan las plántulas. Además, si se siembra a principios de otoño el cultivo podrá establecerse antes de las heladas.

También mencionan que el pasto ovillo se adapta bien a las condiciones climáticas de la Península y posee diversas variedades, gracias a ello su uso está ampliamente extendido, pero en casi todas las mezclas es secundaria respecto a otras gramíneas. Por lo general la fertilización es esencial para un alto rendimiento.

1.2.4 IMPORTANCIA AGRONÓMICA.

(Hughes et al, 1966), mencionan que esta planta produce un buen forraje cuando es joven pero pierde enseguida su calidad y digestibilidad al florecer. Si es sometido a defoliaciones muy severas y frecuentes mediante siega o pastoreo (sobre todo mediante pastoreo) las sustancias de reserva desaparecerán, su capacidad de regeneración se verá limitada y además de producir menos puede morir.

Las asociaciones de dátilo y leguminosas necesitan siega y pastoreo o su combinación para aprovecharlo cuando aún es joven y apetecible para el ganado y para mantener un buen equilibrio entre ambos.

1.3 PATÓGENO (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei).

(Aguirre, 1992), menciona que *Puccinia striiformis* f.sp. hordei, es el patógeno responsable de la enfermedad denominado "roya". Es un hongo de la clase de los basidiomicetos y es considerado un parásito obligado; ya que muchos biotipos tienen una capacidad muy limitada para desarrollarse "in vitro". El ciclo de vida de estos patógenos depende de la existencia de un hospedero alternante o de un hospedero graminícola, en el caso de *Puccinia striiformis* f.sp. hordei, en nuestro medio no se ha registrado ningún hospedero alternante, según Hoog et al, (1969); motivo por el cual las teliosporas no cumplen papel alguno en el ciclo de vida del patógeno.

1.3.1 CARACTERÍSTICAS DEL PATÓGENO.

TAXONOMÍA.

(Garcia et al, 2010), manifiestan que la posición taxonómica de la *Puccinia striiformis f.sp. hordei* es la siguiente:

Reino	:Mycetae (fungi)
División	:Myxomycota
Subdivisión	:Basidiomicotina
Clase	:Hemibasidiomycetes
Orden	:Uredinales
Familia	:Pucciniaceae
Género	:Puccinia
Especie	: <i>Puccinia striiformis f. sp. hordei</i>



1.3.2 EPIDEMIOLOGIA.

Según (Hacke y Ramirez, 1981), las uredosporas son el estadio infectivo que origina la formación de epifitas. Además es importante para la caracterización del curso de una epifita en la roya, el tomar en cuenta el periodo de tiempo que se sucede entre la infección y la aparición de los uredosporas (período de latencia), así como del período de infección.

1.3.3 HOSPEDANTE.

- **Temperatura**

Las temperaturas adecuadas para el desarrollo del cultivo dependen del estado vegetativo del mismo. Son recomendables las bajas temperaturas

durante el periodo de plántulas y altas en el momento de la cosecha, pero *Puccinia striiformis f.sp. hordei* prospera en zonas con temperatura entre 18 a 22 °C, según Hacke y Ramírez, (1981) y las temperaturas fluctuantes alrededor de los 20 °C son los ideales para el desarrollo normal de la roya.

- **Humedad**

Es también otro factor importante para la germinación de la espora en la superficie foliar así como para la penetración hacia el interior del tejido vegetal, es decir en el desarrollo de la hifa infectiva.

La humedad relativa óptima para la infección y germinación de las uredosporas es de 72.5% a 100%.

1.3.4 CICLO DE VIDA DEL PATÓGENO

(Zilinsky, 1984), afirma que las infecciones primarias son producidas por las uredosporas transportadas por el viento, a veces desde muy lejos. La enfermedad avanza con rapidez cuando existe humedad (lluvia o rocío) y la temperatura oscila entre 10 y 20°C. Con temperaturas superiores a los 25°C, se interrumpe o reduce la producción de uredosporas y a menudo aparecen teliosporas negras.

(Arbeláez y Esparza, 1976), mencionan que *Puccinia striiformis*, se reproduce mediante uredosporas, las cuales propagan la enfermedad; las uredosporas son diseminadas principalmente por el viento y en menor escala por el agua, la ropa y las herramientas. Bajo condiciones favorables las uredosporas germinan sobre las plantas de cebada

produciendo un tubo germinativo provisto de un apresorio, el cual penetra a través de las estomas, crece entre las células de la planta y es capaz de emitir haustorios. Después del desarrollo del hongo dentro de los tejidos de la planta, se producen nuevamente uredosporas.

También menciona que la duración entre el momento de la germinación de la uredospora, la penetración dentro de la planta y la producción de nuevas uredosporas mediante infección, es de 12 a 13 días bajo condiciones favorables.

Cuando la planta madura se inicia la formación de teliosporas, las cuales germinan produciendo basidiosporas que son diseminadas principalmente por el viento, pero que no producen infección directa en cebada. Hasta ahora no se ha encontrado la planta que actúe como hospedero alternante de la *Puccinia striiformis*. Y mencionan que el hongo, en ausencia de cultivos de cebada, sobrevive mediante fracciones de micelio o con uredosporas en residuos de cosecha, o en pastos hospederos silvestres o cultivados, a pesar de que las uredosporas tienen un periodo relativamente corto de viabilidad. El hongo no se transmite a través de la semilla. Mientras que en tubos destapados dentro de un desecador permanecen viables durante 68 días. Sin embargo estas esporas tienen menor viabilidad que las esporas de otras royas que atacan la cebada y el trigo.

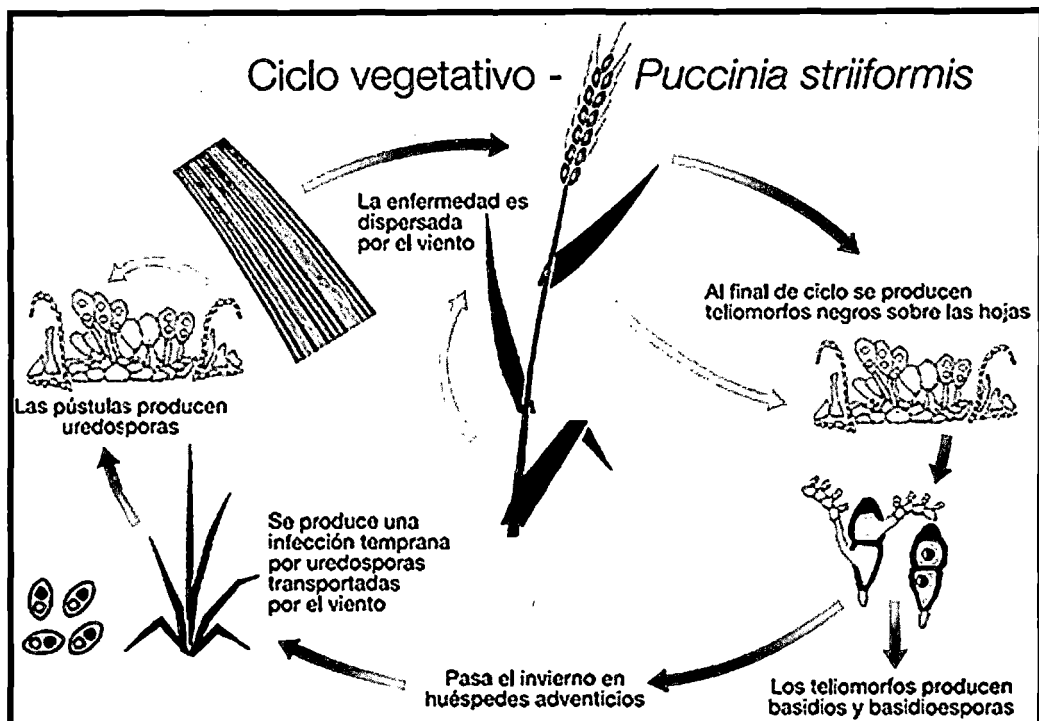


FIGURA N° 03: Ciclo vegetativo de *Puccinia striiformis*. Arbeláez y Esparza, (1976)

1.3.5 CARACTERÍSTICAS DE LAS ESTRUCTURAS DEL PATÓGENO

(Arbeláez y Esparza, 1976), mencionan que esta roya se caracteriza por producir pustulas pequeñas (0.2 – 0.5 mm) de color amarillo, alargados y dispuestos en forma ordenada y paralelamente en líneas (uredosporas) predominando en la cara inferior de las hojas.

También mencionan que los uredos amarillos localizados por ambos lados de las hojas, en largas líneas o bandas, uredosporas globosas o elipsoidales, de 25 – 30 x 20 – 24 micras con una pared de 1.5 micras de espesor, de color amarillo a incoloras, ligeramente equinuladas. Teliósporas biceladas, lisas, de 40 – 60 x 17-23 micras, de formas variables, pero la mayoría oblongas a oblongo-clavadas, de color marrón claro.

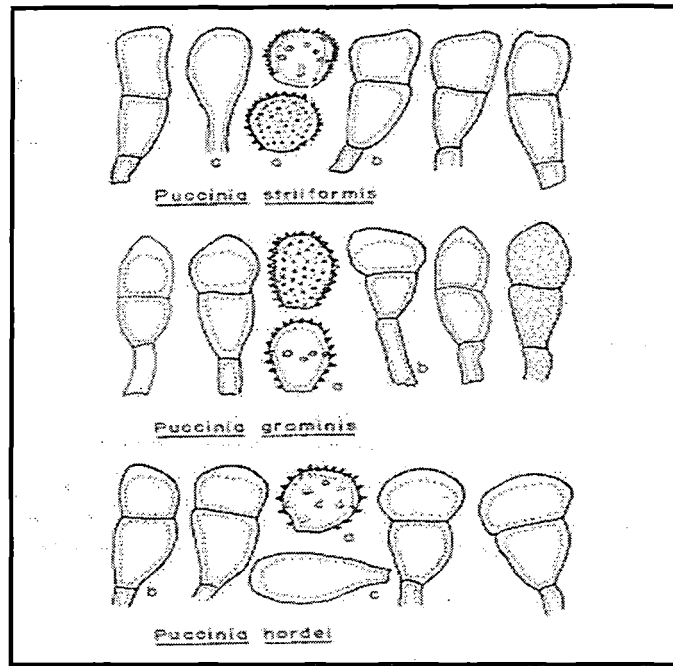


FIGURA N° 04: Estructuras características de la *Puccinia striiformis* f.sp. *hordei*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* y *Puccinia hordei*. Uredosporas b) Teliosporas c) Parafisos. Cummins (2003).

1.3.6 DISTRIBUCIÓN DE LA ROYA Y SUS HOSPEDEROS.

Las royas son parásitos biótrofos obligados, con micelio intercelular y haustorios. Aunque pueden aparecer en cualquier parte aérea de la planta, atacan mayormente a hojas y tallos.

(Agrios, 1991), las royas no forman basidiocarpos, ya que su papel es reemplazado por los telios y teliósporas. Sin embargo, su ciclo vital es muy complicado; pueden pasar hasta por 5 fases vitales, con sus correspondientes esporas. La nomenclatura es compleja, y en ciertos géneros resulta difícil separar unas fases de otras y hay que proponer nuevas denominaciones; he aquí la nomenclatura más aceptada:

- FASE 0: espermogonios (=picnios o picnidios): forman los espermacios (= picniosporas) y las hifas receptoras.
- FASE I: ecios (= ecidios): forman las eciósporas (= ecidiósporas).
- FASE II: uredos (=uredinios o uredosoros): forman uredósporas (= urediniósporas).
- FASE III: telios (=teleutosoros): forman teliósporas (= teleutosporas).
- FASE IV: basidios: forman basidiósporas.

Estos hongos son parásitos obligados de desarrollo zonal, muy específicos, que salvo algunas excepciones, roya amarilla (*Pucciniaglumarum*), son heteroicos (necesitan de un huésped secundario para completar su ciclo biológico) aunque en condiciones cálidas, al poder sobrevivir las uredosporas a los no muy rigurosos fríos invernales, no son fundamentalmente ni imprescindibles los huéspedes secundarios.

(Agrios. 1991), la basiodiospora transportada por el viento, al encontrar el huésped secundario, provoca la aparición de unos abultamientos o soros en las hojas denominados picnidios y aecios. Las aeciosporas, son los agentes responsables del ataque a los cereales, provocando, en las hojas, abultamiento subepidérmicos parecidos a los del huésped secundario denominados uredios donde se forma multitud de esporas, uredosporas que, cuando están maduras, rompen la cutícula foliar y difunden la enfermedad en el espacio ya que son capaces y aptas para infectar los cereales. Incluso, en lugares cálidos, pueden invernar sin perder su viabilidad de reinfectar.

No obstante lo normal es que con la llegada de los primeros fríos otoñales se formen unos nuevos soros, telios, que darán lugar a esporas provistas de cubierta o episporio grueso que les permitirá defenderse de las heladas invernales, llamadas teliosporas.

Estas invernán en el rastrojo y, al llegar la primavera, germinan produciendo un promicelio o basidio del que nacen las basidiosporas, cerrándose así el ciclo 'biológico de estos polimórficos uredales (royas macrocíclicas o de ciclo de vida largo, las que solo producen teliosporas y basidiosporas se denominan royas microcíclicas o de ciclo corto).

CUADRO N° 03: Principales especies de *Puccinia* sp. y su hospedador. (Agrios. 1991)

Especie	Nombre vulgar	Hospedador	
		Primario	Secundario
<i>P. graminis</i>	Roya negra	Trigo	
<i>P. g. f. sp. secalis</i>	Roya negra	Centeno	<i>Berberis vulgaris</i>
<i>P. g. f. sp. avenae</i>	Roya negra	Avena	(agracejo)
<i>P. glumarum</i>	Roya amarilla	Trigo Centeno Avena	No hay (Es autoico)
<i>P. triticina</i>	Roya parda	Trigo	Ranunculaceas: <i>Thalictrum</i> sp. <i>Isopyrum fumaroides</i>
<i>P. dispersa</i>	Roya parda	Centeno	<i>Anchusa</i> sp. <i>Lycopsis arvensis</i>
<i>P. conifera</i>	Roya coronada	Avena	<i>Rhamnus</i> sp.
<i>P. hordei</i>	Roya parda	Cebada	<i>Ornithogalum</i> sp.
<i>P. farghi</i>	Roya del maíz	Maíz/Sorgo	<i>Oxalis</i> sp.
<i>P. purpurea</i>	Roya del sorgo	Sorgo	<i>Oxalis corniculata</i>

1.3.7 DIFERENCIA COMPARATIVAS ENTRE LAS PRINCIPALES ROYAS QUE ATACAN LA CEBADA.

(Arbeláez y Esparza, 1976), mencionan que las distintas royas que atacan la cebada se diferencian entre sí macroscópicamente, tanto por las características de los uredos como por los síntomas específicos que determinan:

a) Roya amarilla: *Puccinia striiformis f.sp. hordei*

Se caracteriza por la presencia de uredoserupentes de color amarillo oro sin evidencias, dispuestos en bandas a lo largo de la hoja. No se conoce aún hospedero alternante alguno del patógeno.

b) Roya del tallo: *Puccinia graminis f.sp. tritici*

A diferencia de la roya amarilla descrita anteriormente, los uredos tienen un color rojo ladrillo, son más o menos grandes, y se presentan con remanentes de la epidermis; se localizan en el tallo, en las hojas y ocasionalmente en las espigas. El hospedero alternante conocido es el agracejo (*Berberis spp.*) en la espiga.

1.3.8 CULTIVO MONOPUSTULAR DE ROYAS

El cultivo monopustular consiste en colocar esporas de una pústula que esta sin germinar; en fragmentos de hojas del cultivo que se desea reproducir, utilizando diferentes métodos de aplicación (Lui, 1980). La finalidad de utilizar esta metodología es para conseguir la infección con uredosporas que son similares genéticamente.

1.4 ADN (ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO)

(Ridley, 2006), menciona que el ácido desoxirribonucleico, abreviado como ADN, es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria. El papel principal de la molécula de ADN es el almacenamiento a largo plazo de información. Los segmentos de ADN que llevan esta información genética son llamados genes, pero las otras secuencias de ADN tienen propósitos estructurales o toman parte en la regulación del uso de esta información genética.

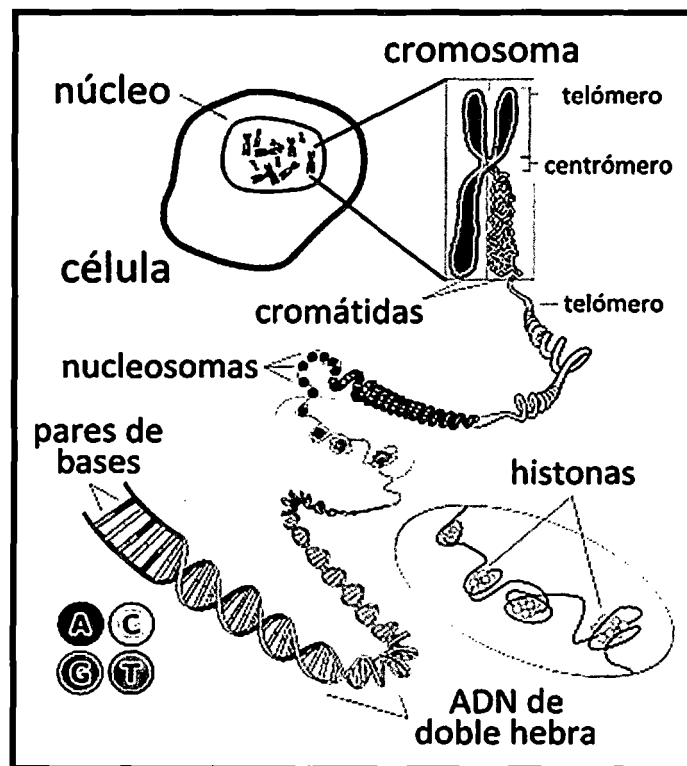


FIGURA N° 05: Situación del DNA dentro de una célula eucariota. Ridley, (2006).

1.4.1 CROMOSOMA

Según (Ridley, 2006), en biología, se denomina cromosoma a cada uno de los pequeños cuerpos en forma de bastoncillos en que se organiza la cromatina del núcleo celular durante las divisiones celulares (mitosis y meiosis). Este material se encuentra en el núcleo de las células eucariotas y se visualiza como una maraña de hilos delgados. Cuando el núcleo celular comienza el proceso de división (cariocinesis), esa maraña de hilos inicia un fenómeno de condensación progresivo que finaliza en la formación de entidades discretas e independientes: los cromosomas.

Por lo tanto, cromatina y cromosoma son dos aspectos morfológicamente distintos de una misma entidad celular.

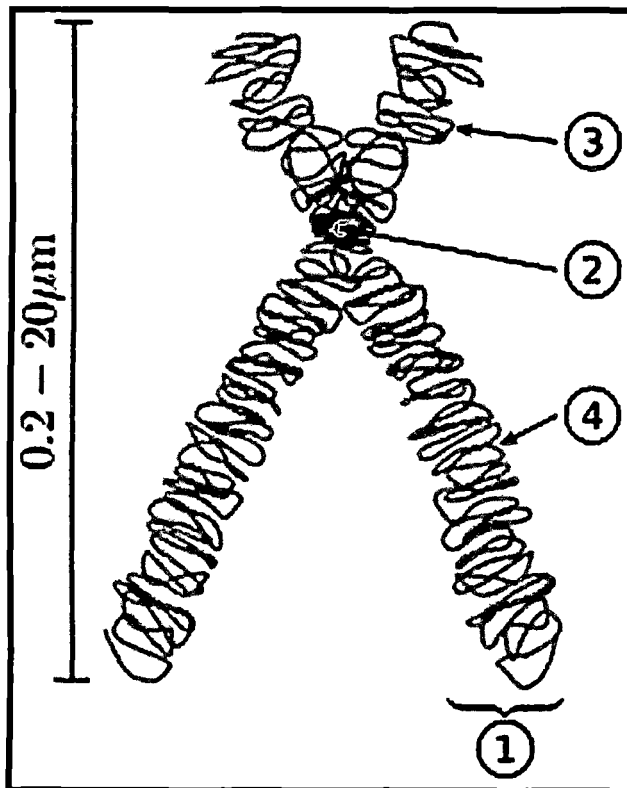


FIGURA N° 6:

Diagrama de un cromosoma eucariótico duplicado y condensado (en metafasemitótica). (1) Cromátida, cada una de las partes idénticas de un cromosoma luego de la duplicación del ADN. (2) Centrómero, el lugar del cromosoma en el cual ambas cromátidas se tocan. (3) Brazo corto. (4) Brazo largo. Ridley, (2006).

1.4.2 ADN RIBOSOMICO

Según (Hillis y Dixon, 1991), el ADN ribosómico (ADNr) es una secuencia de ADN contenida en los cromosomas del nucléolo que codifica ARN ribosómico. Estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación y contienen segmentos espaciadores transcribibles y no transcribibles. Las unidades de transcripción del ARN ribosómico se agrupan en tándem. Estas regiones de ADNr se denominan también regiones de organización del nucléolo.

También mencionan que el nivel bajo de polimorfismo en la unidad de transcripción de ADNr permite la caracterización de cada especie usando sólo unos pocos ejemplares y hace que este ADN sea útil para la comparación interespecífica. Además, las repeticiones de las diferentes regiones de codificación del ADNr muestran distintas tasas de evolución.

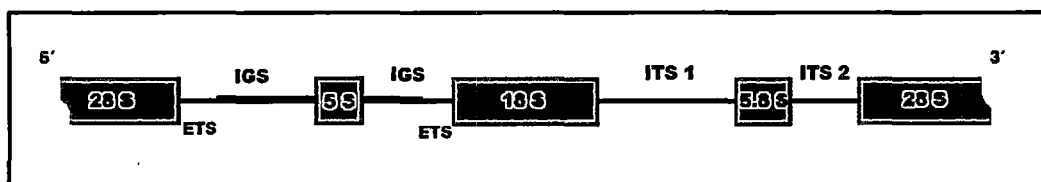


FIGURA N° 07: Disposición del (ADNr) eucariótico 18S, 5.8S y 28S en tándem; el ADNr 5S se codifica separadamente. NTS: espaciador no transcribible, ETS: espaciador transcribible externo, ITS: espaciador transcribible interno. (Hillis y Dixon, 1991).

1.4.3 EXTRACCIÓN DE DNA

El aislamiento de moléculas como el DNA que se encuentra dentro de las células, puede realizarse a través de diferentes métodos, los cuales deben tomar en cuenta la fragilidad de dicha molécula y además de las diferentes barreras que se deben de vencer para poder aislarlo de los

demás componentes celulares tales como organelos, sustancias polipeptídicas, carbohidratos, etc. que son característicos para cada especie vegetal, (Vos P, et al, 1995).

El método que generalmente se utiliza implica el uso de la fuerza mecánica, variaciones térmicas y fuerzas de gravedad, todos estos combinados con detergentes, solventes orgánicos y sustancias químicas, dan como resultado final el aislamiento del DNA.

El uso de sustancias químicas tales como el CTAB (bromuro de hexadecil-trimetil-amonio) sirve para poder disolver las membranas polipeptídicas que son las que forman compartimentos dentro de las células de tal manera que el DNA pueda ser liberado de su interior. Sustancias como el EDTA y PVP sirven para inactivar (quelar) las enzimas conocidas como DNAasas que se encuentran en gran número dentro de la célula y que pueden degradar el DNA. Sustancias tales como el TRIS son tampones (buffers) que sirven para mantener regulado el pH del medio en el que se encuentra el DNA. Sales como el NaCl permiten la precipitación de carbohidratos, el acetato de amonio y acetato de sodio permiten la captación de algunos iones contaminantes que rodean a la molécula. Una combinación de solventes orgánicos como cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) permiten la separación y precipitación de proteínas. El uso de alcoholes, tales como etanol absoluto o isopropanol, permiten la precipitación del DNA, librándolo de la solución de solventes, de sales y otras impurezas.

1.4.4 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE DNA

Existe un elevado número de protocolos para la extracción de DNA que presentan diferencias dependiendo del tipo de organismo, del tejido de partida o de la calidad final deseada del DNA.

La metodología clásica consiste en una primera homogenización mecánica del tejido en un tampón de extracción. Este tampón está generalmente compuesto por TRIS, que proporciona las propiedades tamponadoras, un quelante EDTA (ethylenediaminetetraaceticacid) para inhibir la acción de DNAasas, una sal (normalmente cloruro sódico) y un detergente que facilite la ruptura de las membranas celulares y nucleares. El DNA puede separarse de las proteínas y restos celulares mediante precipitación de las proteínas facilitada por la presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) y acetato potásico (el DNA permanece en suspensión tras la precipitación por centrifugación), o alternatively, utilizando cloroformo para separar las proteínas de la fase acuosa, donde permanece el DNA. La extracción con cloroformo permite obtener un DNA más puro y mejor sensible a degradación, aunque tiene el inconveniente del manejo de disolventes orgánicos.

El DNA en disolución puede ser concentrado y purificado por precipitación con etanol o isopropanol para posteriormente resuspender en un volumen apropiado de tampón TE o agua. La pureza del DNA puede mejorarse siguiendo diversos protocolos que se discutirán a continuación.

Los tejidos vegetales presentan dos características específicas que hay que tener en cuenta a la hora de poner a punto un protocolo de extracción de DNA:

a. Contenido en fenoles. Al homogenizar el material se libera fenoles que se oxidan rápidamente y pueden provocar la pérdida del DNA. Para evitarlo se añaden al tampón de extracción compuestos antioxidantes como el beta-mercaptoetanol o el bisulfito sódico (este último más recomendable ya que el primero es volátil y tóxico).

b. Contenido en polisacáridos. Las paredes de las membranas celulares vegetales están compuestas fundamentalmente por celulosa y otros polisacáridos, que son muy solubles y precipitan con el DNA, por lo que son contaminantes muy difíciles de evitar.

Como consecuencia, el precipitado final de DNA adquiere una consistencia gelatinosa, lo que dificulta el pipeteo e incluso puede inhibir la digestión del DNA con enzimas de restricción. Para intentar reducir esta contaminación de polisacáridos se utilizan compuestos como el bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB), aunque su eficacia suele ser baja. Una estrategia mejor es la recolección de tejido joven, proveniente de tejidos apicales en fase de crecimiento y evitar tomar muestras de tejido adulto.

El protocolo a elegir depende del uso al que se va a destinar el DNA y del material de extracción de partida. Atendiendo a estos criterios, podemos elegir diferentes protocolos de extracción de DNA.

1.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción cíclica dirigida enzimáticamente que permite la amplificación in vitro de una región del

ácido desoxirribonucleico (DNA), localizada entre dos regiones de secuencia conocida, (Jordán, 2005).

Utiliza dos oligonucleótidos que funcionan como "iniciadores", que se hibridan a las cadenas opuestas de DNA de secuencia complementaria, flanqueando a la secuencia de interés. Los iniciadores, toman diferentes denominaciones, tales como oligonucleótidos, cebadores, primadores, amplímeros, detonadores o primers. Los iniciadores son moléculas de DNA de cadena individual y longitud corta (10-30 nucleótidos), se hibridan complementariamente a las partes terminales o flancos de una secuencia específica de la cadena sencilla del DNA patrón, se efectúa la amplificación (extensión) por la DNA polimerasa, la enzima que cataliza la síntesis de cadenas largas de polinucleótidos. La síntesis se dirige incorporando monómeros de trifosfato de desoxinucleósido al grupo libre 3'-hidroxilo del iniciador en dirección 5'→3', la polimerización se efectúa siempre del α-fosfato 5' del trifosfato de desoxinucleósido al grupo hidroxilo terminal 3' de la cadena creciente de DNA. Esto resulta en la síntesis de nuevas cadenas de DNA complementarias a las cadenas patrón inicial.

En cada ciclo de amplificación, las cadenas de DNA sintetizadas se convierten en un patrón (o sustrato) para cualquier nuevo ciclo; idealmente, la secuencia de DNA "objetivo" o "DNA blanco" se amplificará de manera selectiva ciclo tras ciclo. Teóricamente, los productos de amplificación (amplicones) del primer ciclo serían el resultado de la síntesis de DNA del patrón original, de longitud indefinida. La polimerasa

del DNA sintetizaría nuevas moléculas (a partir de tales moldes o patrones) hasta que fuese interrumpida por el inicio del siguiente ciclo. A partir del tercer ciclo, los productos de amplificación poseerían una longitud definida, pues únicamente se sintetizan los fragmentos de la secuencia "objetivo", cuya longitud correspondiera a las posiciones de alineamiento (anillamiento, ensamblaje) de los iniciadores con el patrón original. En lo consecutivo, la secuencia "objetivo" se amplificará exponencialmente. Concretamente la amplificación entendida como el número final de copias de la secuencia "objetivo", se expresa por la fórmula:

$$(2^n - 2n) \times x \approx x (2^n)$$

Dónde:

n = número de ciclos

2^n = primer producto obtenido después del ciclo 1, y productos obtenidos después del ciclo 2.

$2n$ = productos amplificados que contienen la secuencia objetivo y salientes en los extremos (no corresponden exactamente a la región objetivo)

x = número de copias del patrón original.

Los componentes de la reacción de PCR son:

- Dos iniciadores sintéticos, que son regiones complementarias a las cadenas opuestas que flanquean a la región de DNA blanco que se desea amplificar.

- Una secuencia blanco en una muestra de DNA que este entre el par de primers, la cual puede ser de 100 a 5 000 pares de bases.
- Una enzima, la DNA Polimerasa termoestable que pueda resistir altas temperaturas de calentamiento (95°C a más).
- Los cuatro deoxiribonucleótidos (dNTPs).
- Un buffer para darle las condiciones adecuadas al sistema en conjunto.

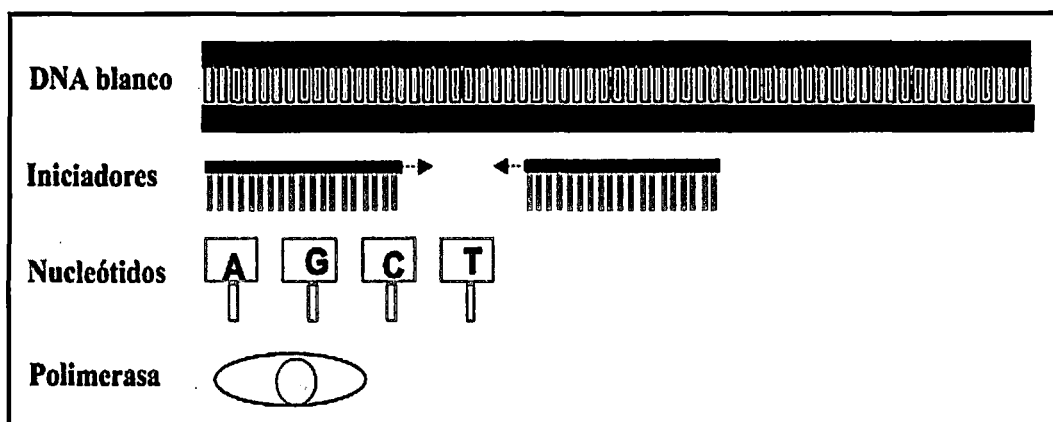


Figura N° 08: Componentes del PCR, para la amplificación del gen ITS.

1.5.1 CICLOS TÉRMICOS.

Los parámetros de los ciclos de temperatura son considerablemente importantes para una PCR óptima. Los pasos más importantes en los perfiles del tiempo y temperatura a considerar, son:

- **Etapas del ciclo de amplificación:**

Un proceso típico de PCR, requiere de un número de ciclos para amplificar una secuencia de DNA, cada ciclo tiene generalmente tres pasos:

Desnaturalización. La temperatura entre 90-96 °C provoca una desnaturalización completa del DNA genómico para permitir el ensamblaje posterior de los iniciadores. El daño térmico del DNA conduce a un índice creciente de mala incorporación de los nucleótidos, por lo que debe evitarse manejar temperaturas muy altas, y/o desnaturalizar por períodos prolongados. Limitar la exposición ayuda también a mantener la actividad máxima de la polimerasa. Sin embargo, existen moléculas de DNA de grandes proporciones o desmedidamente complejas (como plásmidos de DNA super enrollado) que son más difíciles de desnaturalizar y que requieren mayor energía térmica, por lo que se sugiere la inmersión de los tubos de reacción en agua hirviendo por algunos minutos o un "hotStart" (predesnaturalización). Por el contrario, el calentamiento insuficiente deviene en un completo fracaso de la PCR. Típicamente la temperatura de desnaturalización es entre 92 y 94 °C.

Ensamblaje. Período térmico que define el ensamblaje (alineamiento, anillamiento, anclaje) o hibridación de los iniciadores a la secuencia complementaria; típicamente, entre 36 y 70 °C. Se calcula en función de la longitud y contenido de guanina y citosina de los iniciadores.

Extensión. La extensión, propiamente la amplificación o polimerización, se efectúa generalmente a 70-85 °C, temperatura óptima de actividad para las polimerasas termoestables. La duración de los pasos de extensión puede incrementarse si se polimerizan amplicones de gran longitud, aun cuando la mayor parte de los tiempos de PCR se restringen a 2 minutos (1 minuto/1000 pb de secuencia "objetivo" o sustrato).

A menudo, el tiempo de extensión del ciclo final es mayor (hasta 10 minutos) con la finalidad de asegurar la total extensión de las moléculas. La temperatura de extensión óptima en los PCR es 72 °C, donde la Taq polimerasa tiene su mayor actividad catalítica.

- **Número de ciclos:**

Usualmente son 25 a 35. El aumento en el número de ciclos ocasiona un incremento en el número de productos no deseados, sin impacto alguno en el rendimiento del producto de elección. Así, es poco común encontrar protocolos experimentales con más de 40 ciclos.

1.5.2 DNA PATRÓN.

Estas secuencias pueden ser DNA genómico, DNA clonado (a partir de clones individuales o bancos genómicos: lambda, cósmidos o vectores BAC o YAC), y/o bancos de cDNA (derivado de RNA total, RNA poli(A)+ó RNAm). Secuencias patrón, también son conocidos como DNA sustrato, blanco, objetivo o molde, Watson y Crick (1953).

La muestra de PCR puede ser de una o dos cadenas de DNA o RNA, no siendo generalmente el tamaño del DNA un factor fundamental.

De utilizarse DNA genómico de alto peso molecular, se mejora la amplificación si se digiere previamente con enzimas de restricción. De no conocerse la concentración de la secuencia "objetivo", se recomienda optimizar la reacción con controles positivos de ADN; normalmente, e utilizan subnanogramos de un patrón clonado y submicrogramos de ADN genómico. Potencialmente, la PCR puede realizar la amplificación de una

sola molécula de DNA en grandes números, es factible amplificar una secuencia a partir de cantidades del orden de picogramos, por lo que debe extremarse el cuidado en el manejo de reactivos y muestras, así como reducir al mínimo cualquier posibilidad de contaminación.

Concentración de enzimas:

La introducción de las polimerasas termoestables del DNA permitió la automatización de la PCR, pues sólo se incorporan al inicio del proceso de amplificación. La primera polimerasa del DNA termoestable utilizada fue la Taq polimerasa, Roberts, et al, (2005).

Los resultados obtenidos, en términos de amplificaciones de alto rendimiento, de uno o varios fragmentos, o de fragmentos de gran longitud reportan el uso de cantidades considerables de la enzima (1-4 U/100 µl). Utilizar mayores cantidades puede resultar en la producción de productos no específicos y/o en la reducción del rendimiento del amplicón "objetivo". La concentración típica de la enzima usada es de 2U/100 µl de volumen de reacción. Normalmente, la cantidad de la enzima se torna limitante luego de 25 a 30 ciclos de PCR, debido a un exceso molar de la secuencia "objetivo".

Para el desarrollo de la reacción, la enzima polimerasa del DNA requiere mínimo 1 mM de magnesio libre, lo que significa que las concentraciones de magnesio deberán ser 1 mM mayores que la concentración total de los dNTPs (ya que secuestran magnesio).

Esto es, la cantidad de Mg^{2+} libre disponible para la polimerasa Taq del DNA resulta de la sustracción de la concentración total de dNTPs de la

concentración total de $MgCl_2$. La concentración de $MgCl_2$ tiene un efecto fuerte sobre la especificidad y rendimiento de la PCR. La concentración óptima de $MgCl_2$ en la mezcla final de reacción puede variar dentro del intervalo de 1.0- 2 mM, pero en ciertas ocasiones se ensayan diferentes concentraciones de Mg^{2+} (considerando una cantidad individual de dNTP del orden de 200 μM). Los iones Mg^{2+} estimulan la actividad de la polimerasa e incrementan la temperatura de fusión (T_m) del DNA de doble hélice, así como la interacción iniciador/secuencia patrón.

1.5.3 INICIADORES.

La estabilidad del iniciador puede medirse por la longitud (en pares de bases) del duplo DNA-iniciador, el cociente GC/AT, la energía libre del duplo (kcal/mol), o por la temperatura de fusión (en $^{\circ}C$). Para realizar con exactitud los cálculos, se deben considerar varios parámetros termodinámicos, cuestión que se facilita con el uso de programas computacionales.

Éstos permiten calcular la estabilidad del dúplex DNA iniciador, la composición y porcentaje de desoxinucleótidos; analizar las posibles interacciones del par más cercano, las regiones de complementariedad del DNA, los sitios de formación de dímeros de iniciador, o la longitud de amplicones; además de contemplar cuestiones como la estructura secundaria, la formación de palíndromos, etc.

En general, los iniciadores utilizados en la PCR constan de 10 a 30 nucleótidos de longitud, lo que permite utilizar altas temperaturas de

ensamblaje e incrementar la especificidad de la reacción. Cuanto menor sea la longitud de los iniciadores, menor será la especificidad de hibridación con la secuencia patrón. De ser posible, los iniciadores deben elaborarse con un número aproximadamente igual de cada una de las cuatro bases, evitando regiones de secuencia anormal, tramos de polipurinas, polipirimidinas, o patrones de repetición; y secuencias con estructura secundaria.

Temperatura de fusión (melting temperature, T_m)

La T_m puede calcularse para un iniciador empleando algunas ecuaciones, siendo indicado para cada reacción de amplificación considerar a los iniciadores como un par, donde cada uno posee una T_m similar; o bien, puede determinarse la T_m de acuerdo con valores termodinámicos de energía libre entre combinaciones sucesivas de los nucleótidos. La fórmula más ampliamente usada es:

$$T_m = [(\text{número de A+T}) (2\text{ °C}) + (\text{número de G+C}) (4\text{ °C})]$$

Originalmente calculada en una concentración salina 1M para pruebas de hibridación de oligonucleótidos. Sin embargo, es inexacta con iniciadores mayores de 20 nucleótidos (nt) y requiere de correcciones para la concentración salina.

1.5.4 TRIFOSFATOS DE DESOXINUCLEÓSIDOS (dNTPs)

De cada uno de los dNTP, se requiere una concentración de 50-200 μM para sintetizar 6.5-25 ng/ μl de DNA, respectivamente. Una concentración mayor tendería a promover la incorporación errónea por la polimerasa del DNA. Pueden manejarse soluciones ya sea individualmente o en mezcla de los cuatro dNTPs. Normalmente, se encuentran a un pH de 7.5 por NaOH. La concentración óptima de los dNTPs determina:

- ✓ La concentración de MgCl_2 y de la enzima (puesto que los dNTPs forman un complejo soluble con los iones Mg^{2+} , esencial para la incorporación de nucleótidos al amplicón),
- ✓ la longitud del producto amplificado, y
- ✓ el número de ciclos de PCR.

1.5.5 PROMOTORES E INHIBIDORES DE LA PCR:

Diferentes sustancias inhiben o promueven la PCR, dependiendo de la naturaleza de los especímenes biológicos nativos, Prieto, et al (2005), y de los métodos y reactivos usados para la extracción del DNA.

Deben usarse con precisión y cuidado a los detergentes iónicos (dodecilsulfato de sodio, SDS) en los métodos de extracción de DNA, pues es muy probable que inhiban los efectos de la enzima polimerasa. Las trazas de solventes tales como el fenol, cuando utilizado en la purificación del DNA, deben removerse por extracción por cloroformo:alcoholiso-amílico (49:1) o por precipitación etanólica. En adición, es recomendable evitar el uso de la proteinasa K, pues es una

proteasa que digiere proteínas desnaturalizadas, y podría afectar a la polimerasa del DNA. En el caso de que se efectúe una RT-PCR, es fundamental remover la totalidad de DNA; viceversa la presencia de RNA puede interferir en las PCR donde se use DNA como sustrato.

1.6 ELECTROFORESIS.

Es el movimiento de una partícula cargada (ion) en un campo eléctrico. El movimiento se realiza en medio líquido que está sostenida por sustancia sólida inerte, como papel o gel semisólido. La separación de las partículas o fragmentos de DNA depende de su tamaño, es decir fragmentos más grandes encuentran mayor resistencia en el gel que los pequeños, de modo que su migración será más lenta, y por el contrario los fragmentos más pequeños migrarán rápidamente, separándose de los grandes.

En consecuencia, electroforesis es una técnica usada para separar y a veces purificar macromoléculas especialmente proteínas y ácidos nucleicos, que difieren en tamaño, carga o conformación. Como tal, es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en bioquímica y biología molecular. Cuando las moléculas cargadas son colocadas en un campo eléctrico, ellas migran hacia los polos, al positivo (ánodo) o al negativo (cátodo) según sus cargas. (FIGURA N°09).

Las proteínas y los ácidos nucleicos son separados dentro de una matriz o de un "gel". El gel se prepara de forma rectangular y de espesor fino (aproximadamente 1 cm de espesor), con los pozos para cargar la muestra. El gel se sumerge dentro de un buffer de electroforesis que

proporciona los iones para llevar una corriente y un cierto tipo de buffer para mantener el pH en un valor relativamente constante. El gel puede ser de agarosa o del poliacrilamida, cada uno de los cuales tiene cualidades convenientes para las tareas particulares.

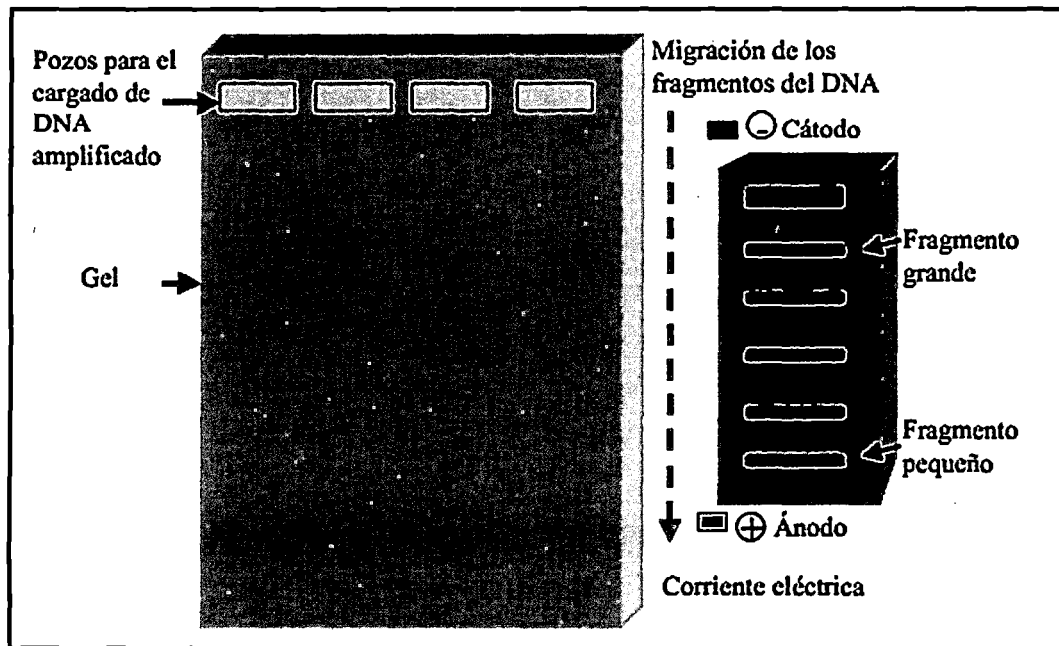


FIGURA N° 09: Representación gráfica de la electroforesis.

La agarosa es un polisacárido extraído de alga marina. Se utiliza típicamente en las concentraciones de 0.5 a 2 %. Los geles de agarosa son muy fáciles de preparar: se mezcla simplemente el polvo de agarosa con la solución tampón (buffer), se derrite calentando, y luego se vierte el gel. Este gel no es tóxico. Los geles de agarosa tienen un rango grande de la separación, pero el poder de resolución es relativamente baja. Variando la concentración de agarosa, los fragmentos del DNA de cerca de 200 a 50000 pb se pueden separar usando técnicas electroforeticas estándares.

1.7 PROGRAMAS BIOINFORMATICOS.

1.7.1 PROGRAMA BLAST

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos, (Smith y Waterman, 1981).

El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema. Es importante mencionar que BLAST usa un algoritmo heurístico por lo que no nos puede garantizar que ha encontrado la solución correcta.

Normalmente el BLAST es usado para encontrar probables genes homólogos. Por lo general, cuando una nueva secuencia es obtenida, se usa el BLAST para compararla con otras secuencias que han sido previamente caracterizadas, para así poder inferir su función. El BLAST es la herramienta más usada para la anotación y predicción funcional de genes o secuencias proteicas. Muchas variantes han sido creadas para resolver algunos problemas específicos de búsqueda.

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=blastSearch&LINK_LOC=blasthome.

1.7.2 PROGRAMA DE ALINEAMIENTO CLUSTAL

Es un programa de computadora ampliamente utilizado para realizar alineamientos múltiples de secuencias, (Thompson et al, 1997).

Este programa acepta un amplio rango de formatos de entrada. Incluyendo NBRF/PIR, FASTA, EMBL/Swissprot, Clustal, GCC/MSF, GCG9 RSF y GDE.

El formato de salida puede ser alguno de los siguientes: Clustal, NBRF/PIR, GCG/MSF, PHYLIP, GDE, NEXUS.

ALINEAMIENTO DE MULTIPLES SECUENCIAS.

Hay tres etapas importantes:

1. Hacer un alineamiento por pares
2. Crear un árbol filogenético (o usar un árbol definido por el usuario)
3. Usar el árbol filogenético para llevar a cabo el alineamiento múltiple

Esto es hecho automáticamente cuando seleccionas "Do Complete Alignment" ("Hacer el alineamiento completo", en español). Otras opciones son "Do Alignment from guide tree" ("Hacer el alineamiento con el árbol guía) y "Produce guide tree only" ("Sólo producir el árbol guía).

ALINEAMIENTO DE PERFILES.

Los alineamientos de parejas son computados con un método todos contra todos y las similitudes son guardadas en una matriz. Esta es luego convertida en una matriz de distancias, donde la longitud de la distancia refleja la distancia evolutiva entre cada par de secuencias.

De esta matriz de distancias, es creado un árbol de guía o filogenético utilizando un algoritmo de clustering neighbour-joining para determinar el orden en que los pares de secuencias serán alineados y combinados con alineamientos previos. Las secuencias son alineadas progresivamente en cada punto de ramificación empezando por los pares de secuencias más cercanos.

CONFIGURACIONES.

Los usuarios pueden alinear las secuencias usando las configuraciones por defecto, pero ocasionalmente es más útil personalizar los parámetros. Los principales parámetros son la penalización por abrir huecos ("gaps") y por extenderlos.

www.ebi.uk.Tools/services/web/tools/resultebi/old=clustal/2pg.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DEL EXPERIMENTO.

2.1.1 UBICACIÓN:

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la F.C.A. – UNSCH, en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga departamento Ayacucho, a una altitud de 2750 m.s.n.m.

2.2 MATERIALES:

- ❖ Bolsas de papel.
- ❖ Arena, tierra agrícola y materia orgánica.
- ❖ Bolsa plástica negra y transparente.
- ❖ Refrigeradora.
- ❖ Termómetro: B.H. y B.S.
- ❖ Tubos Eppendorf: 1.5 y 2.0 µl y morteros de plástico.

- ❖ Cooler y cubos de hielo.
- ❖ Microscopio óptico.
- ❖ Centrifugadora: velocidad 14'000 rpm.
- ❖ Microcentrifugadora.
- ❖ Termomixer Confort Eppendorf (1.5ml).
- ❖ Termociclador Eppendorf.

A. Reactivos:

- ❖ Agar PDA.
- ❖ Solución de CTAB, con 0.2% de β -mercaptoetanol.
- ❖ Proteinasa K.
- ❖ NFW (Water Free Nuclease).
- ❖ Cloroformo: Alcohol-isoamilico (24:1).
- ❖ Etanol al 80% y 90%.
- ❖ RNAasa (10mg/ml).
- ❖ Solution stock de primers (ITS1, ITS4)(10 μ M).
- ❖ Solución stock de dNTPS (10mM).
- ❖ Solución stock de cloruro de Magnesio (25mM).
- ❖ Taq polimerasa: Solución stock 5U/ μ l.
- ❖ Gel agarosa: 1%, 1.5% y 2%.
- ❖ Tampón de carga: Loading buffer orange (6X).
- ❖ Patrones de peso molecular: 100bp Ladder.
- ❖ Tampón TBE: 10X (tris borato y EDTA)
- ❖ Para elución de banda: MenbranaBindingSolution.

B. Muestras.

El estudio se realizó utilizando muestras de hojas de pasto ovillo y cebada común, que presentaban pústulas de roya amarilla lineal. Las muestras de hojas con pústulas de roya amarilla en cebada fueron recolectadas en la comunidad campesina de Campanayocc a una altitud de 3565 m.s.n.m., y las muestras de hojas con roya amarilla de pasto ovillo se recolectaron en el Núcleo de Investigación y Producción de la Universidad de Huamanga a una altitud de 2757 m.s.n.m.

2.3 MÉTODOS:

Se realizaron pruebas de inoculación del patógeno en condiciones de invernadero para aumentar la cantidad de esporas de cada uno de los aislamientos monopustular obtenidos en campo se comprobó la metodología utilizada por Liu (1980), que consiste en espolvorear esporas sobre las hojas; la metodología de Braitwaite (2005), que consiste en depositar esporas sin germinar en fragmentos de hoja del cultivo; la metodología de Asnaghi, et al (2001), que consiste en depositar esporas en cuadraditos de agar y luego pasarlos a fragmentos de hoja.

Para el proceso de instalación de las metodologías se procedió de la siguiente manera:

2.3.1 COLECCIÓN DEL INÓCULO.

Para la colección del inóculo de (*Puccinia striiformis*) de pasto ovillo y de cebada que se encuentran en el NIPUH (Núcleo de Investigación y

Producción de la Universidad de Huamanga), primeramente se identificó la zona donde es mayor la propagación de la roya amarilla en las dos especies; luego de ello se cortaron las hojas que presentaron mayor cantidad de pústulas amarillas lineales; posteriormente se colocaron dentro de bolsas de papel debidamente rotuladas para ser llevadas a la Unidad de Genómica del LGBV.



FIGURA N°10: Identificación de la zona con mayor incidencia de roya amarilla en pasto ovillo y cebada en el NIPUH (Núcleo de Investigación y Producción de la Universidad de Huamanga).

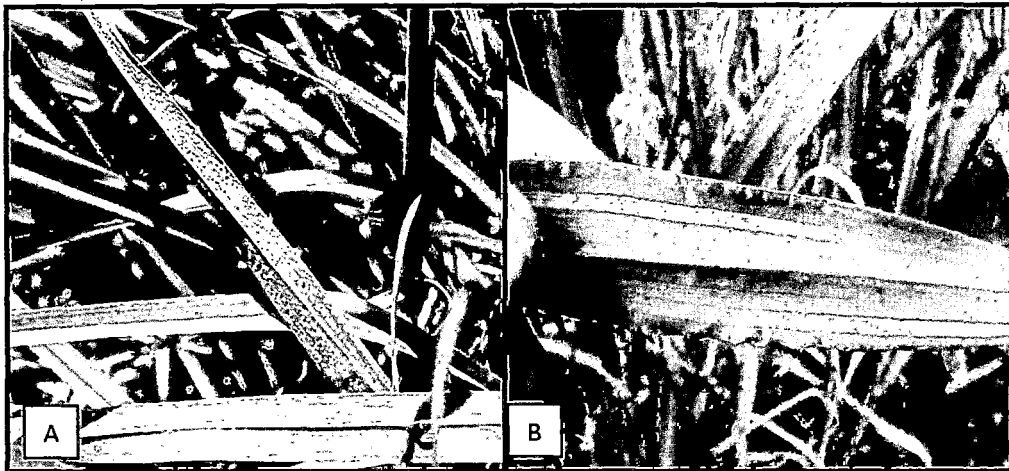


FIGURA N°11: A. Roya amarilla lineal en pasto ovillo. B. Roya amarilla lineal en cebada. Se cortaron las hojas que presentaron mayor número de pústulas amarillas lineales en pasto ovillo y cebada común.

2.3.2 CULTIVO MONOPUSTULAR DE ROYA AMARILLA.

Previamente al recojo de las muestras (un día antes), de roya amarilla en pasto ovillo, se cogieron talluelos limpios de zonas aun no infestadas, estas se colocaron en macetas con suelo (2suelo agrícola: 1 materia orgánica:1arena), la cantidad de repeticiones es de acuerdo a los tratamientos.



FIGURA N° 12: Maceteros con talluelos de pasto ovillo.

Para el caso de la cebada se tuvo que sembrar 15 días antes de realizar la inoculación, siguiendo la literatura citada por García (2010), además se utilizó cebada común para realizar el trabajo, debido a que esta es más susceptible a la roya amarilla.

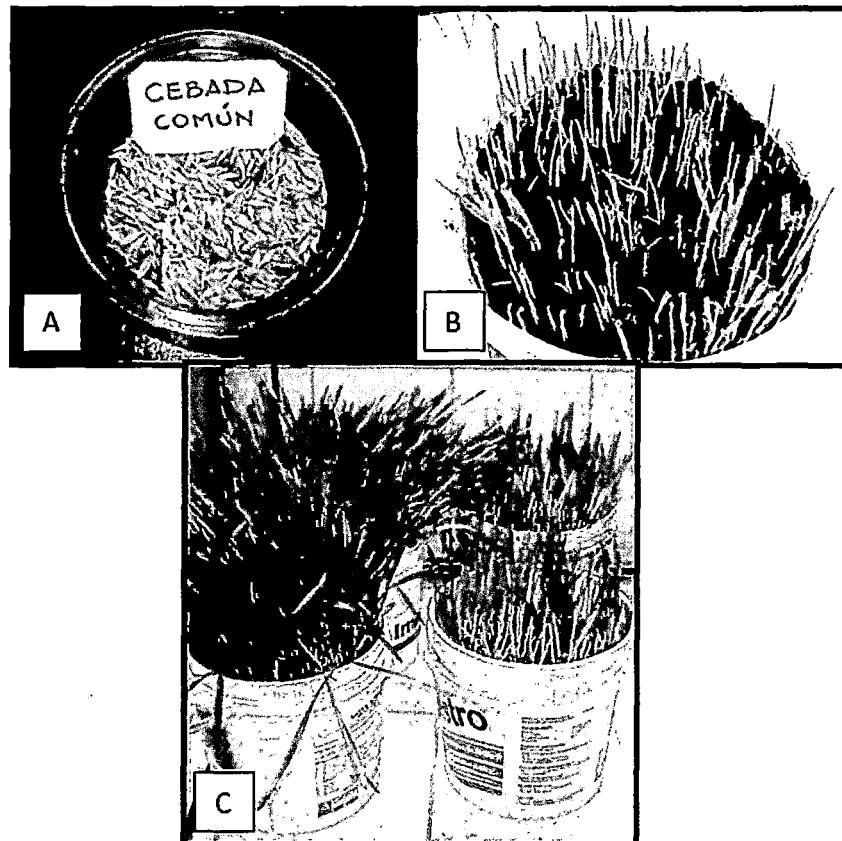


FIGURA N°13: A. Semillas de Cebada común. B. Plántulas a los 7 días de germinación. C. Maceteros con plántulas de cebada listas para la inoculación.

PROCESO DE INOCULACIÓN.

Se tomaron fragmentos de hojas infectadas, aproximadamente de 20cm de longitud con pústulas de roya amarilla sin erupciones Purdy y Dean (1980). Los fragmentos de hoja fueron lavados con abundante agua destilada.

- a) De las hojas de pasto ovillo y cebada recolectas (con roya lineal amarilla), se cortaron los trocitos que presentaron la mayor cantidad de pústulas cerradas.
- b) La posición de colocar el trocito con roya se dio de acuerdo a la posición de los estomas, en las dos especies la mayor cantidad de los estomas se da en el haz. corte de la cutícula para contabilizar el número de estomas por cultivo.
- Cebada (10estomas/cm²)
 - Pasto ovillo (7estomas/cm²).
- c) Los trocitos de hoja con roya lineal amarilla de pasto ovillo y cebada, se colocaron 1 trocito por cada hoja de planta libre en cada maceta, se consideraron 4 repeticiones; es decir se tomaron 4 hojas por maceta, y a cada hoja mediante 3 tipos de adherentes (Agua, Agar y Clip).

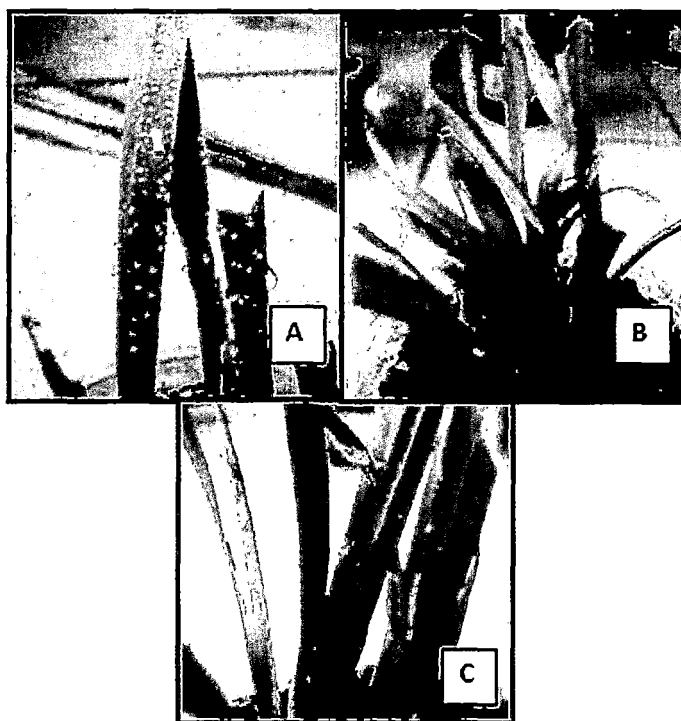


FIGURA N°14: A. Inoculo adherido con agua, B. Inoculo adherido con agar, C. Inoculo adherido con clips.

- d) Se prepara una bandeja que contenga en el fondo agua a una altura de 1.5cm. (para mantener la humedad), luego se colocan las macetas una a una procurando que los adherentes permanezcan; se cubre con un plástico negro para que pueda conservar la humedad en el interior de la bandeja, este proceso es denominado “cámara húmeda”, según Asnaghi, et al, (2001).



FIGURA N°15: A. Macetas en bandejas con agua para mantener la humedad, B. Macetas inoculadas dentro de la refrigeradora.

- e) Se lleva a la refrigeradora por (1día, 2días y 3 días), según el tratamiento establecido, se mantiene una temperatura promedio de 8.5°C, se asperja cada 8 horas, para mantener la humedad, y se va retirando de acuerdo a que se cumpla el periodo en cámara oscura de cada tratamiento.

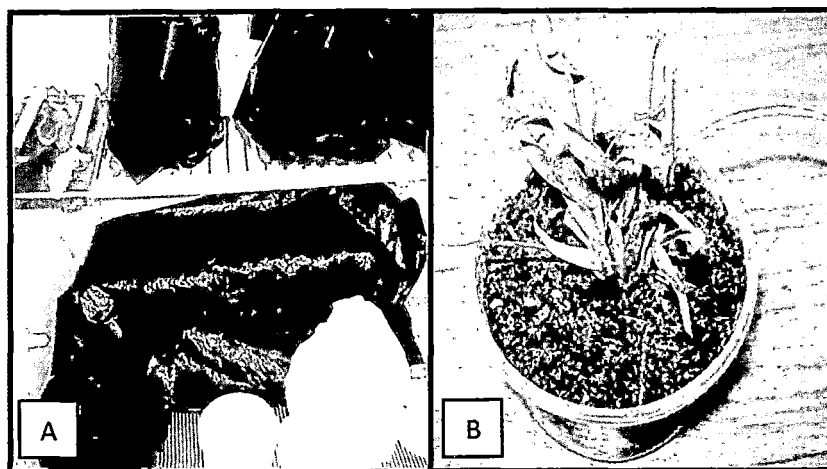


FIGURA N°16: A. Plántulas en cámara oscura a 8.5°C de temperatura. B. Maceta a capacidad de campo.

f) Después de cumplido el tiempo del tratamiento en la cámara húmeda, se van retirando los tratamientos hacia el mini invernadero, el cual esta acondicionado a una temperatura en promedio de 25°C, y humedad relativa entre 85 a 90%, según lo menciona Asnaghi, et al, (2001).

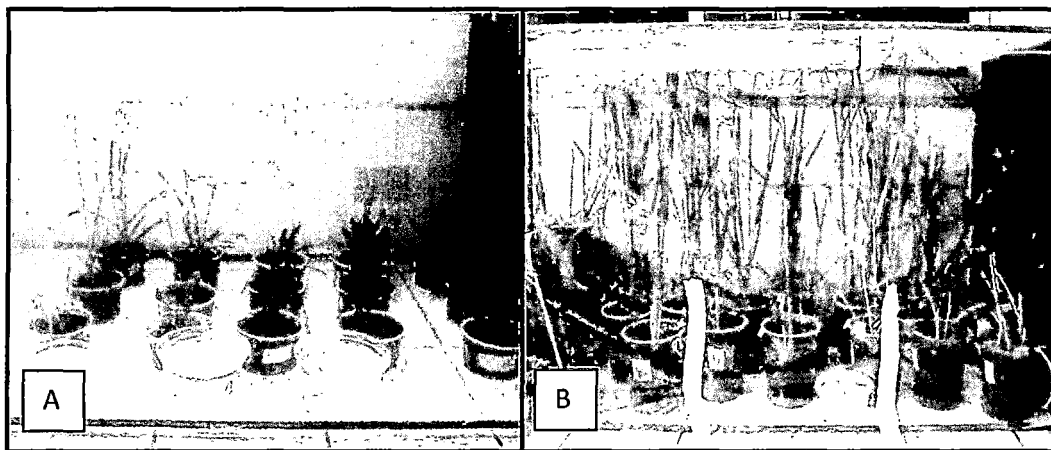


FIGURA N° 17: A. Macetas con talluelos de pasto ovillo; B. Plántulas de cebada, dentro del mini invernadero.

g) Luego de transcurridos 18 días después de la inoculación según Asnaghi, et al, (2001), se procedió a realizar la purificación, pero

ahora solo con pústulas limpias, con la ayuda del estereoscopio se identificaron las pústulas aun no abiertas, de las cuales se extrajo las uredosporas, y se inocularon a las plantas libres.

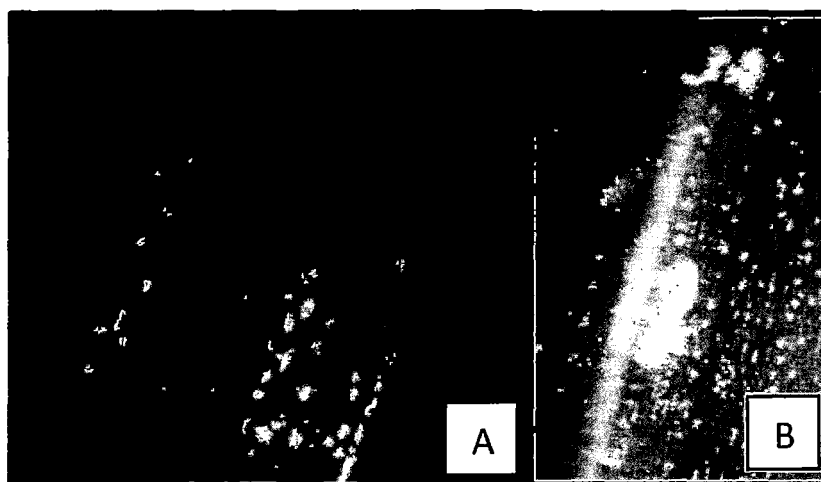


FIGURA N° 18: A. Pústulas de roya amarilla en pasto ovillo observadas a estereoscopio (10x4) B. Pústulas de roya amarilla en pasto ovillo observadas a un aumento de (10x10).

h) Para realizar la purificación de las muestras obtenidas se realiza la misma metodología anteriormente detallada.

2.3.3 EXTRACCIÓN DE ADN CON EL MÉTODO CTAB.

Las muestras de roya amarilla de pasto ovillo y cebada fueron enviadas al Laboratorio de Genómica de la UPCH, las cuales fueron almacenadas a una temperatura de -80°C , con esta temperatura se evita la contaminación y degradación de las muestras. Se utilizó el método (CTAB 2x) con algunas modificaciones, Roose Amsaleg et al. (2002), debido a que solo se requiere ADN de las esporas de pústulas de roya amarilla, mas no así de las plantas.

A continuación se explica los pasos realizados para la extracción de ADN genómico:

1. Retirar las muestras del refrigerador a -80°C , y colocarlas dentro de un cooler, para empezar a realizar la extracción.

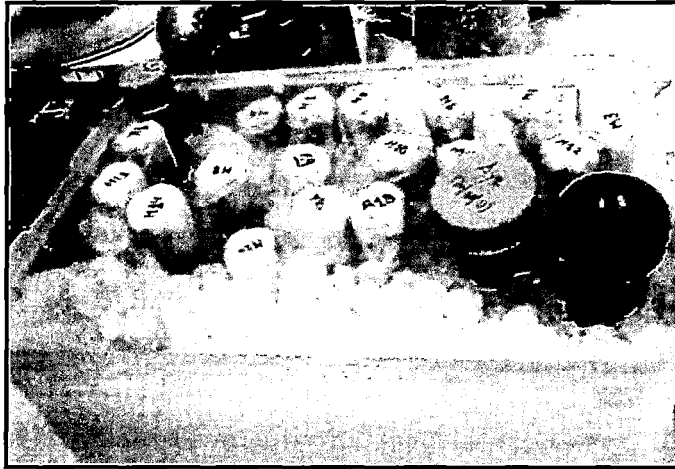


FIGURA N°19: Muestras y reactivos para la extracción de DNA.

2. De las muestras de hojas de pasto ovillo y cebada se cortaron trozos pequeños para colocarlos en tubos de Eppendorf de 1.5 ml. para luego añadirles NFW (Water Free Nuclease), y pasarle vortex, para evitar burbujas.



FIGURA N°20: Corte de muestras en trozos pequeños y colocados en tubos Eppendorf.

3. Los tubos con las muestras se llevan a la centrifugadora a una velocidad de 13 mil rpm, por 10 minutos, a 20 °C, con lo que obtenemos un pellet y eliminamos el sobrenadante.
4. Luego agregamos 50uL de buffers de extracción (CTAB 2X, recientemente preparado y agregando 0.2% de β -mercaptoetanol), con ayuda de un mortero de plástico trituramos el pellet de esporas durante unos 2 – 5 minutos. Completamos con buffer de extracción (CTAB 2X) el tubo, hasta alcanzar un volumen de 600uL, tratando de limpiar todos los residuos pegados al mortero. Mezclar bien los componentes con la ayuda de un vortex.



FIGURA N°21: Trituración mecánica de las uredosporas.

5. Agregar 20uL de Proteinasa K (20ng/uL). Luego colocar los tubos a 65°C, en el Termomixer confort (1.5ml) a 600 rpm, durante 2 horas (invertir cada 15 minutos). Dejar enfriar a temperatura ambiente. En la extracción de DNA sin el uso de Proteinasa "K" no se agrega este reactivo a las muestras.



FIGURA N° 22: Uso de proteinasa K en la extracción del DNA genómico.

6. Agregar 600uL de cloroformo:alcohol-isoamilico (24:1) a cada tubo. Mezclar suavemente e invertir los tubos varias veces (mínimo 10 veces). Centrifugar a 14000rpm por 5 minutos.
7. Transferir la parte acuosa superior a un tubo de microcentrifuga nuevo de 2ml. Luego agregar a cada tubo, 50uL de CTAB 10X, mezclar por inversión y repetir pasos 5 y 6.

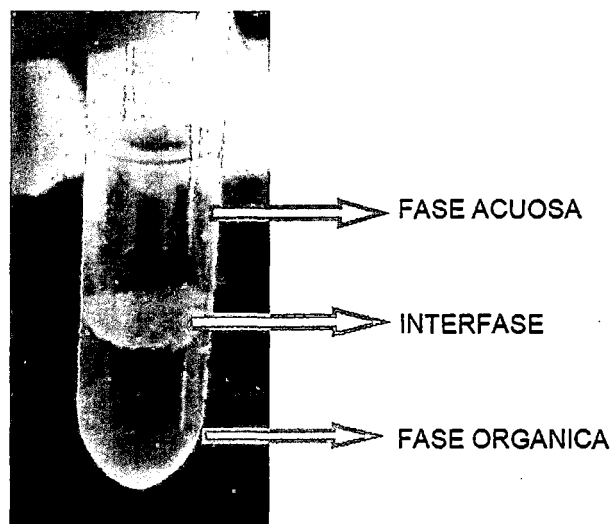


FIGURA N°23: Fases del DNA genómico extraído.

8. Centrifugar a 14000rpm por 5 minutos. Transferir la parte acuosa superior a un tubo de microcentrifuga nuevo de 1.5ml. Luego agregar un volumen igual de isopropanol (400 – 500uL) a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejar a 4°C por 30 minutos o a -20°C por 15 minutos. En este punto las muestras pueden permanecer refrigeradas por toda una noche.
9. Centrifugar a 14000 rpm por 20min y descartar el sobrenadante. Lavar por inversión el pellet con 1mL de etanol 80 % por 1 minuto y centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos. Cuidadosamente descartar el etanol.



FIGURA N°24: Lavado del pellet con etanol al 80%.

10. Lavar por inversión el pellet con 1mL de etanol 90% por 1 minuto y centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos. Cuidadosamente descartar el

etanol. Con ayuda de una pipeta retire el máximo de líquido posible, luego invierta los tubos y dejar secar el pellet por toda una noche.



FIGURA N°25: Pellet secado por toda una noche.

11. Resuspender el ADN en 40uL de TE, agregar 1.5uL de RNAsa (10 mg/mL). Incubar a 37°C por 1 hora. Almacenar el ADN extraído a 4°C por 6 meses o a -20°C si es por un periodo mayor.
12. La cuantificación de la cantidad de DNA extraído se realiza mediante el espectrofotómetro, Nanodrop, de acuerdo a la cantidad de DNA se realizara las diluciones a una concentración homogénea.

2.3.4 PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DEL ITS MEDIANTE PCR.

La amplificación del gen ITS1 y gen ITS4 propuesta por Vogler y Bruns, (1998), se realizó utilizando el termociclador de Eppendorf. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50µl, a una cantidad de primers de 0.4µM, a una concentración de 0.2mM de dNTP y 2.0mM de cloruro de magnesio en tampón de reacción 1X.

Se utilizaron los siguientes primers:

SECUENCIA DEL Primer ITS1:

5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

SECUENCIA DEL Primer ITS4:

5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

PARA LA TEMPERATURA DE ANNEALING DE 50°C:

El programa del termociclador con el cual se empezó a optimizar el PCR fue: Pre-denaturación a 95°C por 5 minutos, *seguido de 35 ciclos con tres etapas de Desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, Annealing a 50°C durante 40 segundos, y Extensión a 72°C durante 1 minuto.* Posteriormente a los ciclos se programó una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

1. Preparación del MIX de PCR para 07 Reacciones (Con y Sin el uso de Proteinasa "K"). Las muestras de DNA están a una concentración homogénea de 20ng/μl, y todas las reacciones se lleva a un volumen final de 50μl debido a que se necesita mayor cantidad para el secuenciamiento.



FIGURA N°26: Reactivos para preparar el MIX de PCR.

CUADRO N° 04: Cálculos para el MIX de PCR a temperatura de Annealing de 50°C.

	[] inicial	[] final	Volumen 1Rxx	Volumen 7Rxx
NFW			20.6 µl	144.2
Buffer 5X	5X	1X	10.0 µl	70.0 µl
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	4.0 µl	28.0 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1.0 µl	7.0 µl
F (ITS 1)	10 µM	0.4 µM	2.0 µl	14.0 µl
R (ITS 4)	10 µM	0.4 µM	2.0 µl	14.0 µl
Taq DNA polimerasa	5.0U/µl	1.0 U/µl	0.4 µl	2.8 µl
DNA			10.0 µl	
		Vol. Final	50.0 µl	280.0 µl

PARA LA TEMPERATURA DE ANNEALING DE 55°C:

El programa del termociclador con el cual se empezó a optimizar el PCR fue: Pre-denaturación a 95°C por 5 minutos, *seguido de 35 ciclos con tres etapas de Desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, Annealing a 55°C durante 40 segundos, y Extensión a 72°C durante 1 minuto.* Posteriormente a los ciclos se programó una extensión final a 72°C durante 7 minutos, metodología propuesta por Vogler y Bruns (1998).

2. Preparación del MIX de PCR para 19 Reacciones (Con uso de Proteinasa "K"). Las muestras de DNA están a una concentración homogénea de 20ng/μl, y todas las reacciones se lleva a un volumen final de 50μl debido a que se necesita mayor cantidad para el secuenciamiento.

CUADRO N° 05: Cálculos para el MIX de PCR a temperatura de Annealing de 50°C.

	[]inicial	[]final	Volumen 1Rxx	Volumen 19Rxx
NFW			20.6 μl	391.4 μl
Buffer 5X	5X	1X	10.0 μl	190 μl
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	4.0 μl	76 μl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1.0 μl	19 μl
F (ITS 1)	10 μM	0.4 μM	2.0 μl	38 μl
R (ITS 4)	10 μM	0.4 μM	2.0 μl	38 μl
Taq DNA polimerasa	5.0U/μl	1.0 U/μl	0.4 μl	7.6 μl
DNA			10.0 μl	
		Vol. Final	50.0 μl	760 μl

3. El control negativo es todo el MIX sin DNA, y se reemplaza con NFW, o puede ser otro organismo que no amplifique (no debe ser DNA de patógeno).
4. En 17 tubos de Eppendorf de 1.5 ml se coloca el DNA extraído de cada muestra (10.0 μl), luego de agrega el MIX de PCR, a cada tubo, menos la Taq DNA Polimerasa, esto se agrega al final por su fácil degradación a temperatura ambiental. Finalmente se da un vortex y se lleva al Temociclador.

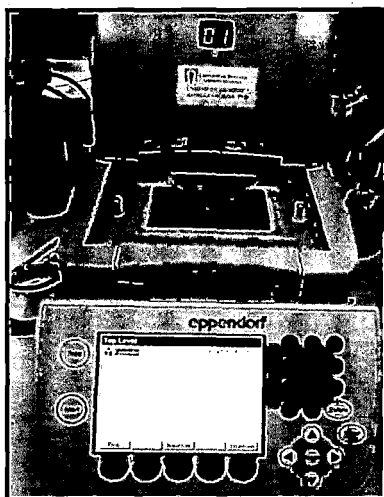


FIGURA N°27: Muestras en el termociclador, previo proceso de PCR.

El análisis de los resultados de la PCR se realizó con un gel de agarosa al 1% la muestra (5 μ l) del PCR fue coloreada con Loading buffer Orange (1 μ l), y se corrió el marcador 100bp Ladder (1 μ l), lo cual fue teñido con bromuro de etidio (10mg/ml). El gel se fotografió en el transiluminador Molecular BIOMETRA.

El marcador de 100bp Ladder, patrón de peso molecular conocido, nos indicara el peso molecular de las bandas, comparando las migraciones electroforéticas.

2.3.5 ELUCIÓN DE LA BANDA DE ADN_r

Se prepararon las reacciones de PCR en volúmenes de 50 μ l para obtener mayor cantidad de producto el cual pueda ser purificado a partir de los geles de agarosa. Para la purificación se utiliza in kit comercial Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), que facilita el proceso.

1. Del gel de agarosa corrido de las muestras del PCR, se cortan trozos pequeños de bandas.



FIGURA N°28: Corte de trozos de DNA.

2. Luego de agregar Menbrana Binding Solution, dar vortex.

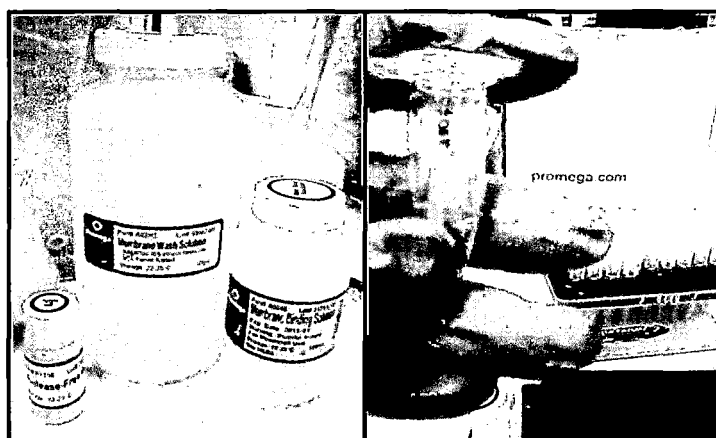


FIGURA N°29: Purificación del DNA con el Kit comercial Wizard®.

3. Lo llevamos al Termomixer Confort (Eppendorf) a 65° por 10 minutos dándole vortex cada 2 minutos.
4. Luego lo centrifugamos a 14000 rpm por 1 minuto.
5. Eliminamos el líquido inferior y agregamos 700µl de Menbrana Binding Solution y lo centrifugamos 14000 por 1 minuto, luego eliminamos el líquido inferior y agregamos 500µl de Menbrana Binding Solution a la reja lo volvemos a centrifugar 14000 durante 5 minutos, finalmente eliminamos el líquido inferior y agregamos 50 µl de NFW a 14000rpm durante 1 minuto.

Se prepararon las muestras para el envío a secuenciar en la empresa Macrogen (Corea del Sur) y con los resultados se realizaron los análisis bioinformática.

2.3.6 EVALUACIÓN DE SECUENCIAS MEDIANTE PROGRAMAS BIOINFORMATICOS.

La evaluación de secuencias se realizó a través de software en línea, que tiene una base de información acerca de regiones de genes estudiados a nivel internacional y almacenado en una base de datos denominada Genbank. Las secuencias que nos enviaron de Macrogen, fueron comparadas mediante estos programas: BLAST y CLUSTAL, los cuales nos brindan resultados de la comparación como: porcentaje de la identidad, gaps, score, etc.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DE LA METODOLOGIA PARA CULTIVOS MONOPUSTULARES.

Se evaluó los resultados de la propagación monopustular en los diferentes tratamientos y se describió morfológicamente la roya amarilla de la cebada y del pasto ovillo, para lo cual se tomó las medidas biométricas de cada espora en tanto en cebada como en pasto ovillo.

3.1.1 EVALUACIÓN DE LA INOCULACIÓN EN PASTO OVILLO.

La unidad experimental fue conformada por una hoja con una pústula de roya amarilla, la evaluación se realizó cuantificando la cantidad de pústulas por hoja a los 22 días luego de haber realizado la inoculación, los datos obtenidos se muestran en el CUADRO N° 6.

CUADRO N° 06: Número de pústulas por tratamiento en hojas de pasto ovillo, diseño experimental DCR.

PASTO OVILLO					
FACTORES		REPETICIONES			
ADHERENTE	TIEMPO EN OSCURIDAD A 8.5°C	1	2	3	4
A1 (AGUA)	T1 (1 DIA)	2	3	3	2
	T2 (2DIAS)	8	10	12	7
	T3 (3DIAS)	15	18	15	20
A2 (AGAR)	T1 (1 DIA)	3	2	5	7
	T2 (2DIAS)	14	12	13	12
	T3 (3DIAS)	18	20	22	19
A3 (CLIP)	T1 (1 DIA)	2	2	4	5
	T2 (2DIAS)	7	9	7	10
	T3 (3DIAS)	16	15	19	15

En el CUADRO N° 07, se muestra los resultados del Análisis de Variancia, el cual indica que los efectos principales de Adherente (A) y Tiempo (T) en cámara húmeda resultaron ser altamente significativos (p: 0.05 y 0.01); siendo mayor el valor calculado que el valor de la tabla de valores; lo mismo ocurre con la interacción (AxT) de ambos factores que resulto ser altamente significativo.

CUADRO N° 7: Análisis de variancia de los tratamientos en la inoculación de pústulas de roya amarilla en pasto ovillo.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	Fc	FT (0.05, 0.01)
Adherente (A)	2	64.889	32.444	10.3976	3.35 5.49 **
Tiempos (T)	2	84.056	42.028	13.4688	3.35 5.49 **
Interaccion (AxT)	4	1163.111	290.778	93.1869	2.73 4.11 **
Error	27	84.250	3.120		
Total	35	1396.306			

C.V.17%

En el CUADRO N° 08, se muestra la prueba de contraste de Tukey para el efecto principal del Adherente, resultando el mejor Adherente agar (A2) con un promedio de 12 pústulas por hoja inoculada; seguido de Adherente agua (A1) con un promedio de 10 pústulas por hoja inoculada, y finalmente el Adherente clip (A3) con un promedio de 9 pústulas por hoja inoculada; siendo diferente el tratamiento Agar (A2) de los demás Adherentes. La FIGURA N°30 muestra los resultados de cada tratamiento.

CUADRO N° 8: Prueba de contraste de Tukey para los efectos principales del adherente.

	Adherente	Promedio número de pústulas	TUKEY 0.05
Agar	A2	12.25	a
Agua	A1	9.58	b
Clips	A3	9.25	b

El CUADRO N° 9, muestra la prueba de contraste de Tukey para los efectos principales del tiempo, resultando el mejor tiempo de tres días en cámara húmeda (T3) con un promedio de 18 pústulas por hoja inoculada; seguido del tiempo de dos días en cámara húmeda (T2) con un promedio de 2 pústulas por hoja inoculada; y finalmente el tiempo de 1 día en cámara húmeda (T1) con un promedio de 3 pústulas por hoja inoculada; los tres tiempos en cámara húmeda mostraron diferencia entre si. La comparación de éstos se puede observar en la FIGURA N°30.

CUADRO N° 09: Prueba de contraste de Tukey para los efectos principales de tiempo.

	Tiempos en C.H.	Promedio número de pústulas	TUKEY 0.05
3 dias C.H.	T3	17.6	a
2 dias C.H.	T2	2.4	b
1 dia C.H.	T1	3.3	c

Al existir alta significación en la interacción (AxT) se realiza el estudio de ésta, la cual se basa en el análisis de los efectos simples; es decir cada uno de los adherentes (A) en cada tiempo de cámara húmeda, y los diferentes tiempos (T) en cada tipo de adherente. El ANVA de los efectos simples y el resumen de este se muestran en el Anexo N°01.

En el CUADRO N°10a, prueba de promedios de Tukey (0.05) de los efectos simples de Adherentes (A) en cada tiempo en cámara húmeda (t1, t2 y t3).

CUADRO N° 10a. Prueba de promedios de Tukey (0.05).

TRATAMIENTOS	n	PROMEDIO	TUKEY 0.05		
T en a1					
t3 en a1	4	17	a		
t2 en a1	4	9.25		b	
t1 en a1	4	2.5			c
T en a2					
t3 en a2	4	19.8	a		
t2 en a2	4	12.8		b	
t1 en a2	4	4.25			c
T en a3					
t3 en a3	4	16.25	a		
t2 en a3	4	8.25		b	
t1 en a3	4	3.25			c

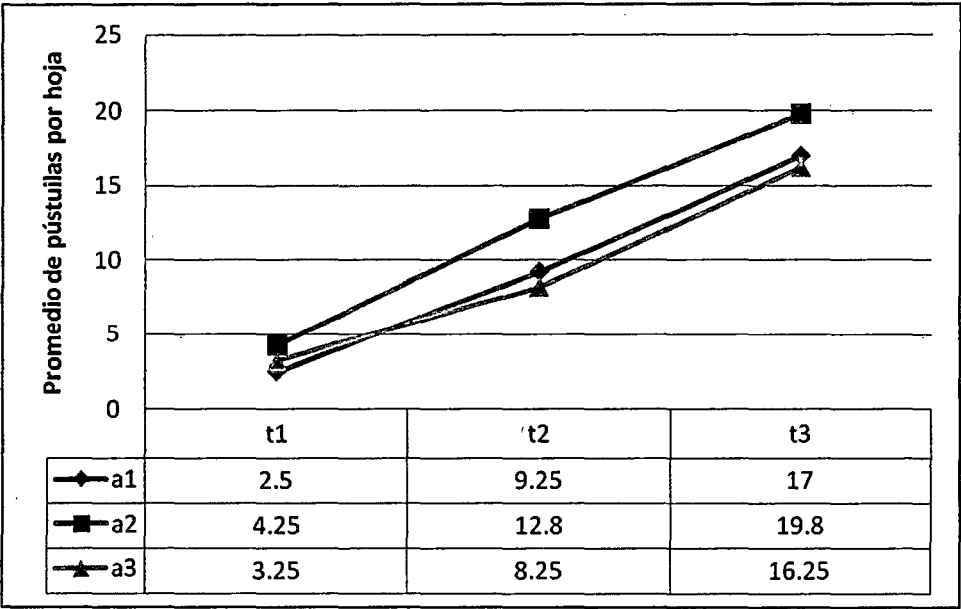
En el CUADRO N°10b, prueba de promedios de Tukey (0.05) de los efectos simples de los tiempos en cámara húmeda (T) con cada tipo de Adherente (a1, a2, y a3).

CUADRO N° 10b. Prueba de promedios de Tukey(0.05).

TRATAMIENTOS	n	PROMEDIO	TUKEY 0.05	
A en t1				
a2 en t1	4	4.25	a	
a3 en t1	4	3.25	a	
a1 en t1	4	2.5	a	
A en t2				
a2 en t2	4	12.8	a	
a1 en t2	4	9.25		b
a3 en t2	4	8.25		b
A en t3				
a2 en t3	4	19.8	a	
a1 en t3	4	17		b
a3 en t3	4	16.25		b

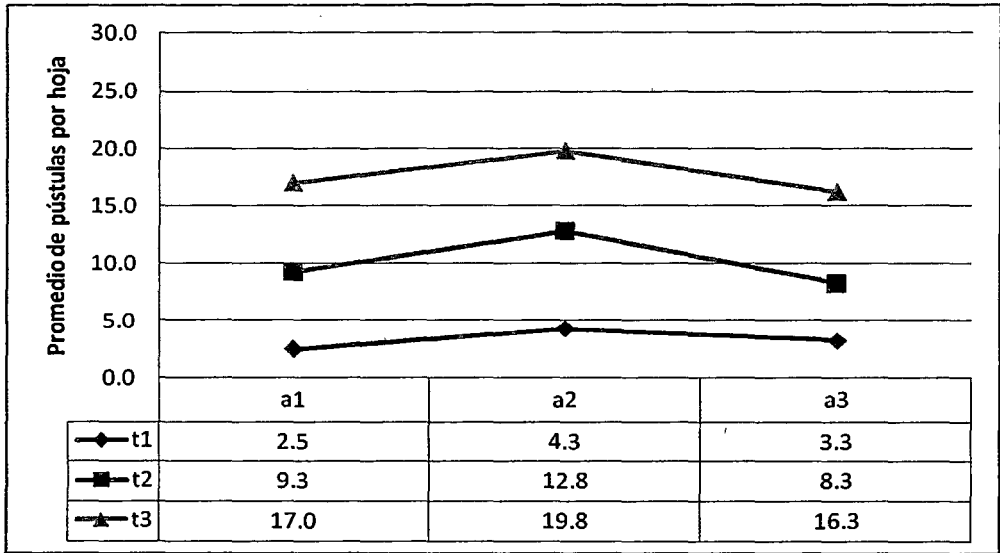
En el gráfico N° 01a, se muestra el estudio de los efectos simples en diferentes tipos de adherentes (A) en cada tiempo en cámara húmeda (t1, t2 y t3), el mayor número de hojas infectadas con pústulas fue cuando se utilizó en la inoculación el adherente agar (A2), mostrando diferencia con respecto a los adherentes.

GRAFICO N° 01a. Estudio de los efectos simples de los diferentes tipos de Adherente en cada tiempo en cámara húmeda.



En el gráfico N° 1b, se muestra el estudio de los efectos simples en diferentes tiempos en cámara húmeda (T) en cada adherente (a1, a2 y a3), el mayor número de hojas con pústulas se logró al tercer día en cámara húmeda, mostrando diferencia frente a los demás tiempos en cámara húmeda.

GRAFICO N° 01b. Estudio de los efectos simples de los diferentes tipos de Adherente en cada tiempo en cámara húmeda.



Del presente experimento se destaca que el Adherente agar (A2), mostro mayor número de pústulas por hoja inoculada; en un periodo de tiempo de tres días (T3) en cámara húmeda, el cual es propicio para la diseminación del patógeno.

En la FIGURA N° 30, se muestra los resultados del tratamiento con el mejor adherente Agar (A2) y en los diferentes tiempos en cámara húmeda, el tiempo óptimo para que germine la uredospora e ingrese a la planta es de 3 días (T3), el cual presenta los mejores resultados con mayor cantidad de pústulas en las hojas inoculadas.

Zadokset *al.*, (1974), menciona que resultaron mejor las plantas inoculadas en una cámara con temperatura de 10°C en completa oscuridad y 100% de humedad relativa durante 24 horas.

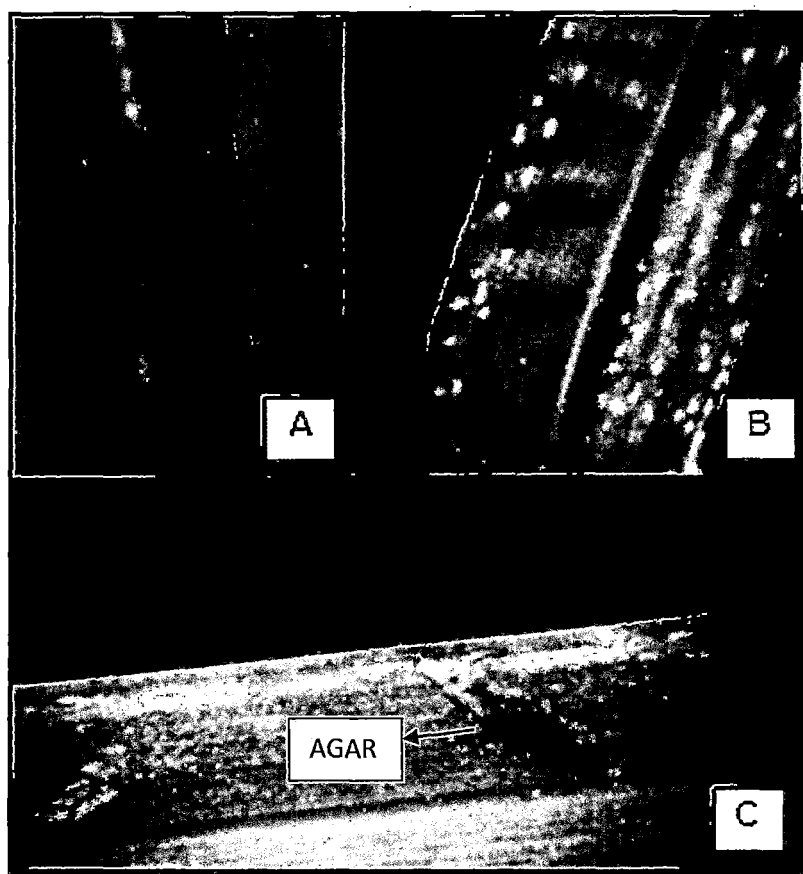


FIGURA N°30: Multiplicación monopustular de roya amarilla en pasto ovillo. A Tratamiento (A2T1), B Tratamiento (A2T3), C Tratamiento (A2T2), entre 18 a 22 días después de realizado la inoculación.

3.1.2 EVALUACIÓN DE LA INOCULACIÓN EN CEBADA.

En este cultivo se evaluaron los mismos tratamientos tanto de la aplicación de adherentes y tiempos en cámara húmeda, los resultados no se lograron registrar debido a que la variedad de cebada no reprodujo las pústulas inoculadas, y en muchos casos se contaminaban las muestras con otros microorganismos saprofitos o facultativos que lo deterioraban tal como se muestra en la FIGURA N°31; además la variedad de cebada utilizada fue la "cebada común", debido a la información que nos

brindaron los agricultores sobre la susceptibilidad a la roya amarilla; y no se ha utilizado una variedad que haya sido registrada genéticamente como altamente susceptible a la roya.



FIGURA N°31: Las Fotografías A y B demuestran el deterioro por patógenos del cultivo de cebada inoculado con roya amarilla, estos resultados se presentaron a los 20 días después de la inoculación.

Sin embargo luego de varias repeticiones e intentos se logró la multiplicación monopustular de roya amarilla en cebada lo cual se muestra en la Figura N°32, los resultados se observaron en el tratamiento (A2T2) y en las 3 repeticiones, mas no así en todos los tratamientos para evaluar los parámetros en estudio, estos datos se muestran en la CUADRO N°11.

CUADRO N° 11: Número de pústulas luego de la multiplicación monopustular de roya amarilla en cebada entre los 18 y 25 días de inoculado.

CEBADA COMUN					
FACTORES		REPETICIONES			
ADHERENTE	TIEMPO EN OSCURIDAD	1	2	3	PROM.
	A 8.5°C				
A2 (AGAR)	T2 (2DIAS)	10	27	12	16

Como se muestra en la Cuadro N° 11, los datos obtenidos pertenecen a 3 repeticiones, por lo que solo se obtuvo el promedio.

La FIGURA N°32, se muestran pústulas con uredosporas y teliosporas, esto se debería al comportamiento de la roya para producir sus estructuras de conservación, debido a las condiciones desfavorables que se presentaron.



FIGURA N°32: Multiplicación monopustular de roya amarilla en cebada, las fotografías A, B y C pertenecen al tratamiento (A2T2), entre 25 a 28 días después de realizado la inoculación.

3.1.3 DESCRIPCIÓN BIOMÉTRICA Y MORFOLOGÍA DE ESPORAS.

Se realizó la comparación biométrica (CUADRO N°12), y se evaluó las características morfológicas (FIGURA N°33) de uredosporas, que resultaron de la inoculación realizada en cebada y pasto ovillo.

CUADRO N° 12: Datos obtenidos con el microscopio óptico y el ocular micrométrico (10X/40X), las medidas evaluadas son de largo y ancho de una uredospora en micrómetros. El factor de conversión fue 2.632µm.

N° DE MUESTRAS	UREDOSPORAS DE ROYA AMARILLA EN PASTO		UREDOSPORAS DE ROYA AMARILLA EN CEBADA	
	LARGO (µm)	ANCHO (µm)	LARGO (µm)	ANCHO (µm)
1	15.79	10.53	15.79	21.06
2	13.16	10.53	13.16	18.42
3	15.79	13.16	18.42	21.06
4	13.16	13.16	13.16	18.42
5	13.16	13.16	15.79	13.16
6	13.16	10.53	18.42	13.16
7	10.53	10.53	18.42	15.79
8	13.16	15.79	15.79	13.16
9	13.16	10.53	15.79	13.16
10	15.79	15.79	15.79	18.42
11	15.79	13.16	18.42	18.42
PROMEDIO	13.88	12.44	16.27	16.75

Las características de las uredosporas de roya amarilla en cebada y pasto ovillo se muestran en la FIGURA N°33, ambas uredosporas demostraron ser diferentes tanto en largo como ancho de uredosporas, siendo las más grandes las uredosporas de roya amarilla en cebada, con un largo promedio de 16.3 µm, y un ancho de 16.8 µm; mientras la uredospora de roya amarilla en pasto tiene un largo promedio de 13.9 µm y un ancho de 12.4 µm. Se realizó la prueba de contraste de TUKEY para ambos parámetros (largo y ancho), en uredosporas de roya amarilla en cebada y uredosporas de roya amarilla en pasto ovillo.

CUADRO N° 13. Análisis de variancia para el Largo de uredoporas de roya amarilla de cebada y pasto ovillo.

	G.L.	S.C.	C.M.	F. calculado	F. tabular		**
TRATAMIENTOS	1	30.4	30.4	10.93	0.05	0.01	
ERROR	20	55.68	2.78	—	4.35	8.10	
TOTAL	21	86.08	—	—			

El ANVA demuestra que hay una alta significancia estadística, por ello se realiza la prueba de TUKEY.

CUADRO N° 14. Prueba de contraste de TUKEY para el parámetro largo de uredoporas.

TRATAMIENTOS	PROMEDIO	TUKEY 0.05	
L.U.R.A en Cebada	13.88	a	
L.U.R.A en Pasto Ovillo	16.27		b

La prueba de TUKEY demuestra estadísticamente, que hay diferencia entre las dos medidas de largo de uredosporas, el largo de uredosporas de roya amarilla en pasto ovillo es 16.3µm mayor al largo de uredosporas de roya amarilla de cebada 13.9 µm.

CUADRO N° 15. Análisis de variancia para el ancho de uredoporas de roya amarilla de cebada y pasto ovillo.

	G.L.	S.C.	C.M.	F. calculado	F. tabular		**
TRATAMIENTOS	1	101.95	101.95	14.2	0.05	0.01	
ERROR	20	143.54	7.18	—	4.35	8.10	
TOTAL	21	245.49	—	—			

El ANVA demuestra que hay una alta significancia estadística, por ello se realiza la prueba de TUKEY.

CUADRO N° 14. Prueba de contraste de TUKEY para el parámetro del ancho de uredoporas.

TRATAMIENTOS	PROMEDIO	TUKEY 0.05	
A.U.R.A en Cebada	12.44	a	b
A.U.R.A en Pasto Ovillo	16.75		

La prueba de TUKEY demuestra estadísticamente, que hay diferencia entre las dos medidas de largo de uredoporas, el ancho de uredoporas de roya amarilla en pasto ovillo es 16.8µm mayor al ancho de uredoporas de roya amarilla de cebada 12.4 µm.

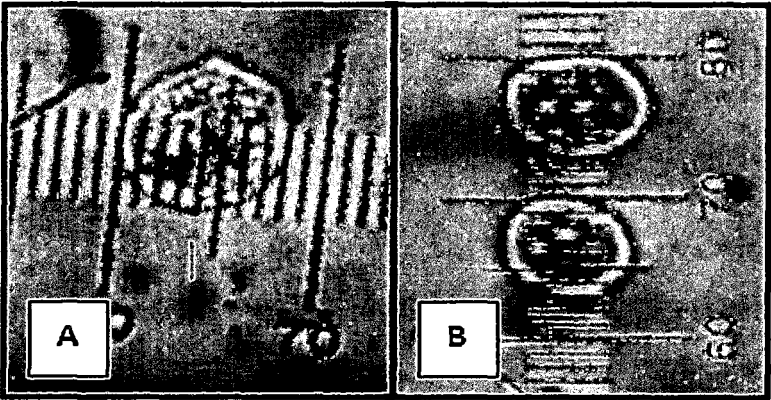


FIGURA N° 33: Fotografías. Uredoporas observadas al microscopio óptico (10X/40X) con ocular micrométrico. A. uredospora correspondiente a roya amarilla de cebada, B. uredospora correspondiente a roya amarilla de pasto ovillo.

Las uredoporas de roya amarilla en pasto ovillo muestran un color amarillo y de forma ovoide, a diferencia de las uredoporas de roya amarilla en cebada que presentan forma circular y de color amarillo, ambas uredoporas tienen el mismo color y tamaño de pared 2.6µm.

3.2 DE LA ESTANDARIZACIÓN DE PRÓTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Una de las etapas determinantes de los procedimientos analíticos basados en PCR es la extracción y purificación de DNA, ya que la detección depende de la calidad e integridad del DNA extraído García et al, (2010).

La extracción de DNA genómico de patógenos, se realizó mediante el método CTAB, mencionado por Roose Amsaleg et al. (2002); a partir de la cual se evaluó agregar el reactivo proteinasa "K" mencionada por Wingfiel et al, (2004), en la extracción de DNA genómico de esporas.

Se realizó la evaluación de las muestras con y sin agregar proteinasa "K" en la extracción de DNA genómico; después de evaluar este primer resultado se realizó la extracción de DNA de las muestras con la mejor metodología.

3.2.1 DE LA EVALUACIÓN DEL USO DE PROTEINASA "K" EN LA EXTRACCIÓN DEL DNA.

La proteinasa K, es una enzima que hidroliza proteínas, entre ellas las enzimas ADNasas que además de digerir el DNA interfieren durante el proceso de amplificación por PCR. Algunos autores sugieren que es suficiente la adición del agente quelante EDTA, que retira iones metálicos Mg^{2+} o Ca^{2+} que actúan como cofactores de las ADNasas evitando usar la enzima proteinasa K, mencionada por Csaikl U.M. et al, (1998).

CANTIDAD DE DNA EXTRAIDO DE LAS MUESTRAS

La cantidad del DNA genómico extraído se evaluó a través del espectrofotómetro, y la medida de la pureza se realizó midiendo la absorbancia a 280nm, siendo el coeficiente de absorbancias 260/280 el que nos indica la pureza de la solución. Un cociente de 1.8 indica que la solución es de DNA puro, valores inferiores indican una contaminación por proteínas o polifenoles mientras que si la relación es de 2.0 se trata de ADN puro. Se utilizó 2µl del total de cada una de las muestras.

CUADRO N° 13: Stocks de DNA de muestras de roya amarilla en cebada, DNA de roya amarilla en pasto ovillo y DNA de hojas de cebada.

COD.	PROVINCIA	DISTRITO	DNA EXTRACTION	DNA (ng/µl)	CALIDAD DE DNA ELECTROFORESIS	PROTEINASA "K"
P1	HUAMANGA	AYACUCHO	✓	28.0	BUENA	CON
P2	HUAMANGA	AYACUCHO	✓	11.2	BUENA	SIN
P3	HUAMANGA	AYACUCHO	✓	18.6	BUENA	CON
P4	HUAMANGA	AYACUCHO	✓	21.0	BUENA	SIN
C1	HUAMANGA	CARMEN ALTO	-	0.0	NO HAY DNA	CON
C2	HUAMANGA	CARMEN ALTO	-	0.0	NO HAY DNA	SIN
CEB	HUAMANGA	AYACUCHO	✓	104.0	BUENA	SIN

De las muestras de roya amarilla de cebada (C1 y C2), no se logró extraer DNA, según la cuantificación por espectrofotometría, lo cual puede deberse a la falla de la trituración mecánica y la poca cantidad de muestra (esporas) que se utilizó para la extracción de DNA, debido a que degradaciones y/o una cantidad insuficiente de DNA tiene como consecuencia la disminución de la eficacia del proceso de PCR como lo menciona Sommer R, (1989).

INTEGRIDAD DEL DNA DE LAS MUESTRAS.

Luego de obtener los valores de concentración de DNA, se evaluó la integridad de éste, mediante el sistema de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, posteriormente el gel que contiene bromuro de etidio, es observado bajo luz ultra violeta con un transiluminador (BIOMETRA) y fotografiado, el resultado se observa en la FIGURA N° 34.

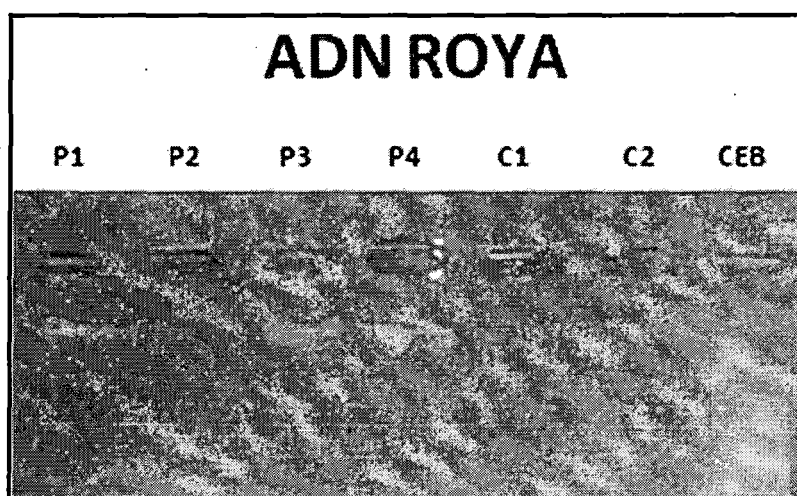


FIGURA N°34: Resultados de electroforesis del DNA extraído de muestras de roya amarilla en hojas de pasto ovillo (P1, P2, P3 y P4), roya amarilla en hojas de cebada (C1 y C2) y solo hojas de cebada (CEB).

Las muestras (P1, P3 y P4) muestran una banda uniforme y compacta, lo cual demuestra la integridad del DNA, en cambio la muestra P2 no presenta banda y es un tratamiento sin proteinasa "K"; las muestras C1 y C2 no presentan bandas, la muestra C1 es con proteinasa "K" y la muestra C2 es sin proteinasa "K", en tanto que las muestras de hojas de cebada (CEB), presenta una banda que está dispersa lo cual indica que el DNA está degradado. Al observar los resultados de la evaluación FIGURA

Nº 34, con y sin proteinasa K en la extracción del DNA, se observa que 2 muestras de 3 extracciones con proteinasa “K” (66.6%) resultaron con bandas integrales; en tanto que sin proteinasa “K” resultó 1 muestra de 3 extracciones (33.33%), con banda integral. Por lo tanto se decidió realizar la extracción de DNA para el PCR agregando proteinasa “K”.

3.2.2 DE LA EXTRACCIÓN DE DNA PARA PCR.

CANTIDAD DE DNA EXTRAÍDO DE LAS MUESTRAS:

La cantidad del DNA genómico extraído con proteinasa “K”, a partir de pústulas de roya amarilla, fue cuantificado con el espectrofotómetro, para lo cual se utilizó 2µl de DNA disuelto en TE. En la CUADRO Nº14 se presenta las cantidades obtenidas en ng/ul de las 5 muestras: roya amarilla de cebada (R-9), roya amarilla de pasto ovillo (PASTO I, PASTO II-A, PASTO II-B y P12).

CUADRO Nº14: Cantidad de DNA de muestras de roya amarilla en cebada y en pasto ovillo.

COD. GEL	MUESTRA	CODIGO	PROVINCIA	DISTRITO	CENTRO POBLADO	DNA extraction	[DNA] (ng/ul)	Calidad de DNA (electroforesis)
4	GRU027	R9	Huanta	Huamanguilla	Marayniyoq	✓	182.58	BUENA
5	GRU102	PASTO I	Huamanga	Ayacucho	Ayacucho	✓	28.05	BUENA
6	GRU103	PASTO II-A	Huamanga	Ayacucho	Ayacucho	✓	128.21	BUENA
7	GRU104	PASTO II-B	Huamanga	Ayacucho	Ayacucho	✓	440.24	BUENA
8	GRU105	P12 (PURIFICADO)	Huamanga	Ayacucho	Ayacucho	✓	55.12	BUENA

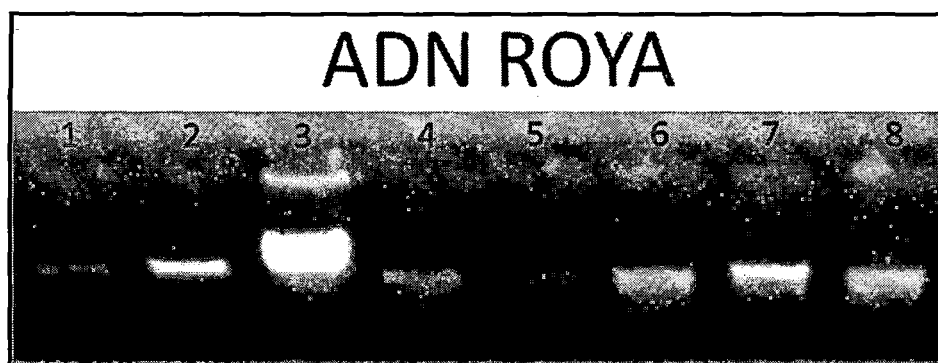
En el CUADRO Nº14, se muestra que se obtuvo gran cantidad de DNA a partir de esporas de roya amarilla de cebada y de pasto ovillo.

INTEGRIDAD DEL ADN DE LAS MUESTRAS.

Luego de tener los valores de concentración se realizó las diluciones de todas las muestras para obtener una dilución homogénea a 20ng/uL, a partir de este stock se extrajo 10uly se corrió en un gel de agarosa al 1% para observar la integridad de las muestras.

El resultado de electroforesis se observa en la FIGURA N°35, el marcador Lambda 5ng/uL en el pocillo N°01, Marcador Lambda 20ng/uL en el pocillo N°02, Marcador Lambda 100ng/uL en el pocillo N°03; las muestras de DNA de roya de cebada (R-9) en el pocillo N°04; y las muestras de roya amarilla en pasto ovillo PASTO I, en el pocillo N°05,PASTO II-A en el pocillo N°06, PASTO II-B en el pocillo N°07 y P12 (Pasto Purificado) en el pocillo N°08.

Estos resultados determinan la integridad de las muestras de DNA, por presentar una banda uniforme, fluorescente y sin degradaciones. Con este resultado y estas muestras se prosigio con el PCR.



**FIGURA N°35: Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%.
Muestras homogenizadas a 20ng/μl.**

3.2.3 DE LA ESTANDARIZACIÓN DEL PCR.

La estandarización del PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) descrita por Mullis y Faloona, (1987), se realizó modificando el programa, de temperatura en la fase de Annealing, evaluando dos temperaturas, a 50°C la primera modificación y la segunda a 55°C, esta es la temperatura de la unión de primers ITS1 e ITS4, propuesta por Vogler y Bruns, (1998); estas temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo están regulados por parámetros, incluyen la enzima usada para la síntesis de DNA, la concentración de iones divalentes, de los dNTP en la reacción, y la longitud del DNA que se desea copiar.

A. PCR CONTEMPERATURA DE ANNEALING A 50°C.

En la FIGURA N° 36, se muestra las bandas de DNA pertenecientes al gen ITS de roya amarilla, delimitado por los primers ITS1 e ITS4. El control negativo (C-) no amplificó ninguna banda indicando que el MIX de PCR no ha sido contaminado. Se observa la uniformidad de las bandas en las muestras (P1,P2, P3 y P4) el cual significa que el primer se ha hibridado correctamente en las muestras de roya amarilla de pasto ovillo. Las muestras de hojas de cebada (Ceb y CEB) presentan las bandas actuando como control positivo. Sin embargo el marcador Lambda indicador de peso molecular no polimerizó adecuadamente. Las bandas no se observan bien definidas a esta temperatura de Annealing de 50°C.

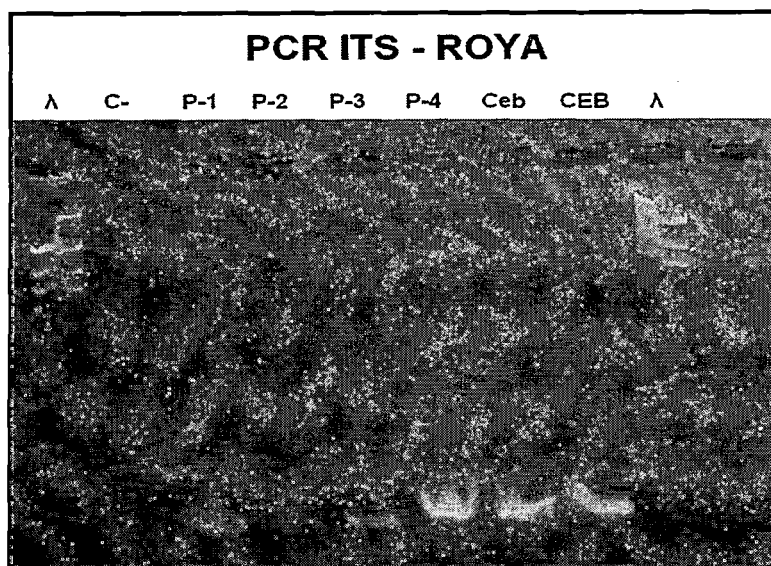


FIGURA N°36: Fotografía del PCR con los primers ITS1 e ITS4, a temperatura Annealing de 50°C, con el marcador 100bp (λ) Lambda a los extremos derecho e izquierdo, en el centro las muestras de DNA de roya amarilla en pasto ovillo y en cebada, en un gel de agarosa al 1%.

B. PCR CON TEMPERATURA DE ANNEALING A 55°C.

Según la FIGURA N°37, no hay presencia de otras bandas, el primer ITS1 e ITS4 solo amplificaron el gen de DNA ribosomal (GEN ITS), los pocillos N°1 y 7 pertenecen al marcador 100bp (Lambda), el cual nos indicara el peso molecular del DNA; las muestras de DNA de roya de cebada (R-9) en el pocillo N°02; y las muestras de roya amarilla en pasto ovillo PASTO I, en el pocillo N°03, PASTO II-A en el pocillo N°04, PASTO II-B en el pocillo N°05 y P12 (Pasto Purificado) en el pocillo N°06.

Al contrastar y alinear las muestras de roya amarilla en cebada y en pasto ovillo, se observa que las 5 muestras migraron y se alinearon al marcador

de peso 700bp, con lo cual se está demostrando mediante densitometria (electroforesis), que las muestra de roya amarilla de cebada y de pasto ovillo presentan la misma cantidad de pares de bases, que conforman el gen ITS de DNA ribosomal de la roya amarilla, esta cantidad de pb encontrada en roya amarilla de cebada también fue estudiada por Braithwaite et al., (2004), en la descripción filogenética de roya amarilla en cebada (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei). Las bandas bien definidas demuestran que la temperatura de Annealing de 55°C es la correcta para proseguir con el envío y secuenciamiento las muestras.

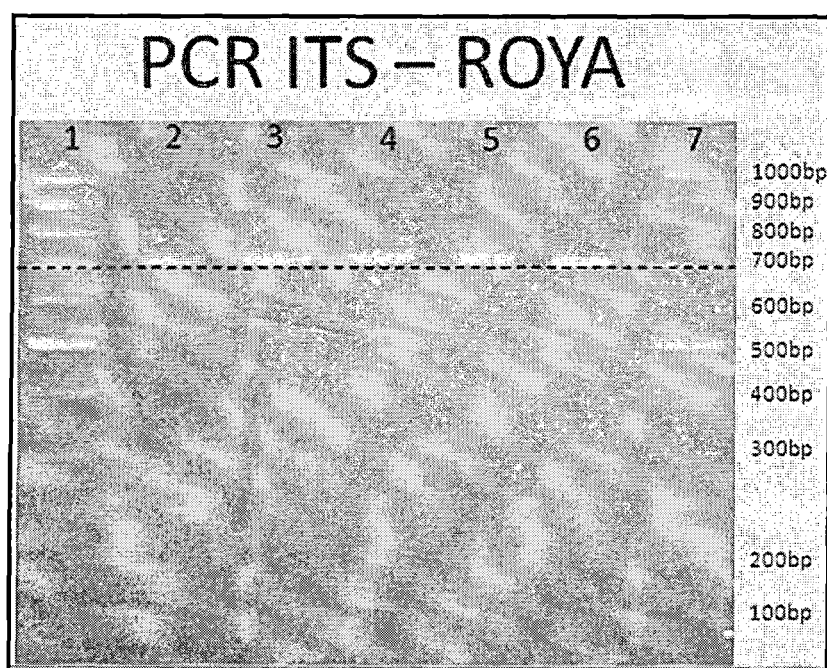


FIGURA N°37: Fotografía del PCR con los primers ITS1 e ITS4 a temperatura annealing de 55°C, con el marcador 100bp al lado derecho e izquierdo (pocillo 1 y 7), en el centro las muestras de DNA (pocillo 2 al 6) de roya amarilla en cebada y roya amarilla en pasto ovillo, en gel de agarosa al 1%.

3.3 DE LA COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DEL GEN ITS DEL rDNA.

Luego de realizado el PCR, se extrajeron las bandas del gen ITS del rDNA de roya amarilla, el cual fue purificado con el kit comercial Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), y se enviaron para su secuenciamiento a través de la compañía Macrogen (Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas con los cebadores ITS1 e ITS4 fueron analizados mediante comparación con la base de datos moleculares del Genbank, mediante el programa BLAST (NCBI 2007), que nos ayudó a comparar las secuencias de desoxinucleótidos de las muestras en estudio y otras similares evaluadas anteriormente, paralelamente las secuencias se alinearon mediante el software CLUSTAL.

3.3.1 DE LOS RESULTADOS DEL SECUENCIAMIENTO DEL GEN ITS DEL ADN RIBOSOMAL.

➤ SECUENCIA DEL GEN ITS DE ROYA AMARILLA EN CEBADA:

CUADRO N° 13: Secuencias de Gen ITS de la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei) de cebada (R9).

>SECUENCIA DEL GEN ITS DE ROYA DE CEBADA R9

```
TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGA
TCATTACAAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACT
CTGTTGCCTCCGGGGCGACCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAA
CTCTTGCGTAACCTTGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTAATAAACTTTTAACAAC
GGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCC
GGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCA
ACGCGGTCCGCCGCTGCCTCAAATCGACCGGCTTGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTG
```

➤ **SECUENCIAS DEL GEN ITS DE ROYA AMARILLA DE PASTO**

OVILLO:

CUADRO N° 14: Secuencias de Gen ITS en roya amarilla. (*Puccinia striiformis*) de Pasto Ovillo (PASTO II).

>SECUENCIA DEL GEN ITS DE ROYA DE PASTO OVILLO (PASTOII)

ATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAC
CTTTCTATCAGAAACCGCTCTATACTCGGGTTTGCCTGACGTGTAAGCGGTCTGATTCTCCCA
TGTCTTTTGCCTACTCTTGTTCCTGGGACAGGCTCGCCTGCCAACAGGACAACCTTACAACCT
TGCAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAGTAATTATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT
CATTTGTACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTACATCGACTCGCCTTAAAAACAATT
GGCAGCCGGCACGATAGCCTGAAGCGCAGCACATTTTGGCCTCTTGCTATTGCTGTTGGCAT
CCATCAAGATCTTTGCTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATC
ATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACA

CUADRO N° 15: Secuencias de Gen ITS del cultivo monopustular o purificado de roya amarilla en Pasto Ovillo (P12).

>SECUENCIA DEL GEN ITS DE PASTO OVILLO PURIFICADO (P12)

GTTAGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGCCCTACCTGATTGGA
GGCCAGATCATGAATATGTGGGGTTATCAGCCACCCAGAAGGATGAAACGTATTACATCCAA
GGTGCTTATGTCTTTAAGGCGAGCCTTTAGCAAGGCAACACCCAATACACCACCGCTCAGGCA
AAAACCCAAGTGGGGTGAGGTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCAAAG
GGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC
ATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTGTGTTTGT
TATGATATTACATTACTTAACAGTTTGTGATGGCCGAAGCCACAGTTTCACGGTGTGTATG
GAAACCTCTTCTTGCGAAGAGAGCAGATCTAACCAATGATTTGCATCAGAGGGCACTATTA
ATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGAA

3.3.2 ANALISIS BIOINFORMATICO DE SECUENCIAS DEL GEN ITS DEL ADN RIBOSOMAL MEDIANTE EL PROGRAMA BLAST.

El programa BLAST, es un programa Online utilizado para la comparación de secuencias de DNA, de especies similares ubicadas en la base de datos del GENE BANK, para este trabajo de investigación todas las secuencias fueron evaluadas con la base de datos de (*Puccinia striiformis* f.sp hordei), lo mismo realizo Cummis y Hiratsuka. (2003) para filogenia en roya amarilla de cebada.

A. BLAST DE R9 Y GENE BANK.

En la FIGURA N° 38, al comparar las secuencias obtenidas de la muestra de rDNA de cebada (R9), con las secuencias de (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei) del Genebank, se comprueba que es idéntica en un 86 %, con un E value de $1e-48$, Querycover de 54%, Total score de 387 y Max score de 180.

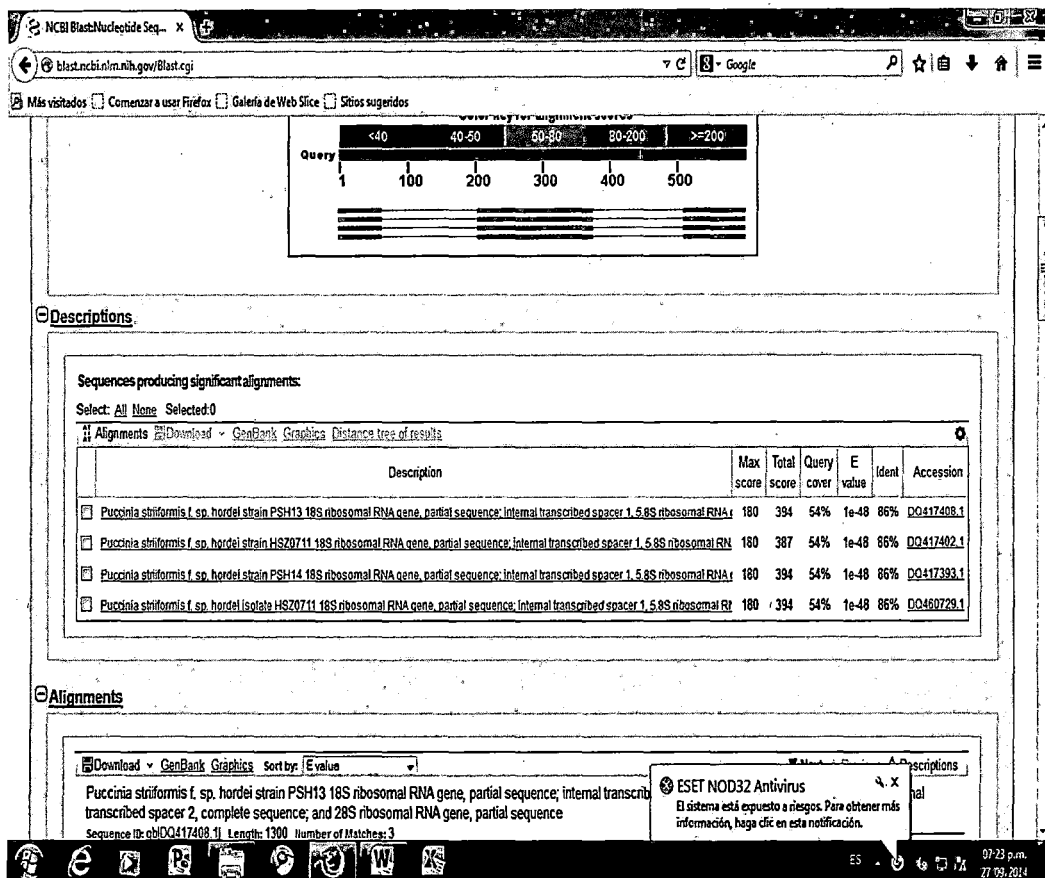


FIGURA N° 38: Comparación de secuencias de rDNA (ITS) de roya amarilla en cebada (R9), con roya amarilla de cebada (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei) del Genebank mediante el BLAST.

En la FIGURA N° 39, se muestra las comparaciones entre las desoxinucleótidos (pirimidinas y purinas), de los segmentos del gen ITS del rDNA de roya amarilla de cebada (R9), de las secuencias almacenadas en el Genebank y las secuencias en estudio. En la primera subunidad 18S la identidad entre el Query y Sbjct es 97% con un Gaps de 0%, lo cual puede deberse a una mutación o delección de las bases nitrogenadas; en la segunda subunidad 5.8S la identidad entre el Query y Sbjct es de 88%, con un Gaps de 6%, lo cual se debe a una mutación de

NCBI BlastNucleotide Seq.

Download
GenBank
Graphics
sort by: E-value

Next
Previous
Descriptions

Puccinia sturmifurmis f. sp. *hordei* strain PSH13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [cbiDO417458.1](#) Length: 1300 Number of Matches: 3

Range 1: 274 to 440
GenBank
Graphics

Next Match
Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
180 bits(97)	1e-48	147/171(86%)	4/171(2%)	Plus/Plus

Query 204
263

TTAATTAAATAAATTAAGCTTTTAAACAAGGATCTCTTGGTTCTGGCATGATGAAGAC
||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 274
329

TTAATT-ATAAA-T--AACTTTTAACTATGATCTCTAGGCTTCACATCGATGAGAAC

Query 264
323

GCAACGAAATGCGATAGTAACTGATGATGCAAGATCGATGATCATCGAATCTTGA
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 330
399

AACTGAAATGCGATAGTAACTGATGATGCAAGATCGATGATCATCGAATCTTGA

Query 324
374

CGCACTTGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 390
440

CGCACTTGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG

Range 2: 621 to 711
GenBank
Graphics

Next Match
Previous Match
First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
108 bits(56)	5e-27	83/94(88%)	6/94(6%)	Plus/Plus

Query 507
563

AAGCAACCCCAATTCATAGGTT--GACTTCGATCGATGATGAAGGAA-TACCCGCTGA
||| ||||| ||||| ||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 621
677

AAA-AAGCAATTT-TAGCTTAAGATCGATGATGAGT-GGACTACGCGCTGACTTGA

Query 564
597

AGCATATCAATAAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 678
711

AGCATATCAATAAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG

Range 3: 6 to 68
GenBank
Graphics

Next Match
Previous Match
First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
106 bits(57)	2e-26	61/63(97%)	0/63(0%)	Plus/Plus

Query 1
60

TCATTTAGAGGAGTAAAGTCTGATACAGGCTCTGATGAGTGGACTTCGGGAGATCA
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 6
65

TCATTTAGAGGAGTAAAGTCTGATACAGGCTCTGATGAGTGGACTTCGGGAGATCA

Query 61
63

TTA

Sbjct 66
68

TTA

Download
GenBank
Graphics
sort by: E-value

Next
Previous
Descriptions

Puccinia sturmifurmis f. sp. *hordei* strain H520744 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2

07:22 p.m.
27/09/2014

86

En la FIGURA N°40, se describe gráficamente la cantidad de pares de bases que son compatibles entre las secuencias de roya amarilla de cebada (R9) que son las muestras en estudio denominadas (Query) y las secuencias de roya amarilla en cebada (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei) del Genbank denominadas (Sbjct); la comparación se da en las regiones 18S, 5.8S y 28S del rDNA. En la región 18S el Query va desde 1 al 63pb y la Sbjct va desde 6 al 68pb; en la región 5.8S el Query va desde 204 al 374pb y la Sbjct va desde 274 al 440pb; y finalmente en la región 28S el Query va desde 507 al 621pb y la Sbjct va desde 597 al 711pb.

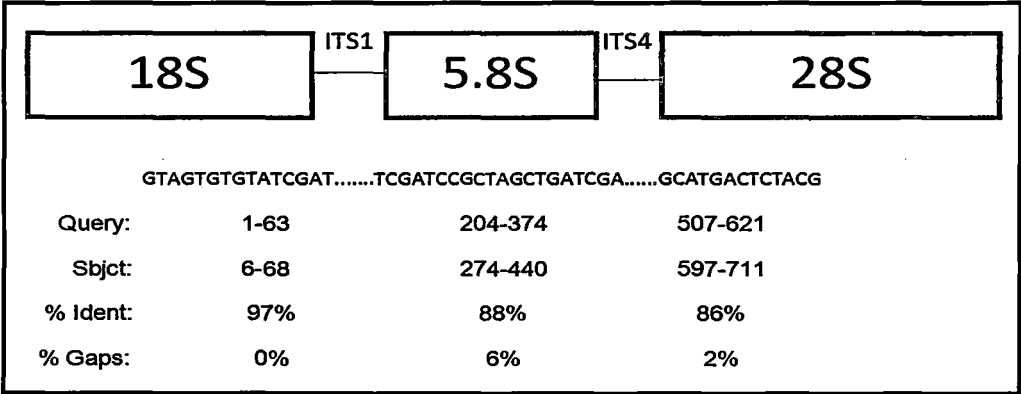


FIGURA N° 40: Ilustración grafica de la comparación de las secuencias de las muestras en estudio R9 (Query), y las muestras del Genebank (Sbcjt).

B. BLAST DE PASTO II Y GENE BANK.

En la FIGURA N°41, al comparar las secuencias obtenidas del gen ITS de roya amarilla en pasto ovillo, PASTO II con las secuencias de (*Puccinia striiformis* f.sp hordei) del Genebank, se comprueba que es idéntica en un 85%, con un E value de 6e-47, Querycover de 51%, Total score de 400 y Max score de 180.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain P2K01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	220	435	47%	3e-49	92%	JF704743.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	180	400	51%	6e-47	85%	DQ417393.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain HS27119 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	398	49%	2e-46	86%	KC395497.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain 9139 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	284	39%	2e-46	86%	JX047495.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain 45S119 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	JQ380861.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain 78984 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	JQ380860.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain T733 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	JN575605.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain RS460 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	JN575123.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain DAQ01 240021 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	HM057121.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain RS477 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	HM057120.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain DAQ01 240070 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	HM057119.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain DAQ01 240069 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	HM057118.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain DAQ01 240068 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	HM057116.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain HMAS 79075 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	HM057114.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PUR 66275 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	178	27%	2e-46	86%	HM057112.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain HS21872 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	391	49%	2e-46	86%	GU382673.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain HS21849 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	398	49%	2e-46	86%	GU382672.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain HS21847 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	178	398	49%	2e-46	86%	GU382671.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei isolate IS-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene	178	374	47%	2e-46	86%	FJ224378.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei isolate IS-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene	178	374	47%	2e-46	86%	FJ224376.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei isolate IS-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene	178	374	47%	2e-46	86%	FJ224375.1

FIGURA N° 41: Comparación de secuencias de rDNA (ITS) de roya amarilla en pasto ovillo (PASTO II), con roya amarilla de cebada (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei) del GENE BANK mediante el BLAST.

En la Figura N°42, se muestra las comparaciones entre los desoxinucleótidos (pirimidinas y purinas), de los segmentos del gen ITS del rDNA de roya amarilla de pasto ovillo (PASTO II), de las secuencias almacenadas en el Genebank y las secuencias en estudio. En la primera subunidad 18S la identidad entre el Query y Sbjct es 100% con un Gaps de 0%, empatan perfectamente; en la segunda subunidad 5.8S la identidad entre el Query y Sbjct es de 85%, con un Gaps de 1% lo cual puede deberse a una mutación o delección de los desoxinucleótidos; y en la última subunidad 28S la identidad entre el Query y Sbjct es 94% con un Gaps de 2%, lo cual puede deberse a una mutación o delección de las bases nitrogenadas.

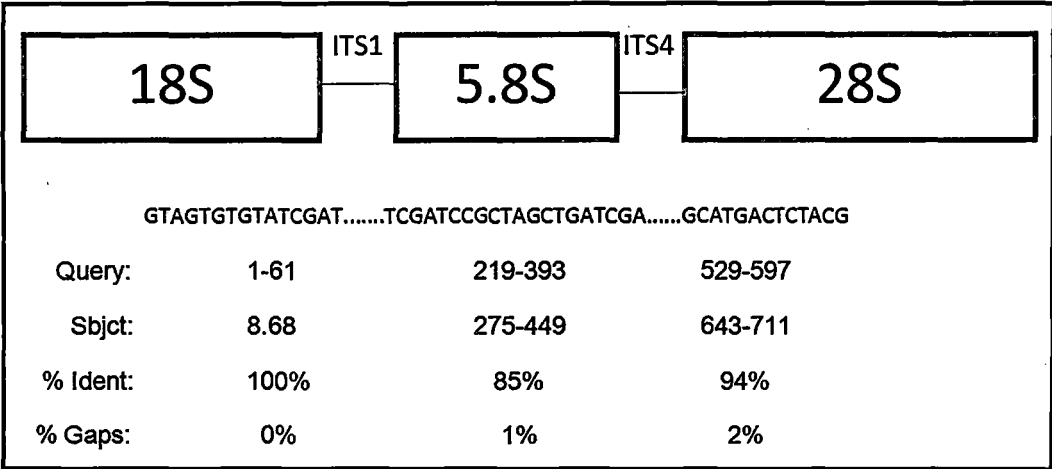


FIGURA N° 43: Ilustración grafica de la comparación de las secuencias de las muestras en estudio PASTO II (Query), y las muestras del Genebank (Sbcjt).

C. BLAST DE P12 Y GENE BANK.

En la Figura N° 44, al comparar las secuencias del gen ITS obtenidas de la muestra de roya amarilla de pasto ovillo purificado (P12), con las secuencias

De (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei) del Genebank, se comprueba que es idéntica en un 93 %, con un E value de 3e-64, Querycover de 51%, Total score de 466 y Max score de 237.

Accession	Length	Identical	Similarity	Accession
Puccinia striiformis f. sp. tritici strain PS2X01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	316	434	77%	JF770474.1
Puccinia striiformis isolate HS22118 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	KC305497.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici voucher HS21849 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	GU382672.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici voucher HS21847 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	GU382671.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate IS-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence, and 5.8S ribosomal RNA gene	237	444	49%	FJ224378.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate IS-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence, and 5.8S ribosomal RNA gene	237	444	49%	FJ224376.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate IS-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence, and 5.8S ribosomal RNA gene	237	444	49%	FJ224375.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici strain baihua 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	444	49%	EJ924747.1
Puccinia striiformis isolate R205 clone 02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	444	49%	EU014048.1
Puccinia striiformis isolate R205 clone 01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	444	49%	EU014049.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	DQ417408.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici strain HS20724 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	DQ417406.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici strain HS20718 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	DQ417401.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici strain HS20725 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	DQ417400.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici strain HS20728 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	DQ417398.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici strain 2299 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	DQ417397.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici strain PSH29 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	DQ417395.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici strain PSH17 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	DQ417394.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei isolate HS20711 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	DQ460729.1
Puccinia striiformis f. sp. tritici 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	466	51%	AY114292.1
Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	231	461	51%	DQ417393.1
Puccinia striiformis voucher IRAN 11497 F 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	237	428	47%	AY856559.1
Puccinia striiformis isolate 204 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2	237	428	47%	AY874152.1

FIGURA N° 44: Comparación de secuencias de rDNA (ITS) de roya amarilla en pasto ovillo purificado (P12), con roya amarilla de cebada (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei) del Genbank mediante el BLAST.

En la Figura N°45, se muestra las comparaciones entre los desoxinucleótidos (pirimidinas y purinas), de los segmentos del gen ITS del rDNA de roya amarilla de pasto ovillo (P12), de las secuencias almacenadas en el Genbank y las secuencias en estudio. En la primera subunidad 18S la identidad entre el Query y Sbjct es 100% con un Gaps de 0%, demostrando así que son idénticas; en la segunda subunidad 5.8S la identidad entre el Query y Sbjct es de 93%, con un Gaps de 0%, lo cual se debe a una mutación de bases nitrogenadas; y en la última subunidad

28S la identidad entre el Query y Sbjct es 97% con un Gaps de 0%, lo cual puede deberse a una mutación o delección de las bases nitrogenadas.

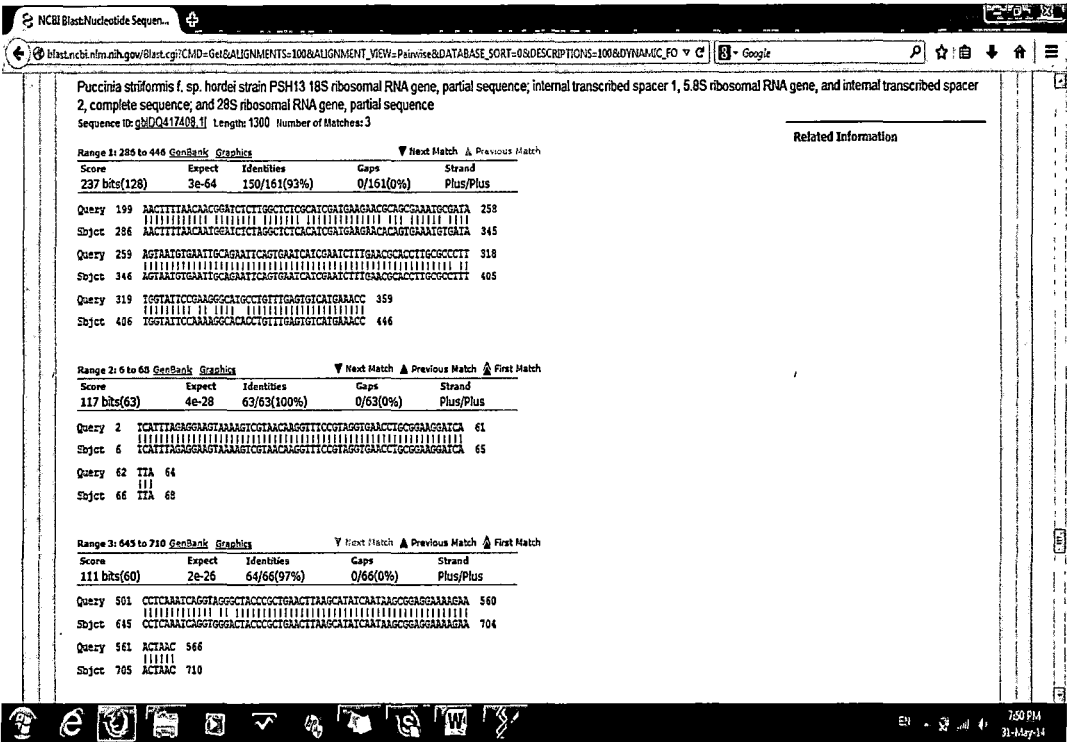


FIGURA N° 45: Comparación de bases nitrogenadas de la subunidad: 18S, 5.8S y 28S, gen ITS de rDNA de roya amarilla de pasto ovillo (P12) con las secuencias de (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei) del Genebank.

En el Figura N°46, se describe gráficamente la cantidad de pares de bases que son compatibles entre las secuencias de roya amarilla de pasto ovillo (P12) que son las muestras en estudio denominadas (Query) y las secuencias de roya amarilla en cebada (*Puccinia striiformis* f.sp. hordei) del Genebank denominadas (Sbjct); la comparación se da en las regiones 18S, 5.8S y 28S del rDNA. En la región 18S el Query va desde 2 al 64pb y la Sbjct va desde 6 al 68pb; en la región 5.8S el Query va desde 199 al

359pb y la Sbjct va desde 286 al 446pb; y finalmente en la región 28S el Query va desde 501 al 566pb y la Sbjct va desde 645 al 710pb.

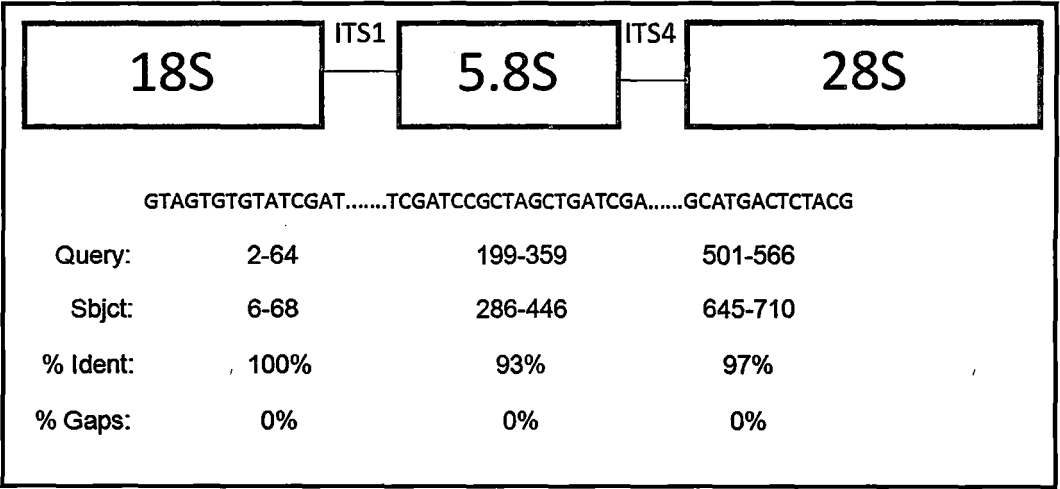


FIGURA N° 46: Ilustración gráfica de la comparación de las secuencias de las muestras en estudio (Query), y las muestras del Genebank (Sbcjt).

3.3.3 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DEL GEN ITS DEL ADN RIBOSOMAL MEDIANTE CLUSTAL.

Este análisis se realizó para alinear las secuencias de gen ITS de roya amarilla en cebada (R9), pasto ovillo (PASTOII y P12), y dilucidar la similitud a nivel molecular de las secuencias de las muestras en estudio, este evaluación también lo realizó Maier *et al.* (2003). Encontrando diferencia entre *Puccinia striiformis* f.sp. hordei con *Puccinia striiformis* f.sp.tritici.

En la figura N°47 de la comparación de las tres secuencias en estudio (R9, PASTOII y P12), la similitud en la subunidad 18S es 61pb, en la

subunidad 5.8S es de 168pb, y en la subunidad 28S es de 64pb, con lo que se comprobaría que estas regiones mantienen sus caracteres genéticos ancestrales.

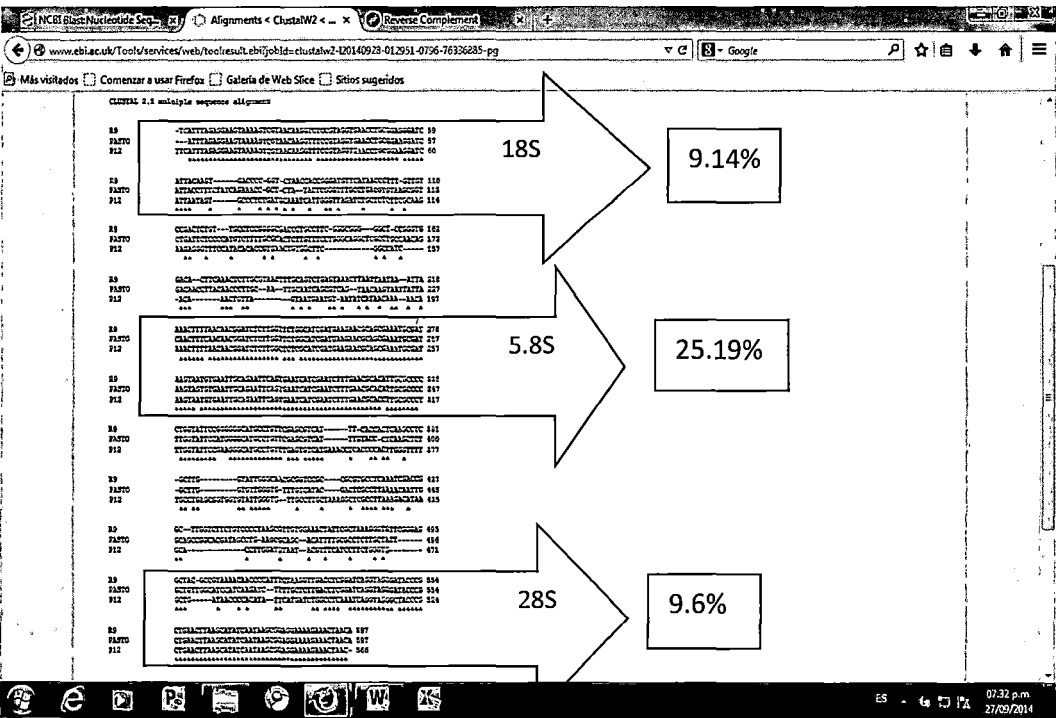


FIGURA N°47: Alineamiento CLUSTAL, de las secuencias de rDNA en la región parcial 18S, región total ITS1, 5.8S e ITS4, región parcial 28S; entre las tres muestras de estudio: R-9, PASTOII Y P12.

En este trabajo se realizó un estudio morfológico basado en la secuenciación de las sub unidades 18S,5.8S y 28S, de roya amarilla en dos especies de cultivo diferente, cebada y pasto ovillo ambos recolectados en la región de Ayacucho, en comparación con secuencias de roya amarilla en cebada (*Puccinia striiformis f.sp. hordei*), que se encuentran disponibles en el Genbank; la investigación se realizó con el

objetivo de dilucidar información referente a la probabilidad de que *Puccinia striiformis*, se presente tanto en cebada como en el pasto ovillo, Cummis y Hiratsuka, (2003), siendo este último un posible hospedero secundario, lo cual se ha comprobado en el presente trabajo de investigación mediante genética molecular y programas bioinformática.

Del estudio realizado, los resultados presentados demuestran que la secuencia del gen ITS del rDNA (ADN ribosomal) de la roya amarilla en cebada es semejante a la secuencia de rDNA de la región del gen ITS de pasto ovillo (93%), por ende se acepta la hipótesis nula: Las secuencias del gen ITS del ADNr (ADN ribosomal) de la roya amarilla en cebada es la misma que las secuencias de ADNr (ADN ribosomal) región ITS de pasto ovillo.

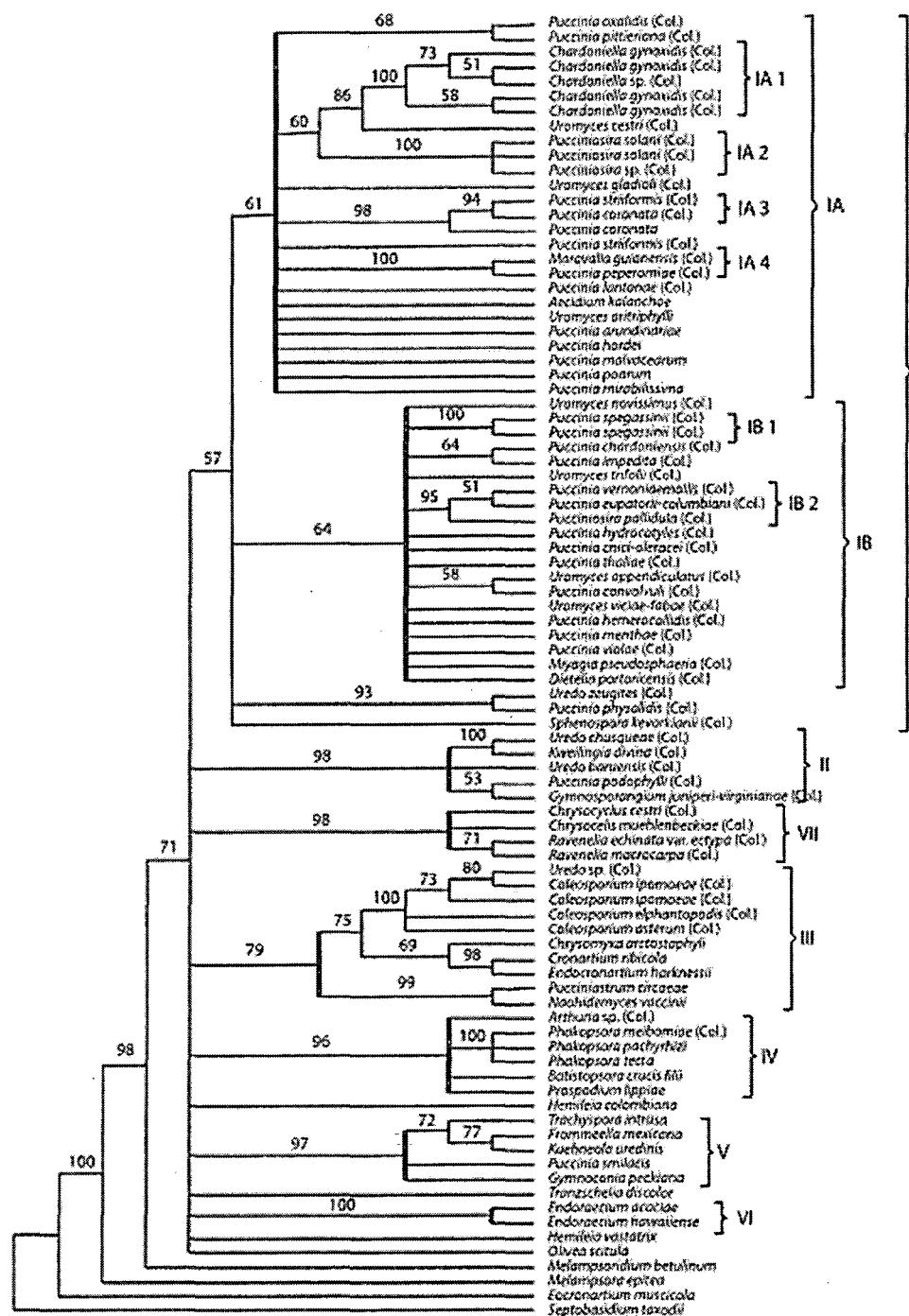


FIGURA N°48 Árbol filogenético generado con las secuencias del ADN ribosomal 28S de 87 hongos roya de Colombia (Col.) y otras regiones del mundo. Los números romanos indican los clados principales. (Zuluaga et al, 2010).

Estudios filogenéticos recientes basados en la secuenciación del ADNr y de algunos genes nucleares (Maier et al. 2003, Wingfield et al. 2004, Aime 2006) revelan incongruencias a todos los niveles taxonómicos con la clasificación basada en caracteres morfológicos.

(Zuluaga et al, 2010), demostró que el subgrupo IA, incluye cuatro clados bien soportados estadísticamente: IA-3: incluyó la secuencia referencia de *Puccinia coronata* y las especies identificadas morfológicamente en este estudio como *P. coronata* y *P. striiformis*. También en este análisis demuestra que existen especies que no se agrupan en los clados representativos de dichas familias y que por lo tanto requieren un tratamiento taxonómico especial, siendo evidente esta situación con algunas especies del genero *Puccinia*.

(Zuluaga et al, 2010), realiza una discusión basada en las familias establecidas por Cummins y Hiratsuka (2003) con relación a los hallazgos de los análisis filogenéticos y morfológicos, mencionando que el clado que representa esta familia en el análisis filogenético aparece dividido en dos sub grupos (IA y IB), los que a su vez representan indistintamente especies de *Puccinia* y *Uromyces* colectadas en Colombia y en otras regiones del mundo, y se demostró la naturaleza polifilética de dichos géneros. Esta situación fue confirmada por dos estudios recientes realizados con base en secuencias de los genes nucleares EF 1 α y β -tub y de la subunidad grande del ADNr (Maier et al. 2007).

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES:

En base a resultados obtenidos, la discusión realizada y teniendo en cuenta las condiciones en que se condujo el presente experimento, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- La metodología para cultivo monopustular de roya amarilla en cebada y pasto ovillo se basa en el estudio de los efectos simples de adherente y tiempos en cámara húmeda, la interacción estos factores fueron altamente significativos ($p:0.01$), en el uso del agar (A2) como adherente del inóculo, en un tiempo de tres días (T3) en cámara húmeda, para la apertura de las pústulas y la germinación de las uredosporas del inóculo.

- El protocolo de extracción de DNA a partir de esporas de roya amarilla en cebada y pasto ovillo en las condiciones del LGBV-UNSCH fue estandarizado utilizando el método CTAB con proteinasa "K". La óptima temperatura y tiempo de Annealing en el PCR fue: 55°C y 1 minuto en 35 ciclos de amplificación.

- Al comparar las secuencias del gen ITS del rADN de roya amarilla en cebada y en pasto ovillo son idénticas en un 93%, lo cual demuestra que ambas especies son hospederos de *Puccinia striiformis f.sp. hordei*.

4.2 RECOMENDACIONES:

En base a las conclusiones obtenidas en el presente trabajo se recomienda los siguientes:

- Preferiblemente no sembrar estos dos cultivos juntos debido a que siempre se tendrá incidencia de la roya amarilla.
- En la región Ayacucho se encuentra mayor incidencia de roya del tallo o roya negra (*Puccinia graminis*), recomendando realizar trabajos de evaluación de secuencias del gen ITS en los cultivos de trigo avena y centeno.
- Se debe realizar investigaciones filogenéticas de *Puccinia striiformis*, evaluando muestras de roya amarilla en diferentes cultivos y zonas ecológicas.
- Desarrollar e implementar metodologías moleculares para extracción de DNA genómico de patógenos y cultivos agrícolas en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal.

RESUMEN:

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, Escuela de formación Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, y en el Laboratorio de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, durante los años 2013-2014. El objetivo del presente trabajo de investigación fue Implementar métodos moleculares en la Unidad de Genómica – Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal-FCA-UNSCH para la comparación de secuencias de ADN-ribosomal (ADNr) e identificación molecular de la roya amarilla de cebada y pasto ovillo. Previo a ello se realizó inoculaciones con tres diferentes adherentes y tres diferentes tiempos en cámara húmeda; resultando el mejor adherente el agar en un tiempo de tres días en cámara húmeda; y seguidamente realizar la estandarización del protocolo extracción de DNA genómico a partir de esporas, agregando proteinasa “K” a la solución de extracción y sin agregar este reactivo; luego de realizar la estandarización de la temperatura a 50°C y 55°C en la fase de Annealing del PCR en el cual se observó mejores resultados (gel de agarosa al 1%) en temperatura de 55°C; con este parámetro obtenido continuo el PCR para amplificar las secuencias del gen ITS del DNA Ribosomal; y posteriormente comparar las secuencias en estudio con secuencias de *Puccinia striiformis*, almacenadas en el banco de genes (Genebank), mediante programas bioinformáticos (BLAST Y CLUSTAL), que permiten el alineamiento entre las subunidad 18S, 5.8S y 28S.

El resultado de la comparación de secuencias demuestra que la roya amarilla de la cebada *Puccinia striiformis* f.sp. hordei, es idéntica en un 93% a la secuencia de roya amarilla en pato ovillo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. (1991). Fitopatología. Compendium of Wheat diseases. The American Phytopathological Society Phytoma, Vol 172. Octubre.
- AGUIRRE, y GONZALO. (1992). Estudio del enrollamiento lento en cebada (*Hordeum vulgare*) infectada con roya morena de la hoja (*Puccinia hordei*) UNALM.
- AIME, M.C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). Mycoscience 47:112-122.
- ARBELÁEZ, T., G. Y ESPARZA D., J. (1976). Contribución al estudio de la roya amarilla de la cebada (*Puccinia striiformis f.sp. hordei*) en Colombia.
- ASNAGHI, C., D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. Y ROOT, P. (2001) Resistance of Sugarcane Cultivar 570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. 2001. Plant Disease. 85(3):282-283.
- BRAITHWAITE, K., CROFT, B. Y BRUMBLEY, S. (2004). Genetic diversity within collections of the Sugarcane orange rust fungus. En: Australian Society of Sugarcane Technologist. Conference. Proceedings- Abstracts, Brisbane, Queensland. 4 May – 7 May. 2004 Brisbane Qld Australia.
- BRAITWAITE, K. (2005). Assessing the Impact that pathogen variation has on the Sugarcane breeding program. Final report Ltda. Australia. December 47p.

- CHEN, X.M., MOORE, M.K., AND WOOD, D.A. (2003). Epidemics and control of stripe rust on spring wheat in the Pacific Northwest in 2002. *Phytopathology*, 93: S16.
- CHENNA, SUGAWARA, KOIKE, LOPEZ, GIBSON TJ, HIGGINS DG, THOMPSON JD (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*, 31:3497-3500.
- CIUDAD BAUTISTA FRANCISCO (2006). Unidad de Cultivos Herbáceos.
- CSAIKL U.M., BASTIAN H., BRETTSCNIDER R. GAUCH S., MEIR A., SCHAUERTE M., SCHOLZ F., SPERISEN C., VORNAM B. Y ZIEGENHAGEN B. (1998) Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter* 16:69-86,
- CUMMIS, G. Y Y. HIRATSUKA. (2003). Illustrated general of rust fungi. American Phytopathological Society, San Pablo, EEUU.
- DUBIN, H. J. AND R.W. STUBBS (1986). Epidemic spread of barley stripe rust in south America. *Plant Disease* 70:141-144.
- GARCICAÑAS V., CIUENTES A. y GONZALEZ R. (2004) Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Critical Reviews in Food Science*, 44: 425-436.
- GILCHRIST S, BERATTO M, RIVEROS B. (1982) Polvo amarillo de la cebada en Chile; Agricultura técnica en Chile.
- HACKE ERNESTO, RAMIREZ IGNACIO (1981) Epifitas del polvillo o

roya del trigo y la cebada observadas, Chile.

- HILLIS DM AND DIXON MT (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *QuartRevBiol* 66:411-453.
- HOGG, W. H., C.E. HOUNAM, AK MALLIK Y. ZADOKS.(1969). Meteorological Hecting the epidemiology wheat rusts. Tech Note 99. 143.
- HUGHES, H.D., HEATH, M., METCALFE, D. (1966). "Forrajes". Editorial Continental, México.
- IMPACTO AGRARIO (2015) Boletín Agrario, N°007-Año IV, Pag:3.
- INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS CENTRO DE INVESTIGACION AGRICOLA DE LA MESA CENTRAL DE CAMPO AGRICOLA EXPERIMENTAL "VALLE DE MEXICO" (1980) Chapingo, México Circular CIAMEC N°127, Octubre.
- JORDAN M. (2005). Estadios de cultivo de tejidos. En: Biotecnología Vegetal. Colección libros, INIA, Chile (15). 55-98.
- LIU, L.J. (1980). Observations and Considerations on Surgarcane rust incidence, varietal reaction and possible ocurrence of Phisiologic Races. *Surgarcane Phisiologic* 25:5,10.
- MAIER, D. BEGEROW, M.Y. WEI Y F. OBERWINKLER. (2003) Phylogeny of the rust fungi: An approach using nuclear large subunit ribosomal DNA sequences *Can.J. Bot.* 81:1-12
- MOLINA CANO J.L., (1989): "LA CEBADA. MORFOLOGÍA, FISIOLOGÍA, GENÉTICA, AGRONOMÍA Y USOS INDUSTRIALES". ED. MUNDI-PRENSA. MADRID.

- MULLIS K.B., FERRE F., GIBBS R.A EDS. (1994). The polymerase chain reaction. Birkhauser, Boston, EUA
- MULLIS KB, FALOONA FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155,335-350.
- MUSLERA PARDO, E., RATERA GARCÍA, C. (1991). "Praderas y Forrajes". Mundi-Prensa, Madrid
- PRIETO H, JORDAN M, BARRUETO LP (2005), *Biología Vegetal*. Colección libros INIA No. 5, Santiago de Chile. 217 p.
- PURDY, L. H. Y DEAN J.L. (1980).Un sistema para registrar los datos sobre las interacciones entre la roya de la caña de azúcar y el hospedero. P. 177-180. En seminario Interamericano de la caña de azucar.1. Enfermedades de la caña de azúcar. *Memories*. Miami, 8 – 10 de October, 1980 Vanguard.Miami.
- QUISPE SOLANO, MIGUEL ANGEL (2012), Situación de la producción, industrialización, comercialización y consumo de cereales en el Perú y el mundo Tarma-Perú
- RIDLEY, MATT.(2006) *Discoverer of the Genetic Code (Eminent Lives)* HarperCollins Publishers; 192 pp,
- ROBERTS RJ, VINCZE T, POSFAI J, (2005). "REBASE: Restriction enzymes and DNA methyltransferases". *Nucleic Acids Research*,. Vol.33: 230-232.
- RODRÍGUEZ GARCÍA, M. FLORENCIA; HUERTA ESPINO, JULIO; VILLASEÑOR MIR, HÉCTOR E.; SANDOVAL ISLAS, JOSÉ S.;

- SINGH, RAVI P. (2010). Análisis de virulencia de la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en los valles altos de México Agro ciencia, vol. 44, núm. 4, mayo-junio, 2010, pp. 491-502 Texcoco, México.
- ROOSE AMSALEG C., DE VAILAVIEILLE POPE, C., BRYOO, Y., LEVIS, C., (2002), Characterization of ribosomal RNA in *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*, the causal agent wheat yellow rust. *Mycol res.* 106 (8), 918-924.
 - SMITH TF, WATERMAN MS (1981). «Identification of common molecular subsequences». *J Mol Biol* **147** (1): pp. 195-7
 - SOMMER R, TAUTZ D. (1989). Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6749.
 - THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25:4876-4882.
 - VOGLER, D Y T. BRUNS. (1998), Phylogenetic relationships among the pine stem rust fungi (*Cronartium* and *Peridermium* spp.) 33,327-335.
 - VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, ET AL. (1995): A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21):4407–4414.
 - WATSON JD. & CRICK FHC. (1953) A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 171:737-738.

- WINGFIEL, B., L. ERICSON, T. SZARO Y BURDON. 2004. Phylogenetic patteerns in the Uredinales. *Australas, Plant Pathol.* 33:327-335.
- ZADOKS, J.C., T.T. CHANG, AND C.F. KONZAK. (1974). A decimal code for the growth steges of cereals. *Weed Research* 14:415-421.
- ZILLINNSKY, F. J. (1984). Enfermedades comunes de los cereales de grano pequeño, una guía para su identificación, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo CIMMYT, El Batan, México. Pág:112-115.
- ZULUAGA, Y MARIN. (2010). Filogenia de hongos roya (Uredinales) en la zona andina colombiana mediante el uso de secuencias del ADN ribosomal 28S. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Pág. 517-518

PAGINAS UTILIZADAS:

- http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.
- www.ebi.uk.Tools/services/web/tools/resultebi/old=clustal/2pg.

ANEXO

ANEXO N°01

Análisis de Variancia para efectos simples.

T	A						
	A1	A2	A3	SUMA	SC	CM	Fc
T1	10	17	13	40	8.22	4.11	1.32
T2	37	51	33	121	59.56	29.78	9.54
T3	68	79	65	212	36.22	18.11	5.80
SUMA	115	147	111				
SC	561.56	642.67	458.67				
CM	280.78	321.33	229.33				
Fc	89.98	102.98	73.50				

Resumen del Análisis de Variancia para efectos simples.

F. de VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	F.T. (0.05, 0.01)
A en t1	2	8.22	4.11	1.32	3.35 , 5.49 NS
A en t2	2	59.56	29.78	9.54	3.35 , 5.50 **
A en t3	2	36.22	18.11	5.80	3.35 , 5.51 **
T en a1	2	561.56	280.78	89.98	3.35 , 5.52 **
T en a2	2	642.67	321.33	102.98	3.35 , 5.53 **
T en a3	2	458.67	229.33	73.50	3.35 , 5.54 **

ANEXO N°02

Extracción de DNA a partir de esporas:

1. Agregar de 50 – 100uL de buffers de extracción (CTAB 2X, recientemente preparado y agregando 0.2% de β -mercaptoetanol), con ayuda de un mortero de plástico trituras el pellet de esporas durante unos 2 – 5 minutos
2. Completar con buffer de extracción (CTAB 2X) el tubo, hasta alcanzar un volumen de 600uL, tratando de limpiar todos los residuos pegados al mortero. Mezclar bien los componentes con la ayuda de un vortex.
3. Agregar 20uL de Proteinasa K (20ng/uL)
4. Colocar los tubos a 65°C durante 2 horas (invertir cada 15 minutos). Dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Agregar 600 uL de cloroformo:alcoholisoamilico (24:1) a cada tubo. Mezclar suavemente e invertir los tubos varias veces (mínimo 10 veces)
6. Centrifugar a 14000rpm por 5 minutos, transferir la parte acuosa superior a un tubo de microcentrifuga nuevo de 2mL.
7. Agregar a cada tubo, 50uL de CTAB 10X, mezclar por inversión y repetir pasos 5 y 6.
8. Centrifugar a 14000rpm por 5 minutos. Transferir la parte acuosa superior a un tubo de microcentrifuga nuevo de 1.5mL
9. Agregar un volumen igual de isopropanol (400 – 500 uL) a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejar a 4°C por 30 minutos o a -20°C por 15 minutos. En este punto las muestras pueden permanecer refrigeradas por toda una noche.
10. Centrifugar a 14000 rpm por 20min y descartar el sobrenadante
11. Lavar por inversión el pellet con 1mL de etanol 80 % por 1 minuto y centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos. Cuidadosamente descartar el etanol.
12. Lavar por inversión el pellet con 1mL de etanol 90% por 1 minuto y centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos. Cuidadosamente descartar el etanol. Con ayuda de una pipeta retire el máximo de líquido posible, luego invierta los tubos y dejar secar el pellet por toda una noche.
13. Resuspender el ADN en 40uL de TE, agregar 1.5uL de RNAsa (10 mg/mL). Incubar a 37°C por 1 hora.
14. Almacenar el ADN extraído a 4°C por 6 meses o a -20°C si es por un periodo mayor.

ANEXO N°03

PREPARACIÓN DE LOS REÁCTIVOS:

CTAB 2% del Lab:

Reagent	Concentración Final		
CTAB	1 g	2 g	10%
NaCl	4.09 g	8.18 g	1.4 M
EDTA (0.5 M)	2 mL	4 mL	20 mM
Tris-HCl 1M pH 8.0	5 mL	10 mL	100 mM
PVP	0.5 g	1 g	1%
H ₂ O (completar para)	50 mL	100 mL	

CTAB 10%

Reagent	Concentración Final		
CTAB	5 g	10 g	10%
NaCl	2.05 g	4.09 g	0.7 M
EDTA (0.5 M)	2 mL	4 mL	20 mM
Tris-HCl 1M pH 8.0	5 mL	10 mL	100 mM
H ₂ O (completar para)	50 mL	100 mL	

(*) El CTAB se adiciona cuando la solución este caliente, luego de haber agregado las demás soluciones excepto el PVP, evitar que alcance el punto de ebullición, luego cuando ya esté disuelto el CTAB se agrega el PVP manteniendo la solución caliente (sin ebullición). Se recomienda almacenar este buffer a 37°C para evitar que forme precipitaciones.

El CTAB es un compuesto catiónico, que ayuda a la precipitación de ácidos nucleicos y polisacáridos de soluciones de baja fuerza ionica.

Esterilizar en autoclave.

EDTA (0.5M) pH 8

EDTA (ethylenediamenetetraacetic acid)

NaOH

(*) To prepare EDTA at 0.5 M (pH 8.0): Add 186.1 g of disodium EDTA•2H₂O to 800 mL of H₂O. Stir vigorously on a magnetic stirrer. Adjust the pH to 8.0 with NaOH (~20 g of NaOH pellets). Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving. The disodium salt of EDTA will not go into solution until the pH of the solution is adjusted to ~8.0 by the addition of NaOH. Store at room temperature.

Tris-HCl (1M) pH 8

Tris base

HCl

(*) To prepare a 1 M solution, dissolve 121.1 g of Tris base in 800 mL of H₂O. Adjust the pH to the desired value by adding concentrated HCl.

pH	HCl
7.4	70 mL
7.6	60 mL
8.0	42 mL

(*) Allow the solution to cool to room temperature before making final adjustments to the pH. Adjust the volume of the solution to 1 L with H₂O. Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.

If the 1 M solution has a yellow color, discard it and obtain Tris of better quality. The pH of Tris solutions is temperature-dependent and decreases ~0.03 pH units for each 1°C increase in temperature. For example, a 0.05 M solution has pH values of 9.5, 8.9, and 8.6 at 5°C, 25°C, and 37°C, respectively.

T₁₀E₁ (Buffer de Resuspensión):

Reagent	Quantity (for 100 mL)	Final concentration
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	0.2 mL	1 mM
Tris-Cl (1 M, pH 8.0)	1 mL	10 mM
H ₂ O	to 100 mL	

(*) Sterilize by autoclaving and store at 4°C

TBE Electroforesis Buffer (10X):

Reagent	Quantity (for 1 L)	Final concentration
Tris base	121.1 g	1 M
Boricacid	61.8 g	1 M
EDTA (disodiumsalt)	7.4 g	0.02 M

(*) Prepare with RNase-free H₂O. Dilute 100 mL to 1 L to make gel running buffer (1X). Store for up to 6 mo at room temperature.

Solución Cloroformo :Alcohol Isoamílico (24:1)

Reagent	Quantity (For 250mL)
Cloroformo	240mL
Alcohol Isoamílico	10mL

(*) Preparar la solución en una campana y guante (cloroformo es potencialmente cancerígeno). Preparar en una botella esteril y luego forrarla con papel aluminio o de lo contrario usar una botella ambar. Almacenar a 4°C.

ANEXO N°04: Blast de R9 y Genebank.

NCBI Blast:Nucleotide Seq... x

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Más visitados Comenzar a usar Firefox Galería de Web Slice Sitios sugeridos

Query: <40 40-50 50-80 80-200 >=200

1 100 200 300 400 500

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. hordei strain PSH13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	180	394	54%	1e-48	86%	DQ417408.1
☐	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. hordei strain HSZ0711 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	180	387	54%	1e-48	86%	DQ417402.1
☐	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. hordei strain PSH14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	180	394	54%	1e-48	86%	DQ417393.1
☐	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. hordei isolate HSZ0711 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	180	394	54%	1e-48	86%	DQ460729.1

Alignments

Download GenBank Graphics Sort by: E value

Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|DQ417408.1| Length: 1300 Number of Matches: 3

ESET NOD32 Antivirus
El sistema está expuesto a riesgos. Para obtener más información, haga clic en esta notificación.

07:23 p.m.
27/09/2014

ANEXO N°05: Comparación de desoxinucleótidos de la muestra R9 y Genebank.

NCBI BlastNucleotide Seq... x

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Más visitados Comenzar a usar Firefox Galería de Web Slice Sitios sugeridos

Download GenBank Graphics Sort by: E value

Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2.
complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: gb|DQ417408.1| Length: 1300 Number of Matches: 3

Range 1: 274 to 440 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
180 bits(97)	1e-48	147/171(86%)	4/171(2%)	Plus/Plus

Query 204 TTAATTAAATAAATAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC 263
Sbjct 274 TTAATT-ATAAA-T--AACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAAC 329

Query 264 GCACCGAAATCCGATAGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA 323
Sbjct 330 ACAGTGAATGTGATAGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA 389

Query 324 CGCAGATGCGCCCGCTTGGTATTCGGGGGGGCAATGCTCTTCGAGCGTCAT 374
Sbjct 390 CGCAGCTTGGCGCTTTTGGTATTCGAAAGGCAACCTGTTTGAGTGTGAT 440

Range 2: 621 to 711 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
108 bits(58)	6e-27	83/94(88%)	6/94(6%)	Plus/Plus

Query 507 AAACAACCCCATTTCTAAGGTT--GACCTCGGATCAGGTAGGGA-TACCCGCTGAACCTTA 563
Sbjct 621 AAA-AAACCAATTT-TACCTTACAGACCTCAATCAGGT-GGAGTACCCGCTGAACCTTA 677

Query 564 AGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAAGAACTAACA 597
Sbjct 678 AGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAAGAACTAACA 711

Range 3: 6 to 68 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
106 bits(57)	2e-26	61/63(97%)	0/63(0%)	Plus/Plus

Query 1 TCATTAGAGGAAGTAAAGTCTGTAACAGGTTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGATCA 60
Sbjct 6 TCATTAGAGGAAGTAAAGTCTGTAACAGGTTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGATCA 65

Query 61 TTA 63
Sbjct 66 TTA 68

Download GenBank Graphics Sort by: E value

Puccinia striiformis f. sp. hordei strain HS74741 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2.

ES 07:23 p.m. 27/09/2014

ANEXO N°06: Blast de PASTO II y Genebank.

NCBI Blast:Nucleotide Sequen...						
blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Puccinia striiformis f. sp. tritici strain PSZK01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	220	435	47%	3e-59	92%	JF770474.1
☐ Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	180	400	51%	6e-47	85%	DQ417393.1
☐ Puccinia striiformis isolate HSZ2116 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	178	398	49%	2e-46	86%	KC305497.1
☐ Puccinia striiformis strain 9130 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequ	178	284	39%	2e-46	86%	JX047495.1
☐ Puccinia striiformis strain 46S119 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed sp	178	178	27%	2e-46	86%	JQ360861.1
☐ Puccinia striiformis strain 78S84 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed sp	178	178	27%	2e-46	86%	JQ360860.1
☐ Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate TZ33 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	178	178	27%	2e-46	86%	JN575605.1
☐ Puccinia striiformis strain RS480 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequ	178	178	27%	2e-46	86%	HM057123.1
☐ Puccinia striiformis strain DAOI 240071 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, comple	178	178	27%	2e-46	86%	HM057121.1
☐ Puccinia striiformis strain RS477 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequ	178	178	27%	2e-46	86%	HM057120.1
☐ Puccinia striiformis strain DAOI 240070 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, comple	178	178	27%	2e-46	86%	HM057119.1
☐ Puccinia striiformis strain DAOI 240069 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, comple	178	178	27%	2e-46	86%	HM057118.1
☐ Puccinia striiformis strain DAOI 240066 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, comple	178	178	27%	2e-46	86%	HM057116.1
☐ Puccinia striiformis strain HMAS 79075 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	178	178	27%	2e-46	86%	HM057114.1
☐ Puccinia striiformis strain PUR 66275 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	178	178	27%	2e-46	86%	HM057112.1
☐ Puccinia striiformis f. sp. tritici voucher HSZ1872 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in	178	391	49%	2e-46	86%	GU382673.1
☐ Puccinia striiformis f. sp. tritici voucher HSZ1849 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in	178	398	49%	2e-46	86%	GU382672.1
☐ Puccinia striiformis f. sp. tritici voucher HSZ1847 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in	178	398	49%	2e-46	86%	GU382671.1
☐ Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate t5-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosoma	178	374	47%	2e-46	86%	FJ224378.1
☐ Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate tb-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosoma	178	374	47%	2e-46	86%	FJ224376.1
☐ Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate t5-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosoma	178	374	47%	2e-46	86%	FJ224375.1
☐ Puccinia striiformis f. sp. tritici strain baihua 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	178	374	47%	2e-46	86%	EU924747.1

ANEXO N°07: Comparación de desoxinucleótidos de la muestra PASTO II y Genebank.

NCBI Blast Nucleotide Sequen...

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?aln=Hdr_90186454

Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: gb|DQ447393.1| Length: 1200 Number of Matches: 3

Related Information

Range 1: 275 to 449 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
180 bits(97)	6e-47	150/176(85%)	2/176(1%)	Plus/Plus

Query 219 TAATTAT-TACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGGATCGATGARGAACGACG 277
Sbjct 275 TAATTATAAATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCAATCGATGARGAACACAGT 334

Query 278 GAAATCGGATAAGTAGTGTGAATGACAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGACGCGAC 337
Sbjct 335 GAAATGTATAAGTAATGTGAATGACAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGACGCGAC 394

Query 338 AITGCGCCCTTGGTATTCATGGGGCATGCCGTTCGAGCGTCATTTGTACCCCTC 393
Sbjct 395 CTITGCGCTTTTGGTATTCAAAAGGCACACCTGTTTGTAGTGTATGAG-ACCCCTC 449

Range 2: 8 to 68 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
113 bits(61)	6e-27	61/61(100%)	0/61(0%)	Plus/Plus

Query 1 AATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAGGTTCCTGAGGTAACCTGCGGAGGATCAT 60
Sbjct 8 AATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAGGTTCCTGAGGTAACCTGCGGAGGATCAT 67

Query 61 A 61
Sbjct 68 A 68

Range 3: 643 to 711 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
106 bits(57)	1e-24	66/70(94%)	2/70(2%)	Plus/Plus

Query 529 GACCTCGGATCAGGTAGGGA-TACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAGCGGAGGAAA 587
Sbjct 643 GACCTCAATCAGGT-GGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAGCGGAGGAAA 701

Query 588 GAAACTAACA 597
Sbjct 702 GAAACTAACA 711

EN 7:43 PM 31-May-14

ANEXO N°08: Blast de P12 y Genebank.

NCBI Blast:Nucleotide Sequen...		blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&ALIGNMENTS=100&ALIGNMENT_VIEW=Pairwise&DATABASE_SORT=0&DESCRIPTIONS=100&DYNAMIC_FO		Google			
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici strain PSZK01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	316	434	77%	4e-88	82%	JF770474.1
☐	Puccinia striiformis isolate HSZ2116 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	237	466	51%	3e-64	93%	KC305497.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici voucher HSZ1849 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in	237	466	51%	3e-64	93%	GU382672.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici voucher HSZ1847 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in	237	466	51%	3e-64	93%	GU382671.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate t5-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosoma	237	444	49%	3e-64	93%	FJ224378.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate t6-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosoma	237	444	49%	3e-64	93%	FJ224376.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici isolate t5-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosoma	237	444	49%	3e-64	93%	FJ224375.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici strain baihua 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	237	444	49%	3e-64	93%	EU924747.1
☐	Puccinia striiformis isolate R205 clone 02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	237	444	49%	3e-64	93%	EU014048.1
☐	Puccinia striiformis isolate R205 clone 01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	237	444	49%	3e-64	93%	EU014049.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	237	466	51%	3e-64	93%	DQ417408.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici strain HSZ0724 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	237	466	51%	3e-64	93%	DQ417406.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici strain HSZ0718 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	237	466	51%	3e-64	93%	DQ417401.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici strain HSZ0725 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	237	466	51%	3e-64	93%	DQ417400.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici strain HSZ0728 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	237	466	51%	3e-64	93%	DQ417398.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici strain 22/99 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	237	466	51%	3e-64	93%	DQ417397.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici strain PSH29 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intern	237	466	51%	3e-64	93%	DQ417395.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici strain PSH17 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Intern	237	466	51%	3e-64	93%	DQ417394.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. hordei isolate HSZ0711 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ir	237	466	51%	3e-64	93%	DQ460729.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. tritici 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed s	237	466	51%	3e-64	93%	AY114292.1
☐	Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	231	461	51%	1e-62	93%	DQ417393.1
☐	Puccinia striiformis voucher IRAN 11497 F 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	237	428	47%	3e-64	93%	AY958559.1
☐	Puccinia striiformis isolate 204 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spac	237	428	47%	3e-64	93%	AY874152.1

ANEXO N°09: Comparación de desoxinucleótidos de la muestra P12 y Genbank.

NCBI Blast:Nucleotide Sequen...

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&ALIGNMENTS=100&ALIGNMENT_VIEW=Pairwise&DATABASE_SORT=0&DESCRIPTIONS=100&DYNAMIC_FO

Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: gb|DQ417408.1| Length: 1300 Number of Matches: 3

Range 1: 286 to 446 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
237 bits(128)	3e-64	150/161(93%)	0/161(0%)	Plus/Plus

Query 199 AACITTTAACACGGAATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGAGCGAATGCGATA 258
Sbjct 286 AACITTTAACAAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAATGCGATA 345

Query 259 AGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGACCTTGGCCCTTT 318
Sbjct 346 AGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGACCTTGGCCCTTT 405

Query 319 TGGTATCCGAAGGGCAAGCCTGTTTGAAGTGTCAAGAAC 359
Sbjct 406 TGGTATCCGAAGGGCACACCTGTTTGAAGTGTCAAGAAC 446

Range 2: 6 to 68 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
117 bits(63)	4e-28	63/63(100%)	0/63(0%)	Plus/Plus

Query 2 TCATTAGAGGAAGTAAAGTCGTAAACAGGTTTCCGTAGGTGAACCTTGGGAAAGGATCA 61
Sbjct 6 TCATTAGAGGAAGTAAAGTCGTAAACAGGTTTCCGTAGGTGAACCTTGGGAAAGGATCA 65

Query 62 TTA 64
Sbjct 66 TTA 68

Range 3: 645 to 710 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
111 bits(60)	2e-26	64/66(97%)	0/66(0%)	Plus/Plus

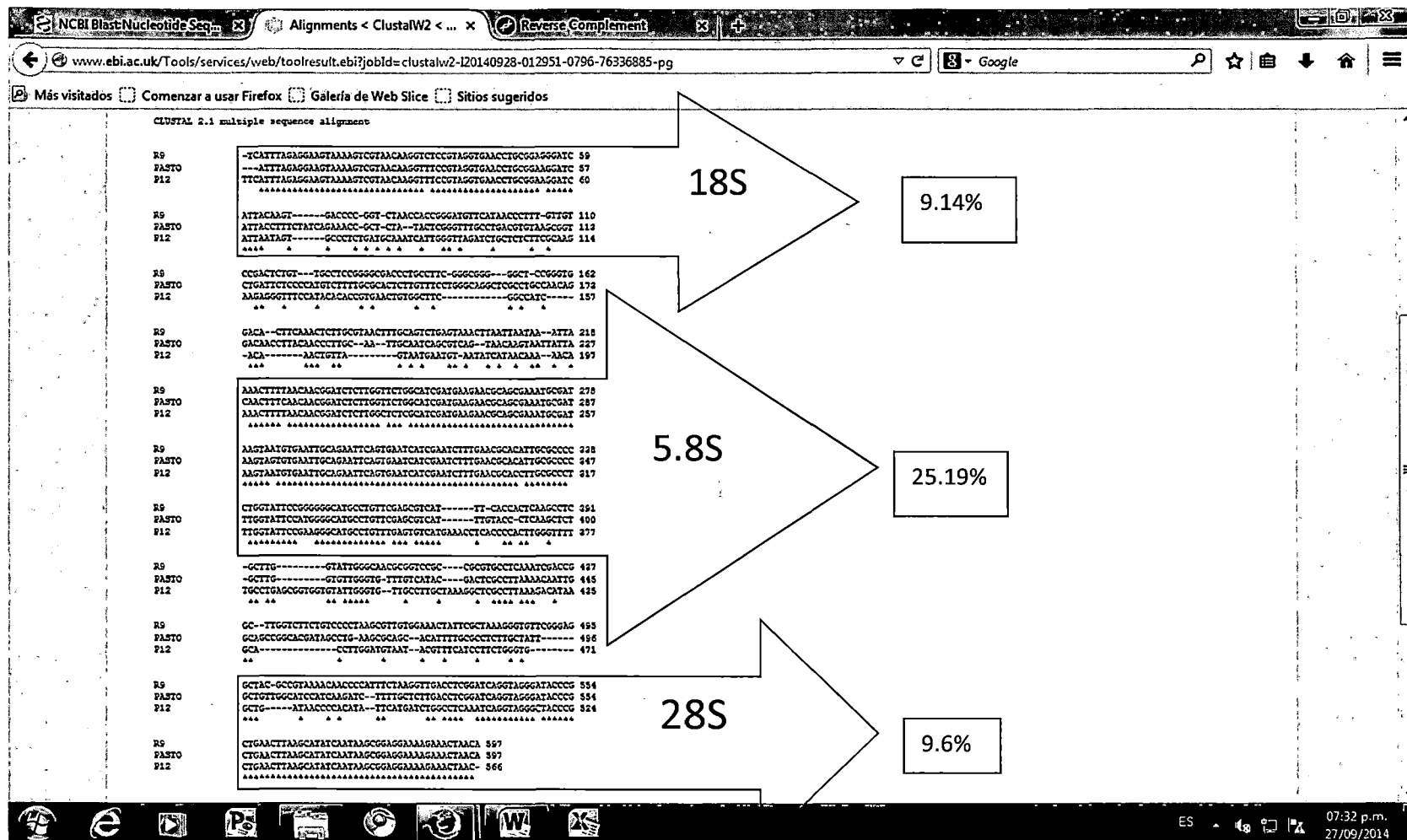
Query 501 CCTCAAAATCAGGTAGGGCTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAGCGGAGGAAAAGAA 560
Sbjct 645 CCTCAAAATCAGGTAGGGCTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAGCGGAGGAAAAGAA 704

Query 561 ACTAAC 566
Sbjct 705 ACTAAC 710

Related Information

EN 7:50 PM 31-May-14

ANEXO N°10: Alineamiento CLUSTAL de R-9, PASTO II Y P12.



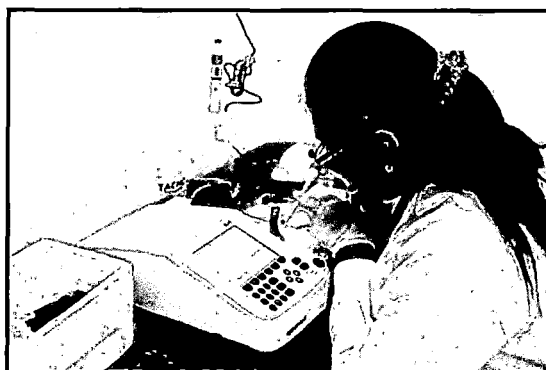
ANEXO N°11:
EXTRACCION DE DNA DE LAS MUESTRAS



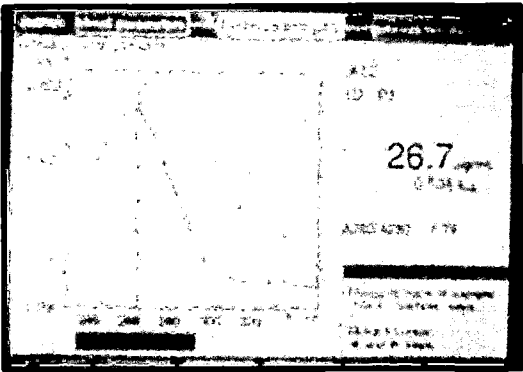
PREPARACION DE LOS REACTIVOS PARA PCR



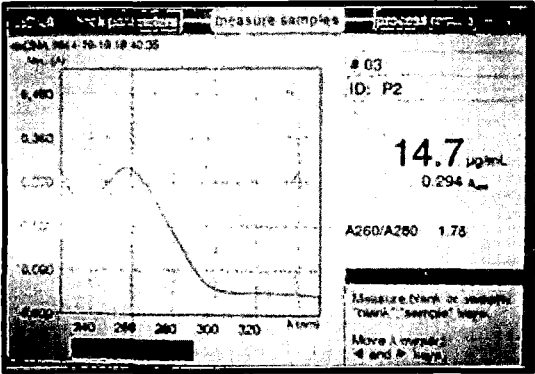
CUANTIFICACIÓN DEL DNA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA.



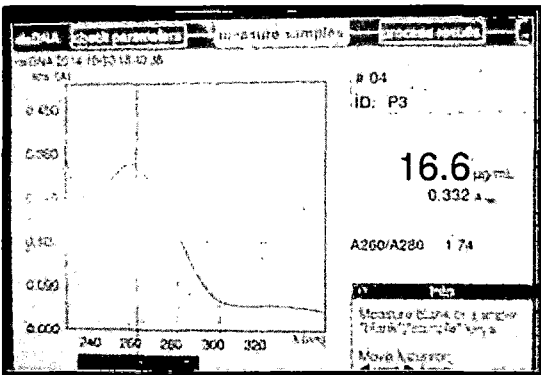
- Muestra P1:



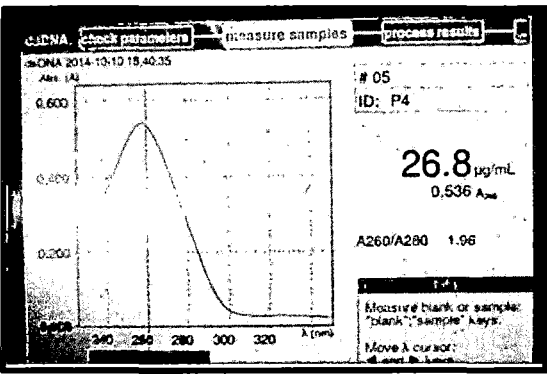
- Muestra P2:



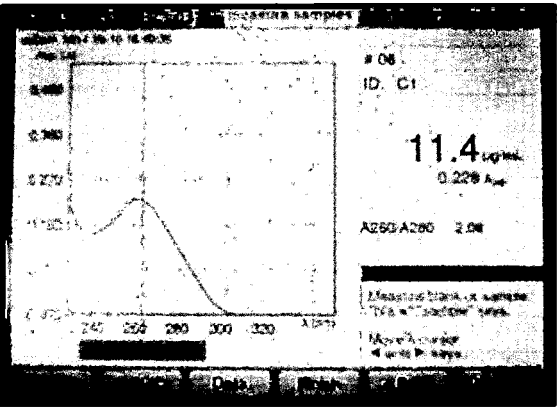
- Muestra P3:



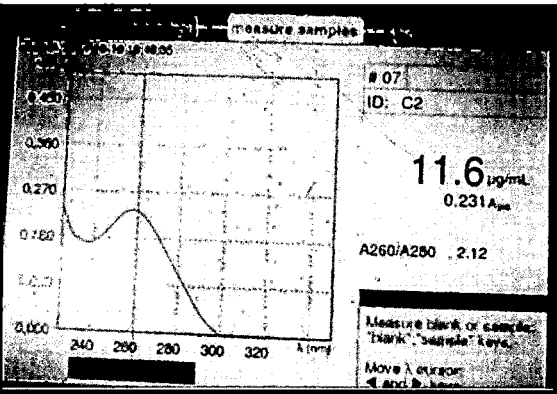
- Muestra P4:



• Muestra C1:



• Muestra C2:



• Muestra CE:

