

UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Departamento de Biología Molecular

Área de Genética

TESIS DOCTORAL



**ESTUDIO DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS DE
RESERVA, MAPEO GENÉTICO, ANÁLISIS DE QTLs Y
ESTUDIO DE GENES DE RESISTENCIA A *Ascochyta lentis*
EN *Lens***

CARLOS DAVID NEYRA RIVERA

León, 2014



INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS¹

Los Dres. D. **Pedro García García** y D. **Luis Enrique Sáenz de Miera y Carnicer** como codirectores² de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de genes codificantes de proteínas de reserva, mapeo genético, análisis de QTLs y estudio de genes de resistencia a *Ascochyta lentis* en *Lens*" realizada por D. **Carlos David Neyra Rivera** en el programa de doctorado "Biología Molecular y Biotecnología", informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, en León a 15 de diciembre de 2014

Fdo.: Pedro García García

Fdo.: Luis E. Sáenz de Miera

¹ Solamente para las tesis depositadas en papel.

² Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.

*Esta memoria ha sido realizada gracias al Plan Nacional de I + D + I (2008-2011). Resistencia a estreses bióticos y abióticos en lenteja, *Lens culinaris Medik.*: detección, análisis genéticos y mejora. AGL2009-07853.*

Ayudas a Grupos de Excelencia GR113 de la Junta de Castilla y León.

A mi familia.

A Liz.

En estas líneas intentare expresar mi gratitud más sincera a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de este trabajo.

A mis directores de tesis, el Dr. Pedro García García y Luis Sáenz de Miera y Carnicer por su infinita paciencia y apoyo en la realización de esta tesis. En ambos pude observar un ejemplo de cómo ser un excelente Biólogo, enseñanzas que intento e intentare brindar a todo lugar que vaya o donde labore.

A los Doctores y técnicos que trabajan día a día en el Laboratorio de Genética de la Universidad de León, María Luisa Ruiz, Marcelino Pérez de la Vega, Ana Isabel González, Francisca Vaquero, Maribel Sánchez, Francisco Javier Vences, Juan Guerra y Richard Fratini quienes en algún momento del desarrollo de esta tesis me brindaron palabras de aliento para seguir adelante y persistir en el objetivo de concluir la tesis.

A mis compañeros, tesistas en su momento, Rita, Nati, Carlos y Ariadna, quienes compartíamos nuestras inquietudes y sueños.

A mis amigos Jesús "Pequeñin", Arantxita, Fernando, Paco, Julio, Miriam y Fernando VigoNo.....(disculpádmeme si no los menciono a todos ya que es una lista bastante larga) quienes me brindan una amistad pura y sincera y me motivaron a seguir adelante y no dejar las cosas a medias. Lo mismo que mis amigos del otro lado del Charco, Diana, Vannesa, Lucero, Martin, Jhonny, Billy, Akemi, Paola.....quienes siempre compartían mis penas y celebraban mis logros.

A toda mi familia. A mi hermano Calin, a quien le estaré eternamente agradecido por "obligarme" a asumir este reto tan bonito que fue realizar un Doctorado. A mis hermanas Jacqui e Imiliz, que siempre me brindaron su apoyo y palabras de ánimo. A mi madre Susana Rivera Sologuren quien gracias a su apoyo y empuje sigo cumpliendo mis metas. A mi padre Carlos Neyra Rodríguez[†], que aunque ya no esté entre nosotros nunca olvido una de sus enseñanzas "ser perseverante".

A mi novia Liz, quien ha estado conmigo durante todo este tiempo siendo paciente y apoyándome en todo lo que estuvo a su alcance y más, y realizando hasta lo imposible para que no me dé por vencido y cumpla la meta trazada "culminar satisfactoriamente la tesis".

Finalmente, a todas las personas que han estado presentes en mi vida a lo largo del desarrollo de la Tesis, a los que están y a los que ya no están. Gracias infinitas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La Lenteja.....	3
1.1.1. Clasificación taxonómica de la lenteja.....	3
1.1.2. Distribución de especies silvestres.....	7
1.1.3. Origen y domesticación.....	7
1.1.4. Producción.....	8
1.1.5. Características nutritivas y cultivo de la lenteja	9
1.2. Características de importancia económica en la lenteja.....	11
1.3. Proteínas de reserva	12
1.3.1. Vicilinas.....	14
1.3.2. Convicilinas.....	15
1.4. Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)	16
1.4.1. Apirasas.....	18
1.5. Marcadores genéticos en lenteja.....	19
1.5.1. SNPs o polimorfismos de un único nucleótido.....	21
1.6. Mapas de ligamiento.....	24
1.6.1. Mapa de ligamiento en lenteja	25
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1. Material biológico.....	35
3.1.1. Esterilización de las semillas.....	37
3.1.2. Siembra de las semillas	37
3.1.3. Condiciones de la cámara de cultivo	37
3.1.4. Condiciones de cultivo y mantenimiento del hongo <i>Ascochyta lentis</i>	37
3.1.5. Obtención de suspensión de esporas	38
3.1.6. Tratamiento de <i>Lens culinaris</i> con esporas del hongo <i>Ascochyta lentis</i>	38
3.2. Caracterización fenotípica	39
3.2.1. Resistencia o susceptibilidad de la planta al hongo <i>Ascochyta lentis</i>	39
3.2.2. Peso de las semillas	39
3.2.3. Diámetro de las semillas	39

3.3. Aislamiento de ácidos nucleicos	39
3.3.1. Extracción de ADN mediante el kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN)	40
3.3.2. Protocolo TENS-P	40
3.3.3. Aislamiento de ARN con el kit PureLink™	41
3.4. Obtención de ADN copia a partir de ARN	41
3.4.1. Tratamiento de ARN con DNasa	42
3.4.2. Síntesis de ADN copia	42
3.5. Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos	42
3.6. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)	42
3.6.1. Diseño de cebadores	43
3.6.2. Reacciones de amplificación por PCR	43
3.6.3. Análisis de los datos de PCR a tiempo real	45
3.7. Electroforesis de ácidos nucleicos	47
3.7.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	47
3.7.2. Electroforesis de ARN en geles de agarosa	48
3.8. Clonación y secuenciación de los productos de PCR	48
3.8.1. Células competentes	49
3.8.2. Vector de clonación	49
3.8.3. Reacciones de ligación	50
3.8.4. Transformación	51
3.8.5. Selección de clones	51
3.8.6. Secuenciación	52
3.9. Herramientas informáticas	52
3.9.1. Análisis de secuencias de ADN	52
3.9.2. Mapas de ligamiento	53
3.9.3. Análisis de QTLs	57
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
4.1. Caracterización de los genes codificantes para convicilina y apirasa tipo 1	63
4.1.1. Amplificación del gen de la convicilina	64
4.1.2. Amplificación de genes de apirasa tipo 1	64
4.1.3. Clonación de productos de PCR	65
4.1.4. Secuenciación	66
4.1.5. Ensamblado de secuencias obtenidas	67
4.1.6. Secuencias de la colección EST	69
4.1.7. Análisis de secuencias	70

4.1.7.1. Frecuencia nucleotídica.....	71
4.1.7.2. Diversidad nucleotídica	72
4.1.7.3. Frecuencias de aminoácidos y utilización de tripletes	73
4.1.7.4. Intrones	76
4.1.7.5. Filogenias.....	79
4.1.7.5.1. Filogenia de convicilina en lenteja	81
4.1.7.5.2. Filogenia de las apirasas	83
4.1.7.5.3. Sustituciones sinónimas y no sinónimas.....	88
4.2. Marcadores moleculares.....	91
4.2.1. PCR específica	92
4.2.2. Análisis de secuencias de restricción amplificadas y polimórficas (CAPS).....	94
4.2.3. Desnaturalización de alta resolución (High Resolution Meltin, HRM)	95
4.2.4. Discusión general de marcadores	99
4.3. Mapa de ligamiento	102
4.4. Análisis de loci de caracteres cuantitativos (QTLs)	111
4.4.1. Análisis por marcador simple	120
4.4.2. Análisis de mapeo por intervalo	122
4.4.3. Análisis de mapeo por intervalo compuesto	125
4.4.4. Análisis de QTLs de peso y diámetro de la semilla	129
4.4.4.1. QTLs para peso de la semilla	129
4.4.4.2. QTLs para diámetro de la semilla	131
4.4.4.3. QTLs para resistencia a <i>Ascochyta</i>	135
4.5. Estudios de genes de resistencia	137
4.5.1. Aislamiento de ARN de plantas de lenteja control e infectadas con el hongo <i>Ascochyta lentis</i>	138
4.5.2. Análisis de la expresión de posibles genes de resistencia al hongo <i>Ascochyta lentis</i>	139
5. CONCLUSIONES	153
6. BIBLIOGRAFÍA	159
7. APÉNDICE	181
7.1. Listado de cebadores empleados para la construcción del mapa de ligamiento	181

7.2. Secuencias nucleotídicas utilizadas para HRM.....	189
7.3. Secuencias nucleotídicas	190
7.3.1. Secuencias nucleotídicas de convicilina alineadas en formato MEGA	190
7.3.2. Secuencias nucleotídicas de apirasa alineadas en formato MEGA.....	197
7.4. Salidas de convicilina y apirasa obtenidas con el programa MEGA	206
7.4.1. Porcentaje de nucleótidos presentes en la secuencia de la convicilina	206
7.4.2. Porcentaje de nucleótidos presentes en la secuencia de la apirasa.....	206
7.4.3. Número de aminoácidos codificados en el gen de la convicilina	207
7.4.4. Porcentaje de aminoácidos codificados por el gen de la convicilina.....	208
7.4.5. Porcentaje de aminoácidos codificados por el exón 1 del gen de convicilina	209
7.4.6. Porcentaje de aminoácidos codificados por los exones 2 al 5 del gen de la convicilina.....	210
7.4.7. Número de aminoácidos codificados por el gen de la apirasa.....	211
7.4.8. Porcentaje de aminoácidos codificados por los exones del gen de la apirasa	212
7.4.9. Uso de codones en el exón 1 del gen de la convicilina. Entre paréntesis el uso relativo de los distintos tripletes que codifican para el mismo aminoácido.....	213
7.4.10. Uso de codones en el gen de la apirasa	213
7.4.11. Número de sustituciones sinónimas y número de sustituciones sinónimas por cada 1000 sitios sinónimos para el gen de la convicilina	214
7.4.12. Número de sustituciones no sinónimas y número de sustituciones no sinónimas por cada 1000 sitios no sinónimo para el gen de la convicilina	215
7.4.13. Diferencia entre sustituciones sinónimas por sitio sinónimo y sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo y el cociente entre sustituciones sinónimas y no sinónimas (ω) para el gen de la convicilina	216
7.4.14. Número de sustituciones sinónimas y número de sustituciones sinónimas por cada 1000 sitios sinónimos para el gen de la apirasa tipo	217

7.4.15. Número de sustituciones no sinónimas y número de sustituciones no sinónimas por cada 1000 sitios no sinónimos para la apirasa tipo 1	218
7.4.16. Diferencia entre sustituciones sinónimas por sitio sinónimo y sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo y el cociente entre sustituciones sinónimas y no sinónimas (ω) para el gen de la apirasa tipo 1.....	219
7.5. Secuencias de apirasa tipo 1 y 2 alineadas en formato MEGA.....	220
7.5.1. Secuencias de apirasa tipo 1 alineadas en formato MEGA	220
7.5.2. Secuencias de apirasa tipo 2 alineadas en formato MEGA	231

Relación de figuras.

Figura 1.1. Distribución geográfica del género Lens	7
Figura 1.2. Producción global de lenteja del año 2012 (FAOSTAT)	9
Figura 1.3. Utilización de marcadores tipo CAPS para la detección de SNPs.....	22
Figura 1.4. Diferencias en las curvas de fusión entre dos muestras que difieren en un único nucleótido.....	23
Figura 3.1. Cinética de amplificación de la secuencia de β -tubulina.....	46
Figura 3.2. Mapa del Vector de clonación pGEM [®] -T-easy	50
Figura 4.1. ADN genómico de lenteja extraído con el kit DNAeasy Plant.....	63
Figura 4.2. Productos de PCR del gen de convicilina.....	64
Figura 4.3. Productos de PCR del gen de apirasa tipo 1.....	65
Figura 4.4. Rapid preps de la clonación de la PCR de la muestra MALA para el gen de la convicilina	66
Figura 4.5. Productos de amplificación del gen de la convicilina.....	68
Figura 4.6. Productos de amplificación del gen de la apirasa tipo 1	69
Figura 4.7. Esquema del ensamblado de 13 EST para determinar las secuencias codificantes para apirasas tipo A y B	70

Figura 4.8. Plot de hidrofobicidad de las proteínas codificadas por las secuencias de convicilina y apirasa de tipo 1	76
Figura 4.9. Secuencias nucleotídicas de dos intrones de la apirasa tipo 1	78
Figura 4.10. Árbol filogenético de convicilinas	82
Figura 4.11. Árbol filogenético de apirasas de leguminosas, secuencias codificantes	85
Figura 4.12. Árbol filogenético de apirasas de leguminosas, secuencias completas.....	86
Figura 4.13. Producto de PCR específica del marcador P670 (relacionado con el gen codificante para la subunidad 6B de citocromo C oxidasa)	93
Figura 4.14. Producto de PCR del marcador P500 (gen codificante para la uridilato kinasa)	94
Figura 4.15. Alineamiento de secuencias obtenidas del producto de amplificación del gen convicilina.....	96
Figura 4.16. Comparación de curvas de desnaturalización para el gen codificante de la convicilina	98
Figura 4.17. Mapa de ligamiento basado en marcadores moleculares analizados en las líneas RIL.....	104
Figura 4.18. Relaciones entre las posiciones de los marcadores comunes del mapa genético de De la Puente <i>et al.</i> (2013) y el obtenido en el presente estudio	107
Figura 4.19. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para el peso de 100 semillas	112
Figura 4.20. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para el peso sin valores atípicos.....	112
Figura 4.21. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para el diámetro	114
Figura 4.22. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para el diámetro sin valores atípicos.....	114

Figura 4.23. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para la resistencia al hongo <i>Ascochyta lentis</i>	115
Figura 4.24. Rectas de regresión lineal del peso, diámetro y resistencia	116
Figura 4.25. Rectas de regresión lineal del peso, diámetro y resistencia excluyendo valores atípicos	118
Figura 4.26. Posibles QTLs relacionados con la característica peso de la semilla mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo	122
Figura 4.27. Posibles QTLs relacionados con la característica diámetro de la semilla mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo	123
Figura 4.28. Análisis la característica resistencia al hongo <i>Ascochyta lentis</i> mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo	124
Figura 4.29. Posibles QTLs relacionados con la característica peso y diámetro de la semilla mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo.....	125
Figura 4.30. Posibles QTLs relacionados con la característica peso de la semilla mediante el modelo de análisis de mapeo por intervalo compuesto	126
Figura 4.31 Posibles QTLs relacionados con la característica diámetro de la semilla mediante el modelo de análisis de mapeo por intervalo compuesto	127
Figura 4.32. Posibles QTLs relacionados con la característica resistencia al hongo <i>Ascochyta lentis</i> mediante el modelo de análisis de mapeo por intervalo compuesto	128
Figura 4.33. Posibles QTLs relacionados con las características peso y diámetro de la semilla mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo compuesto	131
Figura 4.34. Posibles QTLs ligados a marcadores polimórficos para las características peso de la semilla, diámetro de la semilla y resistencia al hongo <i>Ascochyta lentis</i>	132
Figura 4.35. Hongo <i>Ascochyta lentis</i> sembrado en medio PDA/AGAR	137
Figura 4.36. Conteo de esporas en la cámara de recuento Thoma.....	138
Figura 4.37. Plantas de lenteja variedad Mala al día 15 de infección	138

Figura 4.38. Producto de extracción de ARN del género <i>Lens</i> utilizando el kit RNA Pure Link	139
Figura 4.39. PCR convencional de las muestras Mala e ILL323. Marcadores P43, P46, P53, P73 y P75.....	140
Figura 4.40. PCR convencional de las muestras Mala e ILL323. Marcadores P98, P179, P260, P51982, P52010, P52014, P52052 y P52059.....	140
Figura 4.41. PCR para el marcador P43 al día 1 después de la infección.....	140
Figura 4.42. Niveles de expresión de los marcadores P43, P53, P73, P75, P98 y P179.....	144
Figura 4.43. Niveles de expresión de los marcadores P260, P51982, P52010, P52014, P52052 y P52059	145

Relación de tablas.

Tabla 1.1. Clasificaciones del género <i>Lens</i> basadas en distintos tipos de caracteres	5
Tabla 1.2. Agrupamiento de los taxones del género <i>Lens</i> , de acuerdo a distintos criterios	6
Tabla 1.3. Efectos de germinación y descascarillado en algunos componentes de las semillas de lenteja	10
Tabla 1.4. Familias de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).....	17
Tabla 1.5. Principales estudios de mapeo genético en lenteja	28
Tabla 3.1. Material vegetal utilizado y su origen, así como el grupo en el que fueron clasificadas.....	36
Tabla 4.1. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR para el gen de la convicilina y la apirasa tipo 1	65
Tabla 4.2. Porcentaje promedio de nucleótidos presentes en las secuencias completas, en los exones y en los intrones de los genes codificantes para convicilina y apirasa tipo 1.....	71

Tabla 4.3. Diversidad nucleotídica entre secuencias de convicilina y apirasa tipo 1	72
Tabla 4.4. Uso promedio de codones en las secuencias de apirasa, convicilina y exón 1 de convicilina	75
Tabla 4.5 Ajuste de diferentes modelos evolutivos a los alineamientos de convicilinas de lenteja, apirasas de leguminosas mediante análisis de máxima verosimilitud (ML)	80
Tabla 4.6 Análisis de sustituciones sinónimas y no sinónimas en los genes codificantes para convicilina y apirasa tipo 1	89
Tabla 4.7. Relación de marcadores de PCR específica y tamaños de los amplicones que se producen en cada uno de los parentales	92
Tabla 4.8. Relación de marcadores con las segregaciones correspondientes observadas y valores de chi-cuadrado en el supuesto de segregación 1:1	93
Tabla 4.9. Relación de marcadores CAPS obtenidos en el estudio con enzimas de restricción.....	94
Tabla 4.10. Resumen del mapa de ligamiento con la línea RIL del cruce de Lupa x <i>Lens culinaris</i> spp. <i>orientalis</i>	103
Tabla 4.11. Marcadores génicos no asignados a ninguno de los grupos de ligamiento.....	103
Tabla 4.12. Comparación de marcadores morfológicos (<i>Yc</i> , <i>Gs</i> y <i>Scp</i>) y marcadores ISSR entre los mapas de ligamiento obtenidos a partir de RILs y F ₂	106
Tabla 4.13. Localizaciones de los marcadores génicos y su correspondencia con los grupo de ligamiento obtenidos por Sharpe <i>et al.</i> (2013) y los cromosomas de <i>Medicago truncatula</i>	110
Tabla 4.14. Correlaciones (Pearson) para las características fenotípicas evaluadas incluyendo los valores atípicos	115
Tabla 4.15. Correlaciones (Pearson) para las características fenotípicas evaluadas excluyendo los valores atípicos	117

Tabla 4.16. Estudio de QTLs por medio del análisis de marcador simple.....	121
Tabla 4.17. Características de los QTLs de Peso de semilla.....	126
Tabla 4.18. Características de los QTLs de Diámetro de semilla	128
Tabla 4.19. Características de los QTLs de Resistencia a <i>Ascochyta lentis</i>	129
Tabla 4.20. Intervalos de los QTLs de peso (QPS-QPESO) y diámetro (QDS-QDIAM) de la semilla en el GL2	132
Tabla 4.21. Cebadores utilizados en las reacciones de qPCR	141
Tabla 4.22. Valores de nivel de cambio o <i>foldchange</i> (\log_2) de diferentes variedades resistentes y susceptibles al hongo <i>A. lentis</i>	142

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA LENTEJA.

1.1.1. Clasificación taxonómica de la lenteja.

En el año 1787, Friedrich Kasimir Medikus, botánico y médico alemán, nombró científicamente por primera vez a la lenteja cultivada como *Lens culinaris* (Cubero *et al.*, 2009). Sin embargo, se han utilizado otros muchos nombres que todavía pueden encontrarse en algunas publicaciones, como *Lens esculenta* propuesto por Moench, o menos frecuentemente *Lens lens*, *Lens disperma* Webb & Berthel, *Cicer lens*, *Vicia lens* (L.) Coss. & Germ., *Ervum lens* L. o *Lentilla lens* (Pérez de la Vega *et al.*, 2011).

Lens culinaris es una de las leguminosas domesticadas más antiguas (Yadav *et al.*, 2007). Se trata de una especie diploide ($2n=2x=14$) perteneciente al orden *Fabales*, familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoidae*, tribu *Vicieae* DC. (syn. *Fabeae* Rchb.). Su ciclo de vida es anual y se reproduce por autofecundación, si bien suele existir una pequeña proporción de descendientes, hasta un 5%, que se forman por fecundación cruzada (Horneburg, 2006). Presenta un genoma de aproximadamente 4 Gb (Arumuganathan y Earle, 1991), tamaño similar al de especies muy relacionadas como el guisante, bastante menor que el de otras especies de su tribu como *Lathyrus* o *Vicia*, pero relativamente grande cuando se compara con la mayoría de las especies de la familia (Bennett y Leitch, 2012).

Barulina (1930) subdividió las lentejas cultivadas en dos tipos, macrosperma y microsperma, basándose en los caracteres de la semilla. Las variedades de tipo macrosperma están caracterizadas por poseer semillas grandes (6-9 mm de diámetro), cotiledones amarillos y flores y partes vegetativas con escasa pigmentación, mientras que las de tipo microsperma tienen semillas pequeñas (2-4 mm de diámetro), cotiledones naranja-rojizos o amarillos y pigmentación en las flores y partes vegetativas.

Además de la lenteja cultivada, el género *Lens* Miller presenta un número todavía por determinar de especies silvestres, siendo todas ellas diploides, con $2n=14$ y con cariotipos muy similares (Ladizinsky, 1993). En Pérez de la Vega *et al.* (2011) se presenta una revisión detallada de la controversia sobre las especies del género *Lens*. Entre los trabajos que han analizado la taxonomía se pueden destacar los realizados por Ladizinsky (1979, 1984, 1986, 1997) utilizando características morfológicas, proteínas de la semilla, "cruzabilidad" y fertilidad de la descendencia. A partir de ellos se han delimitado 7 taxones (*L. culinaris*, *L. orientalis*, *L. ervoides*, *L. odemensis*, *L. tomentosus*, *L. lamottei* y *L. nigricans*) aunque su estatus varía de especie a subespecie en función de los autores. Así el propio Ladizinsky

(1979) consideró en un primer momento a cuatro de los taxones nombrados con rango de especie (el taxón *L. odemensis* se propuso en 1986, y los taxones *L. lamottei* y *L. tomentosus* en 1997), posteriormente (Ladizinsky *et al.*, 1984) consideró sólo dos especies: *L. culinaris* (con las subespecies *L. c. culinaris* y *L. c. orientalis*) y *L. nigricans* (con las subespecies *L. n. nigricans* y *L. n. ervoides*), y en 1986 reconoció de nuevo el estatus específico de los 4 taxones, al mismo tiempo que describía la nueva especie *L. odemensis*.

La aplicación de diferentes tipos de marcadores moleculares a la delimitación de las especies de *Lens* no ha dado un resultado único, sino que las conclusiones dependen de los marcadores. Así, Sharma *et al.* (1995, 1996), utilizando marcadores RAPD y AFLP, observaron que *L. orientalis* y *L. culinaris* eran muy similares, lo que apoyaba la sugerencia de que ambos taxones constituían dos subespecies de la misma especie y *L. orientalis* sería la forma silvestre a partir de la cual se obtuvo la forma domesticada, mientras que *L. odemensis*, *L. ervoides* y *L. nigricans* serían especies diferentes.

Van Oss *et al.* (1999) utilizando el ADN del cloroplasto y marcadores moleculares de tipo RFLP, concluyeron que el género *Lens* está compuesto de seis especies (Tabla 1.1), idea que es la más aceptada en la actualidad. Por otro lado, Ferguson *et al.* (2000) valoraron la clasificación del género *Lens*, apoyándose en evidencias relacionadas con cruzamientos y relaciones filogenéticas basadas en marcadores isoenzimáticos y RAPDs llegaron a la clasificación que se muestra en la Tabla 1.1 y que es la utilizada por el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

En la Tabla 1.2, se muestran diferentes estudios realizados a partir del año 2001 que agrupan a los taxones de *Lens* según varios criterios. La nomenclatura filogenética de Zimniak-Przybylska *et al.* (2001), basada en el análisis de proteínas de semilla mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) coincide con los estudios de Ferguson *et al.* (2000), mientras que el resto de estudios que utilizan otros tipos de marcadores moleculares concluyen que *L. tomentosus* y *L. odemensis* forman un grupo aparte de *L. culinaris* y *L. orientalis*. Estudios filogenéticos recientes basados en la secuencia del espaciador interno (ITS), marcadores moleculares y secuencias de convicilina (revisados en Pérez de la Vega *et al.*, 2011) apoyan fuertemente la condición divergente de *L. nigricans* de otras especies de *Lens* y el estatus de subespecies de *L. c. culinaris* y *L. c. orientalis*. Sin embargo las relaciones entre los otros taxones es menos clara, aunque *L. tomentosus* parece ser el taxón hermano del grupo de *L. culinaris*, *L. lamottei* parece más cercana a *L. ervoides*, y *L. odemensis* varía su posición, pero generalmente está unida al grupo de *culinaris-orientalis-tomentosus* para la mayoría de los autores (Mayer y Braga, 2002; Sonnante *et al.*, 2003; Durán y Pérez de la Vega, 2004).

Tabla 1.1. Clasificaciones del género *Lens* basadas en distintos tipos de caracteres.

Clasificación del Género <i>Lens</i>	
Van Oss et al. (1999) Caracteres: similitudes morfológicas, RFLPs, ADN de cloroplasto	Ferguson et al. (2000) Caracteres: cruzamientos, marcadores isoenzimáticos y RAPDs
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lens culinaris</i> <i>ssp. culinaris</i> Medik <i>ssp. orientalis</i> (Boiss.) Ponert • <i>Lens odemensis</i> (Godr.) Ladiz. • <i>Lens tomentosus</i> Ladiz. • <i>Lens ervoides</i> (Bring.) Grande • <i>Lens nigricans</i> (M. Bieb.) Godr • <i>Lens lamottei</i> Cezfr. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lens culinaris</i> <i>ssp. culinaris</i> Medik <i>ssp. orientalis</i> (Boiss.) Ponert <i>ssp. tomentosus</i> (Ladiz.) M.E.Ferguson <i>et al.</i> <i>ssp. odemensis</i> (Ladiz.) M.E.Ferguson <i>et al.</i> • <i>Lens ervoides</i> (Bring.) Grande • <i>Lens nigricans</i> (M. Bieb.) Godr • <i>Lens lamottei</i> Cezfr.

Además, Galasso (2003) en un análisis de los cariotipos mediante hibridación *in situ* (FISH), encontró muy pocas variaciones cromosómicas dentro de cada taxón (excepto en *L. odemensis*), una gran similitud entre *L. c. culinaris* y *L. c. orientalis* y diferencias con *L. tomentosus*, *L. lamottei* y *L. nigricans*, y de éstas entre sí, lo que apoya la consideración específica de estos tres últimos taxones a pesar de las semejanzas morfológicas descritas por Van Oss *et al.* en 1999.

En el año 2011, Alo *et al.* publicaron el primer estudio amplio sobre la variabilidad presente en las secuencias de ADN del género *Lens*, utilizando los datos de 22 genes en 308 accesiones pertenecientes a todos los taxones. Sus resultados coinciden con los previamente comentados en identificar dos subespecies en *L. culinaris* (*L. c. ssp. culinaris* y *L. c. ssp. orientalis*) e indicar que *L. ervoides* y *L. nigricans* constituyen especies bien definidas. Para *L. tomentosus*, *L. lamottei* y *L. odemensis* los resultados fueron menos claros, aunque sugerían que estos tres taxones forman un único grupo que podría ser otra subespecie de *L. culinaris*.

En resumen, la clasificación del género *Lens* basado en marcadores morfológicos y moleculares ha pasado de tener cuatro especies en 1979 (*L. culinaris*, *L. orientalis*, *L. nigricans* y *L. ervoides*) a seis en el 2003 (*L. culinaris* con las subespecies *culinaris* y

orientalis, *L. odemensis*, *L. tomentosus*, *L. nigricans*, *L. ervoides* y *L. lamottei*). Durante los años 1979 al 2003, las subespecies *L. c. culinaris* y *L. c. orientalis* son las únicas que no han variado su clasificación.

Tabla 1.2. Agrupamiento de los taxones del género *Lens*, de acuerdo a distintos criterios, en estudios a partir del año 2001 (modificada de Cubero *et al.*, 2009).

Método ^a	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Referencia
SDS-PAGE	<i>culinaris</i> <i>orientalis</i> <i>tomentosus</i> <i>odemensis</i>	<i>ervoides</i> <i>lamottei</i>	<i>Nigricans</i>				Zimniak-Prybylska. <i>et al.</i> (2001)
ITS	<i>culinaris</i> <i>orientalis</i>	<i>tomentosus</i> <i>odemensis</i> <i>ervoides</i> <i>lamottei</i>	<i>Nigricans</i>				Mayer y Bagga (2002)
ITS+ cpDNA	<i>culinaris</i> <i>orientalis</i>	<i>odemensis</i>	<i>Ervoides</i>	<i>nigricans</i>			Mayer y Bagga (2002)
ITS	<i>culinaris</i> <i>orientalis</i>	<i>tomentosus</i> <i>odemensis</i> <i>lamottei</i> <i>ervoides</i>	<i>Nigricans</i>				Sonnante <i>et al.</i> (2003)
FISH de ADN repetitivo	<i>culinaris</i> <i>orientalis</i>	<i>tomentosus</i>	<i>odemensis</i>	<i>lamottei</i>	<i>ervoides</i>	<i>nigricans</i>	Galasso (2003)
RAPD+ ISSR	<i>culinaris</i> <i>orientalis</i>	<i>tomentosus</i>	<i>odemensis</i>	<i>lamottei</i>	<i>ervoides</i>	<i>nigricans</i>	Durán y Pérez de la Vega (2004)
Cruzabilidad	<i>culinaris</i> <i>orientalis</i>	<i>odemensis</i> <i>nigricans</i>	<i>Ervoides</i>				Fratini <i>et al.</i> (2004), Fratini y Ruiz (2006)
Caracteres morfológicos florales	<i>culinaris(m)</i> <i>orientalis</i> <i>odemensis</i> <i>nigricans</i>	<i>ervoides</i>	<i>culinaris(M)</i>				Fratini <i>et al.</i> (2006)
Secuencias génicas	<i>culinaris</i> <i>orientalis</i>	<i>odemensis</i> <i>lamottei</i> <i>tomentosus</i>	<i>Ervoides</i>	<i>nigricans</i>			Alo <i>et al.</i> (2011)

^a Abreviaturas usadas: cpDNA, ADN de cloroplasto; FISH, hibridación *in situ* con fluorescencia; ISSR, secuencia entre microsatélites; ITS, espaciador interno transcrito del rRNA; RAPD, ADN polimórfico amplificado al azar; SDS-PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico de proteínas totales de semilla. (m), microsperma; (M), macrosperma

Los resultados contradictorios de diferentes estudios son consecuencia de un proceso evolutivo complejo. Las especies del género *Lens* comparten muchas características bioquímicas y estructuras comunes, y las diferencias obtenidas en diferentes estudios pueden atribuirse al origen de las accesiones, los caracteres particulares y los marcadores morfológicos o moleculares elegidos (Cubero *et al.*, 2009).

1.1.2. Distribución de las especies silvestres.

Geográficamente el género *Lens* se distribuye principalmente en la región del Mediterráneo, aunque existen variaciones significativas en la distribución de especies individuales. Las más extendidas son *Lens culinaris* ssp. *orientalis*, que se encuentra desde Turquía e Israel hasta el este de Uzbekistán, *L. nigricans* se localiza principalmente en España, sur de Argelia, Marruecos y las Islas Canarias, *L. ervoides* ha sido descrita en Etiopía, además de en toda la zona mediterránea y *L. odemensis*, distribuida principalmente en el Mediterráneo oriental. *L. tomentosus* y *L. lamottei* parecen tener una distribución muy limitada en el este y oeste del Mediterráneo respectivamente (ver Figura 1.1, modificada de Cubero *et al.*, 2009).

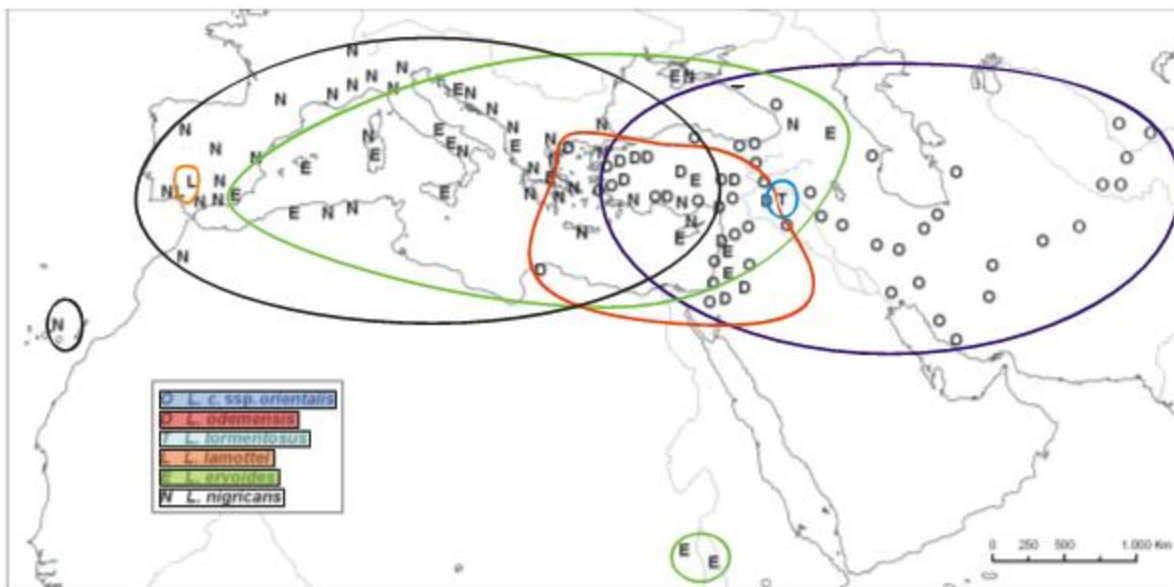


Figura 1.1. Distribución geográfica del género *Lens*. Grafica modificada de Cubero *et al.* (2009).

1.1.3. Origen y domesticación.

La lenteja es una de las primeras especies domesticadas en el Creciente Fértil, siendo tan antigua como el trigo, la cebada o el guisante (Harlan, 1992). El origen de la lenteja cultivada es la lenteja silvestre *L. culinaris* ssp. *orientalis*. Cubero *et al.* (2009) consideran que las lentejas se han mantenido entre las especies cultivadas debido a su capacidad de crecer en suelos pobres, climas duros y condiciones difíciles para humanos, animales y otros cultivos, siendo la lenteja la principal fuente de proteína para los agricultores. De acuerdo a los estudios realizados por Ladizinsky (1999), Zohary (1999) y Lev-Yadun *et al.* (2000) se sitúa el origen de domesticación entre el sur de Turquía y el norte de Siria, donde algunas poblaciones de *L. c.* ssp. *orientalis* se sometieron a domesticación inconsciente para dar lugar al nuevo cultivo *L. c.* ssp. *culinaris*. En el trabajo de Alo *et al.* (2011) se sugiere el

territorio del sur de Turquía situado entre Antakya y Denizli como el lugar más probable, aunque no se descarta un origen multirregional.

Los agricultores del neolítico cultivaron gramíneas y leguminosas, de modo que los aminoácidos limitantes de las proteínas de plantas de una familia eran aportados por la otra. Así, en el Este asiático se desarrollaron cultivos de soja y arroz, en el Nuevo Mundo de judías y maíz, en África de *Vigna unguiculata* y sorgo, y en las culturas del Oriente próximo y el Mediterráneo de guisante y lenteja junto con trigo y cebada (Jeswani, 1988; Deshpande, 1992). Al realizar esta combinación, inconscientemente se suplía la carencia de aminoácidos azufrados y triptófano en leguminosas, y la de lisina en los cereales.

Actualmente es una planta ampliamente extendida en todas las regiones templadas, ya que resulta relativamente fácil de cultivar, favorece la regeneración de los nutrientes del suelo al alternar su cultivo con el de los cereales y es rica en energía, barata, de fácil conservación y capaz de combinar con todo tipo de alimentos.

1.1.4. Producción.

De acuerdo con las estadísticas publicadas por FAOSTAT (2012), para el cultivo de lenteja en el mundo se emplean actualmente 4,2 millones de hectáreas, siendo el principal productor Canadá con 998.800 hectáreas y 1,5 millones de toneladas (Figura 1.2.A y 1.2.C). El continente con una mayor producción de lenteja es Asia y el de menor Europa (Figura 1.2.B). En la Unión Europea el mayor productor de lenteja es España con 38.500 hectáreas y una producción de 29.300 toneladas, aunque para cubrir la demanda es necesario importar una cantidad muy superior (por ejemplo en 2011 se importaron 44.000 toneladas según los datos de FAOSTAT). Otros productores importantes son la India con 1,6 millones de hectáreas y 950.000 toneladas, Australia con 207.000 hectáreas y 463.000 toneladas, Turquía con 237.470 hectáreas y 438.000 toneladas y Estados Unidos con 182.110 hectáreas y 240.490 toneladas. En América también destacan las producciones de México con 7.000 hectáreas y 9.080 toneladas y el Perú con 3.953 hectáreas y 3.740 toneladas.

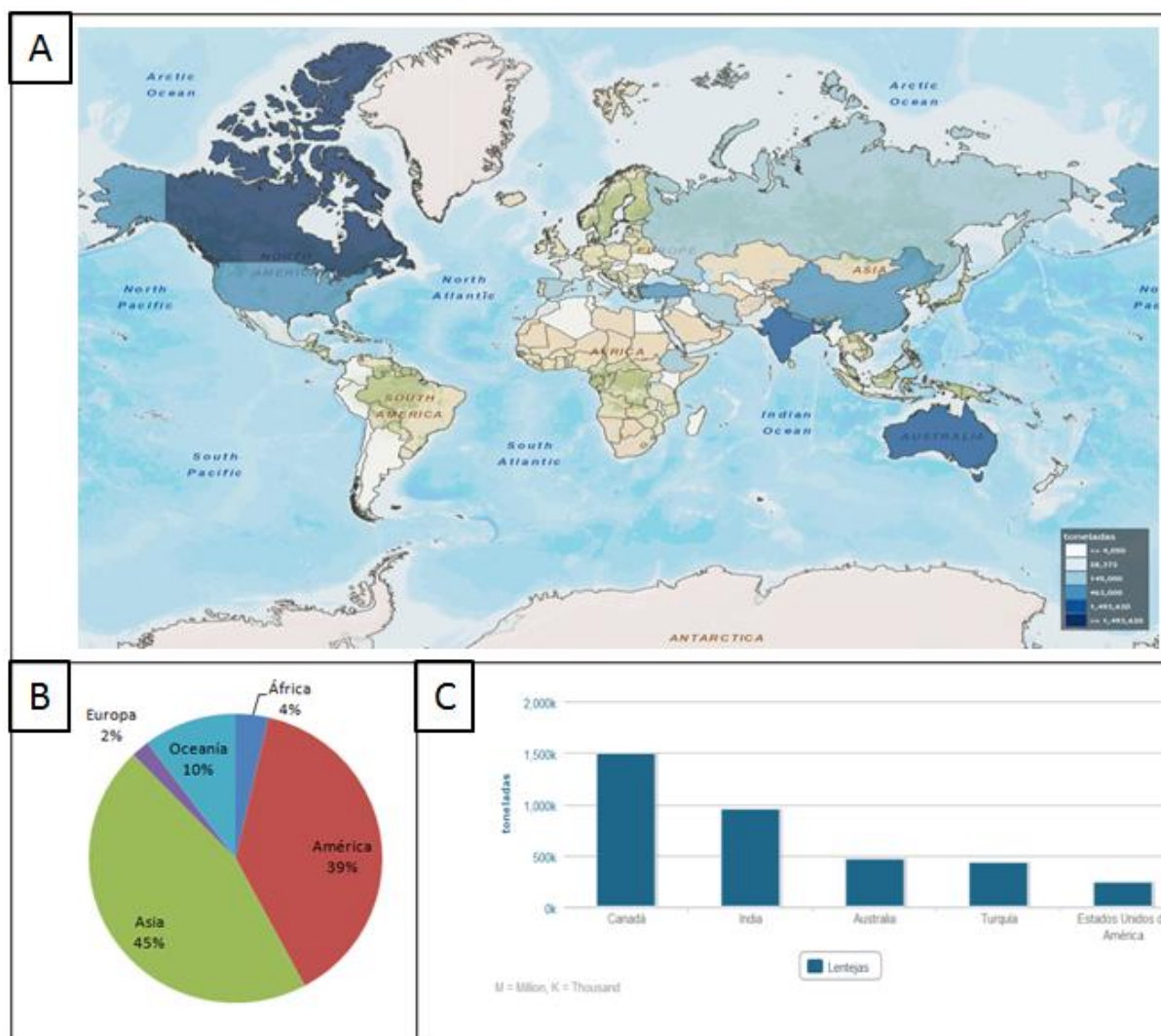


Figura 1.2. Producción global de lenteja del año 2012 (FAOSTAT). En (A) se muestra la producción de los países (en toneladas), en (B) los porcentajes de producción de cada continente y en (C) la producción de los 5 principales productores.

1.1.5. Características nutritivas y cultivo de la lenteja.

Se denominan legumbres secas o leguminosas grano a aquellas especies de la familia de leguminosas de las que se consumen las semillas secas, limpias y separadas de su vaina. En esta categoría están incluidas, además de las lentejas, alubias (*Phaseolus vulgaris*), garbanzos (*Cicer arietinum*), guisantes (*Pisum sativum*) y habas (*Vicia faba*), así como algunas legumbres locales propias de cada país.

La composición de nutrientes de la lenteja es similar al de otras leguminosas. De acuerdo a los estudios realizados por Urbano *et al.* (2007), 100 g de lenteja seca aportan entre 1.483-2.010 kJ de energía, 20,6-31,4 g de proteínas, 0,7-4,3 g de lípidos, 43,4-69,9 g de carbohidratos, 5,0-26,9 g de fibra y 2,2-4,2 g de cenizas (sales minerales). Además estas cantidades varían si se analizan las semillas completas o descascarilladas. Ghavidel y

Prakash (2007) mostraron los efectos del descascarillado de las semillas de lenteja (Tabla 1.3), observando que la cantidad de lípidos, proteínas, tiamina y taninos se incrementa en la semilla descascarillada, mientras que disminuye la fibra soluble e insoluble.

Tabla 1.3. Efectos de germinación y descascarillado^a en algunos componentes de las semillas de lenteja (datos de peso seco/100g) (Resumen de Gavidel y Prakash, 2007).

	Semilla seca	Semilla germinada	Semilla Descascarillada
Lípidos (g)	0,9	0,8	1,2
Proteínas (g)	26,5	28,5	29,6
Almidón (g)	38,2	34,3	37,3
Fibra soluble (g)	0,9	1,5	0,3
Fibra insoluble (g)	15,6	15,5	0,3
Tiamina (mg)	0,5	0,7	0,8
Ácido fítico (g)	0,2	0,1	0,1
Taninos (g)	0,8	0,6	5,5
Hierro (mg)	77,0	63,0	50,3

^aLas semillas se mantuvieron en agua durante 12 horas y se permitió su germinación durante otras 24 horas, parte de las semillas germinadas fueron descascarilladas.

De Almeida-Costa *et al.* (2006) compararon semillas cocinadas y no cocinadas de lentejas detectando un incremento de las proteínas, carbohidratos y fibra insoluble (20,6 a 23,4, 56,4 a 61,8 y 19,0 a 21,4 g/100 g respectivamente) mientras que disminuyó la fibra soluble (1,44 a 1,37 g/100 g). Wang *et al.* (2009) obtuvieron resultados similares al combinar análisis de cocción y descascarillado. La concentración de proteínas en la lenteja es relativamente alta ya sea en semillas crudas, germinadas, descascarillas, cocinadas o no cocinadas, sin embargo, las proteínas contienen pocos aminoácidos azufrados y triptófano, aunque como contrapartida, las proteínas son altamente digeribles y no pierden sus cualidades al someterlas al calor.

Las lentejas son una fuente importante de hierro, otros minerales esenciales y vitaminas solubles, y tienen bajos contenidos de fitato (0,1-0,8%) y taninos (0,5-10,5%). Esta composición es importante porque los ácidos fíticos forman complejos con proteínas y minerales y los taninos con proteínas, reduciendo la capacidad de asimilación de estos componentes en los alimentos (Thavarajah *et al.*, 2009a, b). Además de los fitatos y taninos, las semillas de lentejas tienen otros componentes antinutritivos como α -amilasa, tripsina, inhibidores de quimotripsina, lectinas y saponinas. Los niveles de lectinas son bajos y los inhibidores de tripsina y saponinas son más bajos que en otras legumbres, excepto en los

altramuces. Afortunadamente, muchas de las actividades antinutritivas se pierden por tratamientos de calor o cocción (Iskratsch *et al.*, 2009).

1.2. CARACTERÍSTICAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN LENTEJA.

El valor económico de las lentejas depende en gran medida de características controladas genéticamente, por lo que los programas de mejora deben tener el objetivo de producir variedades que sean provechosas tanto para los productores como para los consumidores. Fratini y Pérez de la Vega (2011) y Sharma (2012) recogen los rasgos que se consideran más importantes como el tamaño y contenido proteico de las semillas, debido a su utilización como alimento, y la resistencia a estreses bióticos y abióticos, que influirían en la producción.

Entre los estreses bióticos que más afectan a la producción de la lenteja y a su valor económico está la enfermedad denominada ascoquitosis, producida por el hongo *Ascochyta lentis* (syn *A. fabae* f. sp. *lentis*; teleomorfo *Didymella lentis*). Esta enfermedad se manifiesta en una primera fase mediante la aparición de manchas en los bordes y extremos de los folíolos que pueden provocar el posterior marchitamiento y caída. También se pueden producir daños similares en los tallos, pecíolos y ápices de crecimiento. Las lesiones pueden alcanzar a la semilla, produciendo una disminución en la producción y una depreciación de su valor para consumo humano, llegando a tener que ser desviada para su utilización como pienso.

La ascoquitosis puede controlarse con fungicidas pero se considera que es más eficiente y sostenible la utilización de variedades resistentes (Davidson y Kimber, 2007), de ahí el esfuerzo que se ha realizado para identificar fuentes de resistencia en el germoplasma disponible, incluyendo el correspondiente a las especies silvestres (Ye *et al.*, 2002; Tullu *et al.*, 2010), y la base genética de la respuesta a *Ascochyta*.

El número y naturaleza de los genes implicados en la resistencia al hongo varía en función de los cruzamientos realizados (para una revisión detallada ver Pérez de la Vega *et al.*, 2011). Así en algunos casos la resistencia aparece como un carácter cualitativo determinado por un único gen dominante (Tay y Slinkard, 1989; Vakulabharanam, 1997; Ford *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2002) o recesivo (Tay y Slinkard, 1989; Ye *et al.*, 2002), mientras que en otras ocasiones aparecen implicados dos genes (Nguyen *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2002). Para algunos de estos genes se dispone de marcadores moleculares de tipo RAPD, como en el caso del gen recesivo *ral2* (Chowdhury *et al.*, 2001), o del dominante *Ral1* (*AbR1*) (Ford *et*

al., 1999), que presentan gran utilidad en los programas de mejora. Sin embargo, generalmente el mecanismo de resistencia a un patógeno es un proceso complejo en el que suelen estar implicados varios genes (poligenes o QTLs) que explican individualmente sólo parte de la respuesta. Este hecho también ha sido observado con la resistencia a *Ascochyta* en lenteja (Rubeena *et al.*, 2003, 2006; Gupta *et al.*, 2012).

El conocimiento de los genes concretos subyacentes a la resistencia a *Ascochyta* en lenteja comenzó en el año 2009 cuando Mustafa *et al.* analizaron mediante un microarray los cambios de expresión génica que ocurren en genotipos resistentes y susceptibles de lenteja al ser infectados por *A. lentis*. De este modo se consiguieron identificar varios genes candidatos que parecen relacionados con diferentes aspectos de la respuesta al patógeno, como algunos codificantes para proteínas con dominios kinasa serina/treonina que son característicos, aunque no exclusivos, de proteínas implicadas en la transmisión de señales que producen activación de las respuestas de defensa, genes codificantes de superóxido dismutasas, implicados en la producción de compuestos ROS (especies reactivas de oxígeno) que es una de las primeras respuestas detectadas después de la infección de genotipos resistentes a patógenos, o genes codificantes de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR).

Genes similares a los anteriores también se han detectado mediante la técnica SuperSage en experimentos realizados por el grupo de Genética de la Universidad de León al infectar con *Ascochyta* la accesión ILL5588 (resistente al hongo) (García *et al.*, 2012), o en respuesta a la infección con *Colletotrichum truncatum*, hongo causante de la antracnosis en lenteja (Bhadauria *et al.*, 2013).

1.3. PROTEÍNAS DE RESERVA.

Las semillas de las plantas suelen presentar una alta concentración de proteínas de reserva, especialmente en las leguminosas, en las que pueden constituir un 20-25% del peso seco, mientras que en los cereales grano está alrededor del 10-15% de su peso seco. Las proteínas de reserva no tienen una función enzimática conocida, frecuentemente están en vesículas separadas en las semillas (Berg *et al.*, 2002) y sirven como fuente de nitrógeno y aminoácidos para el desarrollo del embrión durante la germinación.

Dentro de las proteínas de reserva, las de mayor interés son las prolaminas, presentes en gran cantidad en el endospermo de los cereales, y las globulinas que están presentes en los órganos de reserva de la mayoría las plantas superiores y son características de las

leguminosas. A su vez, dentro de las globulinas encontramos dos tipos de proteínas, las leguminas y las vicilinas, que se diferencian en su coeficiente de sedimentación, teniendo en las leguminas un valor de aproximadamente 11S y en las vicilinas de aproximadamente 7S (Danielsson, 1949).

Aunque los datos anteriores corresponden a la especie *Pisum sativum*, se encontraron resultados similares en otras leguminosas, y dichas proteínas recibieron el nombre de acuerdo al género o la especie en las que fueron halladas por primera vez. Así las vicilinas de *Phaseolus*, *Glycine* y *Canavalia* se denominan faseolinas, conglicinas y canavalinas respectivamente, o las leguminas de *Glycine* reciben el nombre de glicininas (Gatehouse *et al.* 1984; Borroto y Dure 1987). Además, dentro del grupo de las vicilinas algunas especies muestran dos tipos estrechamente relacionados evolutivamente, las vicilinas propiamente dichas y las convicilinas.

El ARN mensajero codificante para proteínas de reserva se sintetiza exclusivamente durante el periodo de maduración de las semillas en los tejidos embrionarios; en las leguminosas se produce únicamente en los cotiledones y el hipocotilo. En *Pisum*, los ARNs mensajeros que predominan a los 18 días después de la antesis corresponden a los codificantes de leguminas, convicilinas y vicilinas, siendo los dos primeros los que se encuentran en mayor cantidad (Gathouse *et al.*, 1984 y Boulter *et al.*, 1987).

Cada especie tiene un patrón específico de acumulación de proteínas de reserva, por ejemplo en *Glycine max* se acumulan leguminas, vicilinas y conglicinas (variante de las vicilinas); en cambio en *Phaseolus vulgaris* no se encuentran leguminas, hay principalmente vicilinas (Gatehouse *et al.*, 1986).

Existen muchos factores que afectan a la cantidad o a la relación final entre las diferentes proteínas de reserva. Por ejemplo una falta de azufre provoca una disminución en la producción de leguminas con respecto a las vicilinas en *Glycine* (Fujiwara *et al.*, 1992) o la administración de ácido abscísico exógeno afecta a la producción de mensajeros en *Vicia* (Barrat, 1986), aunque no tiene efectos en *Pisum* (Barrat *et al.*, 1989).

1.3.1. Vicilinas.

Las vicilinas están codificadas por familias multigénicas (Sáenz de Miera y Pérez de la Vega, 1998) que han sido identificadas en las formas cultivadas de lenteja y en especies silvestres del género *Lens*. La comparación de secuencias de nucleótidos indica que las vicilinas de la lenteja son similares a las secuencias de otras especies de legumbres (*Vicia faba* y *Pisum sativum*) (Sáenz de Miera y Pérez de la Vega, 1998).

Los precursores para vicilinas son sintetizados con un péptido señal en su extremo N-terminal (Beachy *et al.*, 1981; Higgins y Spencer, 1981; Tumeret *et al.*, 1981; Sengupta *et al.*, 1985), que sirve para su exportación al retículo endoplasmático rugoso. Antes de terminar su traducción se produce la glicosilación de la proteína y la agregación en trímeros que forman la proteína madura (Banedoch-Jones *et al.*, 1981; Bollini *et al.*, 1984); posteriormente son transportadas a vesículas especiales, denominadas cuerpos proteicos, donde se acumulan. En *Pisum* se ha demostrado que tiene lugar un procesamiento proteolítico de las subunidades, dando lugar a distintos polipéptidos que confieren heterogeneidad a las proteínas maduras (Chrispeels *et al.*, 1982).

Utilizando plantas transgénicas a las que se han introducido genes quiméricos que portan información para vicilinas y promotores constitutivos víricos, se ha observado que se sintetizan vicilinas en todos los tejidos de las plantas pero éstas son degradadas y se acumulan sólo en los tejidos de reserva de las semillas. Así ocurre en *Glycine* (Lawton *et al.*, 1987), *Pisum* (Higgins y Spencer, 1991) y *Phaseolus* (Bagga *et al.*, 1992).

Los promotores de los genes para vicilinas, al igual que los de leguminas, contienen cajas TATA y CAAT en regiones próximas al inicio de la transcripción. En el caso de los genes de vicilinas se ha descrito una secuencia relativamente conservada que se ha denominado caja vicilina, situada entre -120 y -130 pb con respecto al inicio de la transcripción, y fue el primer elemento al que se le atribuyó un papel regulador. Sin embargo, tanto en *Pisum*, *Phaseolus* como en *Lens*, la caja vicilina no está presente en todos los genes y además no es una señal exclusiva de los genes de vicilinas, ya que también se ha encontrado esta secuencia en genes de leguminas de *Pisum* (Lycett *et al.*, 1984).

Bustos *et al.* (1991a) demostraron la presencia de cinco dominios reguladores que actúan en cis en los genes de faseolinas (vicilinas en *Phaseolus*). Tres de estos dominios regulan la transcripción de forma positiva (UAS1, UAS2 y UAS3) y dos de forma negativa (NRS1 y NRS2). El dominio UAS3 constituye un "enhancer" y es rico en pares A/T, mientras que UAS1 y UAS2 tienen un papel importante en la regulación espacial, siendo la primera necesaria para la expresión en los cotiledones y la segunda en el hipocotilo. Los dominios

NRS reducen los niveles de síntesis de los mensajeros y se encargan, en parte, de la regulación de la expresión temporal.

Los intrones de los genes para vicilinas no parecen jugar un papel fundamental en la regulación, ya que su ausencia en un gen de faseolina en plantas transgénicas de tabaco no afecta a su expresión (Bustos *et al.*, 1991b).

1.3.2. Convicilinas.

Las convicilinas son un grupo de proteínas de reserva de semilla que sólo se han descrito en especies de la tribu *Viceae*. Fueron identificadas inicialmente en *Pisum sativum* y *Vicia faba* (Gatehouse *et al.*, 1984; Pasqualini *et al.*, 1991; Tucci *et al.*, 1991) y posteriormente se han secuenciado en distintas especies del género *Lens*, *Pisum*, *Vicia* y *Lathyrus* (Sáenz de Miera y Pérez de la Vega, 2001 y Sáenz de Miera *et al.*, 2008).

Las convicilinas tienen un peso molecular aproximado de 70 KDa, carecen de cadenas laterales de azúcar y son pobres en aminoácidos azufrados (Croy *et al.*, 1980). Representan entre el 5,8 y 8,3% del contenido total de proteínas en las semillas en *Pisum sativum* y más del 13,4% en *Pisum fulvum*, pero sólo el 3,2% en *Vicia faba* (Domoney y Casey, 1983; Pasqualini *et al.*, 1991; Tucci *et al.*, 1991). Estas proteínas se degradan en las primeras fases de la germinación y desaparecen antes que las vicilinas y leguminas (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008).

Los genes para las convicilinas están localizados en dos loci ligados, como se ha descrito en varias especies de *Pisum* o en *Vicia faba* (Casey *et al.*, 1986; Ellis *et al.*, 1986; Bown *et al.*, 1988; Sáenz de Miera *et al.*, 2008), mientras que en otras especies de *Vicia*, las del género *Lens* o de *Lathyrus* se ha identificado un único gen (Sáenz de Miera *et al.*, 2008). Las secuencias de los genes de convicilinas generalmente presentan 6 exones, pero en algunas especies un intrón se ha perdido, como es el caso del intrón 4 en *Lathyrus clymenum*, *L. clymenum articulatus* y *L. ochrus*, del intrón 5 en *L. aphaca* o del intrón 2 en *Vicia articulata*. Todas estas secuencias muestran marcos de lectura sin codones de fin lo que indica que la pérdida de los intrones no está asociada a un proceso de formación de pseudogenes, y que las secuencias parecen seguir siendo funcionales (Sáenz de Miera *et al.*, 2008).

La principal diferencia entre las secuencias de los genes de convicilina y vicilina en *Lens culinaris*, *Pisum sativum* y *Vicia narbonensis* es una extensión N-terminal de origen incierto en el primer exón (Bown *et al.*, 1988; Shutov *et al.*, 1996; Sáenz de Miera *et al.*, 2001). Una modificación similar aparece en la conglicina, que es un tipo de proteína análoga a la convicilina en el género *Glycine* (Doyle *et al.*, 1986), y que también difiere de las vicilinas por

una extensión N-terminal en la región correspondiente al primer exón. Sin embargo la posición y la secuencia de las extensiones de convicilinas y conglicinas muestran claramente que no son homólogas.

La secuencia codificante para la extensión N-terminal es particularmente rica en nucleótidos púricos (43,4% A, 31,9% G, en promedio). Así el codón GAA representa hasta un 21% en esta región, mientras que en el resto de la secuencia de convicilina o en las vicilinas muestra un bajo porcentaje (Sáenz de Miera y Pérez de la Vega, 2001).

El tamaño de la región N-terminal varía claramente entre las diferentes especies de la tribu *Viceae* (Sáenz de Miera y Pérez de la Vega, 2001) pudiendo presentar desde 80 a 190 aminoácidos. Es de destacar el alto contenido en residuos con carga, especialmente de ácido glutámico (alrededor del 30%) y de arginina (alrededor del 15%), ya que en el resto de la proteína los aminoácidos predominantes son neutros.

1.4. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PATOGÉNESIS (PR).

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) fueron descritas por primera vez en plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TVM) (Van Loon y Van Kammen, 1970). Generalmente se encuentran en niveles bajos en las células, presentando una expresión específica de tejido, pero si existe un proceso de infección por patógenos se produce un incremento en la expresión y las proteínas codificadas se acumulan durante y después de la infección. Los genes PR se inducen en respuesta a oomicetos, hongos, virus, bacterias o ataques de insectos (Van Loon *et al.*, 2006a), así como también a factores ambientales como la temperatura, la luz y ozono, y daños mecánicos como heridas (Vidhyasekaran, 2008).

Las proteínas PR se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a proteasas, y localización intra y extracelular (Van Loon y Van Kammen, 1970). Van Loon *et al.* (2006) y Vidhyasekaran (2008) las han clasificado en 17 familias basándose en sus propiedades y en las plantas de las que se aislaron (ver Tabla 1.4). En el caso de muchas de las proteínas PR se ha demostrado que poseen actividad antifúngica directa, tanto *in vitro* como *in vivo*, o que están involucradas en la señalización de defensas.

De los 17 grupos de proteínas PR, al menos tres de ellos están implicados en la interacción lenteja - *Ascochyta lentis* según los resultados obtenidos con microarrays (Mustafa *et al.*, 2009): PR-2 (β -1,3-glucanasas), PR-4 (quitinasas) y PR-10 (RNAsas). La proteínas con actividad β -1,3-glucanasas protegerían a la planta al hidrolizar la pared celular de los hongos

y producir la lisis de las células; las proteínas PR4 interactúan con la quitina, especialmente la situada en los extremos de las hifas, por lo que inhiben el crecimiento del hongo; las proteínas con actividad RNasa penetran en las células del hongo por un mecanismo de transporte activo y ejercerían su actividad antifúngica debido a la destrucción de los ARNs.

Tabla 1.4. Familias de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)

Familia	Miembro tipo	Planta en la que fue aislada	Propiedades	Gen
PR-1	Tabaco PR-1	Arroz, cebada, maíz, perejil, tabaco, tomate	Antifúngica	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tabaco PR-2	Arroz, cebada, alubias, garbanzo, maíz, papa, pepino, remolacha, repollo, soja, tabaco, tomate, trigo	B-1,3-glucanasa	<i>Ypr2</i>
PR-3	Tabaco P, Q	Arroz, colza, maíz, pimienta, remolacha, tomate	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI y VII	<i>Ypr3, Chia</i>
PR-4	Tabaco P, Q	Caucho, tabaco, tomate	Quitinasa tipo I y II	<i>Ypr4, Chid</i>
PR-5	Tabaco S	Arroz, avena, cebada, patata, sorgo, tabaco, tomate, trigo	Semejante a taumatina	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomate inhibidor I	Cebada, patata, tabaco, tomate	Inhibidor de proteinasas	<i>Ypr6, Pis</i> ("Pin")
PR-7	Tomate P69	Tomate	Endoproteinasa	<i>Ypr7</i>
PR-8	Quitinasa calabaza	Pepino	Quitinasa tipo III	<i>Ypr8, Chib</i>
PR-9	Peroxidasa formada de lignina tabaco	Arroz, tabaco, tomate, trigo	Peroxidasa	<i>Ypr9, Prx</i>
PR-10	Semejante a PR1	Arroz, guisantes, espárrago, alubias, patata, perejil, soja	Ribonucleasa	<i>Ypr10</i>
PR-11	Quitinasa Clase V tabaco	Tabaco	Quitinasas tipo I	<i>Ypr11, Chic</i>
PR-12	Rábano Rs-AFP3	<i>Arabidopsis thaliana</i> , guisante, rábano	Defensina	<i>Ypr12</i>
PR-13	<i>Arabidopsis</i> TH12.1	Cebada	Tionina	<i>Ypr13, thi</i>
Pr-14	Cebada LTP4	Arroz, cebada, pimienta	Proteína de transferencia de lípidos	<i>Ypr14, Ltp</i>
PR-15	OxOa (germin) cebada	Cebada	Oxalato-oxidasa	<i>Ypr15</i>
PR-16	OxOLP cebada	Cebada, trigo	Semejante a oxalato-oxidasa	<i>Ypr16</i>
PR-17	PRp27 tabaco	Cebada, tabaco, trigo	Peptidasas	<i>Ypr17</i>

Fuente: Modificado de Van Loon *et al.*, 2006; Vidhyasekaran, 2008.

En los análisis SuperSage (García *et al.*, 2012) se encuentra una mayor variedad de genes PR, ya que además de los anteriores, aparecen cambios en la expresión de genes homólogos a los codificantes de taumatinas (PR-5), peroxidases (PR-9), proteínas transportadoras de lípidos (PR-10), defensinas (PR-12), tioninas (PR-13), además de otros

que aunque no codifican para proteínas PR, parecen jugar un papel importante en la respuesta al patógeno, como son los genes de apirasas.

1.4.1. Apirasas.

Un ejemplo de proteínas que pudieran estar implicadas en la resistencia a patógenos lo encontramos en las apirasas. Estas proteínas son enzimas que catalizan la hidrólisis de uniones fosfoanhidridos de nucleósidos di- y trifosfato (NDPs y NTPs) en presencia de cationes divalentes. El nombre de apirasa (adenilpirofosfatasa) fue acuñado por Meyerhof (Meyerhof, 1945) para describir enzimas de levaduras con esta actividad enzimática. Las apirasas se encuentran principalmente en los tejidos de crecimiento rápido y en los de secreción activa de todas las eucariotas, aunque también se han descrito en algunos procariontes. En plantas, las apirasas tienen un papel importante en diferentes procesos fisiológicos como la germinación del polen (Steinebrunner *et al.*, 2003), el crecimiento y desarrollo de las semillas (Wolf *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007), en los procesos de nodulación por *Rhizobium* en leguminosas (McAlvin y Stacey, 2005) e intervienen en la resistencia o susceptibilidad en las interacciones planta-patógeno (Chivasa *et al.*, 2009).

Existen muchos tipos diferentes de enzimas que hidrolizan ATP pero las apirasas son distintas de otras fosfohidrolasas porque actúan sobre sustratos nucleotídicos específicos, su actividad enzimática es dependiente de diversos cationes divalentes como por ejemplo Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} y son insensibles a inhibidores específicos conocidos de otras ATPasas (Komoszynski y Wojtczak, 1996). Casi todas las apirasas contienen cinco dominios altamente conservados (ACRs, del inglés Apyrase Conserved Regions) (Handa y Guidotti, 1996; Vasconcelos, 1998) que no se han encontrado en otras fosfohidrolasas mientras que la mayoría de ATPasas comparten un dominio de unión al ATP (Walker *et al.*, 1982) que está ausente en las apirasas.

La participación de las apirasas en la reacción de respuesta a patógenos se ha demostrado en la interacción entre el guisante y el hongo *Mycosphaerella pinodes* (anamorfo *Ascochyta pinodes*). Cuando este hongo se pone en contacto con las células de guisante, secreta compuestos, denominados susprecinas, que interaccionan con las apirasas de la pared celular, inhibiendo la actividad de hidrólisis del ATP extracelular (ATPe). El consiguiente incremento en ATPe provoca una reducción en la respuesta de defensa extracelular incluyendo la formación de compuestos ROS. En el caso de los genotipos resistentes o de especies que no son susceptibles a *M. pinodes*, no existe efecto de las susprecinas o incluso se incrementa la actividad ATPasa (Toyoda *et al.*, 2012). Resultados similares se han obtenido en *Nicotiana* al realizar infecciones con virus del mosaico y *Pseudomonas*, ya

que cuando se incrementaba artificialmente la cantidad de ATPe, las respuestas de defensa de la planta disminuían significativamente, mientras que niveles muy bajos de ATPe provocaban la inducción de genes PR (Chivasa *et al.*, 2009).

Los estudios filogenéticos de las apirasas de plantas ponen de manifiesto la existencia de dos grupos (Cannon *et al.*, 2003), uno de ellos específico de las leguminosas y cuyas proteínas estarían relacionadas con los procesos de nodulación, mientras que en el otro grupo aparecen apirasas de todas las especies y cuyas funciones son muy variadas, desde la regulación de la síntesis de almidón en *Solanum* (Traverso-Cori *et al.*, 1970; Valenzuela *et al.*, 1989), hasta el control de la germinación del polen en *Arabidopsis* (Steinbrunner *et al.*, 2003). Hasta el momento las apirasas de leguminosas relacionadas con la respuesta a patógenos se agrupan con las de interacción con *Rhizobium* (Takahashi *et al.*, 2006).

En *Medicago truncatula* se han identificado 6 genes que codifican para apirasas distintas (Cohn *et al.*, 2001, Navarro-Gochicoa *et al.*, 2003), cinco de los cuales pertenecen al grupo exclusivo de las leguminosas, mientras que *MtAPY2* está filogenéticamente más relacionado con los genes para apirasas de *Arabidopsis* implicadas en la regulación del crecimiento.

En guisante se han descrito 3 apirasas, PsNTP9, PsAPY1 y PsAPY2 (Chen y Roux, 1987; Shibata *et al.*, 2001). PsNTP9, que es semejante a PsAPY1 y es capaz de hidrolizar ATP, GTP, CTP y UTP, podría jugar un papel importante en la resistencia a toxinas ya que la sobreexpresión del gen codificante en *Arabidopsis* incrementa la resistencia a xenobióticos (Thomas *et al.*, 2000). La proteína PsAPY1 se encuentra en el citoplasma y en la pared celular, principalmente en tejidos en diferenciación y en menor cantidad en tejidos maduros lo que sugiere un papel en el crecimiento y desarrollo de tejidos (Yoneda *et al.*, 2009). Además otros estudios muestran que la apirasa PsAPY1 pudiera ser el blanco de las susprecinas derivadas del patógeno *M. pinodes* (Toyoda *et al.*, 2012). La proteína PsAPY2 es semejante a las de *Arabidopsis*, y su función todavía está por concretar.

1.5. MARCADORES GENÉTICOS EN LENTEJA.

Existen varias definiciones de marcador genético, Rieger *et al.* (1982) lo definen como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente utilizada en el análisis genético; Pérez de la Vega (1993) como el efecto de un gen fácilmente observable en los individuos, metabolitos característicos de bajo peso molecular, proteínas que pueden observarse y extraerse con facilidad generalmente tras un fraccionamiento mediante electroforesis, o fragmentos de ADN que pueden obtenerse e identificarse por una serie de técnicas

moleculares; Gale (1994) como cualquier medio para identificar un locus específico en el cromosoma, y Collard *et al.* (2005) como diferencias genéticas entre individuos o especies que puede ser o no un gen de interés pero que actúan como una señal o marca que puede encontrarse cerca de los mismos.

En lenteja, el desarrollo de marcadores genéticos ha sido un proceso lento durante bastante tiempo, sólo el desarrollo de marcadores de ADN basados en resultados de experimentos recientes de genómica y transcriptómica ha proporcionado un conjunto suficientemente elevado como para considerar que la genética y mejora de este cultivo está en disposición de entrar en una nueva etapa (Sharpe *et al.*, 2013).

Como en el resto de los organismos, los primeros marcadores utilizados en lenteja fueron los de tipo morfológico, aunque el estudio formal de la herencia de los mismos no comenzó hasta finales de los años 70 del pasado siglo (ver Muehlbauer *et al.*, 2006, y Pérez de la Vega *et al.*, 2011, y la bibliografía citada en dichos artículos para una revisión sobre el desarrollo y utilización de los diferentes tipos de marcadores).

Uno de los principales problemas encontrados en el desarrollo de marcadores tradicionales (morfológicos, isoenzimas, proteínas de reserva de la semilla) ha sido la escasa variabilidad encontrada dentro de la especie cultivada, por lo que en muchos casos para los análisis genéticos era necesario recurrir a cruzamientos con *L. c. ssp. orientalis* y otras especies silvestres, con la consiguiente posibilidad de obtener segregaciones distorsionadas. Los primeros marcadores de ADN (RFLPs, RAPDs, ISSRs, AFLPs y similares) comenzaron a proporcionar un número suficiente de loci para realizar análisis genéticos en cruzamientos intraespecíficos; sin embargo, el gran esfuerzo necesario para analizar suficientes loci RFLP, o las características de los marcadores RAPD, ISSR y AFLP han dificultado la comparación e integración de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios.

Un importante avance en los marcadores disponibles ha venido de la publicación de unos 50 marcadores SSR desarrollados en el ICARDA (Hamwiah *et al.*, 2005, 2009), ya que proporcionan las herramientas para que los distintos grupos de investigación analicen los mismos loci, de modo que se pudieran utilizar como referencia a la hora de comparar resultados. Distintos grupos han contribuido a incrementar el número de loci SSR, bien mediante su aislamiento del genoma (De la Puente *et al.*, 2013) o utilizando los datos procedentes de géneros relacionados, como *Medicago*, *Pisum* o *Trifolium* (Reddy *et al.*, 2010).

Aunque de gran utilidad, estos marcadores SSR no están asociados a ningún gen concreto, lo que limita su uso en determinados estudios, como los relacionados con la identificación de

genes candidatos a ser responsables de características de interés agronómico. El desarrollo a gran escala de marcadores genéticos como EST-SSRs, EST-SNPs, etc. comenzó a finales de la década pasada utilizando en gran medida la información procedente del genoma de *Medicago truncatula*, como en el caso del proyecto europeo "Grain Legume Integrated Project" (GLIP), en el que el Área de Genética de la Universidad de León participaba como integrante en el análisis de *Lens* (De la Puente *et al.*, 2013), o en el trabajo de Gupta *et al.* (2012).

Sin embargo, el número de marcadores genéticos ha continuado siendo escaso hasta la aplicación de técnicas de transcriptómica en lenteja que permiten obtener datos masivos sobre el polimorfismo existente en las secuencias expresadas. En el año 2011 apareció la primera publicación que utilizó esta tecnología (Kaur *et al.*, 2011), aportando información para el estudio de 2.393 SSRs genéticos, si bien de los analizados por estos autores, sólo el 30% presentó polimorfismo en *L. c. culinaris*, valor que se incrementó hasta el 50% cuando en el análisis se incluía *L. nigricans*. Sharpe *et al.* (2013) realizaron un estudio de polimorfismo SNP comparando las secuencias del transcriptoma procedente de 9 muestras de *L. c. culinaris* y dos de *L. ervoides*. Para el conjunto total detectaron unos 45.000 SNPs, y cuando se comparaban dos muestras concretas de *L. c. culinaris*, el rango podía variar entre unos 2.700 y 9.800. En el Área de Genética de la Universidad de León también se ha emprendido este tipo de experimentos, analizando el transcriptoma de 5 muestras de *L. c. culinaris* y una de *L. c. orientalis* (publicación en preparación), obteniéndose un gran número de potenciales SNPs que están siendo validados.

Puesto que en el presente trabajo se han analizado una serie de SNPs genéticos para incluirlos en un mapa de ligamiento de lenteja, se hará una breve introducción a este tipo de polimorfismos y a los métodos utilizados para su estudio.

1.5.1. SNPs o polimorfismos de un único nucleótido.

Los SNPs son el tipo de variación más frecuente en el ADN, presentes tanto en regiones anónimas como en regiones génicas (Wang *et al.*, 1998) ya que son variaciones de un solo nucleótido entre los individuos estudiados. Se encuentran mayoritariamente en las regiones no codificantes del genoma pero cuando están presentes en las regiones codificantes pueden dar lugar a una sustitución sinónima (no hay cambio en la secuencia del aminoácido) o no sinónima (un cambio de aminoácido en la secuencia peptídica) (Sunyaev *et al.*, 1999). El estudio de un SNP es costoso, pero el uso de técnicas basadas en enzimas de restricción y desnaturalización de alta resolución (HRM) (Jeong *et al.*, 2011; Silvar *et al.*,

2001) han mejorado la eficiencia y han reducido costes en los protocolos a seguir para la identificación de SNPs (Ibiza Gimeno, 2011).

En el caso de que el SNP afecte a una secuencia diana para una enzima de restricción, se puede desarrollar un marcador de tipo CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence). Los marcadores CAPS son también conocidos como PCR-RFLP porque utiliza las ventajas de la PCR de utilizar pequeñas cantidades de ADN genómico, y del RFLP de discriminar entre la presencia o ausencia de sitios de restricción para una determinada enzima de restricción (Edwards, 1998).

La metodología consiste en diseñar cebadores específicos para la región del ADN que contenga el SNP que se quiere analizar y posteriormente, estas regiones amplificadas se digieren con enzimas de restricción específicas. Este tipo de marcadores son codominantes, la técnica es simple y se obtienen buenos resultados, pero tienen como desventaja que se requiere un conocimiento previo de la secuencia a amplificar y en algunos casos es difícil detectar sitios de restricción polimórficos de las regiones de interés amplificadas (Figura 1.3) (Rodríguez y Arencibia, 2003)

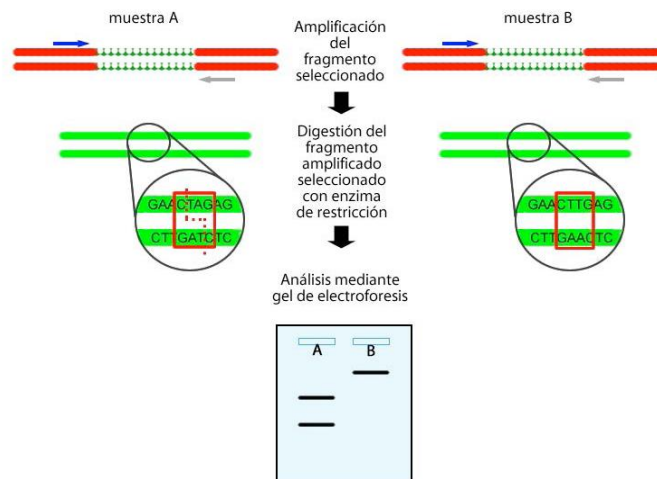


Figura 1.3. Utilización de marcadores tipo CAPS para la detección de SNPs. Fuente: De la Puente, R. (2012).

En el caso de que el SNP no afecte a ninguna diana para una enzima de restricción, existen metodologías alternativas, entre las cuales está la denominada desnaturalización de alta resolución (HRM, high resolution melting). Ésta es una nueva técnica de análisis de ADN introducido por una colaboración entre académicos (Universidad de Utah, UTA, Estados Unidos) y la industria (Idaho Technology, UT, Estados Unidos) que permite identificar SNPs. Es una técnica sencilla que permite realizar genotipados, detección de mutaciones y estudios de metilación (Gundry *et al.*, 2003; Martino *et al.*, 2010). Entre las ventajas de usar esta técnica se encuentran que es económica en comparación con otras como la

secuenciación o la utilización de sondas TaqMan, lo que la hace ideal para proyectos de genotipado a gran escala, es muy rápida, lo que permite determinar el genotipo de un gran número de muestras en poco tiempo y es simple, pudiéndose utilizar en cualquier laboratorio que posea una máquina de PCR a tiempo real.

La HRM se desarrolla a partir de un ADN de doble cadena. Previamente se realiza una PCR en tiempo real en presencia de un colorante que se une de forma específica al ADN de doble cadena. El objetivo de realizar la PCR es obtener gran cantidad de copias de la región de interés (amplicón) que emitirán una alta fluorescencia cuando el colorante se haya unido. Después de este proceso se empezará el análisis HRM. Al aumentar la temperatura del ADN amplificado, éste se desnaturizará gradualmente e irá liberando el colorante, lo que se apreciará como una caída de la fluorescencia. En amplicones de pequeño tamaño la temperatura de fusión puede variar por diferencias en un solo par de nucleótidos y las máquinas de PCR a tiempo real pueden detectar la variación en la pérdida de fluorescencia (Figura 1.4) (Wittwer *et al.*, 2003). La diferencia puede ser mínima, quizás una fracción de grado, pero el equipo utilizado para realizar la HRM detecta esta variación en “Alta Resolución” (High Resolution).

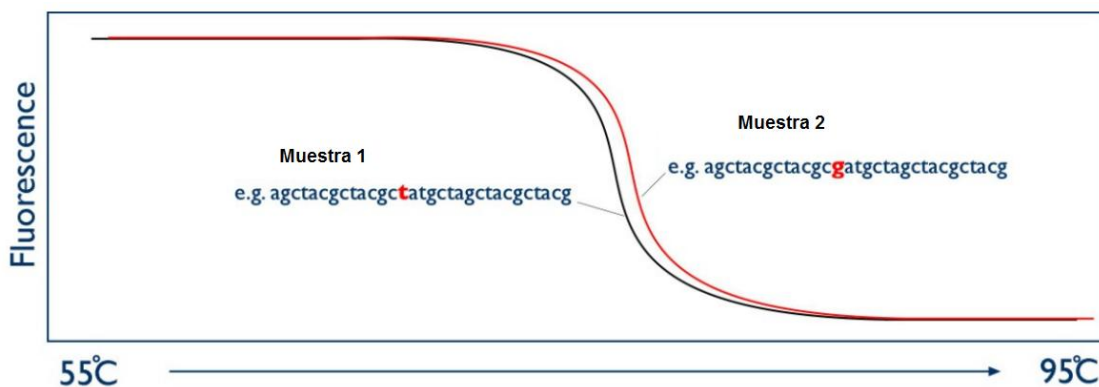


Figura 1.4. Diferencias en las curvas de fusión entre dos muestras que difieren en un único nucleótido. Fuente: Modificado de PrimerDesign beginners guide to High Resolution Melt analysis (www.highresolutionmelt.co.uk).

Además de las metodologías anteriores en las que se analiza un SNP en cada caso, existen varias alternativas para poder estudiar varios SNPs simultáneamente, como por ejemplo la plataforma Sequenom MassArray (Sequenom Inc., San Diego, California) utilizada en el análisis de los haplotipos del genoma humano (Gabriel *et al.*, 2002), o las basadas en microarrays, como la utilizada en el array "Lc1536 OPA" que permite genotipar simultáneamente 1.536 SNPs de lenteja (Sharpe *et al.*, 2013), si bien actualmente el coste de estos métodos resulta prohibitivo para la mayoría de los laboratorios.

1.6. MAPAS DE LIGAMIENTO.

Los mapas de ligamiento son una representación del orden lineal de un grupo de genes y/o marcadores en el genoma, siendo la distancia entre los loci adyacentes proporcional a las frecuencias de recombinación o a una función de las mismas (Danzmann y Gharbi, 2001). Estos marcadores se distribuyen en grupos de ligamientos que deben corresponderse con el número haploide de cromosomas de la especie estudiada cuando el mapa tiene una saturación suficiente.

Un mapa de ligamiento se puede utilizar para la localización de elementos genómicos estructurales, marcadores moleculares y loci que influyen en caracteres mendelianos, en el estudio genético de rasgos cuantitativos (QTL) (Lynch y Walsh, 1998), en el análisis del comportamiento de los cromosomas y sus interacciones durante las divisiones celulares (Sakamoto *et al.*, 2000), para obtener información del tamaño del genoma y realizar estudios de sintenia mediante la comparación de mapas de especies relacionadas (Williams, 1998).

Para construir los mapas de ligamiento comúnmente se utilizan dos funciones de mapeo a partir de las frecuencias de recombinación observadas en una población segregante: Haldane (Haldane, 1919) y Kosambi (Kosambi, 1944). La diferencia entre ambas funciones reside en cómo consideran el fenómeno de interferencia, que se puede considerar como el efecto que genera la aparición de un sobrecruzamiento en una determinada región en la probabilidad de que exista recombinación en una la región adyacente; Haldane asume la ausencia de interferencia entre los sobrecruzamientos en la meiosis mientras que Kosambi considera la presencia de un cierto grado de interferencia.

Un parámetro muy importante a tener en cuenta cuando se realizan los mapas de ligamiento es el LOD (Likelihood Ratio, o Logarithm of Odds), que es el logaritmo de la probabilidad de que dos loci estén ligados con una frecuencia de recombinación concreta entre la probabilidad de que estos loci sean independientes (Morton, 1955). Así un valor de LOD de 3 indica que la hipótesis de que dos loci estén ligados es 1000 veces más probable que la hipótesis nula (independencia). El nivel mínimo del LOD puede ser elegido por el investigador, aunque se recomienda utilizar un valor umbral mínimo de 3 (Kearsey y Pooni, 1998; Nuez, 2000; de Vienne, 2003); si se aumenta el umbral mínimo se evitarán las falsas inclusiones en los diferentes grupos de ligamiento pero se incrementará el número de grupos establecidos.

Otro aspecto importante a tener en cuenta a la hora de hacer un mapa son las poblaciones utilizadas para construir el mapa. Primero, se deben elegir parentales que se diferencien en alguna característica morfológica de control genético conocido. Se debe utilizar como

parental femenino alguna línea de fenotipo recesivo para el carácter; el fenotipo dominante en sus descendientes asegura que se trata de un individuo de la F_1 y que el cruzamiento se ha realizado correctamente.

Las poblaciones utilizadas para realizar mapeos pueden ser entre otras la progenie de la segunda generación (F_2), retrocruzamientos (BC), líneas consanguíneas recombinantes (RILs), dobles haploides (DH) o líneas casi isogénicas (NILs) (Burr *et al.*, 1998; He *et al.*, 2001; Doerge, 2002). Evidentemente, cuanto mayor sea el número de individuos de las poblaciones de mapeo, más fiable y exacto será el mapa obtenido, y si bien se recomienda de modo general unos 200 individuos (Ferreira *et al.*, 2006), con la mitad ya se suele obtener un mapa con una estructura suficientemente fiable (Boopathi, 2013).

1.6.1. Mapas de Ligamiento en Lenteja.

En lenteja se han construido varios mapas de ligamiento que reflejan la disponibilidad de los diferentes tipos de marcadores y cuya evolución está recogida en Pérez de la Vega *et al.* (2011). En un primer momento, sólo incorporaban marcadores morfológicos e isoenzimáticos y las poblaciones utilizadas procedían de cruzamientos intersubespecíficos. Posteriormente, con la adición de los marcadores de ADN señalados previamente en esta introducción y su mayor polimorfismo, se comenzaron a utilizar poblaciones procedentes de cruzamientos intraespecíficos. Sin embargo la falta de marcadores comunes entre los mapas realizados por los diferentes grupos de investigación, hace que todavía no se disponga de un mapa consenso, aunque esta situación parece que va a cambiar en breve como se comentará más adelante.

La mayoría de los mapas publicados que utilizan marcadores de ADN (Tabla 1.5) se han basado casi siempre en marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Los RAPDs tienen como ventajas su simplicidad y alta frecuencia de identificación de polimorfismos (Newbury y Ford-Lloyd, 1993), pero la desventaja es su sensibilidad a las condiciones experimentales que originan problemas de reproducción de patrones, lo que dificulta el intercambio y la comparación de datos entre laboratorios. Los RAPDs son un tipo de marcador anónimo debido a que amplifican varios lugares del genoma no siendo específico para genes concretos. Con la aparición de nuevas técnicas moleculares que permiten evaluar posibles genes que confieran características de interés a un organismo (por ejemplo la qPCR) surge la necesidad de saber la ubicación de genes concretos en los cromosomas para poder utilizarlos en los programas de mejora, lo que se puede conseguir utilizando marcadores moleculares para genes específicos. El desarrollo de mapas basados en secuencias codificantes en lenteja es posible ya que se empiezan a disponer de más

secuencias genómicas de lenteja, que en caso de no estar caracterizadas se pueden comparar con las secuencias homologas de *Medicago truncatula*, *Cicer arietinum* y *Glycine max* para intentar inferir a que genes corresponden y saber su función.

Entre los mapas más importantes se pueden citar los publicados por los siguientes autores:

Eujayl *et al.* (1997), quienes obtuvieron un mapa de ligamiento, a partir de una F_2 , en el que predominaban los marcadores tipo RAPD (28). Consiguieron un mapa compuesto por 9 grupos de ligamiento con una cobertura total de 206 cM. En 1998 el mismo grupo de investigación construyó el primer mapa extenso de lenteja (cobertura total de 1.073 cM) utilizando líneas consanguíneas recombinantes (RIL), en el que los marcadores polimórficos predominantes fueron los RAPD (89) y los AFLP (79). Este mapa de ligamiento contenía 7 grupos de ligamiento con un número relativamente elevado de loci, el número haploide de cromosomas de lenteja, aunque también aparecían varios grupos de ligamiento adicionales con 2-3 marcadores.

Rubeena *et al.* (2003) diseñaron el primer mapa de lenteja intraespecífico utilizando una población F_2 que se diferenciaban en su resistencia a *Ascochyta*. En esta ocasión, los marcadores más utilizados volvieron a ser los RAPDs (100) pero se empezaron a utilizar ISSRs (11). Consiguieron 9 grupos de ligamiento y abarcaron una distancia total de 784,1 cM.

En el año 2004, Durán *et al.* publicaron el primer mapa genético de lenteja que incluye un marcador SSR, utilizando una población F_2 . En este estudio, los RAPDs (62), los ISSRs (29) y los AFLPs (65) fueron los marcadores más empleados. Crearon el mapa más extenso hasta dicha fecha, 2.172,4 cM, y contenía 10 grupos de ligamiento. En el año 2013, De la Puente *et al.* añadieron a dicho mapa 31 marcadores de genes específicos, reduciendo el número de grupos de ligamiento a 8.

Hawieh *et al.* (2005) utilizaron las mismas RILs examinadas por Eujayl *et al.* (1998) y agregaron 39 SSRs y 49 AFLPs. Los marcadores se distribuyeron en 14 grupos de ligamiento, donde la mayoría de marcadores eran AFLPs (129) con una distancia total de 751 cM.

En el 2007, Phan *et al.* diseñaron el primer mapa de ligamiento basado predominantemente en marcadores de tipo ITAP (polimorfismos dirigidos a intrones de genes), utilizando una población F_5 intraespecífica de RILs. Los marcadores polimórficos se distribuyeron en 7 grupos de ligamiento con una cobertura total de 928,4 cM. Un avance importante de este

mapa fue la posibilidad de compararlo con el de *Medicago truncatula* debido a los marcadores génicos utilizados.

Tullu *et al.* (2008) desarrollaron un mapeo de características de precocidad y altura de la planta de lenteja utilizando una población RIL proveniente del cruce *L. c. culinaris* x *L. c. orientalis*. La mayoría de marcadores analizados eran AFLPs (144). Consiguieron 12 grupos de ligamiento y una distancia total de 1.868 cM.

Tanyolac *et al.* (2010) diseñaron un mapa a partir de una población RIL donde los marcadores más utilizados volvieron a ser los RAPDs (75) y los AFLPs (64). El mapa de ligamiento tenía una distancia de 1.396,3 cM y 11 grupos de ligamiento.

Saha *et al.* (2010) han utilizado una población RIL de 206 plantas provenientes del cruce de ILL-6002 x ILL-5888. Los SRAPs fueron los marcadores más utilizados (89 SRAPs frente a 27 RAPDs, 27 ISSRs y 1 morfológico). La cobertura total fue de 1.565,2 cM y 14 grupos de ligamiento.

Un avance importante en la obtención de un mapa de referencia lo constituye el publicado por Sharpe *et al.* (2013), a partir de una población RIL. Para el diseño de este mapa se utilizaron 537 SNPs génicos y 6 SSRs, la distancia total obtenida fue de 834 cM, consiguieron 7 grupos de ligamiento y una distancia media entre marcadores de 1,56 cM. El hecho de que sea el mapa más completo y con un mayor número de polimorfismos génicos, ha permitido un análisis profundo del grado de sintenia entre lenteja y *Medicago truncatula*. Según se indica en la publicación, este mapa se ha propuesto como el de referencia para anclar y ensamblar los "contigs" que se obtengan en el proyecto de secuenciación del genoma de la lenteja.

Fedoruk *et al.* (2013) en un trabajo dirigido al análisis de caracteres cuantitativos han revisado y ampliado el mapa anterior, alcanzando un total de 577 loci (563 SNPs, 10 SSRs y 4 loci morfológicos relacionados con el color de la semilla), con una distancia media entre ellos de 1,20 cM.

El último mapa publicado hasta la fecha ha sido realizado por Yilmaz Temel *et al.* (2014), e incluye 388 marcadores, principalmente de tipo SNP, situados en 7 grandes grupos de ligamiento que pudieran corresponder con los 7 cromosomas de lenteja, y 2 menores. La distancia media entre loci ha sido de 1,11 cM, siendo esta la menor distancia media publicada hasta la fecha.

Tabla 1.5. Principales estudios de mapeo genético en lenteja (modificado de Pérez de la Vega *et al.*, 2011)

Referencia	Población ^a	Número y tipo de marcadores	Método de análisis ^b	LOD (distancia máxima ^c)	Número de grupos de ligamiento	Distancia media entre marcadores	Cobertura total ^c
Eujayl <i>et al.</i> , 1997	Inter, F ₂	33 (28 RAPD, 1 RFLP, 3 oligonucleótidos y 1 morfológico)	MM	3 (27)	9	6,24	206
Eujayl <i>et al.</i> , 1998	Inter, RILs	177 (89 RAPD, 79 AFLP, 6 RFLP y 3 morfológicos)	MM	4 (25)	7	6,06	1.073
Rubeena <i>et al.</i> , 2003	Intra, F ₂	114 (100 RAPD, 11 ISSR, y 3 RGA)	MM	4 (25)	9	6,87	784
Durán <i>et al.</i> , 2004	Inter, F ₂	161 (62 RAPD, 65 AFLP, 29 ISSR, 1 SSR y 4 morfológicos)	MM	3 (30)	10	15,87	2.172
Kahraman <i>et al.</i> , 2004	Intra, RILs	130 (27 RAPD, 48 AFLP y 55 ISSR)	MM	3 (30)	9	9,1	1.192
Hamwieh <i>et al.</i> , 2005	Inter, RILs	283 (110 RAPD, 48 AFLP, 55 ISSR)	JM	3-6 (25)	14	2,65	751
Rubeena <i>et al.</i> , 2006	Intra, F ₂	72 (38 RAPD, 129 AFLP, 39 SSR y 5 morfológicos)	MM	4 (25)	11	5,72	412
Phan <i>et al.</i> , 2007	Intra, RILs	97 (18 SSR, 79 ITAP)	MP	9 (32)	12	9,57	928
Tullu <i>et al.</i> , 2008	Intra, RILs	207 (54 RAPD, 114 AFLP y 9 SSR)	MM	3 (25)	12	9,02	1.868
Tanyolac <i>et al.</i> , 2010	Intra, RILs	166 (75 RAPD, 64 AFLP, 23 ISSR y 4 morfológicos)	MM	3 (30)	11	8,40	1.396
Saha <i>et al.</i> , 2010	Intra, RILs	131 (27 RAPD, 27 SSR, 89 SRAP y 2 morfológicos)	MM	4 (30)	14	11,6	1.565,2
De la Puente <i>et al.</i> , 2013	Inter, F ₂	190 (91RAPD, 79 AFLP, 6 RFLP, 15 SSR, 5 CAPS, 4 P/A, 3ALP, 2 SRAPs y 3 morfológicos)	MM	3	8	12,28	2.234,4
Sharpe <i>et al.</i> , 2013	Intra, RILs	537 SNP y 6 SSR	JM	≥ 6	7	1,56	834,7
Fedoruk <i>et al.</i> (2013)	Intra, RILs	563 SNP, 10 SSR y 4 morfológicos	JM	6 ≤ LOD	7	1,20	697
Yilmaz Temel <i>et al.</i> (2014)	Intra, RILs	376 SNP, 3 SSR y 9 ISSR	JM	3	9	1,11	432,8

^a Inter., Intersubspecífico (*L. c. ssp. culinaris* x *L. c. ssp. orientalis*); intra., intraespecífico. ^b MM, MAPMAKER; JM, JOINMAP; MP, MULTIPPOINT. ^c Distancia en cM

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo han sido los siguientes:

1. Realizar una comparación de los genes codificantes para convicilina y apirasa en muestras de *Lens culinaris* de distintos orígenes geográficos, incluyendo tanto formas cultivadas como silvestres. Por otro lado se tratará de establecer los mecanismos responsables de la evolución de los genes de convicilina y apirasa mediante un análisis filogenético de las secuencias obtenidas.
2. Desarrollar marcadores moleculares específicos de los genes codificantes para convicilina y apirasa, y de algunos genes de los que se ha detectado previamente su relación con la resistencia a *Ascochyta lentis*.
3. Integrar los nuevos marcadores moleculares en el mapa genético de lenteja logrando así un mapa más saturado.
4. Identificar y situar en el mapa genético QTLs para los caracteres morfológicos peso y diámetro de la semilla, y para el carácter resistencia/susceptibilidad al hongo *Ascochyta lentis*.
5. Cuantificar los cambios de expresión de genes que pudieran intervenir en la resistencia a *Ascochyta*, determinando un conjunto de genes candidatos responsables de la respuesta de la planta a la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se han utilizado diversos materiales biológicos para el desarrollo de los diferentes objetivos propuestos, incluyendo una colección de muestras de lenteja de todo el mundo, tanto cultivadas como silvestres, un conjunto de líneas RIL y una cepa del hongo *Ascochyta lentis*. Además se han utilizado secuencias nucleotídicas procedentes de la base de datos del NCBI y de una librería de ESTs (expressed sequence tags) del Laboratorio de Genética de la Universidad de León.

Para estudiar la variación de los genes codificantes para convicilina y apirasa se analizaron muestras de lenteja de trece países diferentes (Tabla 3.1). Veintiséis muestras procedían del ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry areas), asimismo se utilizaron once muestras de la colección del Área de Genética de la Universidad de León, y una recogida en un mercado local de Lima (Perú). Las muestras se clasificaron en 7 grupos, Nigricans, Orientalis, Odemensis, Tomentosus y Ervoides para las muestras silvestres, Domesticadas para las muestras procedentes de la zona de domesticación de la lenteja (Creciente Fértil) y Derivadas para las muestras de otras zonas geográficas.

Para realizar la inclusión en el mapa de ligamiento de loci correspondientes a genes concretos se utilizó una población de 94 líneas RIL en la generación F₇ descendientes de un cruzamiento entre Lupa (cultivar español obtenido por selección a partir del ecotipo Pardina) y *L. c. ssp. orientalis* BG 16880.

En los estudios de expresión génica se trabajó con cuatro variedades de semillas de *L. c. culinaris* pertenecientes a la colección del laboratorio del Área de Genética de la Universidad de León. Dos eran resistentes al hongo *Ascochyta* (ILL 0323 y WA8649090) y dos susceptibles a este hongo (Mala y Precoz).

El hongo utilizado para la infección de plantas ha sido el aislado AL-84 de *Ascochyta lentis*, de sexo MAT 2, con código ATCC 46981 en la base American Type Culture Collection y proporcionado por el Dr. Tobin Peever (Washington State University). Este aislado procede de semillas de lenteja de la accesión PI 298644 recogidas en España (ecotipo Cuenca según el inventario del Departamento de Agricultura de Estados Unidos y cuyas características pueden consultarse en la página <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl?1225541>).

Tabla 3.1. Material vegetal utilizado y su origen, así como el grupo en el que fueron clasificadas.

Especie e identificación	PAÍS	GRUPOS
<i>L. nigricans</i> BGE 16873*	YUGOSLAVIA	NIGRICANS
<i>L. c. ssp orientalis</i> BGE 16880*	ISRAEL	ORIENTALIS
<i>L. c. ssp orientalis</i> BGE 16880 (3)*	ISRAEL	
<i>L. c. ssp orientalis</i> ILW 7*	TURQUÍA	
<i>L. odemensis</i> ILWL235*	SIRIA	ODEMENSIS
<i>L. tomentosus</i> 133*	TURQUÍA	TOMENTOSUS
<i>L. ervoides</i> BG 16877*	MARRUECOS	ERVOIDES
ILL 1323	IRÁN	DOMESTICADAS
ILL 1349	IRÁN	
ILL 1370	IRÁN	
ILL 0590	TURQUÍA	
ILL 0144	TURQUÍA	
ILL 0918	TURQUÍA	
ILL 0062	IRAQ	
ILL 0052	IRAQ	
ILL 0092	IRAQ	
ILL 0060	SIRIA	
ILL 0780	SIRIA	
ILL 4400	SIRIA	
ILL 1645	COLOMBIA	
ILL 1827	CHILE	
ILL 0072	CHILE	
ILL 0092	UCRANIA	
ILL 0913	UCRANIA	
ILL 1645	UCRANIA	
MALA*	ESPAÑA	
ILL 0323*	SERBIA	
ALPO*	ESPAÑA	
ILL 3042	INDIA	
ILL 0191	LÍBANO	
WA8649090*	EE.UU.	
ILL 0343	ITALIA	
ILL 0296	GRECIA	
P2**	PERÚ	
ILL 0096	MARRUECOS	
ILL 3467	ETIOPÍA	

* Procedentes del Laboratorio de Genética de La Universidad de León.

** Procedente de un mercado local en Lima-Perú.

La resistencia o susceptibilidad al hongo *Ascochyta lentis* se analizó en las 94 RILs del cruzamiento entre Lupa y *L. c. ssp. orientalis*. También se inocularon con este hongo plantas de lenteja resistentes (WA8649090 y ILL 0323) y susceptibles (Mala y Precoz) para cuantificar la expresión de genes concretos.

Para ambos experimentos, el cultivo de las plantas se realizó en tubos de vidrio de 3 cm de diámetro y 15 cm de alto que contenían aproximadamente 8 cm³ de algodón humedecido. Estos tubos de vidrio con algodón fueron autoclavados durante 1 h a 117°C.

3.1.1. Esterilización de las semillas.

Las semillas de *Lens culinaris* se desinfectaron, en primer lugar, mediante inmersión en etanol al 70%. Posteriormente se sumergieron en hipoclorito de sodio al 30% durante 15 minutos, y a continuación se lavaron con abundante agua estéril para eliminar los restos de la solución esterilizante. Se mantuvieron en agua estéril hasta su siembra en los tubos con algodón autoclavados.

3.1.2. Siembra de semillas.

En todos los casos se colocaron, en condiciones de esterilidad, tres semillas tratadas en cada tubo con algodón. En los experimentos de expresión génica se utilizaron 8 réplicas (8 tubos, 24 plantas) para cada muestra de lenteja y dos replicas (6 plantas) para el análisis de resistencia o susceptibilidad a *Ascochyta lentis* de las líneas RIL.

3.1.3. Condiciones de la cámara de cultivo.

En los experimentos de expresión génica realizados, las plantas fueron cultivadas en una cámara con fotoperiodo de 16 horas de luz a 23°C y 8 horas de oscuridad a 18°C. La intensidad luminosa fue suministrada por lámparas fluorescentes SYLVANIA GRO-LUX F58W / GRO-T8.

Las muestras se mantuvieron en la cámara de cultivo durante 15 días hasta su tratamiento, infección o control, y otros 15 días más hasta su análisis.

3.1.4. Condiciones de cultivo y mantenimiento del hongo *Ascochyta lentis*.

El hongo *A. lentis* creció en un medio PDA (agar patata dextrosa) de la casa comercial PRONADISA (39 g por litro) a temperatura ambiente. Para la conservación a largo plazo, se cultivaron muestras del hongo en medio PDA sobre el que se habían colocados fragmentos de papel de filtro estéril de 1 cm², después de 21 días de cultivo, cuando el hongo había cubierto los papeles, se guardaron en sobres estériles, los sobres se situaron en una caja de

plástico cerrada herméticamente, protegidos por un saquito de CaSO₄, y se mantuvieron a -20°C (Peever *et al.*, 1999).

Cuando se deseaba obtener esporas del hongo, se preparó un medio PDA menos rico, reduciendo el preparado de PRONADISA a la mitad y añadiendo agar bacteriológico (7,5 g por litro).

3.1.5. Obtención de suspensión de esporas.

La preparación de suspensiones de esporas se realizó a partir de cultivos esporulados de 21 días. Las esporas se separaron del micelio mediante el lavado del cultivo con agua destilada estéril y la solución obtenida se filtró con una jeringa estéril de 50 ml que contenía aproximadamente 20 cm³ de lana de vidrio. Se cuantificó al microscopio el número de esporas utilizando la cámara de recuento Thoma y se ajustó la concentración a 2x10⁵ esporas/ml. A esta solución se le añadió Tween 20 (0,01 v/v) y se mezcló en vórtex. El preparado se aplicó sobre las plantas utilizando un pulverizador.

3.1.6. Tratamiento de *Lens culinaris* con esporas de *Ascochyta lentis*.

En los experimentos de resistencia o susceptibilidad a *A. lentis*, se trataron plantas cultivadas durante 15 días en tubos estériles con algodón como único substrato mediante pulverización con 1 ml de una solución de esporas o con agua estéril mezclada con Tween 20 (0,01 v/v) a modo de control negativo.

Después del tratamiento las plantas se mantuvieron en cultivo. Se recogieron todas las hojas de las plantas de cada tubo a dos tiempos diferentes, a los días 1 y 15 de cultivo después del tratamiento. Las hojas se congelaron inmediatamente en tubos falcón de 50 ml con nitrógeno líquido y se pulverizaron, almacenando las muestras a -80°C hasta su utilización.

En los experimentos de expresión génica, de los 8 cultivos de plantas de cada variedad analizada 4 fueron pulverizados con esporas y 4 controles. De cada tratamiento 2 tubos se cosecharon 1 día después del tratamiento y otros dos después de 15 días.

Para evaluar la resistencia o susceptibilidad de cada una de las RIL del cruzamiento entre Lupa y *L. c. ssp. orientalis* todas las plantas fueron tratadas con 1 ml de la suspensión de esporas y se mantuvieron en la cámara de cultivo hasta ser analizadas el día 15 después del tratamiento.

3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.

Además de la evaluación de resistencia o susceptibilidad de la planta al hongo *A. lentis*, se midieron los caracteres cuantitativos peso y diámetro de la semilla en las 94 líneas RIL para realizar una búsqueda de QTLs (quantitative trait locus) en el mapa de lenteja.

3.2.1. Resistencia o susceptibilidad de la planta al hongo *Ascochyta lentis*.

Para evaluar el grado de resistencia de los individuos tratados con el hongo *A. lentis* se estimó la repuesta al patógeno según la escala propuesta por Ford *et al.* (1999); esta escala es semi-cuantitativa y utiliza las posibles lesiones como referencia para definir 5 clases fenotípicas ordenadas numéricamente. La escala es la siguiente:

1. No hay lesiones visibles (resistente).
3. Se observa alguna lesión después de una búsqueda cuidadosa (moderadamente resistente).
5. Se observan lesiones con facilidad, pero existe poca defoliación (moderadamente susceptible).
7. Las lesiones son comunes y las plantas están muy dañadas (susceptible).
9. Existen lesiones en todas las partes de la planta, la defoliación es total, o las plantas están muertas (altamente susceptible).

3.2.2. Peso de las semillas.

Se utilizó el valor del peso de 100 semillas de cada RIL.

3.2.3. Diámetro de las semillas.

Se utilizó la longitud de 10 semillas de cada RIL.

3.3. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

De forma general se ha aislado ADN genómico de semillas individuales mediante un kit comercial (DNeasy Plant Minikit). Este método se utilizó para la posterior amplificación por PCR de genes específicos o de la mayoría de los marcadores moleculares, tanto para el estudio de las muestras de lenteja de distintos países como para las líneas RIL. Como excepción se utilizó un protocolo estandarizado (TENS-P) para analizar los marcadores basados en la técnica de desnaturalización de alta resolución (HRM).

Para la obtención de ARN total a partir de hojas se utilizó un kit comercial (RNA Pura Link).

3.3.1. Extracción de ADN mediante el kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN).

El protocolo de extracción de ADN se realizó a partir de harina de semillas individuales obtenida mediante la pulverización de la semilla entre dos placas de bronce con un martillo. La muestra pulverizada se transfirió a un eppendorf e inmediatamente se procedió a seguir el protocolo recomendado por el fabricante. A la muestra pulverizada se le adicionaron 400 μ l de buffer AP1 y 4 μ l de una solución de RNasa A (100 mg/ml), se mezcló en vórtex y se incubó a 65°C durante 10 minutos, durante la incubación es necesario mezclar por inversión varias veces. Tras la lisis celular se añadieron 130 μ l de buffer AP2, se mezcló, y se incubó en hielo durante 5 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 5 minutos a 20.000 x g. Se recogió el sobrenadante y se vertió a una columna Mini Spin que retiene impurezas y se centrifugó 2 minutos a 20.000 x g. El efluente, que contiene el ADN, se mezcló en un nuevo eppendorf con el buffer AP3/E en una proporción de 1,5 volúmenes del líquido recogido. En la solución obtenida el ADN está preparado para ser retenido en las columnas Mini Spin, se hizo pasar todo el volumen a través de la columna (en dos pases) mediante 1 minuto de centrifugación suave, a 6.000 x g. Se realizaron dos lavados de la columna con 500 μ l del buffer AW eliminando el efluente tras centrifugar 2 minutos a 20.000 x g. El ADN fue eluido de la columna por adición de 100 μ l de buffer AE, incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugación durante 1 minuto a 6.000 x g. El último paso se repitió para incrementar la cantidad de ADN obtenido. El flujo final contiene ADN genómico de alta calidad y pureza, se almacenó a -20°C hasta su utilización.

3.3.2. Protocolo TENS-P.

Este método de extracción se utilizó para obtener mayor cantidad de ADN a partir de semillas secas de las RILs del cruce de *Lupa* x *L. c. ssp. orientalis*.

Se partió de 5 semillas de cada muestra y se pulverizaron con un martillo situándolas entre dos placas de bronce. La harina de las 5 semillas se incubó a 65°C durante 30 minutos en 750 μ l de buffer de extracción TENS-P (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50mM EDTA; 0,5 M NaCl; 2% SDS; 1% PVP 40.000); justo antes de su utilización se añade β -mercaptoetanol en proporción 1:1000, durante la incubación se agitó la mezcla en varias ocasiones. Se dejó enfriar la muestra durante 5 minutos y se procedió a la extracción del ADN con 750 μ l de solución cloroformo-octanol en proporción 24:1, se separaron las fases acuosa y orgánica por centrifugación (10 minutos a 20.000 x g) y se recogieron 500 μ l del sobrenadante. Se continuó con la extracción añadiendo un volumen de fenol-cloroformo-isoamilico en proporción 25:24:1 (con centrifugación durante 10 minutos a 20.000 x g). A 300 μ l de sobrenadante se añadieron 2/3 de volumen de isopropanol para precipitar el ADN. El

precipitado se obtuvo tras centrifugar 10 minutos a 20.000 x g y se lavó con 1 ml de solución de etanol (76%)-AcNH₄ (10mM). Tras una nueva centrifugación (10 minutos a 20.000 x g), se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado en una estufa a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se resuspendió el precipitado en 100 µl de agua milliQ con 1 µl de RNAasa (100 mg/ml). La muestra final obtenida de ADN genómico tiene una elevada concentración y se almacenó a una temperatura de -20 °C.

3.3.3. Aislamiento de ARN con el kit PureLink™.

Se obtuvo ARN total de hojas de plantas de diferentes muestras tratadas con esporas del hongo *Aschochyta lentis* o de muestras control.

Las hojas se trituraron en nitrógeno líquido en un tubo falcón inmediatamente después de ser cosechadas, el polvo obtenido se guardó a -80°C hasta el momento de la extracción de ARN con PureLink™ RNA Mini Kit de Ambion.

La extracción se realiza a partir de 0,2 g de muestra pulverizada que se mezclan en vórtex con 600 µl de buffer de lisis. Los restos celulares son eliminados por centrifugación (5 minutos a 26.000 x g). Se añadió al sobrenadante un volumen de alcohol al 70%. El ARN se separó de la solución haciendo pasar todo el volumen de la mezcla a través de una columna SpinCartridge mediante centrifugación durante 15 segundos a 12.000 x g. Se lavó la columna que contenía el ARN haciendo pasar una vez 700 µl de Washbuffer1 (15 segundos a 12.000 x g) y 2 veces 500 µl de Washbuffer2 (15 segundos de centrifugación a 12.000 x g). La membrana de la columna SpinCartridge, a la que está unido el RNA, se secó mediante una centrifugación de 2 minutos a 12.000 x g. Finalmente se eluyó el ARN, añadiendo 30 µl de agua libre de RNAsas a la columna e incubando 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugando 2 minutos a 12.000 x g. El flujo final que contenía el ARN total de alta calidad procedente de hojas, se almacenó a una temperatura de -80°C hasta su utilización.

3.4. OBTENCIÓN DE ADN COPIA A PARTIR DE ARN.

El ARN obtenido fue utilizado para experimentos de expresión génica mediante PCR cuantitativa, sin embargo no se utilizó directamente sino que previamente se sintetizó ADN copia (ADNc) utilizándolo como molde.

Para la síntesis del ADNc previamente se trataron las muestras de ARN con DNasa para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico utilizando el kit DNase Treatment of

RNA Samples Prior to RT-PCR de Promega y posteriormente se utilizó el kit High Capacity RNA to cDNA de Applied Biosystems.

3.4.1. Tratamiento de ARN con DNasa.

Las reacciones se realizaron en un volumen de 10 μ l que incluía 1 μ g de ARN, 1 μ l de buffer 10X RQ1, 1 μ l de RQ1 DNasa libre de RNasas. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se inactivó la DNasa por adición de 1 μ l de solución Stop RQ1 DNasa e incubación a 65°C durante 10 minutos. El ARN se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

3.4.2 .Síntesis de ADN copia.

Se utilizó el kit High Capacity RNA to cDNA de Applied Biosystems para obtener ADN copia utilizando ARN como molde.

Se prepararon reacciones de 20 μ l que contenían 10 μ l de RT Buffer (2X), 1 μ l de 20X Enzyme Mix y 9 μ l (0,9 μ g) de ARN libre de DNasas. Se incubó a 37°C durante 60 minutos y se detuvo la reacción por incubación a 95°C durante 5 minutos.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Tanto la concentración de ADN como de ARN se cuantificó por espectrofotometría, midiendo la densidad óptica a 260 nm (DO_{260}) en el Nanodrop ND-1000 (Agilent Technologies) y teniendo en cuenta la relación de absorción a DO_{260}/DO_{280} y DO_{260}/DO_{230} con objeto de comprobar la pureza de las muestras.

Las muestras de ADN y ADNc se diluyeron a una concentración de 10 ng/ μ l y el ARN a 1 μ g/ μ l. Todos los ADN se almacenaron a -20°C y el ARN a -80°C.

3.6. REACCIONES EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en la amplificación de secuencias de ADN utilizando cebadores que reconocen por complementariedad los extremos de la secuencia que se desea amplificar. Cuando no están disponibles en la bibliografía el paso previo a la reacción de amplificación es el diseño de dichos cebadores.

3.6.1. Diseño de Cebadores.

La mayoría de los cebadores utilizados en el presente trabajo fueron diseñados considerando los criterios básicos propuestos por Saiki (1990) para el diseño de oligonucleótidos para PCR. El diseño se realizó utilizando la aplicación web Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007; <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>).

Se diseñaron cebadores para genes codificantes de apirasas a partir de secuencias conservadas de *Pisum sativum* (número de accesoión AB038555) procedentes de la base de datos del NCBI y a partir de secuencias procedentes de la librería de ESTs del Laboratorio de Genética de la Universidad de León.

Los cebadores diseñados a partir de los ESTs de lenteja tenían como objetivo obtener marcadores, por lo que se procuró que amplificasen intrones, con la idea de encontrar diferencias en la longitud o secuencia de los amplificados. La posición de los posibles intrones fue determinada por homología a los genes de *Medicago truncatula*, utilizando la herramienta informática Phytozome (Goodstein *et al.*, 2012; <http://www.phytozome.net/>).

Los cebadores utilizados para experimentos de desnaturalización de alta resolución (HRM) y PCR cuantitativa debían amplificar como máximo 250 pares de bases y tener una temperatura de hibridación entre 58°C y 60°C.

3.6.2. Reacciones de amplificación por PCR.

Las condiciones para realizar las reacciones dependen de la longitud del amplicón esperado, los cebadores utilizados y el tipo de PCR. De forma general podemos clasificar los experimentos realizados en el presente trabajo en cuatro categorías: PCR específica de secuencias largas, para amplificar la secuencia prácticamente completa de algún gen, como es el caso de convicilinas y apirasas; PCR para amplificar secuencias que sirvan como marcadores en la elaboración del mapa de ligamiento, PCR cuantitativa y PCR para la amplificación de marcadores HRM.

PCR de secuencias largas (convicilinas y apirasas)

Los amplicones obtenidos fueron clonados y posteriormente secuenciados. Se prepararon reacciones de 30 µl que contenían, 3 µl de Buffer Biotools 10X, 0,2 mM de NTPs, 15 µM de cada cebador (Forward y Reverse), 20 µg de BSA (Seroalbúmina Bovina), 1,5 U de Taq polimerasa Biotools (5 U/µl) y 30 ng de ADN de la muestra. Las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El programa utilizado para la amplificación consistía en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos,

30 ciclos de amplificación que incluyen desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, unión de los cebadores a 55°C durante 1 minuto y 30 segundos, y síntesis de ADN a 72°C durante 2 minutos y 30 segundos. Las reacciones terminan con una etapa a 72°C durante 10 minutos que permita finalizar las cadenas en formación. El éxito de las amplificaciones se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

PCR para la obtención de marcadores

La finalidad de estas PCR era encontrar variación en longitud o en presencia/ausencia de dianas para enzimas de restricción y poder utilizar estas secuencias como marcadores que se incluyeron en el mapa de ligamiento. Los amplicones obtenidos en este caso fueron de menor longitud. Al igual que en la PCR de secuencias largas se prepararon reacciones de 30 µl con los mismos componentes y las mismas concentraciones, a excepción de la enzima utilizada, en este caso, 1,5 U de *Taq* DNA polimerasa 5 PRIME y el tampón correspondiente, *Taq* DNA Buffer advanced 10X. A los programas de PCR se les asignaron los nombres Intrón, Q-primers, APy2 y SNP. La reacción de amplificación se realizó en el mismo termociclador (GeneAmp PCR System 9700) con programas que diferían del descrito en la PCR de secuencias largas en el número de ciclos de la segunda etapa (35 ciclos) y en las temperaturas de reasociación, que fueron calculadas a partir de la temperatura de fusión de cada pareja de cebadores.

Cuando los productos de PCR no mostraban diferencias de tamaño entre los parentales del cruzamiento, se digirieron con diferentes enzimas de restricción. Las enzimas de restricción escogidas (*AluI*, *DpnII*, *HaeIII*, *HinP1I*, *HpaII*, *HpyCH4IV*, *NlaII*, *MseI* y *Taq^I*) reconocen dianas de cuatro nucleótidos, lo que aumenta la probabilidad de encontrar polimorfismos. La digestión de los productos de PCR se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante, en todos los casos New England Biolabs.

PCR cuantitativa

El nivel de expresión de ciertos genes se cuantificó por medio de la técnica de PCR cuantitativa. Como material de partida se utilizó ADN copia obtenido a partir del ARN de plantas sometidas a los dos tratamientos relacionados con la infección por *Ascochyta lentis*.

Las reacciones de PCR se realizaron en placas multipocillo en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System de Applied Biosystems, en un volumen total de 15 µl. Las reacciones contenían 7,5 µl de *Power SYBR®* Green PCR Master Mix de Applied Biosystems, 3 µM de cada uno de los cebadores y 20 ng de ADN copia. Las reacciones de

amplificación se realizaron utilizando un programa que incluye 3 etapas. Una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, la segunda etapa consiste en 40 ciclos de amplificación que incluyen desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y reasociación y extensión a 60°C durante 1 minuto. La tercera etapa permite comprobar que únicamente se está amplificando un producto mediante una desnaturalización lenta hasta alcanzar los 95°C. La desnaturalización sirve como control, dado que permite detectar una temperatura de fusión única si el producto de PCR es único o varias si existe una mezcla de secuencias amplificadas.

PCR para marcadores HRM

Los marcadores basados en HRM (High Resolution Melting) se obtuvieron mediante reacciones de PCR en un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System. Se trata de una PCR a tiempo real en la que se programa una etapa de desnaturalización lenta después de la PCR estándar.

Se prepararon reacciones de 20 µl en placas multipocillo que contenían 10 µl de MeltDoctor™ HRM Master Mix de Applied Biosystems, 6 µM de cada cebador, y 20 ng de ADN. La reacción se desarrolló con las etapas habituales en una PCR (95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de amplificación que incluyen desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y reasociación y extensión a 60°C durante 1 minuto).

Terminadas las etapas de amplificación, se inicia una etapa de desnaturalización lenta (su duración es de 120 minutos), hasta alcanzar los 95°C, en la que se monitoriza la desnaturalización del amplicón midiendo la disminución de fluorescencia cada 0,1°C. Los resultados se analizaron con el software High Resolution Melt v3.0.1 de Applied Biosystems.

3.6.3. Análisis de los datos de PCR a tiempo real.

El estudio de expresión génica mediante PCR se realizó mediante una cuantificación relativa entre muestras, utilizando genes codificantes para proteínas de expresión constitutiva como controles endógenos. Los genes escogidos como controles fueron los codificantes para la β-tubulina y la fosfatasa 2A, ya que en estudios previos se mostraron como los de expresión más estable en experimentos de infecciones con *Ascochyta* (Ralf Horres y Pedro García, comunicación personal).

Para los análisis de PCR cuantitativa se utilizó el software StepOne™ Software v2.2.2 de Applied Biosystems. Brevemente, el proceso consiste en un estudio cinético en el que se mide la cantidad de ADN de doble cadena mediante cambios en la fluorescencia asociada a un colorante, en este caso SYBR-Green. El parámetro que permite la cuantificación es el

ciclo de amplificación en el que se alcanza una cantidad determinada de fluorescencia o umbral de detección, este ciclo se denomina ciclo umbral o valor Ct. La determinación del umbral de detección se hizo de forma automática con el software que monitoriza el proceso y que estima este parámetro a partir de la cantidad de fluorescencia de los primeros ciclos (línea base) en los que apenas se detectan cambios.

La cinética de amplificación suele analizarse en escala logarítmica porque ofrece una mayor resolución para estimar el valor Ct. En la Figura 3.1 se observa la cinética de amplificación de la secuencia de β -tubulina, utilizada como control endógeno, en escalas lineal y logarítmica.

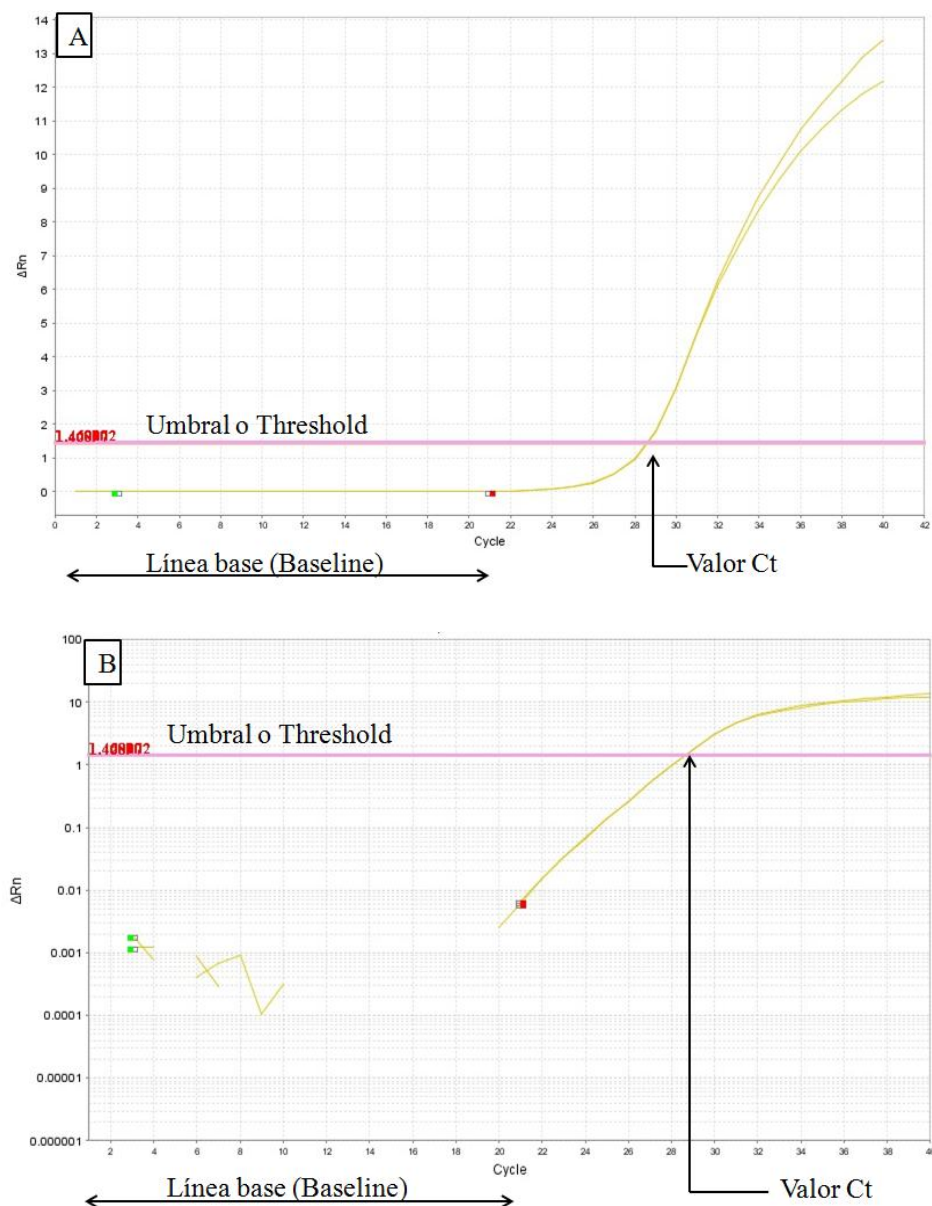


Figura 3.1. Cinética de amplificación de la secuencia de β -tubulina. Gráficas de salida proporcionados por el software del StepOnePlus. En (A) se muestra la gráfica en escala lineal y en (B) en escala logarítmica.

Para estimar el nivel de expresión relativo a las secuencias control se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), según las instrucciones incluidas en Applied Biosystems User Bulletin No 2 (P/N 4303859).

El valor $\Delta\Delta Ct$ mide el cambio relativo de expresión de una secuencia entre dos muestras, en este caso entre una muestra tratada con esporas de *A. lentis* y una muestra control tratada con agua. Este parámetro se calcula utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\Delta Ct_{\text{muestra control}} = Ct_{\text{gen analizado muestra control}} - Ct_{\text{gen endógeno muestra control}}$$

$$\Delta Ct_{\text{muestra tratada}} = Ct_{\text{gen analizado muestra tratada}} - Ct_{\text{gen endógeno muestra tratada}}$$

$$\Delta\Delta Ct_{\text{tratamiento}} = \Delta Ct_{\text{muestra tratada}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$$

El valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proporciona la diferencia de cantidad (expresión) del gen analizado debida al tratamiento normalizada con respecto a la del gen endógeno, que se supone constante.

Para aplicar este método de forma correcta, las eficiencias de las reacciones de PCR de los genes analizados debe de ser similar a la de los genes control y en ambos casos debe estar próxima a la máxima posible que sería duplicar el número de copias en cada ciclo.

Para comprobar las eficiencias se ha utilizado el método de analizar la cinética que presenta la curva de amplificación mediante el programa LinRegPCR v2013.0 (Ruijter *et al.*, 2009). Este se basa en el hecho de que cuando se representa la fluorescencia en escala logarítmica frente al número de ciclo de PCR, la pendiente de la recta que une los valores obtenidos en la fase exponencial de la amplificación puede utilizarse para estimar la eficiencia (Ramakers *et al.*, 2003). El programa identifica en cada PCR los ciclos en los que la eficiencia de amplificación se mantiene constante y ocurre de manera exponencial (window of linearity), permitiendo la estimación de dicha eficiencia. Aquellas PCRs en las que la eficiencia era menor del 80% fueron eliminadas de los análisis.

3.7. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

La visualización de ácidos nucleicos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa y visualización con luz ultravioleta.

3.7.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Se prepararon geles de agarosa para la electroforesis de ADN de diferentes tamaños y con concentraciones de agarosa que variaron entre el 1 y el 2% (p/v). En cualquier caso la agarosa se disolvió en tampón TAE 1X (40 mM Tris-Acético, 1 mM EDTA, pH 7,8) y los

geles se prepararon con el colorante fluorescente RedSafe™ a la concentración indicada por el fabricante. RedSafe™ (CHEMBIO) es una alternativa al tradicional bromuro de etidio para detectar ácidos nucleicos en geles de agarosa.

La concentración a la que se preparan los geles depende del tamaño de la molécula que se pretende visualizar. Para moléculas grandes como el ADN genómico sin digerir se prepararon geles al 1%, mientras que para analizar fragmentos pequeños se utilizaron geles hasta al 2% con el objetivo de obtener una buena resolución y detectar pequeñas variaciones en su longitud.

Para determinar el tamaño de los fragmentos visualizados se incluyó en todos los geles un carril cargado con el marcador sintético 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Se tomaron 10 µl de las muestras y se mezclaron con 5 µl de tampón de carga (Bromofenol 0,025%, Glicerol 50%, Agua 50%) antes de cargar el gel.

3.7.2. Electroforesis de ARN en geles de agarosa.

La electroforesis del ARN se llevó a cabo en condiciones semejantes a la del ADN, siguiendo la metodología de Maseka *et al.* (2005). Siempre se utilizaron geles al 1% de agarosa en tampón TAE 1X con RedSafe™, pero todos los tampones se prepararon con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) a una concentración de 0,1% en volumen durante 24 horas a 37°C, y esterilizada en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Se utilizó el marcador sintético RiboRuler RNA Ladder (Invitrogen) como control de tamaño de las muestras. Se tomaron 5 µl de las muestras y se mezclaron con 7 µl de formamida además de los 5 µl de tampón de carga; antes de cargarlas se incubaron a 65°C durante 5 minutos y se enfriaron 5 minutos en hielo.

El material utilizado para la electroforesis del ARN fue limpiado previamente con la solución RNase Away de Bio Products. Las condiciones de la electroforesis y de visualización fueron semejantes a las utilizadas con el ADN.

3.8. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.

Los productos de PCR que se deseaba secuenciar se clonaron en la células competentes de la cepa bacteriana de *Escherichia coli* DH5α, utilizando el vector de clonación pGEM® -T-easy.

La clonación se realizó mediante ligación utilizando el kit pGEM[®]-T-easy de Promega, transformación y posterior selección de colonias portadoras del inserto deseado.

3.8.1. Células competentes.

Las células competentes se prepararon a partir de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Estas células ofrecen un alto rendimiento de transformantes (1×10^6 a 1×10^9 por μg de ADN), facilitan la producción y la calidad de los plásmidos debido a la mutación *endA1* y aseguran la estabilidad de los insertos en los vectores debido a la mutación *recA1*. Posee una deleción en el gen *lacZ* del operón *lac*, que permite la selección por color de aquellos transformantes portadores de un plásmido que complemente dicha mutación. También es resistente al bacteriófago T1.

Las células competentes se obtuvieron según el protocolo INOUE (Inoue *et al.*, 1990). A partir de un cultivo fresco de *E. coli* DH5 α cultivado en medio SOB líquido (Bacto-tripsina 2%, Extracto de levadura 0,5 %, NaCl 1 M, KCl 2,5 M, pH 7) se sembraron a diferentes concentraciones cultivos de 250 ml de SOB líquido suplementado con iones Mg (MgCl_2 2 mM) y se incubaron entre 18 y 20 horas a 20°C y agitación (120 rpm en una incubadora Innova 4000 de New Brunswick Scientific). De los diferentes cultivos se escogió aquel que tuviese una $\text{DO}_{600} = 0,55$. El cultivo seleccionado se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a $1.600 \times g$ durante 10 minutos a 4°C para obtener un precipitado de bacterias. Éste se resuspendió en 80 ml de tampón de transformación INOUE (MnCl_2 55 mM, CaCl_2 15 mM, KCl 250 mM, PIPES 10 mM, pH 6,7) enfriado en hielo. Se centrifugó de nuevo a $1.600 \times g$ en frío durante 10 minutos y las células obtenidas se resuspendieron en 20 ml de tampón de INOUE frío. Se añadió 1,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y las células, ya competentes, se guardaron en alícuotas a -70°C hasta su uso tras descongelarlas durante 10 minutos de incubación en hielo.

3.8.2. Vector de clonación.

Se utilizó el vector pGEM[®]-T-easy de la casa comercial Promega. Se trata de un vector derivado de los plásmidos de la serie pGEM, tiene un bajo peso molecular (3,015 pb) y cuando se replica en las células alcanza un alto número de copias. Este vector, o algunos relacionados con él, se utiliza de forma sistemática para clonar fragmentos procedentes de la amplificación por PCR. La estrategia de clonación en este vector se fundamenta en la capacidad de la *Taq* DNA polimerasa de añadir un nucleótido de adenina en los extremos 3' de los fragmentos sintetizados mediante su actividad de transferasa terminal. El vector pGEM[®]-T-easy se comercializa como un plásmido abierto al que se ha agregado una timina

en sus extremos 3', lo que posibilita ligar secuencias de ADN generadas por PCR en condiciones similares a una ligación entre fragmentos de extremos cohesivos.

En la Figura 3.2 se muestran el mapa del vector pGEM[®]-T-easy y un detalle de la región de clonación múltiple incluyendo los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Estos sitios de restricción permiten la liberación del inserto que puede ser utilizado para múltiples aplicaciones (clonación en otro vector, utilización como sonda para Northern o Southern blot, entre otras). A su vez el vector contiene los promotores T7 y SP6 flanqueando a la región de clonación múltiple, que está contenida dentro de la región que codifica para la enzima (*lacZ*). La presencia de los promotores T7 y SP6 en el vector de clonación hacen posible la secuenciación de los fragmentos de DNA clonados en el vector utilizando los oligonucleótidos universales correspondientes.

La inserción de un fragmento de ADN en la región de clonación causa una inactivación de la enzima β -galactosidasa y permite la identificación de los clones recombinantes mediante un cribado blanco/azul. El vector también incluye un gen que confiere resistencia a ampicilina y permite la selección de células transformantes.

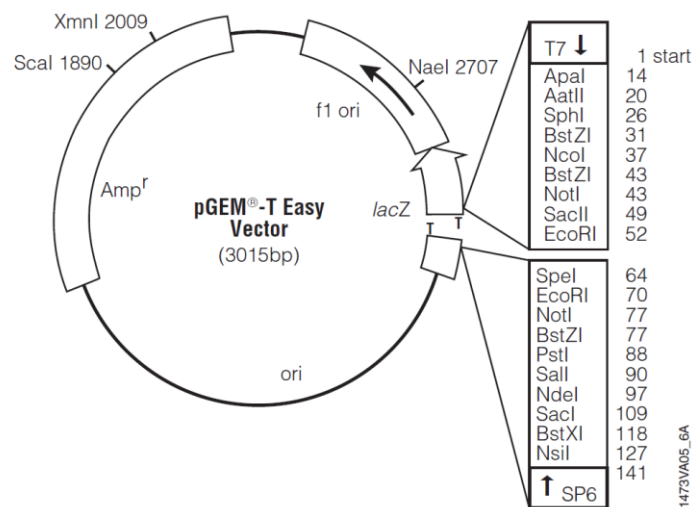


Figura 3.2. Mapa del Vector de clonación pGEM[®]-T-easy.

3.8.3. Reacciones de ligación.

Se ha utilizado el kit pGEM[®]-T-easy de Promega. Se realizaron reacciones de 10 μ l que contenían 5 μ l de Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase (2X), 1 μ l de vector pGEM[®]-T (50 ng/ μ l); 1 μ l de enzima (T4 DNA Ligase, 3 U/ μ l) y 3 μ l de producto de PCR. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente o 24 horas a 4°C. Las reacciones de ligación fueron utilizadas directamente en experimentos de transformación.

3.8.4. Transformación.

La transformación se realizó sobre alícuotas de 50-100 μ l de células competentes DH5 α , que se descongelaron lentamente (10 minutos en hielo), a las que se les añadió el contenido completo de la reacción de ligación. La mezcla se mantuvo en hielo durante 20 minutos. La entrada del ADN a las células se facilitó con un choque térmico a 42°C durante 45-50 segundos, seguida de una incubación en hielo durante 2 minutos. Inmediatamente se añadió 1 ml de medio LB (Luria-Betani; Bactotripton 10%, Extracto de levadura 5%, NaCl 10%, pH 7,5) y se incubó 90 minutos a 37°C para activar el metabolismo celular. Se sembraron distintas cantidades de la transformación en placas con medio LB sólido suplementado con ampicilina (LB, agar bacteriológico 37,5%, ampicilina 0,1%). Previamente se añadieron a las transformaciones 75 μ l de IPTG (Isopropil-Beta-D-Tiogalactopiranos, 0,1M) y 75 μ l de X-Gal (5-Bromo-4Cloro-3-Indol-B-D Galactopiranos, 5% en N,N-dimetilformamida p/v). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

3.8.5. Selección de clones.

El cultivo de las mezclas de transformación sobre el medio selectivo es la primera selección, ya que únicamente las células transformantes, que han adquirido la resistencia a ampicilina, pueden crecer. Las células que portan vectores recombinantes pueden reconocerse por el gen de la β -galactosidasa, inactivado por inserción de fragmentos de la PCR. En las colonias no recombinantes el IPTG activa el gen *lacZ* y la β -galactosidasa hidroliza el compuesto X-Gal produciendo color azul.

Se realizó una última selección de las colonias blancas (transformantes y recombinantes) mediante una preparación rápida de plásmidos que permite comprobar su tamaño mediante electroforesis. De cada clon escogido, se resuspendió media colonia en 50 μ l de EDTA 0,01 M, pH 8; se realizó una lisis celular añadiendo 50 μ l de Cracking Buffer (Sacarosa 200% p/v, 0,2 M NaOH, SDS 0,5%) e incubando a 70°C durante 5 minutos. Las muestras se dejaron enfriar 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 1,5 μ l KCl 4 M y 2 μ l de Bromofenol 0,4% y se enfriaron otros 5 minutos en hielo. Los restos celulares y otros compuestos no solubles se eliminaron por centrifugación (4 minutos, a 20.000 x g) y después de otros 5 minutos en hielo las muestras se cargaron directamente en geles de agarosa al 1%. Como control de tamaño, para realizar la selección, se incluyeron en el análisis plásmidos no recombinantes procedentes de varias colonias azules.

3.8.6. Secuenciación.

La secuenciación de los fragmentos clonados se realizó mediante el método de los didesoxi-nucleótidos y electroforesis capilar. Esta tarea fue realizada por el servicio de secuenciación automática del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León.

La secuenciación se realizó a partir de los cebadores universales que hibridan con los promotores T7 y SP6 situados en el vector de clonación y en caso de que el fragmento clonado fuese largo se diseñaron cebadores internos para continuar la secuenciación.

3.9. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.

Se han comentado anteriormente algunas de las herramientas informáticas utilizadas, como es el caso del programa Primer3Plus que permitió el diseño de cebadores para la amplificación por PCR o los programas MeltDoctor y StepOne™ Software v2.2.2 de Applied Biosystems que permiten controlar el sistema de PCR cuantitativa StepOnePlus y analizar los resultados de los marcadores HRM y de los experimentos de expresión génica respectivamente. Además de estas herramientas se han utilizado programas de uso general como Excel de Microsoft para realizar cálculos estadísticos rutinarios o elaborar gráficas, o programas específicos para resolver tareas bioinformáticas concretas, entre ellas el análisis de secuencias de ADN, la elaboración de mapas genéticos de ligamiento y el análisis de QTLs.

3.9.1. Análisis de secuencias de ADN.

Para la edición, administración y análisis de secuencias de ADN se utilizó el programa MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2011). Este programa permitió realizar la mayoría de los análisis basados en secuencias de ADN incluyendo el alineamiento automático y su posterior edición manual, la traducción a secuencias de aminoácidos, el análisis filogenético mediante el cálculo de matrices de distancias o métodos de máxima verosimilitud, la construcción y edición de árboles filogenéticos y la estimación de cambios sinónimos y no sinónimos entre parejas de secuencias. El método escogido en cada análisis se especifica al presentar cada resultado particular.

Parte de las secuencias utilizadas para el diseño de cebadores se han obtenido de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); así mismo, las secuencias de ADN obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI, con la colección de EST del Laboratorio de Genética de la

Universidad de León o con el genoma de *Medicago truncatula* del servidor Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) mediante la herramienta BLAST ya sea en línea o de forma local con la aplicación suministrada por el NCBI.

3.9.2. Mapas de Ligamiento.

El análisis de ligamiento se realizó bajo el supuesto de una segregación 1:1 en la población de las líneas RIL, donde todos los individuos son homocigotos. El genotipo de cada línea para todos los marcadores se anotó de forma manual en un editor de texto codificado como A, si correspondía al genotipo del parental *L. c. culinaris* var LUPA o como B, si era como el parental *L. c. orientalis*. Para comprobar que los marcadores se ajustaban a la segregación 1:1 se utilizó la prueba del χ^2 . Cuando el valor del χ^2 tenía una probabilidad inferior al 5 % se rechazó la hipótesis nula y el marcador se catalogó como distorsionado.

El análisis de ligamiento se realizó mediante la estima de la fracción de recombinación (r) y su función de mapa (Kosambi, 1944), utilizando los programas MAPMAKER/EXP v 3.0b (Lander y col., 1987) y CarthaGene v 1.3 (De Givry *et al.*, 2005).

En ambos casos la posibilidad de ligamiento entre dos loci se estima mediante el parámetro LOD, calculado como:

$$\text{LOD} = \log (P_r / P_{(0,5)})$$

siendo P_r la probabilidad de obtener la descendencia con los loci ligados a una frecuencia de recombinación r y $P_{(0,5)}$, la misma probabilidad suponiendo independencia. Los grupos de ligamiento se realizaron con los loci que mostraron un valor de LOD igual o superior a 3 (es al menos mil veces más probable obtener la descendencia observada si los loci están ligados que si son independientes) y una frecuencia de recombinación máxima de 0,3.

Con Mapmaker/EXP, la ordenación de los loci en los grupos de ligamiento se realizó mediante diferentes comandos dependiendo del número de marcadores en el grupo. Si éste presentaba 10 loci o menos, se utilizó el comando "compare" que calcula la probabilidad de obtener la descendencia observada para todas las ordenaciones posibles, eligiéndose aquella que presentaba mayor probabilidad. En el caso de que el grupo de ligamiento contuviera más de 10 loci, se utilizó el comando "order" mediante el cual el programa elige automáticamente un subconjunto de 5-10 loci, cuyo orden es significativamente más probable que cualquier otro, y para el resto va probando todas las posiciones, situándolos en aquella que es significativamente mejor. Puesto que en ocasiones el orden final depende del subconjunto inicial de loci elegidos, el comando "order" se repitió al menos 20 veces hasta conseguir automáticamente el mapa que incluía más marcadores del grupo de ligamiento.

Los loci que no fueron situados automáticamente, se analizaron mediante el comando "try". El orden final fue verificado mediante el comando "ripple" que realiza la permutación de loci contiguos (generalmente en ventanas de 5) y estima la verosimilitud de los diferentes órdenes.

El programa CarthaGene (De Givry *et al.*, 2005) también realiza la búsqueda de los grupos de ligamiento basándose en los valores LOD, y para grupos con bajo número de marcadores estima la probabilidad de obtener los datos observados con todos los órdenes posibles, escogiéndose el que tiene el valor más alto de verosimilitud. Sin embargo a la hora de buscar las ordenaciones en los grupos de ligamiento con elevado número de marcadores recurre a métodos diferentes a los utilizados en Mapmaker/EXP. Los algoritmos utilizados en este programa están relacionados con el problema del viajante (Travelling Salesman Problem o TSP), en el que dadas n ciudades y conocidas las distancias entre todas ellas hay que encontrar el camino más corto que pase una vez por cada ciudad. En el caso de un mapa genético, los marcadores serían los equivalentes a las ciudades y las distancias utilizadas serían las distancias genéticas entre parejas de loci. Como a partir de 10 loci es prácticamente imposible hacer un análisis exhaustivo de todos los órdenes, CarthaGene presenta tres tipos de algoritmos con los que encontrar la mejor ordenación: los denominados "annealing o templado", "tabú" y "genético".

Los algoritmos de templado toman su nombre por analogía con proceso de templado en metalurgia que consiste en calentar y enfriar el material para cambiar sus propiedades. En el caso del mapeo genético, el algoritmo busca el orden que haga máxima la verosimilitud, dado un parámetro que se denomina "temperatura" (T) y una tasa constante de "enfriamiento" (α). El algoritmo se puede resumir en los siguientes pasos:

- a) Partir de un valor de T inicial y de un orden concreto con un valor de verosimilitud dado.
- b) Aplicar cambios aleatorios en la posición de los marcadores, creando nuevos órdenes y analizar los valores de verosimilitud de cada uno. El número de mapas a analizar es un parámetro modificable (500 por defecto). En caso de que alguno de los órdenes tenga una verosimilitud superior al del mapa inicial, es elegido como nuevo punto de partida. En el caso de que los nuevos órdenes no mejoren al inicial, todavía es posible aceptar alguno de ellos como nuevo orden de partida, con una probabilidad P donde $L(n)$ es la verosimilitud del nuevo orden, $L(i)$ es la verosimilitud del orden inicial, y T es la temperatura.

$$P = e^{[L(n)-L(i)]/T}$$

Por tanto el nuevo orden no tiene que ser obligatoriamente más verosímil que el anterior ya que hay una cierta probabilidad de que órdenes menos probables sean elegidos.

c) Bajar el valor de T según el parámetro α (0,5 por defecto).

d) Repetir los pasos a) y b) hasta alcanzar la T final.

Así al inicio, cuando el valor de T es alto (300 por defecto), la probabilidad P de aceptar un orden que sea peor que el inicial es alta, mientras que al final del proceso cuando T es bajo (0,1 por defecto), la probabilidad de aceptar un orden peor es muy baja.

El hecho de que el algoritmo incluya la posibilidad de aceptar órdenes peores permite la exploración de un mayor número de casos, aumenta la probabilidad de que se llegue al orden con máxima verosimilitud global; si sólo fuera posible mejorar el orden de un modo sistemático, se alcanzaría un máximo de verosimilitud local que no tiene por qué ser el global (Kirkpatrick *et al.*, 1983).

Los algoritmos de tipo tabú también comienzan con un orden inicial, a partir del cual se obtiene un conjunto de mapas derivados (por defecto 100) por intercambio de la posición de un subconjunto de marcadores contiguos. De este subconjunto se elige el que presenta máxima verosimilitud como nuevo mapa. Al repetir el proceso y elegir el nuevo mapa, existen ordenaciones denominadas tabú que son las utilizadas recientemente y que no se van a considerar; de este modo se impide que el algoritmo entre en un bucle en el que se parta continuamente de dos ordenaciones que difieran en una inversión. Finalizadas las iteraciones (por defecto 100), se selecciona el orden que presenta la máxima verosimilitud de todos los que se han analizado, aunque esté en el listado tabú.

Por último los algoritmos genéticos se basan en analogías con los procesos de reproducción, mutación y selección. En resumen, los órdenes se consideran como equivalentes a los individuos de una población de tamaño constante, que pueden cruzarse entre sí, utilizando un proceso de mezcla específico, algunos órdenes pueden sufrir mutaciones aleatorias, y por último existe un proceso de selección en el que los órdenes con valores más altos de verosimilitud tienen mayores probabilidades de participar en la formación de la siguiente generación.

Para la utilización de este tipo de algoritmos, se parte de un conjunto de x órdenes que serán los que definen el tamaño de la población (por ejemplo, los 10 mejores obtenidos con alguno de los algoritmos anteriores). Cada ordenación se va a reproducir con otra para dar dos descendientes en los que se habrá producido un proceso de recombinación. La probabilidad de reproducción de un orden dependerá de su valor de verosimilitud.

Tomando el ejemplo incluido en Gaspin y Schiex (1998), si partimos de los órdenes parentales

P1 – 2 3 7 4 1 6 9 8 5 10

P2 - 5 9 1 6 7 3 2 10 4 8

Cuando se reproduzcan, podrán producir descendientes en los que haya existido recombinación a lo largo del mapa con una cierta probabilidad (por defecto 60%). Suponiendo que existieran dos puntos de recombinación, se eligen dos posiciones al azar en la que se corta el mapa en los dos parentales

P1 - 2 3 7 4 1 6 9 8 5 10

P2 - 5 9 1 6 7 3 2 10 4 8

La sección intermedia del parental 1 será la que forme la sección intermedia del primer descendiente (D1); a continuación los marcadores se colocan siguiendo el orden que aparece en el parental 2, siempre que no esté ya situado.

D1 - 7 3 2 4 1 6 9 10 8 5

Para el segundo descendiente se sigue el mismo proceso, utilizando la zona media del parental 2.

D2 - 4 1 9 6 7 3 2 8 5 10

Posteriormente pueden existir mutaciones aleatorias con una cierta probabilidad (5% por defecto) que consiste en el intercambio de posición de dos marcadores. Una vez obtenidos los valores de verosimilitud de cada orden, se repite de nuevo todo el proceso durante las generaciones que se especifiquen (por defecto 100).

A la hora de obtener los mapas con CarthaGene, cada grupo de ligamiento fue sometido varias rondas a los tres tipos de algoritmos, seguidos de las órdenes "Flips" que es la equivalente a "ripple" en MapMaker/EXP, y "Polish" que analiza posibles posiciones alternativas para los loci, hasta obtener órdenes estables, que no pudieron mejorarse.

Cuando para un grupo de ligamiento los órdenes obtenidos mediante MapMaker/EXP y CarthaGene presentaron alguna discrepancia, se escogió aquel que era significativamente mejor basándose en sus valores de verosimilitud (un orden presentaba una verosimilitud 1000 veces superior al otro), y en el caso de que las diferencias no fueran significativas, como ha sido generalmente el caso, aquél que presentaba una menor longitud en cM, ya

que se ha demostrado en simulaciones que este criterio, denominado SARF (minimum Sum of Adjacent Recombination Frequencies), es muy potente a la hora de encontrar el orden real de los marcadores (Olson y Boehnke, 1990; Mollinari *et al.*, 2009).

La presentación gráfica de los mapas de ligamiento obtenidos se realizó con la ayuda del programa MapChart v2.2 (Voorrips, 2002).

3.9.3. Análisis de QTLs.

Los loci relacionados con los caracteres peso y diámetro de las semillas y resistencia a *Ascochyta lentis* fueron incluidos en el mapa de ligamiento como QTLs. Para ello se utilizó el programa Windows QTL cartographer v 2.5_011 (Wang *et al.*, 2012).

La localización de los QTLs en el mapa genético implica encontrar asociaciones estadísticamente significativas entre los marcadores moleculares cartografiados y los caracteres señalados previamente. Para establecer la significación estadística al nivel del 5% también se utilizó el parámetro LOD, cuyo valor se determinó mediante la realización de 1.000 permutaciones de los datos.

Windows QTL Cartographer permite utilizar varios métodos para la detección de QTLs como la comparación de medias de las diferentes clases de marcadores (Single Marker Analysis) (Soler y Beckman, 1983), el mapeo por intervalos simple (Interval Mapping) (Lander y Botstein, 1989; Knapp *et al.* 1990; Luo y Kearsey, 1992), o el mapeo por intervalos compuesto (Composited Interval Mapping) (Zeng, 1993, 1994).

En este trabajo se ha utilizado el análisis de marcadores individuales con aquellos loci que se comportaron como independientes a la hora de elaborar el mapa genético. El modelo que se utiliza con cada marcador es el siguiente:

$$y_j = b_0 + b_1x + \varepsilon$$

en el que y_j es el valor fenotípico del carácter en la RIL j , b_0 es la media del carácter en el conjunto de las líneas RIL que presentan homocigosis para el alelo de *L. c. ssp. orientalis*, b_1 es el efecto aditivo de cada alelo del parental Lupa, x es el número de alelos del parental Lupa, por lo tanto igual a 2 para las líneas homocigotas para el alelo de este parental y 0 para las líneas homocigotas para el alelo de *L. c. ssp. orientalis*, y ε es el error residual. En el caso de que el marcador esté ligado a algún QTL, b_1 debe ser significativamente distinto de 0.

El programa utiliza el método de máxima verosimilitud para estimar el valor de b_1 que maximice la probabilidad de obtener los datos observados en el conjunto de las líneas. Para

comprobar la significación, realiza una prueba de razón de verosimilitudes (LRT, likelihood ratio test), calculada como:

$$LTR = -2 \ln(L_0 / L_1)$$

en la que L_0 es la verosimilitud del modelo suponiendo $b_1=0$ y L_1 la del modelo suponiendo que b_1 es el valor obtenido en el modelo. Esta prueba está muy relacionada con un test F, de modo que el valor obtenido es convertido en el resultado de una prueba de este tipo, a partir del cual se estima su significación estadística. El programa también proporciona el valor R^2 que indica el porcentaje de varianza fenotípica explicada por la existencia de un QTL estrechamente ligado al marcador analizado.

Para los marcadores que forman parte de los grupos de ligamiento, la detección de QTLs se ha realizado mediante el Mapeo por Intervalos Simple (Simple Interval Mapping) y el Mapeo por Intervalos Compuesto (Composite Interval Mapping; Zeng, 1993, 1994). En estos dos últimos casos, la probabilidad de que existiera un QTL se analizó a lo largo de todo el mapa, avanzando 1 cM en cada paso.

El Mapeo por Intervalos Simple sólo considera la posibilidad de un QTL y no tiene en cuenta la variación que podría originarse por otros QTLs, con lo que tanto el efecto estimado como su posición puede no ser correcta, especialmente si hay ligamiento o relaciones epistáticas entre ellos.

El Mapeo por Intervalos Compuesto también analiza un único QTL en cada caso, pero controla la variación que pudiera deberse a otros QTLs mediante la inclusión de marcadores adicionales como cofactores para explicar los fenotipos observados.

Con el Mapeo Simple, cuando se realiza el análisis de un QTL en un segmento entre dos marcadores contiguos M_1 y M_2 , para los que el parental Lupa es homocigoto para el alelo Q_L del presunto QTL que pudiera existir y los alelos M_{1L} y M_{2L} en los loci marcadores, y el parental *L. c. ssp. orientalis* es homocigoto para los alelos Q_0 , M_{10} y M_{20} , el modelo sería de nuevo:

$$y_j = b_0 + b_1x + \varepsilon$$

donde y_j es el valor del carácter para la línea RIL j , b_0 es la media del valor del carácter para los homocigotos Q_0Q_0 , b_1 es el efecto aditivo del presunto QTL situado en el intervalo estudiado, ε es el error residual del modelo, y x (número de alelos del parental Lupa) tendría un valor de 2 si el genotipo de la línea fuera Q_LQ_L y de 0 si fuera Q_0Q_0 . Por supuesto, el genotipo verdadero que presenta la línea para el QTL es desconocido, pero se puede

estimar la probabilidad de cada caso utilizando los genotipos de los marcadores flanqueantes y la posición concreta del presunto QTL en el segmento. Teniendo en cuenta que en el conjunto de las líneas RIL existen 2 genotipos Q_LQ_L y Q_OQ_O , la distribución de los fenotipos sería la mezcla de dos distribuciones, a las que se le supone normalidad y homocedasticidad (varianzas similares), cada una de ellas con su media ($\mu_{Q_LQ_L}$, $\mu_{Q_OQ_O}$). El programa explora diferentes valores de los parámetros para cada posición del segmento (medias para los genotipos, distintos valores para el efecto aditivo, valores de varianzas, etc.) hasta alcanzar los que proporcionan la máxima verosimilitud de los datos en conjunto. La significación del efecto de un presunto QTL en una posición concreta se suele probar mediante el valor LOD que compara la hipótesis de existencia del QTL y la de no existencia del mismo; en este caso las medias de los diferentes 4 genotipos presentes en los marcadores flanqueantes no serían significativamente diferentes y el efecto aditivo sería 0.

El Mapeo por Intervalos Compuesto extiende la idea del método de marcadores flanqueantes al incluir marcadores adicionales como cofactores, los cuales se encuentran fuera del segmento analizado, con el propósito de eliminar toda la variación asociada a otros QTLs presentes en el genoma. Así el modelo sería:

$$y_j = b_0 + b_1x + \sum E_k b_k x_{kj} + \varepsilon$$

en el que b_k es el coeficiente de regresión parcial del valor del carácter para el marcador k y x_{kj} toma un valor de 2 si la línea es homocigota para el alelo de Lupa y 0 si es homocigota para el alelo de *L. c. ssp. orientalis* para el marcador k; el resto de los parámetros significan lo mismo que en el caso del mapeo simple.

De este modo, al controlar los efectos que otros marcadores (y posibles QTLs) situados fuera del intervalo analizado tienen sobre la característica métrica se obtienen resultados más exactos sobre los efectos reales del presunto QTL incluido en el segmento y su posición. Un problema de este método está en la elección de los marcadores que se deben incluir como cofactores, ya que esto depende del número, localización y efectos de los QTLs que existan, y esto no es conocido hasta que no se realiza el mapeo. Demasiados cofactores reducen el poder estadístico para la detección de QTLs y un número muy bajo no permitiría controlar totalmente los efectos del resto de los posibles QTLs que hubiera. En este trabajo se han utilizado los parámetros por defecto que aparecen en el programa (5 cofactores elegidos mediante regresión hacia atrás o "backward regression method", para incluirlos en un modelo estándar y utilizando una ventana de 10 cM). Esto significa que todos los marcadores son incluidos en el modelo, excepto los flanqueantes al segmento que se va a analizar y los situados a distancias menores de 10 cM, y paso a paso se van

eliminando hasta encontrar la combinación de 5 que presente una mayor asociación al carácter. La ventana de exclusión de 10 cM se debe a que con este método se están utilizando otros marcadores como cofactores para eliminar los efectos de otros posibles QTLs; por esta causa la incorporación de marcadores estrechamente ligados a los que flanquean el segmento a analizar eliminaría una gran parte de los efectos del posible QTL que estuviera en el propio segmento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES PARA CONVICILINA Y APIRASA TIPO 1.

La caracterización de genes de interés agronómico se centró en una de las proteínas de reserva de lenteja, la convicilina, y una proteína relacionada con la resistencia a ciertos patógenos, en este caso un gen codificante para apirasa, particularmente la apirasa 1.

Para aislar estos genes se utilizó la amplificación específica por PCR y su secuenciación en distintas entradas de lenteja cultivada o silvestre. Para evitar encontrar variación que pudiera deberse a diferencias entre individuos de una muestra se optó por eliminar el factor poblacional y extraer el ADN siempre de semillas individuales. Así la variación encontrada dentro de un individuo debe atribuirse a la presencia de duplicaciones génicas, dada la alta consanguinidad de la lenteja.

Para el aislamiento del ADN se utilizó el kit de extracción DNeasy Plant mini kit (QUIAGEN) con el que se obtuvo un ADN de elevado peso molecular y poco degradado (Figura 4.1) que fue utilizado en las reacciones de PCR.

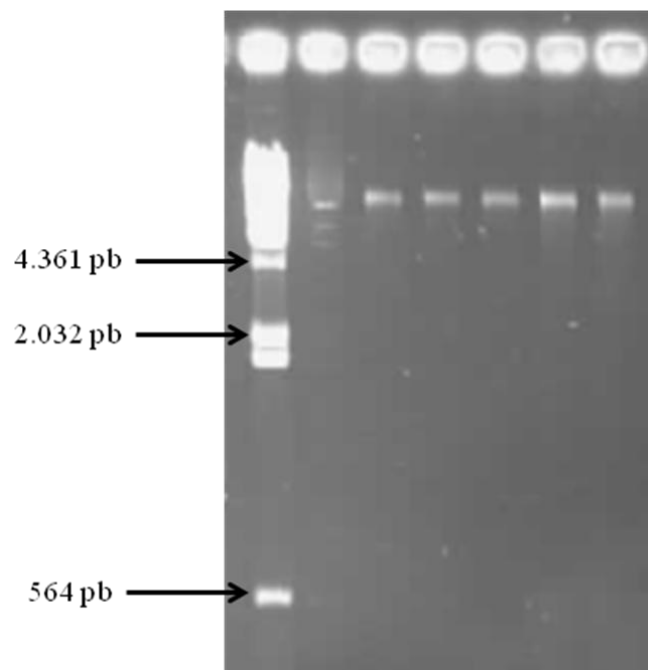


Figura 4.1. ADN genómico de lenteja extraído con el kit DNeasy Plant. Primer carril λ cortado con *Hind*III, resto ADN de diferentes muestras procedentes de España (MALA y ALPO), Iraq (IRQ 52 y IRQ 62) y Turquía (TUR 144 y TUR 590).

4.1.1. Amplificación del gen de convicilina.

La amplificación por PCR del gen de la convicilina se realizó a partir de los cebadores CVC-L2F y CVC-L2R (Tabla 4.1), diseñados por Sáenz de Miera y Pérez de la Vega (1998). Estos oligonucleótidos están situados en el primer y el sexto exón del gen de la convicilina, lo que asegura la amplificación de casi toda su longitud.

La reacción de PCR (55°C de hibridación) permitió amplificar fragmentos de unos 2.100 pb de aspecto uniforme en las 24 muestras utilizadas, aunque la secuenciación posterior reveló que el gen de *L. nigricans* era unos 40 pb más corto. La amplificación del ADN de algunas semillas se muestra en la Figura 4.2.

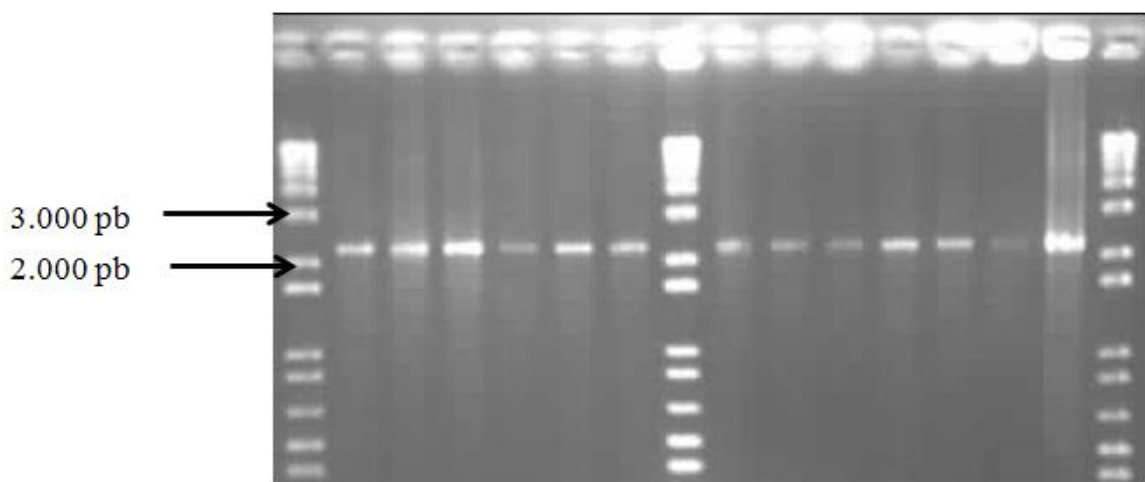


Figura 4.2. Productos de PCR del gen de convicilina. Primer, octavo y decimosexto carril marcador sintético 1kb Plus DNA Ladder, el resto amplicones del gen de la convicilina de las muestras procedentes de España (MALA y ALPO), Iraq (IRQ 52, IRQ 62), Siria (SIR 60 y SIR 780), Turquía (TUR 144, TUR 590 y TUR 918), Irán (IRN 1323, IRN 1349 y IRN 370) y Perú (PER).

4.1.2. Amplificación de genes de apirasa tipo 1.

Los genes codificantes para la apirasa tipo 1 se amplificaron a partir de los cebadores API1_2F y API1_2R (Tabla 4.1). Estos oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia del NCBI de *Pisum sativum* AB038555 (Shibata *et al.*, 2001). De acuerdo con la anotación de la secuencia de guisante los cebadores estarían situados en el primer y último exón (exones 1 y 8 respectivamente) y de nuevo se aseguraría la amplificación del gen en casi toda su longitud.

Mediante PCR (55°C de hibridación) se amplificaron fragmentos en los que se podía apreciar pequeñas diferencias en longitud, los amplificados mostraban entre 1.950 y 2.050 pb según la muestra de lenteja a la que perteneciese el ADN genómico utilizado (Figura 4.3).

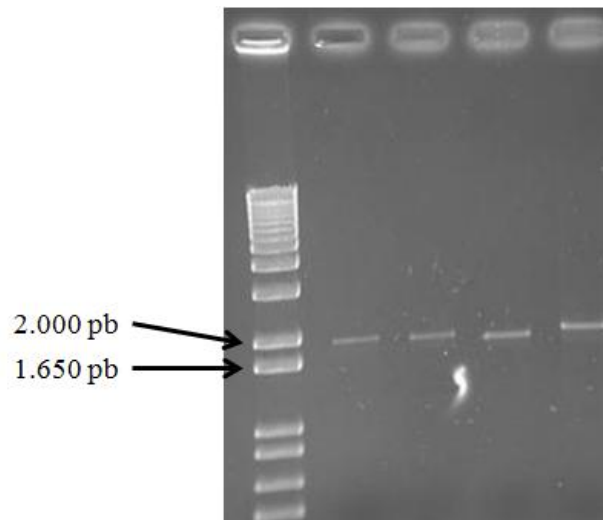


Figura 4.3. Productos de PCR del gen de apirasa tipo 1. Primer carril el marcador sintético 1kb Plus DNA Ladder, resto, *L. c. ssp. orientalis*, LUPA, Iraq 52 y MALA respectivamente.

Tabla 4.1. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR para el gen de la convicilina y la apirasa tipo 1.

NOMBRE	SECUENCIA	TAMAÑO	POSICIÓN	GEN
CVC-L2F	CAACACTCGTCRWWGYTACATG	21	1-20	Convicilina
CVC-L2R	CACATTGTCRTCCGADCCTTC	21	2195-2212	
CVC-6R	GGGGTTTCTTCGTTCTTGTGACT	22	601-623	
API1_2F	GCAATCACYTCCTCCCAATA	20	93-109	Apirasa
API1_2R	CATGCAGCTTCCACAATAGC	20	2.009-2.028	
API1_SF1	CGGTGGTTCTTTTGACGAGT	20	584-600	
API1_SR1	TTTTCTGTCCATTTCTCYTCC	22	1.515-1.536	

4.1.3. Clonación de productos de PCR.

Una vez amplificadas por PCR las secuencias que codifican para los genes de convicilina y de apirasa tipo 1, los amplicones de cada muestra de lenteja se clonaron para analizar las secuencias a nivel nucleotídico.

Se obtuvieron clones con secuencias codificantes para convicilina de 3 muestras silvestres (*L. nigricans* BGE 16873, *L. c. ssp. orientalis* BG 16880 y *L. c. ssp. orientalis* ILW 7) y 21 muestras de lenteja cultivadas (ILL 1323 Irán, ILL1349 Irán, ILL 370 Irán, ILL 144 Turquía, ILL 918 Turquía, ILL 590 Turquía, ILL 780 Siria, ILL 4400 Siria, ALPO España, ILL 0323 Serbia, ILL 1645 Colombia, ILL 1827 Chile, ILL 92 Ucrania, ILL 96 Marruecos, MALA España, ILL 296 Grecia, ILL 3467 Etiopía, P2 PERU, ILL 62 Iraq, ILL 52 Iraq y ILL 60 Siria).

En el análisis de la apirasa tipo 1 se observó que entre muestras cultivadas no había demasiadas diferencias a nivel de secuencia por lo que se analizaron más muestras de lenteja silvestre (*L. c. ssp orientalis* BG 16880, *L. nigricans* BGE 16873, *L. c. ssp orientalis* BG 16880-3, *L. odemensis* ILWL235, *L. tomentosus* 133, *L. ervoides* BG 16877) y únicamente 13 de muestras cultivadas (ILL52 IRQ, Alpo España, ILL72 Chile, ILL60 Iraq, ILL92 Ucrania, ILL0343 Italia, ILL1645 Colombia, ILL3467 Etiopia, Mala España, WA8649090 EE.UU., ILL 0191 Líbano, ILL 3042 India y ILL 0323 Serbia).

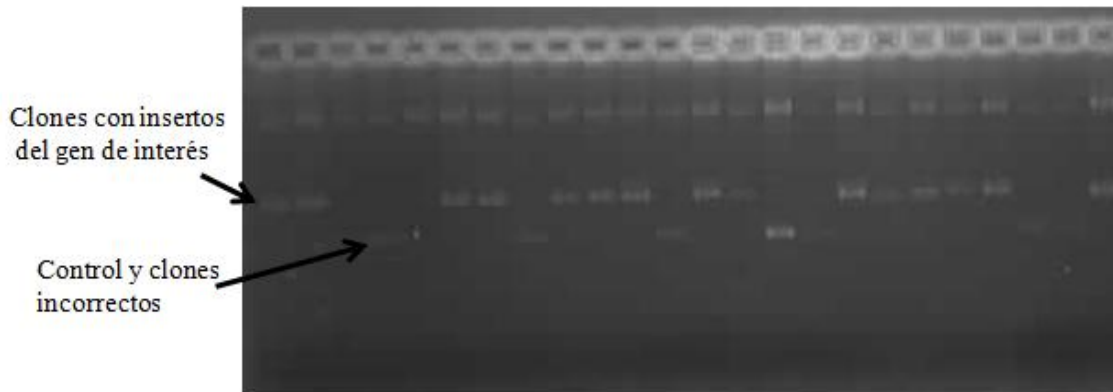


Figura 4.4. Rapid preps de la clonación de la PCR de la muestra MALA para el gen de la convicilina.

4.1.4. Secuenciación.

Las colonias seleccionadas, con los insertos de convicilina y apirasa de las diferentes muestras, se sembraron en medio LB líquido suplementado con ampicilina y fueron incubadas con agitación al menos durante 18 horas para obtener el mayor número posible de células. La secuenciación de los insertos se realizó en el Servicio de Análisis de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. La secuenciación se realizó utilizando el método de los didesoxinucleótidos sintetizando nuevas cadenas de ADN en los dos sentidos a partir de los cebadores universales (que hibridan con los promotores de los fagos T7 y SP6 incluidos en todos los vectores de la serie pGEM) y de los cebadores internos específicos, CVC-6R para el gen de la convicilina y API1_SF1 y API1_SR1 para el gen de la apirasa tipo 1 (Tabla 4.1), diseñados con este fin.

De cada amplificado se procedió a la secuenciación de uno de los clones escogidos. Una excepción lo constituye el amplicón de convicilina obtenido a partir de la muestra IRQ 62; una vez iniciado el análisis de la secuencia se comprobó que difería claramente de los genes de convicilina de otras muestras, por lo que se procedió a secuenciar otros dos clones, y finalmente se obtuvieron dos secuencias diferentes procedentes de la misma planta a las que se denominaron IRQ 62A e IRQ 62B. Para determinar si cada una de estas secuencias tenían su homólogo en el genoma de las lentejas cultivadas se inició la

secuenciación de 5 clones procedentes de la muestra del cultivar MALA. En todos los clones se encontró la misma secuencia.

Las secuencias obtenidas se muestran alineadas en el Apéndice 7.3 utilizando el formato MEGA.

4.1.5. Ensamblado de las secuencias obtenidas.

Con la ayuda del programa MEGA 5 se ensamblaron las diferentes secuencias obtenidas, utilizando como referencia secuencias publicadas. Dado que las secuencias analizadas son semejantes entre sí, junto con el ensamblado se obtuvieron los alineamientos múltiples, realizados principalmente de forma manual, aunque en fragmentos menos semejantes (como intrones) se utilizó la herramienta Clustal que realiza alineamientos globales y progresivos (Thompson *et al.*, 1994) suministrada por el propio programa MEGA 5.

Para el ensamblado del gen de la convicilina se utilizaron como referencia secuencias de lenteja de la especie *L. nigricans* (AM886029, Sáenz de Miera *et al.*, 2008), del cultivar ALPO (AJ276683, Sáenz de Miera y Pérez de la Vega, 2001) y de guisante (X06398, Bown *et al.*, 1988). Para las secuencias de apirasa 1 se utilizó la secuencia de *Pisum sativum* AB038555 (Shibata *et al.*, 2001). En la Figura 4.5 se muestra la estructura de los genes de convicilina, incluyendo la posición y longitud de los diferentes exones e intrones, se incluyen las secuencias de *Pisum* AM886031 y AM886034 y las de *Vicia* AM886048, AM886053 y Y00462 (Sáenz de Miera *et al.*, 2008). Las secuencias de MALA, Iraq 62A e Iraq 62B muestran la misma estructura, sin variaciones en la longitud de sus intrones y exones, al igual que el resto de secuencias de convicilina de muestras de lenteja cultivada pese a que las dos secuencias de Iraq 62 incluyen numerosas diferencias a nivel nucleotídico.

En la secuencia de *L. nigricans* pueden observarse varias diferencias con las muestras de *L. culinaris*. En regiones intrónicas se han producido dos inserciones y dos deleciones de pequeños fragmentos de ADN (entre 5 y 15 pb), este tipo de variación es muy frecuente entre secuencias de géneros diferentes, como puede apreciarse en la Figura 4.5. En la secuencia codificante de *L. nigricans* se ha perdido un triplete en el exón 4 que está presente tanto en *L. culinaris* como en algunas secuencias de otros géneros.

La secuencia de *L. nigricans* tiene una longitud de 6 pb menos en el primer exón que el resto de los genes de convicilina de lenteja. Esta diferencia se debe a una deleción de 30 pb (10 aminoácidos en la proteína) del resto de lentejas y a la deleción independiente de 36 pb (12 aminoácidos) en *L. nigricans* respecto a las convicilinas de otros géneros. Estas alteraciones se han producido en la extensión N-terminal característica de las convicilinas

que es una región evolutivamente inestable, dado el gran número de deleciones, duplicaciones y pequeñas extensiones que se han producido desde la secuencia ancestral (Sáenz de Miera *et al.*, 2008). La diferencia en estructura de esta extensión puede verse en la variación en tamaño de las secuencias de *Pisum* y *Vicia*.

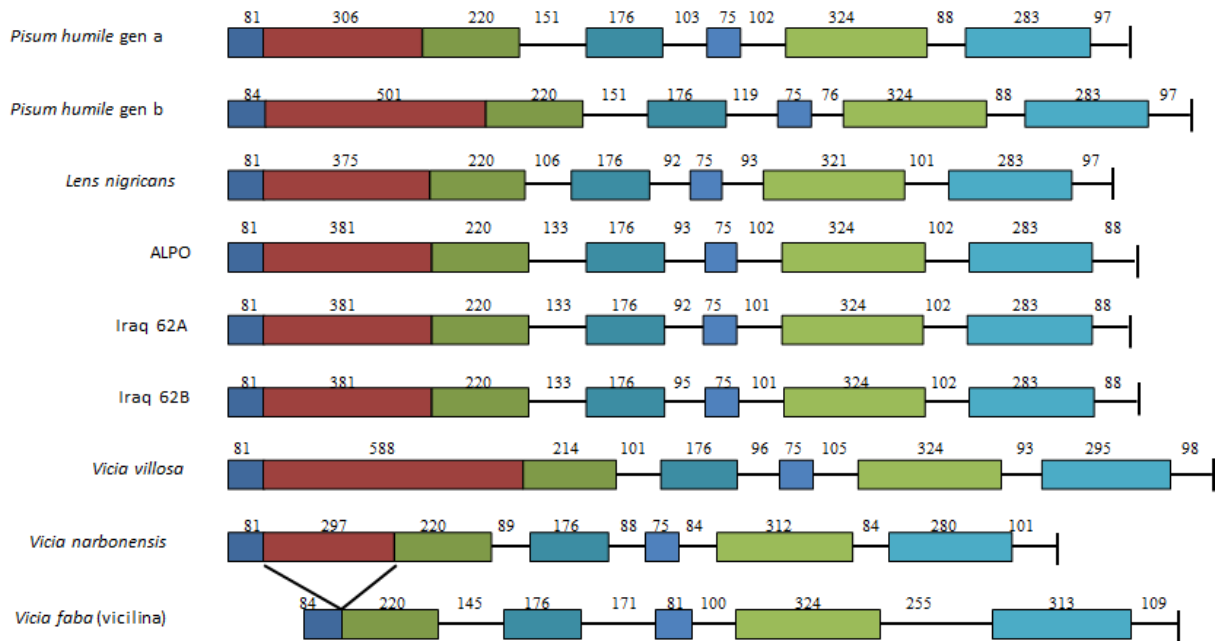


Figura 4.5. Productos de amplificación del gen de la convicilina, se muestra la posición de la inserción del Exón 1 (granate) que diferencia vicilinas y convicilinas. Esta región tiene un tamaño muy variable, como muestran las secuencias de *Vicia* y *Pisum*

La estructura de los genes de apirasa tipo 1 se muestra en la Figura 4.6. No se observan diferencias en la longitud de los 8 exones entre las muestras de lenteja, ni entre éstas y las secuencias AB038669 de *Pisum sativum* y AB098256 de *Vicia faba* procedente de un mensajero. Sí existen diferencias importantes en la longitud de algunos intrones, así el intrón 4 varía entre 104 pb en *L. ervoides*, situación que coincide con *Pisum sativum*, y 166 pb de la variedad de lenteja ALPO.

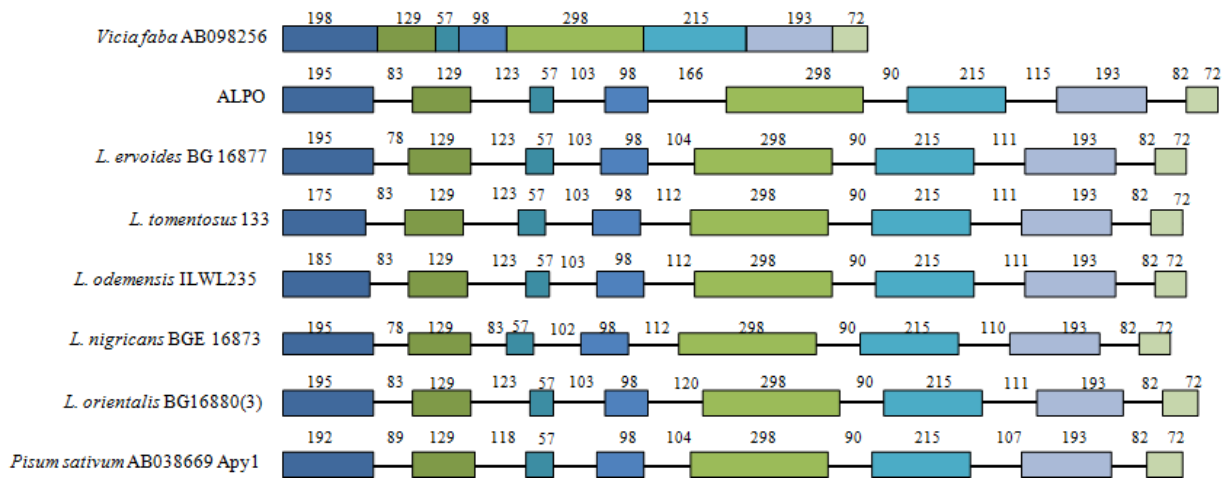


Figura 4.6. Productos de amplificación del gen de la apirasa tipo 1 con los cebadores API1_2F y API1_2R. El número sobre los fragmentos indican el tamaño en pares de bases. Se incluyen las secuencias de la muestra cultivada ALPO, 5 muestras de lenteja silvestre, la secuencia AB038669 de *Pisum sativum* utilizada como referencia además del mensajero AB098256 de *Vicia faba*.

4.1.6. Secuencias de la colección de EST.

Las secuencias AJ276683 de convicilina de lenteja y AB038555 de apirasa de guisante se utilizaron para buscar secuencias homólogas en la colección de secuencias EST del laboratorio de Genética de la Universidad de León, la búsqueda se realizó de forma local utilizando el programa BLAST del NCBI, creando para ello una base de datos específica. Las secuencias buscadas se separaron en exones que se analizaron de forma independiente.

Como era de esperar, no se encontraron secuencias codificantes para convicilina, dado que estas se expresan únicamente en las semillas en formación y se habían utilizado hojas de plantas adultas para la extracción del ARN para obtener la colección de EST. Tampoco se encontraron secuencias codificantes para apirasa de tipo 1, pese a que las plantas mencionadas habían sido sometidas a diferentes condiciones de estrés. Las secuencias codificantes para apirasa 1 parecen ser funcionales, ya que se encontraron dos secuencias homólogas (J1851424 y J1852935) en un transcriptoma de lenteja (Kaur *et al.* 2011).

En la búsqueda local se encontraron secuencias semejantes a la apirasa 1 que pudieron relacionarse con las apirasas de tipo 2 mediante análisis Blast en la base de datos del NCBI. Por ello se utilizó una secuencia de guisante codificante para este tipo de apirasas (AF305783, datos no publicados, Jin y Roux, 2000) y separada en exones para realizar una búsqueda local frente a la base de datos de la colección de EST. La posición de los intrones, no incluidos en la secuencia AF305783, se determinó por comparación con el genoma de *Medicago truncatula*, accesible en el servidor Phytosome.

La búsqueda local de secuencias codificantes para apirasas de tipo 2 permitió localizar 13 EST de la colección con secuencias relacionadas. El ensamblado de las secuencias realizado en MEGA 5 utilizando las secuencias de *Pisum sativum* AF305783 (Jin y Roux, 2000) y AB071370 (Kawahara *et al.*, 2003) permitió detectar dos genes diferentes correspondientes a las apirasas tipo 2A y tipo 2B. La posición de los diferentes EST en los ensamblados se muestra en la Figura 4.7. Mientras que la secuencia de la apirasa 2A se ha reconstruido a partir de numerosos EST y quedan 3 zonas internas sin completar la secuencia de apirasa 2B se ha reconstruido a partir de un único EST (A23602), aunque queda confirmada por otros dos EST y se desconoce la secuencia de los 3 primeros exones.

Puesto que los EST proceden de plantas sometidas a estrés, las secuencias de apirasas de lenteja procedentes del ensamblado de EST pudieran estar relacionadas con la respuesta a condiciones adversas, y por ello se diseñaron oligonucleótidos que permitiesen incluir los genes de apirasas tipo 2A y 2B en el mapa de ligamiento.

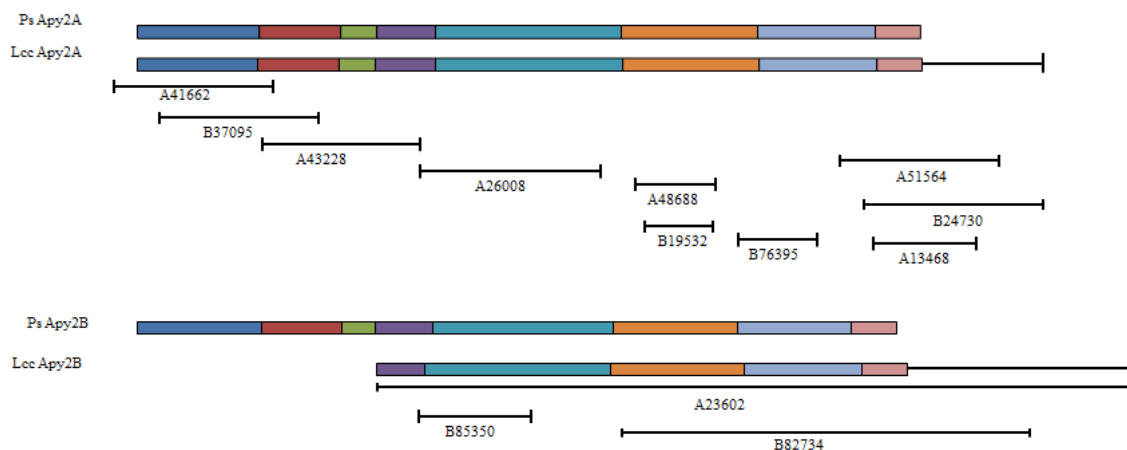


Figura 4.7. Esquema del ensamblado de 13 EST para determinar las secuencias codificantes para apirasas tipo A y B. Se han utilizado secuencias de *Pisum sativum* como referencia.

4.1.7. Análisis de las secuencias.

Por comparación con las convicilinas y apirasas utilizadas como referencia para el ensamblado pudo determinarse la posición de los exones e intrones de las secuencias obtenidas. También pudo comprobarse que en las regiones codificantes no se presentaban tripletes de fin de traducción, lo que indica que todas ellas podrían corresponder a genes funcionales. Las regiones codificantes se tradujeron para estudiar las secuencias de aminoácidos y el uso de tripletes en los genes de convicilina y apirasa.

Relacionado con el uso de tripletes, el análisis de las sustituciones nucleotídicas que no implican cambios de aminoácido (sinónimas) o que sí lo hacen (no sinónimas) permitió estudiar el posible papel de la selección natural sobre estos genes. Finalmente el análisis filogenético de las secuencias ha permitido establecer las relaciones evolutivas entre los genes de las muestras estudiadas.

4.1.7.1. Frecuencia nucleotídica.

Al analizar la cadena de ADN que coincide con los transcritos se puede calcular la proporción de cada uno de los nucleótidos (Tabla 4.2). Estos valores han mostrado diferencias entre convicilinas y apirasas tipo 1. En convicilina el nucleótido más frecuente es la adenina (promedio de 35,7% en el conjunto de las secuencias), la timina también es muy frecuente (27,8%), mientras que el contenido en estos nucleótidos en apirasas se invierten (A = 32,0% y T = 34,1%), pero en ambos casos la proporción de pares AT supera el 63% y la cantidad de citosina no alcanza el 16%.

Tabla 4.2. Porcentaje promedio de nucleótidos presentes en los transcritos completos, en los exones y en los intrones de los genes codificantes para convicilina y apirasa tipo 1 de las diferentes secuencias de muestras de lenteja. También se incluyen los porcentajes de la colección de secuencias EST.

	Convicilina			Apirasa tipo 1			EST
	Completa	Exones	Intrones	Completa	Exones	Intrones	Exones
T	27,8	22,7	43,1	34,1	29,2	42,7	29,2
C	15,5	17,4	9,9	15,7	18,6	10,7	20,7
A	35,7	36,1	34,6	32,0	31,4	33,0	29,4
G	21,0	23,8	12,5	18,2	20,8	13,7	20,7
TA	63,5	58,8	77,7	66,1	60,7	75,6	58,6

Considerando de forma aislada intrones y exones, los intrones son los más ricos en timina (43,1% en convicilinas y 42,7% en apirasas), junto con la adenina alcanzan el 77,7 y 75,6% de pares AT en las secuencias intrónicas de uno y otro gen. En los exones se mantiene el exceso de pares AT, 58,8% en convicilinas y 60,7% en apirasas, aunque en estos elementos el nucleótido más frecuente es la adenina. A partir de los EST de la colección del laboratorio de Genética se ha estimado la frecuencia de cada nucleótido en los mensajeros de lenteja, la estima se ha realizado a partir de $42,67 \times 10^6$ pb y de nuevo puede apreciarse la mayor abundancia de pares AT (58,6%), aunque en este caso la frecuencia de adeninas y timinas es semejante, al igual que lo es la frecuencia de citosinas y guaninas. Por lo tanto, la mayor frecuencia de pares AT es algo general en las secuencias codificantes de lenteja, valor que aún es más acusado la secuencias para apirasas tipo. Verma *et al.* (2013)

encontraron un contenido en pares AT del 60,03% (GC del 39,97%) semejante al encontrado en este trabajo. Estos valores están próximos a los de otras leguminosas con contenidos en GC que varían desde 42,14% en *Lotus* a 39,16% en *Medicago*, pero muy diferente al de otras plantas como arroz (51,64% de pares GC) (Verma *et al.*, 2013).

4.1.7.2. Diversidad nucleotídica.

Se ha calculado la diversidad nucleotídica entre secuencias (π) agrupándolas de tres formas: a) secuencias de *L. culinaris* (incluyendo las formas cultivadas y silvestres), b) sólo las muestras cultivadas, y c) todas las secuencias del género. Este parámetro permite estimar la variabilidad de los genes estudiados. La diversidad se calcula como el promedio de la proporción de diferencias entre todos los pares de secuencias de un grupo y se ha realizado con ayuda del programa MEGA 5.

La Tabla 4.3 muestra la diversidad nucleotídica y el número medio de diferencias encontrados entre las secuencias de lenteja estudiadas considerando a las diferentes muestras de *L. culinaris* como una población, esta población incluye tanto a las muestras cultivadas como a las silvestres de *L. culinaris* spp. *orientalis*. Si se excluyen a las muestras de la subespecie silvestre se analizaría la población de lentejas cultivadas. Finalmente, si se incluyen todas las muestras de lenteja se consideraría a todo el género como una población.

Tabla 4.3. Diversidad nucleotídica entre secuencias de convicilina y apirasa tipo 1 considerando como poblaciones a *L. culinaris*, lenteja cultivada y el género *Lens*.

	Convicilina		Apirasa tipo 1	
	Diversidad nucleotídica	Nº medio de diferencias	Diversidad nucleotídica	Nº medio de diferencias
Secuencias completas	2220 pb		2508 pb	
<i>L. culinaris</i>	0,005821	12,63	0,013447	25,33
Cultivadas	0,005826	12,64	0,013871	26,13
<i>Lens</i>	0,009027	18,84	0,015078	28,09
Secuencias exónicas	1570 pb		1265 pb	
<i>L. culinaris</i>	0,005358	8,25	0,010981	13,75
Cultivadas	0,005342	8,22	0,011024	13,80
<i>Lens</i>	0,008351	12,53	0,012140	14,95

Si se comparan los grupos de *L. culinaris* y lentejas cultivadas puede apreciarse que la diversidad es ligeramente menor dentro de la especie, aunque este grupo incluye dos secuencias de *L. c. orientalis* tanto en convicilina como en apirasa (Tabla 4.3). Añadir las muestras silvestres de la especie a la lenteja cultivada no modifica la diversidad estimada,

las muestras silvestres de *L. culinaris* no son diferentes a las muestras cultivadas de la misma especie. Al añadir *L. nigricans* al análisis de convicilina y otras especies al de apirasa el aumento de diversidad es apreciable (Tabla 4.3). La exclusión de los intrones en el análisis disminuye muy poco la diversidad de las convicilinas, donde 650 pb del alineamiento son intrones, y reduce la diversidad de la apirasa algo más, en este caso la longitud total de los intrones es mayor, 1243 pb.

Las secuencias de apirasa han mostrado mayor diversidad que las secuencias de convicilina en cualquiera de las poblaciones, considerando secuencias completas o únicamente secuencias exónicas. Aunque podría pensarse que proteínas de reserva como convicilinas solo cumplen una función de almacenamiento de aminoácidos para su utilización durante la germinación de la semilla y que por lo tanto podría estar sometido a gran cantidad de mutaciones neutras que aumentasen su diversidad, los resultados obtenidos muestran que esto no es así.

Alo *et al.* (2011) analizaron 22 genes para 308 muestras de lenteja de distintas especies, clasificaron las diferentes muestras según sus semejanzas en 8 grupos distintos y estimaron la diversidad nucleotídica para los 22 genes en conjunto dentro de los diferentes grupos obtenidos y para el conjunto de la muestra. Los dos grupos que incluyen muestras de lenteja cultivada del estudio de Alo *et al.* mostraron diversidades menores que las de convicilina o apirasa 1 (0,00248 y 0,00376) incluso para el conjunto de las muestras, que incluyen 24 entradas de *L. nigricans*, 4 de *L. lamottei* y 45 de *L. ervoides*. La diversidad obtenida en el género también fue inferior que la estimada en este trabajo, 0,00892 frente a 0,009027 en convicilina y 0,015098 en apirasa.

4.1.7.3. Frecuencias de aminoácidos y utilización de tripletes.

Los datos completos de frecuencias de aminoácidos y uso de tripletes de cada secuencia se encuentran en el Apéndice 7.4.

Las lentejas como el resto de leguminosas grano son deficitarias en aminoácidos azufrados, las secuencias de convicilina muestran que efectivamente pocos tripletes codifican para este tipo de aminoácido, uno para metionina y otro para cisteína situados en el primer exón. En la región que tiene en común con la vicilina. En la secuencia de *L. nigricans* son 2 los tripletes codificantes para cisteína, el segundo situado en el quinto exón. También son raros los tripletes codificantes para triptófano (3). Los tripletes codificantes para glutámico (72 a 74), arginina (46 a 48) y leucina (46 a 47) son los más frecuentes. En las secuencias de apirasa tipo 1 los aminoácidos azufrados tampoco son muy frecuentes (6 tripletes para cisteína y entre 4 o 5 para metionina), aunque el aminoácido menos frecuente es el triptófano (2). Los

aminoácidos más frecuentes en esta apirasa son apolares (leucina, 38 a 41; alanina, 34 a 37 y glicina 34 a 36).

Entre los diferentes tripletes que codifican para el mismo aminoácido puede apreciarse que tanto en la convicilina como en la apirasa hay una utilización preferente de tripletes en cuya tercera posición se incluya adenina o uracilo. A modo de ejemplo, de los 4 tripletes codificantes para glicina, GGU y GGA se utilizan más que GGC y GGG en una relación de 3,96 a 0,03 en convicilina y 3,11 a 0,89 en apirasa de tipo 1 (Tabla 4.4). Esta utilización preferente de tripletes con A o U en la tercera posición está claramente relacionada con el alto contenido en pares AT de las secuencias codificantes de lenteja, y posiblemente pueda extenderse a otras leguminosas.

El uso preferente de ciertos codones codificantes para el mismo aminoácido ocurre en diversas especies eucariotas incluyendo plantas, hongos e invertebrados. Diversos estudios realizados en *Drosophila* y *Caenorhabditis* han demostrado que existe correlación entre la frecuencia de algunos codones y la eficacia en la traducción de las proteínas (Kanaya *et al.*, 2001; Percudani, 2001). En *Arabidopsis thaliana* también se ha detectado un uso de codones alternativos relacionados con diferencias en la expresión (Duret y Mouchiroud, 1999), o con diferencias en el tejido en que se expresa (Plotkin *et al.*, 2006; Plotkin y Kudla 2011; Camiolo *et al.*, 2012). Whittle *et al.* (2007) encontraron una asociación entre el uso de codones alternativos para el mismo aminoácido en proteínas expresadas en los órganos reproductores de distinto sexo en trigo y maíz. En diversas especies del género *Citrus* se ha encontrado un uso preferente de tripletes cuyas terceras posiciones son ocupadas por timina o adenina y Xu *et al.* (2013) proponen que este dato es el resultado de una selección positiva producida a nivel de traducción.

Tanto la convicilina como la apirasa tipo 1 son proteínas hidrofílicas, como muestran los plots de hidrofobicidad (Kyte y Doolittle, 1982), aunque incluyen numerosos aminoácidos apolares (Figura 4.8). La región más hidrofílica corresponde con la extensión N-terminal de la convicilina (posiciones entre los aminoácidos 28 y 155), esta región es la que diferencia a la convicilina de la vicilina (Figura 4.5) y en ella se localizan numerosos tripletes GAA, codificantes para glutámico o alguna modificación del mismo triplete, incluyendo GAG (también codificante para glutámico), AGA y AGG (codificantes para arginina). El origen de esta extensión se ha atribuido a una inserción sobre un gen ancestral tipo vicilina y su posterior modificación por duplicación de pequeños fragmentos, además de la expansión de tripletes GAA comentada anteriormente (Sáenz de Miera y Pérez de la Vega, 2001).

Tabla 4.4. Uso promedio de codones en las secuencias de apirasa, convicilina y exón 1 de convicilina. Entre paréntesis el uso relativo de los distintos tripletes que codifican para el mismo aminoácido.

Apirasa							
UUU(F)	10,4(1,40)	UCU(S)	9,8 (1,98)	UAU(Y)	14,7(1,23)	UGU(C)	2,1 (0,70)
UUC(F)	4,5 (0,60)	UCC(S)	4,1 (0,83)	UAC(Y)	9,2 (0,77)	UGC(C)	3,9 (1,30)
UUA(L)	6,7 (1,01)	UCA(S)	6,4 (1,29)	UAA(*)	0,0 (0,00)	UGA(*)	0,0 (0,00)
UUG(L)	9,2 (1,38)	UCG(S)	1,7 (0,34)	UAG(*)	0,0 (0,00)	UGG(W)	2,1 (1,00)
CUU(L)	12,9(1,94)	CCU(P)	7,4 (1,63)	CAU(H)	2,7 (1,01)	CGU(R)	2,8 (1,27)
CUC(L)	6,2 (0,93)	CCC(P)	1,3 (0,29)	CAC(H)	2,6 (0,99)	CGC(R)	1,4 (0,63)
CUA(L)	3,3 (0,50)	CCA(P)	8,7 (1,92)	CAA(Q)	10,4(1,36)	CGA(R)	1,2 (0,56)
CUG(L)	1,6 (0,24)	CCG(P)	0,8 (0,17)	CAG(Q)	4,9 (0,64)	CGG(R)	1,2 (0,56)
AUU(I)	13,3(1,79)	ACU(T)	8,2 (1,49)	AAU(N)	13,7(1,16)	AGU(S)	5,2 (1,05)
AUC(I)	3,3 (0,44)	ACC(T)	3,3 (0,60)	AAC(N)	9,9 (0,84)	AGC(S)	2,5 (0,51)
AUA(I)	5,7 (0,77)	ACA(T)	9,2 (1,66)	AAA(K)	16,5(1,09)	AGA(R)	4,3 (1,95)
AUG(M)	4,5 (1,00)	ACG(T)	1,4 (0,25)	AAG(K)	13,9(0,91)	AGG(R)	2,3 (1,03)
GUU(V)	4,5 (1,89)	GCU(A)	17,1(1,93)	GAU(D)	21,0(1,87)	GGU(G)	10,9(1,27)
GUC(V)	4,5 (0,47)	GCC(A)	2,1 (0,24)	GAC(D)	1,5 (0,13)	GGC(G)	2,5 (0,29)
GUA(V)	4,5 (0,96)	GCA(A)	15,2(1,71)	GAA(E)	12,4(1,27)	GGA(G)	15,8(1,84)
GUG(V)	4,5 (0,67)	GCG(A)	1,0 (0,11)	GAG(E)	7,2 (0,73)	GGG(G)	5,1 (0,6)
Convicilina							
UUU(F)	14,9 (1,30)	UCU(S)	6,3 (0,98)	UAU(Y)	11,5 (1,82)	UGU(C)	1,0 (1,85)
UUC(F)	8,1 (0,70)	UCC(S)	6,0 (0,94)	UAC(Y)	1,2 (0,18)	UGC(C)	0,1 (0,15)
UUA(L)	10,0 (1,28)	UCA(S)	10,0 (1,55)	UAA(*)	0,0 (3,00)	UGA(*)	0,0 (0,15)
UUG(L)	12,8 (1,64)	UCG(S)	4,2 (0,66)	UAG(*)	0,0 (0,00)	UGG(W)	3,0 (1,00)
CUU(L)	9,9 (1,27)	CCU(P)	9,0 (1,51)	CAU(H)	5,0 (0,91)	CGU(R)	6,0 (0,76)
CUC(L)	5,0 (0,65)	CCC(P)	3,0 (0,51)	CAC(H)	6,0 (1,09)	CGC(R)	3,0 (0,38)
CUA(L)	5,0 (0,64)	CCA(P)	10,8 (1,82)	CAA(Q)	25,8 (1,84)	CGA(R)	5,0 (0,64)
CUG(L)	4,1 (0,52)	CCG(P)	1,0 (0,17)	CAG(Q)	2,2 (0,16)	CGG(R)	1,0 (0,13)
AUU(I)	5,9 (0,94)	ACU(T)	2,2 (0,72)	AAU(N)	17,0 (1,07)	AGU(S)	5,9 (0,92)
AUC(I)	6,0 (0,95)	ACC(T)	1,9 (0,63)	AAC(N)	14,8 (0,93)	AGC(S)	6,0 (0,94)
AUA(I)	7,0 (1,11)	ACA(T)	7,0 (2,30)	AAA(K)	23,7 (1,33)	AGA(R)	19,2 (2,44)
AUG(M)	1,0 (1,00)	ACG(T)	1,1 (0,35)	AAG(K)	12,0 (0,67)	AGG(R)	13,0 (1,65)
GUU(V)	11,2 (1,44)	GCU(A)	7,0 (1,26)	GAU(D)	16,8 (1,53)	GGU(G)	11,2 (1,49)
GUC(V)	4,8 (0,63)	GCC(A)	7,0 (1,27)	GAC(D)	5,1 (0,47)	GGC(G)	2,0 (0,27)
GUA(V)	7,0 (0,90)	GCA(A)	6,1 (1,10)	GAA(E)	44,7 (1,22)	GGA(G)	15,8 (2,10)
GUG(V)	8,0 (1,03)	GCG(A)	2,0 (0,36)	GAG(E)	28,3 (0,78)	GGG(G)	1,1 (0,14)
Convicilina (exón 1)							
UUU(F)	6,0 (1,09)	UCU(S)	1,0 (0,42)	UAU(Y)	4,0 (1,98)	UGU(C)	0,9 (1,84)
UUC(F)	5,0 (0,91)	UCC(S)	2,0 (0,82)	UAC(Y)	0,0 (0,02)	UGC(C)	0,1 (0,16)
UUA(L)	2,0 (0,81)	UCA(S)	4,9 (1,96)	UAA(*)	0,0 (0,00)	UGA(*)	0,0 (0,00)
UUG(L)	2,8 (1,15)	UCG(S)	3,0 (1,20)	UAG(*)	0,0 (0,00)	UGG(W)	3,0 (1,00)
CUU(L)	3,9 (1,56)	CCU(P)	5,0 (2,22)	CAU(H)	4,0 (1,14)	CGU(R)	5,0 (1,15)
CUC(L)	3,0 (1,21)	CCC(P)	2,0 (0,91)	CAC(H)	3,0 (0,86)	CGC(R)	3,0 (0,68)
CUA(L)	1,1 (0,44)	CCA(P)	2,0 (0,87)	CAA(Q)	14,8(1,86)	CGA(R)	3,0 (0,70)
CUG(L)	2,1 (0,84)	CCG(P)	0,0 (0,00)	CAG(Q)	1,1 (0,14)	CGG(R)	0,0 (0,00)
AUU(I)	2,9 (1,26)	ACU(T)	0,1 (0,05)	AAU(N)	3,0 (0,87)	AGU(S)	2,0 (0,79)
AUC(I)	2,0 (0,88)	ACC(T)	1,0 (0,63)	AAC(N)	4,0 (1,13)	AGC(S)	2,0 (0,82)
AUA(I)	2,0 (0,86)	ACA(T)	4,0 (2,63)	AAA(K)	8,9 (1,12)	AGA(R)	8,1 (1,86)
AUG(M)	1,0 (1,00)	ACG(T)	1,0 (0,68)	AAG(K)	7,0 (0,88)	AGG(R)	7,0 (1,61)
GUU(V)	2,0 (0,79)	GCU(A)	4,0 (1,99)	GAU(D)	5,9 (1,32)	GGU(G)	4,0 (1,23)
GUC(V)	1,0 (0,40)	GCC(A)	2,0 (0,99)	GAC(D)	3,0 (0,68)	GGC(G)	0,0 (0,01)
GUA(V)	6,0 (2,39)	GCA(A)	1,1 (0,53)	GAA(E)	31,4(1,46)	GGA(G)	8,8 (2,73)
GUG(V)	1,0 (0,42)	GCG(A)	1,0 (0,49)	GAG(E)	11,5(0,54)	GGG(G)	0,1 (0,02)

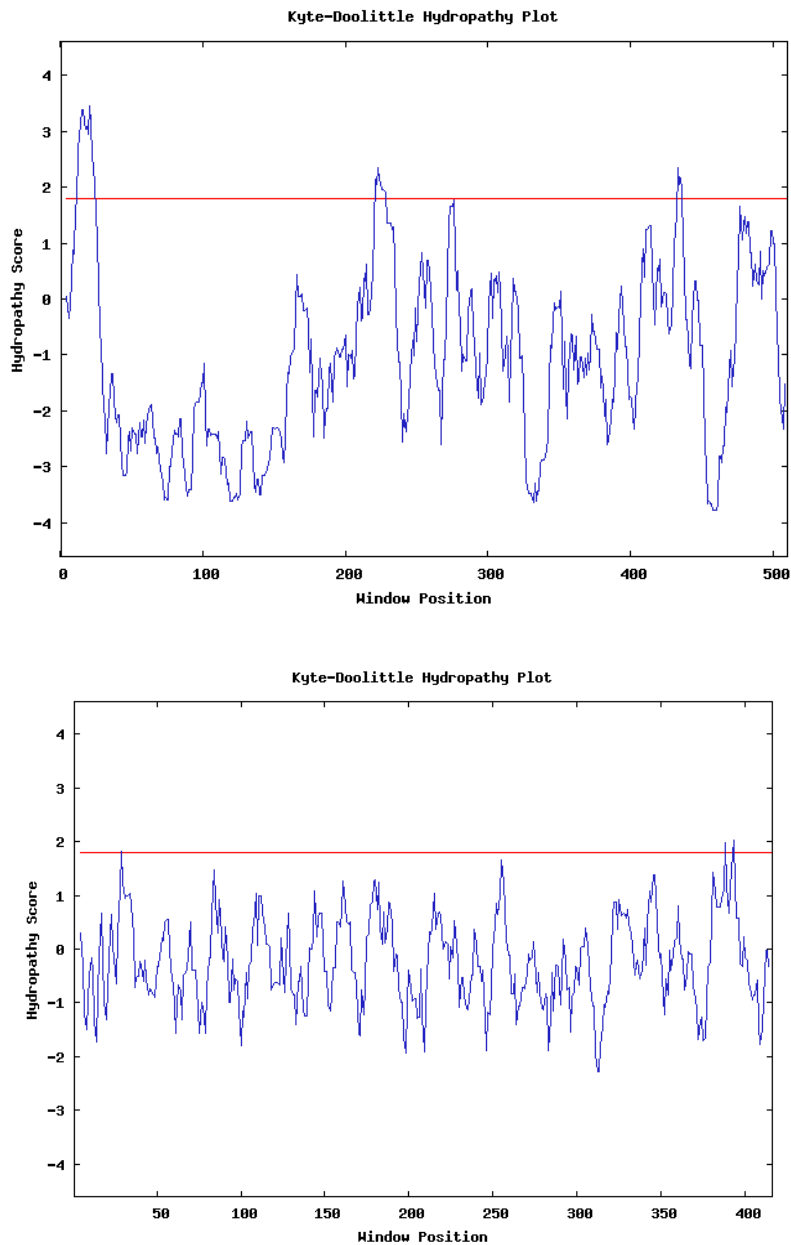


Figura 4.8. Plot de hidrofobicidad de las proteínas codificadas por las secuencias de convicilina (arriba) y apirasa de tipo 1 (abajo) de la muestra MALA. Por debajo de la línea las proteínas muestran dominios hidrofílicos.

4.1.7.4. Intrones.

Los intrones de la convicilina muestran mayor número de sustituciones que los exones, pero apenas se han producido inserciones y deleciones, salvo los mencionados anteriormente en *L. nigricans*, y únicamente se encuentran "gaps" de una o dos bases. Dada la baja diversidad nucleotídica de las convicilinas, los intrones son los responsables de la información filogenética entre estas secuencias.

Los intrones de apirasas muestran mucha mayor variación estructural, no solamente en lentejas, sino respecto a especies de otros géneros relativamente próximos. Así Cannon *et al.* (2003) encontraron que existe una baja conservación entre las secuencias de las regiones no codificantes de *Medicago*, *Glycine* y *Lotus* para la apirasa a pesar de que todos pertenecen a la subfamilia Papilionoideae. Como resultado, apenas es posible determinar las posiciones homólogas en la región no codificante y resulta poco fiable cualquier alineamiento que se realice.

Sin embargo los problemas encontrados en el alineamiento podrían deberse más a la cantidad de inserciones y deleciones (indels) que se han producido que a las sustituciones de nucleótidos. La Figura 4.9 muestra a modo de ejemplo el alineamiento de los intrones 1 y 4 de la apirasa tipo 1. Los indels del intrón 1 parecen separar las muestras de *L. culinaris* en dos grupos, uno de ellos estaría formado por ESP 913, ITL 343, COL 1645, ESP WA, LBN 191 e IRQ 52, y el segundo por las restantes muestras de *L. culinaris*. *L. nigricans* y *L. ervoides* muestran características de los dos grupos anteriores. Sin embargo los análisis filogenéticos de las secuencias completas no confirman la presencia de estos grupos.

Es muy frecuente la presencia del elemento $(TA)_nA$ en los intrones de apirasa tipo 1, se trata de un microsatélite en el que se repite el dinucleótido TA entre 2 y 35 veces. En el intrón 1 aparece hasta 3 veces y está implicado en los dos indels mencionados anteriormente. En el intrón 3 aparece dos veces como $(TA)_2A$, en el intrón 5 $(TA)_5A$, en el intrón 7 de nuevo $(TA)_2A$ sin mostrar variación. En el intrón 6 además de un $(TA)_3A$ no variable se ha encontrado un microsatélite $(TA)_{4-6}TTA$. En el intrón 4, mostrado en la Figura 4.9, el elemento $(TA)_nA$, donde n varía entre 35 en ESP ILL 0323 o LUPA y 2 en *L. ervoides* o 3 en ESP WA, ESP 913, ITL 343 y COL 1645, en todos estos casos el elemento parece algo modificado, posiblemente por la deleción de su parte final.

El microsatélite del intrón 4 parece indicado para el diseño de un marcador que permita localizar el gen codificante para apirasa tipo 1 en un mapa genético. De hecho se diseñaron los oligonucleótidos APY SSR-F y APY SSR-R (Apéndice 1) y se realizaron las primeras pruebas en las muestras de lentejas procedentes de diferentes países que mostraron fenotipos diferentes mediante el análisis de fragmentos por electroforesis capilar.

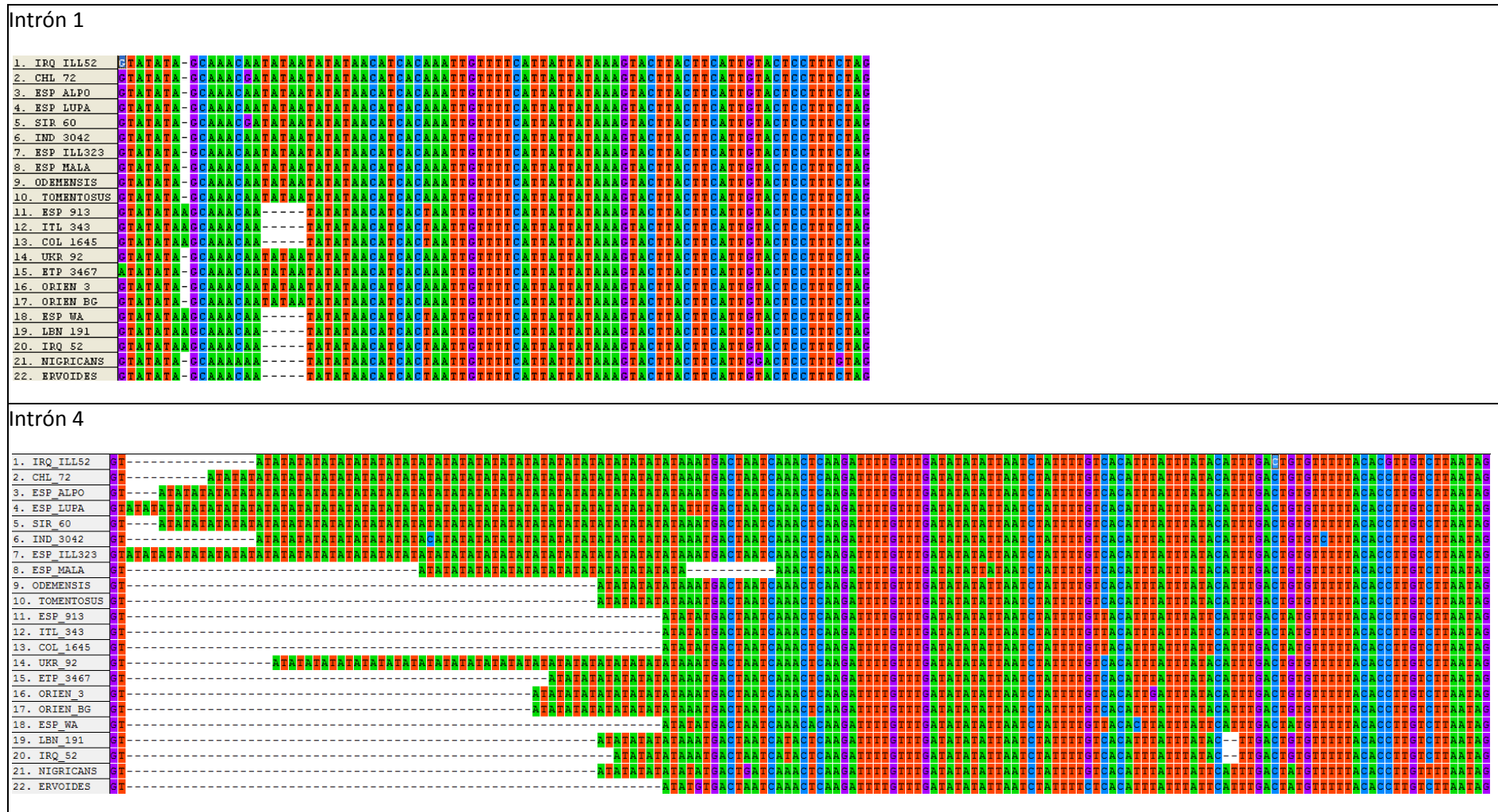


Figura 4.9. Secuencias nucleotídicas de dos intrones de la apirasa tipo 1 procedentes de 22 muestras distintas pertenecientes al género *Lenz*.

4.1.7.5. Filogenias.

Para establecer las relaciones filogenéticas entre secuencias se optó por métodos de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981). En este tipo de análisis se trata de buscar un modelo evolutivo correspondiente a un filograma en el que se establezcan las relaciones evolutivas entre secuencias (topología), las tasas de sustitución nucleotídicas así como otros parámetros que puedan dar mayor credibilidad al modelo (frecuencias de nucleótidos y proporción de sitios invariantes entre otros). Como resultado, los modelos de máxima verosimilitud proporcionan la probabilidad (normalmente su logaritmo) de obtener unos datos, en este caso el alineamiento de las secuencias estudiadas, según los parámetros del modelo estimados.

Dado que existen numerosos modelos para el diseño de árboles filogenéticos y su complejidad puede ser elevada, se trata de escoger el modelo más sencillo posible (con menor número de parámetros) que explique los datos obtenidos con suficiente probabilidad. Para escoger el modelo se ha utilizado el programa ModelTest (Posada y Crandall, 1998) implementado en el programa MEGA, este programa utiliza el criterio (BIC) que considera la verosimilitud (L), el número de parámetros (k) y el número de secuencias (N) de cada modelo ($BIC = -2 \ln L + k \log N$). El modelo con menor valor de BIC es el que se ajusta mejor a los datos y por lo tanto el más adecuado para elaborar el análisis filogenético (Schwarz, 1978).

La Tabla 4.5 muestra los valores de BIC para los 3 conjuntos de datos analizados, secuencias de convicilinas de lenteja, apirasa de diferentes leguminosas y apirasas tipo 1 de lenteja. Cuando se analizan únicamente las secuencias de lenteja se incluyen en los alineamientos tanto exones como intrones, en el análisis de las apirasas en las que se estudian otras leguminosas únicamente se consideran las regiones codificantes.

Para las secuencias de convicilina, el modelo que mejor se ajustó a los datos fue el HKY propuesto por Hasegawa, Kishino y Yano (1985), este modelo es una extensión del de Kimura de 2 parámetros en el que las tasas de sustitución por transición y por transversión son diferentes (Kimura, 1980), además las frecuencias de cada nucleótido en el equilibrio son diferentes a 0,25. Este resultado era esperable, dada la diferencia de frecuencias entre pares AT y GC en las secuencias de convicilina. En las apirasas, tanto considerando diversos genes de leguminosas como los de tipo 1 de lenteja el modelo más adecuado fue el T92 (Tamura de 3 parámetros, Tamura, 1992), de nuevo una extensión del de Kimura de 2 parámetros en el que se considera la proporción de pares GC; nuevamente el desequilibrio de las frecuencias nucleotídicas de los genes de lenteja debe ser tenido en cuenta. Por otro

lado, los modelos escogidos para las apirasas incluyen la distribución gamma como otro factor a considerar. La distribución gamma indica que no todas las posiciones nucleotídicas tienen la misma probabilidad de cambiar y se han establecido 5 categorías de sitios que cambian a ritmos evolutivos diferentes.

Tabla 4.5 Ajuste de diferentes modelos evolutivos a los alineamientos de convicilinas de lenteja, apirasas de leguminosas mediante análisis de máxima verosimilitud (ML). Los modelos están ordenados de menor a mayor complejidad. Se incluye el número fijo de parámetros (k) de cada modelo (aquellos que no varían en función del número de secuencias) y el valor de BIC que permite determinar cuál es el mejor modelo.

Modelo	K	Convicilina		Apirasa Leguminosas		Apirasa tipo I Lentejas	
		BIC	ML	BIC	ML	BIC	ML
JC	0	9244	-4366	17085	-8198	9997	-4769
JC+G	1	9249	-4363	16863	-8081	9970	-4750
JC+I	1	9255	-4366	16878	-8089	10000	-4765
JC+G+I	2	9260	-4363	16869	-8079	9980	-4750
K2	1	9166	-4322	16878	-8089	9915	-4722
K2+G	2	9171	-4318	16639	-7964	9885	-4702
K2+I	2	9177	-4322	16659	-7974	9923	-4721
K2+G+I	3	9182	-4318	16646	-7962	9896	-4702
T92	2	9028	-4247	16826	-8057	9742	-4631
T92+G	3	9031	-4243	16575	-7926	9707	-4608
T92+I	3	9039	-4247	16592	-7935	9753	-4631
T92+G+I	4	9042	-4243	16580	-7924	9717	-4608
HKY	4	9019	-4232	16847	-8057	9760	-4629
HKY+G	5	9022	-4227	16597	-7927	9724	-4606
HKY+I	5	9030	-4232	16614	-7936	9763	-4625
HKY+G+I	6	9033	-4227	16603	-7924	9735	-4606
TN93	5	9029	-4231	16850	-8053	9769	-4628
TN93+G	6	9040	-4227	16602	-7924	9734	-4605
TN93+I	6	9032	-4231	16618	-7932	9777	-4627
TN93+G+I	7	9043	-4227	16607	-7922	9744	-4605
GTR	8	9057	-4229	16865	-8045	9794	-4625
GTR+G	9	9068	-4225	16621	-7918	9760	-4602
GTR+I	9	9059	-4229	16637	-7926	9777	-4611
GTR+G+I	10	9070	-4225	16626	-7915	9770	-4602

Todas las reconstrucciones filogenéticas se han realizado junto a un análisis de remuestreo mediante bootstrap (1000 réplicas) con el objetivo de estimar el soporte estadístico de los diferentes nodos de los árboles obtenidos (Efrom, 1979).

4.1.7.5.1. Filogenia de las convicilinas en lenteja.

En el árbol filogenético obtenido con las secuencias de convicilina (Figura 4.10) pueden apreciarse 3 grupos claramente definidos y con elevado soporte estadístico. El primero de los grupos está formado por la secuencia de *L. nigricans*, que se ha utilizado como outgroup. El segundo grupo incluye a las secuencias IRQ 62A y SIR 60, mientras que el tercero agrupa al resto de secuencias.

De la muestra IRQ 62 se han estudiado dos secuencias diferentes, A y B, tal y como se comentó anteriormente, la primera secuencia obtenida (A) era diferente al resto y se analizaron nuevos clones hasta localizar una secuencia semejante (B). Ambas proceden del mismo individuo, por lo que debe llegarse a la conclusión de que las secuencias IRQ 62A y IRQ 62B son parálogas, originadas por una duplicación que debió producirse antes de la domesticación de la lenteja, dada la posición de las muestras de *L. c. orientalis*. El grupo formado por IRQ 62A y SIR 60 corresponde por lo tanto a un gen parálogo a la convicilina amplificada anteriormente.

Ya se habían descrito copias parálogas de convicilina en otras especies de leguminosas, incluyendo diversas especies del género *Pisum* y en *Vicia faba* (Sáenz de Miera *et al.*, 2008). Esta situación puede tener dos explicaciones de acuerdo a las hipótesis de evolución concertada o de "birth-and-death"; estas dos hipótesis son tratadas en una revisión de Nei y Rooney (2005).

Bajo la hipótesis de evolución concertada, la duplicación que originó las dos copias se habría producido antes de la divergencia de los géneros *Lens*, *Pisum* y *Vicia*, pero los genes parálogos sufrirían fenómenos de evolución concertada y se mantendrían más próximos entre sí dentro de cada género, diferenciándose de los genes surgidos posteriormente por divergencia debida a especiación. La presencia de una única copia en numerosas muestras o en otras especies podría atribuirse a la homogenización completa de las secuencias por evolución concertada, de modo que las dos copias parálogas serían idénticas y por lo tanto indetectables. Una alternativa es que se hayan producido sustituciones en uno de los genes parálogos en la región que hibrida con los cebadores, haciéndolo menos efectivo para la amplificación durante las reacciones de PCR.

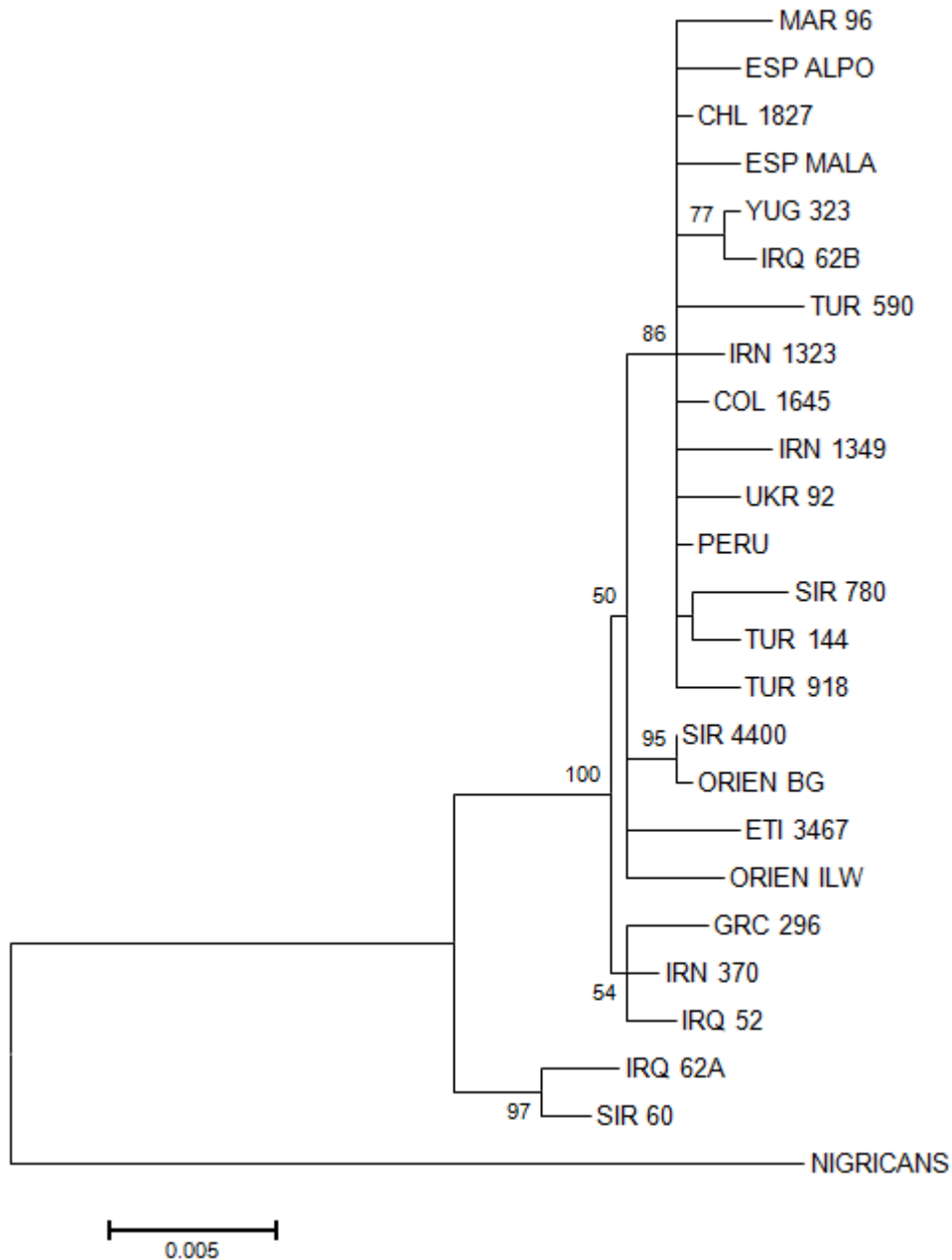


Figura 4.10. Árbol filogenético de convicilinas inferido mediante Máxima Verosimilitud bajo el modelo evolutivo de Hasegawa-Kishino-Yano. El análisis se ha realizado incluyendo intrones y exones. Los valores de bootstrap mayores o iguales al 50% se indican en los nodos. El análisis filogenético fue realizado con el programa MEGA 5. Logaritmo de la verosimilitud -4109, proporción de transiciones frente a transversiones 2,0722.

La segunda hipótesis, evolución por "birth-and-death", implicaría que las duplicaciones ("birth") de los genes de convicilina se han producido de forma independiente en los tres géneros. Mientras que en *Pisum*, las dos copias se mantienen en diferentes especies, en *Vicia* los genes se habrían perdido ("death") en la mayoría de las especies, manteniéndose únicamente en *V. faba*. La muerte de los genes se produciría por su inactivación seguida por una rápida acumulación de mutaciones. En lenteja el nacimiento de las copias parálogas se habría producido después de la divergencia con *L. nigricans* y antes de la domesticación, según indica el árbol filogenético de la Figura 4.8. En todas las muestras podrían existir dos copias parálogas de la convicilina aunque no ha sido posible aislarlas o han desaparecido; en cualquier caso, las mutaciones en la zona de hibridación de los cebadores dificultarían o impedirían su amplificación.

En el grupo en el que se encuentran la mayoría de las secuencias, tercer grupo del árbol, puede observarse que las dos muestras de *L. c. orientalis*, se mezclan con el resto de secuencias de lentejas cultivadas. Este resultado indica que los genes de convicilina no tienen señal filogenética suficiente, sólo dos nodos internos al grupo superan valores de bootstrap del 80%. Aunque la información proporcionada no está apoyada de forma estadística por los resultados, el árbol parece indicar que las lentejas cultivadas no tienen un origen monofilético, así la muestra de SIR 4400 está más próxima a una lenteja silvestre que al resto de lentejas cultivadas, y el nodo que las une tiene una confianza medida como porcentaje bootstrap del 95%.

4.1.7.5.2. Filogenia de las apirasas.

Las secuencias codificantes para apirasas de diferentes leguminosas han permitido elaborar el árbol filogenético de la Figura 4.11. El árbol se ha enraizado en el punto medio entre las apirasas tipo 1 y tipo 2 de guisante (Ps Apy1 y Ps Apy2 en el árbol). Puede apreciarse la presencia de diferentes copias parálogas de los genes codificantes para apirasas.

En *Medicago truncatula*, *Glycine max* y *Lotus japonicus* también se habían descrito diversas copias de genes para apirasa y Cannon *et al.* (2003) habían establecido qué genes eran ortólogos o parálogos entre sí mediante análisis filogenético. En dicho análisis también se incluyeron secuencias de guisante. A partir de los resultados obtenidos por Cannon *et al.*, se escogieron para el análisis las secuencias de *M. truncatula* que permitían definir los diferentes tipos de apirasa para incluirlas en el árbol de la Figura 4.11.

La Figura 4.11 muestra que las apirasas de tipo 1 de lenteja forman un grupo monofilético, con un soporte bootstrap del 98% y están relacionadas con las apirasas de tipo 1 de *Pisum sativum* y *Vicia faba*, con las que forman un grupo monofilético con un soporte del 100%.

Estas secuencias son analizadas con más detalle y utilizando la información de las secuencias intrónicas en la Figura 4.12. En *Medicago* se han descrito 5 genes diferentes de apirasa tipo 1 (Cohn *et al.*, 2001; Cannon *et al.*, 2003), denominadas tipo Gs52 en los trabajos citados de Cannon *et al.*

Las apirasas de tipo 2 de lenteja, obtenidas a partir del ensamblado de las secuencias de los EST, se agrupan en el árbol filogenético con las dos secuencias de apirasas tipo 2 de *P. sativum*. De hecho la nomenclatura utilizada para designar a las secuencias de lenteja está basada en los genes descritos en esta especie. *Medicago* incluye una única secuencia de apirasa tipo 2, que está próxima a las secuencias tipo 2B de guisante y lenteja. La secuencia de tipo 2A presente en *M. truncatula* presenta una gran delección, de modo que sólo se conserva la zona situada a partir del exón 6, por lo que no se ha incluido en los análisis filogenéticos.

Cannon *et al.* (2003) propusieron que los distintos genes de apirasa se han producido por duplicaciones sucesivas. Para estos autores la existencia de genes redundantes para apirasa ha podido permitir mecanismos evolutivos de "co-option", es decir de adquisición de nuevas funciones y modificación de los tejidos y momentos en que se expresa cada una de las copias. Así desde una función inicial relacionada con la fotomorfogénesis y el transporte de fosforo general a todas las plantas, algunas apirasas habrían pasado a realizar una función no demasiado clara en la nodulación de las leguminosas. A partir de genes implicados en la nodulación podrían aparecer nuevos genes que participan en la respuesta a diferentes tipos de estrés, en *M. truncatula* los genes relacionados con la respuesta a estrés serían las apirasas de tipo 1.2, 1.3, 1.5 y 2 (Navarro-Gochicoa *et al.*, 2003).

En el árbol filogenético de la Figura 4.11 se incluyen los 5 genes de *M. truncatula* de tipo 1 o Gs52. Todos ellos son genes parálogos originados a partir de varias duplicaciones. Cuatro de estas copias permanecen ligadas físicamente, hecho que parece apoyar la hipótesis de mini-duplicaciones cromosómicas en tándem (Cannon *et al.* 2003). Sin embargo, debería tenerse en cuenta que las duplicaciones tuvieron que ocurrir antes de la divergencia de *M. truncatula* con la tribu Viceae a la que pertenecen *P. sativum*, *V. faba* y el género *Lens*. Las secuencias de apirasa tipo 1 de la tribu Viceae, incluida la lenteja, parecen ortólogas entre sí y ortólogas al gen Apy1.1 de *M. truncatula*. No se habrían detectado, o no existen, las copias de las especies de la tribu Viceae ortólogas a los otros 4 genes del tipo Gs52 de *Medicago*, lo que permitiría de nuevo plantear la hipótesis de evolución por "birth-and-death" de genes.

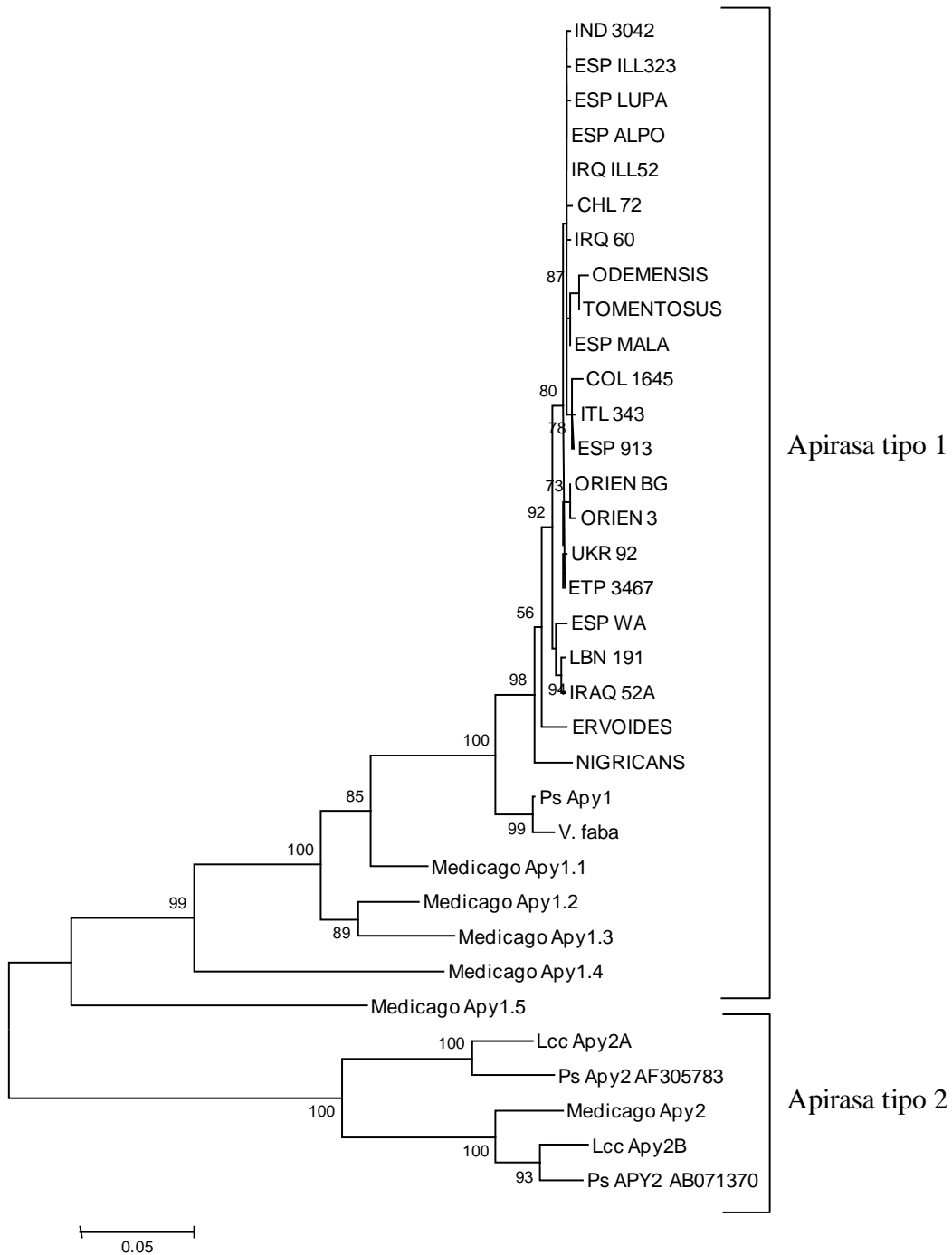


Figura 4.11. Árbol filogenético de apirasas de leguminosas obtenido aplicando el modelo evolutivo de Tamura de 3 parámetros. Como conjunto de datos se ha utilizado el alineamiento de secuencias codificantes. Los valores de bootstrap mayores o iguales al 50% se indican en los nodos. El análisis filogenético fue realizado con el programa MEGA 5. Logaritmo de la verosimilitud -4710, proporción de transiciones frente a transversiones 1,2148. En el modelo se incluyen tasas de sustitución diferentes para 5 categorías de sitios según una distribución Gamma cuyo parámetro alfa es 0,8577.

En la Figura 4.12 se muestra el árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de apirasas de tipo 1 de lenteja, incluyendo tanto exones como intrones, y se ha utilizado el gen de la apirasa 1 de *P. sativum* como "outgroup".

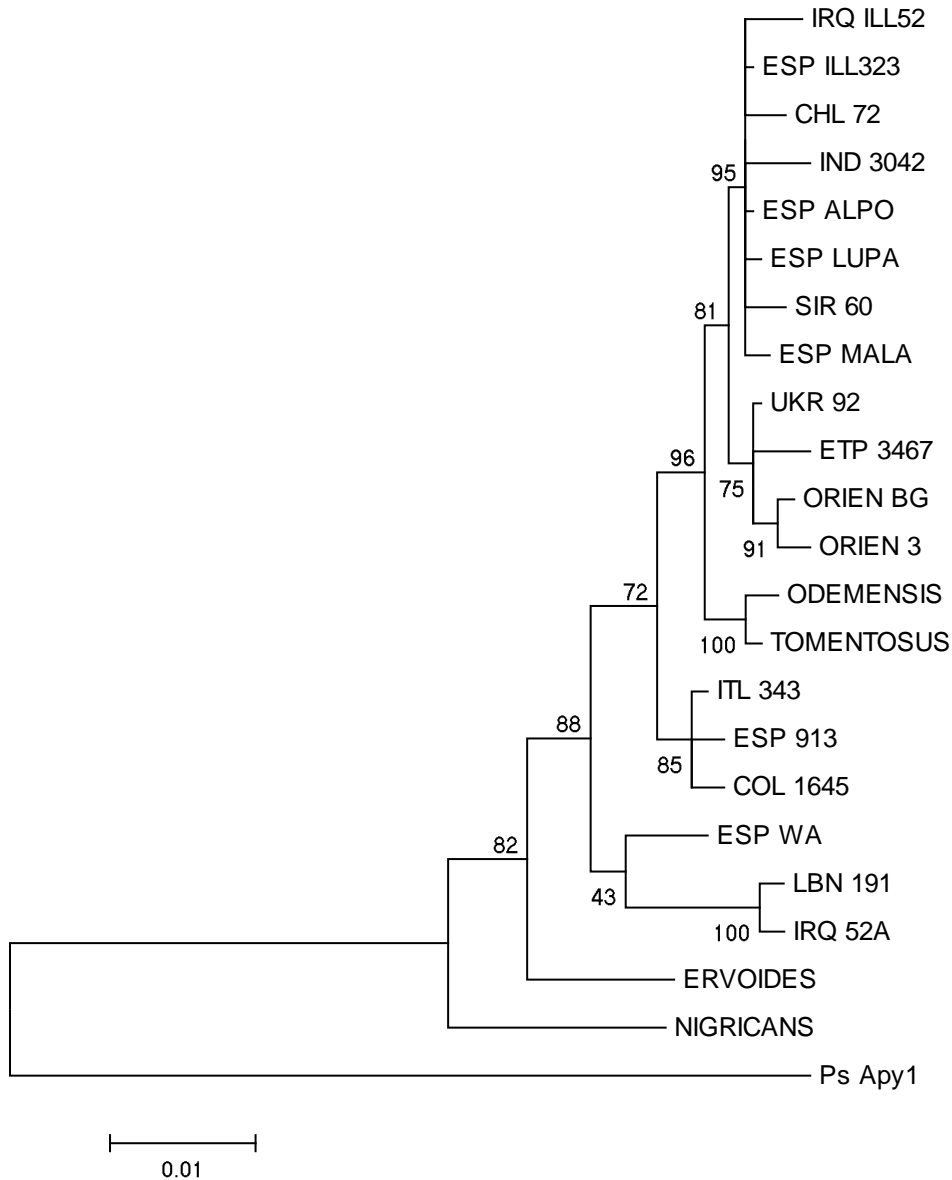


Figura 4.12. Árbol filogenético de apirasas de leguminosas obtenido aplicando el modelo evolutivo de Tamura de 3 parámetros. Como conjunto de datos se ha utilizado el alineamiento de secuencias completas. Los valores de bootstrap mayores o iguales al 50% se indican en los nodos. El análisis filogenético fue realizado con el programa MEGA 5. Logaritmo de la verosimilitud -4419, proporción de transiciones frente a transversiones 1,5764. En el modelo se incluyen tasas de sustitución diferentes para 5 categorías de sitios según una distribución Gamma cuyo parámetro alfa es 0,4215

Las diferentes secuencias de lenteja cultivada quedan agrupadas a partir de un nodo con un soporte bootstrap elevado (88%). Dentro de este grupo quedan incluidas también las muestras silvestres clasificadas como *L. c. orientalis*, *L. odemensis* y *L. tomentosus*. Fuera del grupo se encuentran *L. nigricans* y *L. ervoides*, que serían las formas silvestres estudiadas más alejadas de *L. culinaris* con soporte estadístico del 98% para secuencias exónicas. *L. ervoides* se uniría a *L. culinaris*, aunque el soporte estadístico de bootstrap es muy bajo (56%) cuando se consideran secuencias exónicas, si bien al analizar las secuencias completas (Figura 4.12) el soporte bootstrap alcanza el valor del 82%.

Las dos secuencias de *L. c. orientalis* forman un grupo monofilético, pero en el caso de las apirasas, las secuencias proceden de dos individuos distintos de la misma población (BG 16880). También forman un grupo monofilético *L. odemensis* y *L. tomentosus* (bootstrap 100%). Los dos grupos de lentejas silvestres están agrupadas con diversas muestras de lenteja cultivadas, dejando fuera las muestras de ITL 343, ESP 913, COL 1645, ESP WA, LBN 191 e IRQ 52.

Tanto en los genes de apirasa como en los de convicilina la lenteja cultivada no forma un grupo monofilético, sino que aparece mezclada con varias especies silvestres, por lo que no refleja el proceso de domesticación comúnmente aceptado. Una hipótesis alternativa sería la presencia de genes parálogos dentro de las apirasas de tipo 1 en lenteja, al igual que se ha detectado en los genes de convicilina. Tampoco se ha detectado agrupación por regiones de origen de las lentejas cultivadas, ya que tanto las lentejas denominadas "domesticadas" como "derivadas" se mezclan en las filogenias.

La agrupación de las distintas formas de lenteja mostrada por la apirasa 1 en la Figura 4.10 coincide con la propuesta por Zimniak-Prybylska *et al.* (2001) a partir de la información proporcionada por los patrones electroforéticos de proteínas de reserva de la semilla. Habría tres grupos diferentes, el primero integrado por *L. c. culinaris*, *L. c. orientalis*, *L. tomentosus* y *L. odemensis*, el segundo por *L. ervoides* (no se ha analizado la apirasa tipo 1 de *L. lamottei*) y el tercero por *L. nigricans*.

Alo *et al.* (2011) encontraron resultados semejantes al estudiar 22 genes de 175 entradas de lentejas silvestres y 133 de cultivadas. En este trabajo las muestras de *L. tomentosus* y *L. odemensis* se encuentran junto con muestras de *L. c. orientalis* y éstas a su vez con *L. c. culinaris* en un análisis de agrupamiento mediante el software Structure. Los autores concluyen que únicamente *L. nigricans* y *L. ervoides* están claramente separados entre sí y separados del resto de las lentejas y que la posición taxonómica de *L. tomentosus* y *L. odemensis* es incierta y podrían incluirse como subespecies de *L. culinaris*. También

consideran que la domesticación de la lenteja cultivada no ha sido única o que se han producido diversos cruzamientos entre formas cultivadas y silvestres. Los resultados de este trabajo apoyan esta hipótesis.

4.1.7.5.3. Sustituciones sinónimas y no sinónimas.

La comparación entre la frecuencia con la que llegan a fijarse las sustituciones sinónimas frente a las no sinónimas permite hacer una estima del papel que pueda estar jugando la selección natural sobre genes concretos. Las sustituciones sinónimas son cambios de nucleótidos que no suponen cambio de aminoácido, y por lo tanto serían mutaciones neutras. Las sustituciones sinónimas permiten estimar el número de mutaciones que se han producido entre dos genes y se han mantenido en las secuencias analizadas. Las sustituciones no sinónimas suponen cambio de aminoácido, pueden afectar a la función de la proteína y por lo tanto están sometidas a selección. Las mutaciones que supongan una reducción en la eficacia biológica de los individuos tenderán a ser eliminadas por selección depuradora, aquellas que ofrezcan alguna ventaja tenderán a fijarse por selección positiva.

No es sencillo comparar el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas, dado que es necesario considerar la cantidad de posibles cambios o "sitios" que darían un tipo de sustitución u otro. Nei y Gojobori (1986) han desarrollado un algoritmo que permite identificar cada una de las posiciones de una secuencia como sitio sinónimo o no sinónimo y de este modo estimar el número de cambios sinónimos por sitio sinónimo (dS) y el de cambios no sinónimos por sitio no sinónimo (dN).

El cálculo del número de sustituciones sinónimas y no sinónimas y las estimas de sus proporciones se han realizado con el programa MEGA 5. Los resultados para cada pareja de secuencias se presentan en el Apéndice 7.4.

La Tabla 4.6 muestra el análisis de sustituciones sinónimas y no sinónimas entre diferentes grupos de lentejas. El número de sustituciones entre *L. nigricans* y *L. culinaris* es superior en convicilinas que en apirasas, tanto para sustituciones sinónimas ($dS = 74,19 \times 10^{-3}$ frente a $31,98 \times 10^{-3}$) como no sinónimas ($dN = 31,98 \times 10^{-3}$ frente a $18,20 \times 10^{-3}$). En apirasa *L. ervoides* frente a *L. culinaris* presenta valores semejantes a *L. nigricans* ($dS = 43,01 \times 10^{-3}$ y $dN = 17,04 \times 10^{-3}$). El cociente entre dS y dN ($\omega = dS/dN$) se ha utilizado para medir y caracterizar el tipo de selección, entre parejas de secuencias; así cuando ω toma valores muy superiores a 1 indica una fuerte selección depuradora, permaneciendo tan solo los cambios sinónimos, mientras que un valor inferior a 1 indica una intensa selección positiva. Si el parámetro ω toma el valor de 1, se infiere que no existe selección neta.

Tabla 4.6 Análisis de sustituciones sinónimas y no sinónimas en los genes codificantes para convicilina y apirasa tipo 1 entre distintos grupos de muestras de lenteja.

cvc							
	n	sin	dS	no-sin	dN	dS-dN	$\omega=ds/dn$
<i>nigricans</i> vs <i>L. culinaris</i>	24	24,3	74,19	37,4	31,98	42,21	2,32
<i>orientalis</i> vs <i>orientalis</i>	1	4,0	11,93	3,0	2,50	9,43	4,77
<i>orientalis</i> vs <i>culinaris</i>	44	4,3	12,75	4,1	3,41	9,33	3,94
<i>orientalis</i> vs <i>culinaris-1</i>	39	3,9	11,64	4,0	3,33	8,31	3,74
<i>orientalis</i> vs <i>culinaris-2</i>	4	8,0	23,84	5,0	4,17	19,67	5,89
<i>culinaris-1</i> vs <i>culinaris-1</i>	190	2,7	8,09	4,1	3,44	4,64	2,58
<i>culinaris-2</i> vs <i>culinaris-2</i>	1	3,0	8,93	3,0	2,50	6,43	3,57
<i>culinaris-1</i> vs <i>culinaris-2</i>	40	8,2	24,46	6,1	5,08	19,37	5,01
apy 1							
	n	sin	dS	no-sin	dN	dS-dN	$\omega=ds/dn$
<i>nigricans</i> vs <i>L. culinaris</i>	20	17,9	59,46	17,2	18,20	41,25	3,30
<i>ervoides</i> vs <i>L. culinaris</i>	20	12,9	43,01	16,2	17,04	25,98	2,57
<i>tomentosus</i> vs <i>odemensis</i>	1	2,0	6,74	2,0	2,14	4,60	3,15
<i>tomentosus</i> vs <i>orientalis</i>	2	7,5	25,35	2,5	2,68	22,68	9,74
<i>tomentosus</i> vs <i>culinaris</i>	16	6,8	23,12	3,7	3,91	19,21	8,57
<i>odemensis</i> vs <i>orientalis</i>	2	8,5	28,45	4,5	4,79	23,67	6,06
<i>odemensis</i> vs <i>culinaris</i>	16	7,0	23,32	5,7	6,02	17,30	5,14
<i>orientalis</i> vs <i>orientalis</i>	1	3,0	9,95	1,0	1,05	8,89	9,44
<i>orientalis</i> vs <i>culinaris</i>	32	7,2	23,78	6,3	6,60	17,18	4,37
<i>culinaris</i> vs <i>culinaris</i>	119	5,5	18,07	7,8	8,17	10,00	2,54

n, número de pares de secuencias en la comparación; sin, número promedio de sustituciones sinónimas; no-sin, promedio de sustituciones no sinónimas; dS y dN proporciones de ambos tipos de sustituciones por cada 1000 sitios.

En la tabla *culinaris* se refiere a las muestras cultivadas, *culinaris-1* corresponde a las secuencias de convicilina homólogas a IRQ 62B (mayoritarias), y *culinaris-2* a las homólogas a IRQ 62A.

En este caso ω ha tomado valores entre 2,32 y 3,30 según el gen analizado, lo que indica que dS es entre 2,3 y 3,3 veces superior a dN y puede interpretarse como que en la evolución de estas secuencias ha existido una selección depuradora no demasiado intensa o la selección depuradora ha estado acompañada por cierta selección positiva.

En las secuencias de apirasa de tipo 1, las sustituciones sinónimas y no sinónimas entre *tomentosus* y *odemensis* el parámetro $\omega = 3,15$ muestra una actuación de la selección semejante a lo mostrado entre *L. nigricans* o *L. ervoides* y *L. culinaris*. Las muestras de *tomentosus* u *odemensis* frente a *orientalis* o frente a cultivadas muestran una relación entre sustituciones sinónimas y no sinónimas mucho mayor, entre 5,14 y 9,74, lo que significa que

la selección depuradora juega un papel más importante en estas secuencias. Esta selección depuradora intensa supone un menor número de sustituciones total, y podría explicar por qué *tomentosus* y *odemensis* aparecen junto a las muestras de *L. culinaris* en la filogenia de las apirasas y no en un grupo diferenciado.

Al considerar las sustituciones en las convicilinas dentro de *L. culinaris* se han considerado dos grupos de secuencias dentro de las lentejas cultivadas atendiendo a los dos genes parálogos encontrados en la muestra IRQ 62. La proporción de sustituciones no sinónimas no varía demasiado, aunque es superior en las comparaciones en las que intervienen los genes del grupo de la secuencia IRQ 62A (*culinaris-2* en la tabla). Pero la proporción de sustituciones sinónimas dS es hasta tres veces mayor en las mismas. $23,84 \times 10^{-3}$ o $24,46 \times 10^{-3}$ frente a $8,09 \times 10^{-3}$ o $11,64 \times 10^{-3}$. Esta diferencia parece indicar que la duplicación que originó las copias parálogas debe ser bastante antigua. De hecho Sharpe *et al.* (2013) estimaron el número de sustituciones sinónimas ente *L. culinaris* y *L. ervoides* y encontraron un rango de dS para la mayoría de los genes que se sitúa entre 10^{-3} y 20×10^{-3} . Rango inferior al mostrado por los genes parálogos de *L. culinaris*, aunque la estima de Sharpe *et al.* parece muy baja considerando los valores de dS encontrados entre *L. nigricans* y *L. culinaris* en este trabajo. Los parámetros ω estimados entre *orientalis* y *culinaris-2* o entre *culinaris-1* y *culinaris-2* son los más elevados en las comparaciones entre secuencias de convicilina, 5,89 y 5,01 respectivamente, lo que únicamente apunta a una selección depuradora intensa, las copias parálogas seguirían desarrollando la misma función y las proteínas de reserva resultantes serían muy semejantes.

La proporción de sustituciones sinónimas entre secuencias de apirasa tipo 1 dentro de la especie *L. culinaris* es elevada ($23,78 \times 10^{-3}$, $18,07 \times 10^{-3}$), superior a lo descrito por Sharpe *et al.* (2013) entre especies y superior también a lo encontrado entre genes ortólogos de convicilina en la misma especie. Aunque también son elevadas las proporciones de sustituciones no sinónimas ($6,60 \times 10^{-3}$, $8,17 \times 10^{-3}$). Dentro de las lentejas cultivadas ω toma el valor promedio más bajo entre las secuencias estudiadas (2,54), este dato podría estar apuntando a la existencia de cierta selección positiva entre las apirasas de las lentejas cultivadas.

Xu *et al.* (2013) analizaron el uso de tripletes y los cambios sinónimos y no sinónimos en 84 genes diferentes de 7 especies del género *Citrus*, e interpretan los datos obtenidos como el resultado de una selección positiva relacionada con un alto contenido en pares AT en las secuencias de estas especies y el uso preferente de tripletes con adenina o timina en la tercera posición. La eficacia en la traducción sería el motor de la selección positiva en estas especies.

En lenteja también existe un desequilibrio en la composición de nucleótidos, que afecta a convicilinas y apirasas entre otros genes. Este desequilibrio queda reflejado en la utilización preferencial de ciertos tripletes que codifican para los mismos aminoácidos. Si al igual que se ha propuesto en *Citrus*, la selección positiva en lenteja afecta a la eficacia de traducción más que a la funcionalidad de las proteínas, los cambios identificados como sinónimos por el método de Nei y Gojobori no producirían alelos realmente neutros. Por el mismo motivo, la tasa de sustituciones sinónimas variaría en distintas líneas evolutivas y no permitiría estimar la tasa real de mutación. En definitiva, la interpretación de los valores de $\omega = dS/dN$ debe hacerse con cuidado, ya que tanto las sustituciones sinónimas como no sinónimas estarían sometidas al mismo mecanismo evolutivo de selección positiva asociada al proceso de traducción.

4.2. MARCADORES MOLECULARES.

El estudio de las dos líneas parentales del cruzamiento Lupa x *Lens culinaris* ssp. *orientalis*, se realizó empleando un total de 115 parejas de cebadores (Apéndice 1) utilizando distintas técnicas para la detección de polimorfismos. Los cebadores se diseñaron a partir de datos de distinta procedencia. Un grupo de ellos se sintetizaron con el objetivo de validar los cambios de expresión observados mediante la técnica de SuperSAGE en respuesta a la infección con *Ascochyta* de determinados genes y mapear los loci correspondientes; un segundo grupo se diseñaron a partir de las secuencias génicas obtenidas en este trabajo (convicilina, apirasa); el tercer grupo se basó en secuencias anotadas de la genoteca obtenida en el Área de Genética y elegidas por el posible papel de los genes correspondientes en las respuestas a diferentes tipos de estrés; en último lugar están los cebadores utilizados para amplificar secuencias de *Vicia* relacionadas con la respuesta de resistencia a *Ascochyta* (Madrid *et al.*, 2013).

El ADN extraído de las líneas parentales se amplificó con las parejas de cebadores mediante PCR específica para intentar visualizar diferencias ya sea en el tamaño o presencia o ausencia de amplicones. De las 115 parejas de cebadores, 16 no dieron lugar a ningún producto. De las 99 parejas de cebadores que produjeron amplicones, se escogieron sólo las 28 que dieron lugar a una banda intensa de manera repetible. De estas 28 parejas de cebadores, 6 produjeron amplicones de distintos tamaños entre los parentales y se analizaron directamente mediante PCR. Los amplificados de las 22 parejas de cebadores restantes fueron digeridos con varias endonucleasas de restricción para detectar posibles diferencias de secuencia entre los parentales; con esta técnica se hallaron 6 marcadores

tipo CAPS. Dentro de las secuencias para las que no se encontraron diferencias, estaban los genes codificantes para convicilina, apirasa tipo 2A y los marcadores P73 y P51982; estos cuatro loci resultaban de especial interés para este trabajo y se pretendía incluirlos en el mapa genético. La convicilina es una proteína de reserva de la semilla de lenteja, y la apirasa tipo 2A y las proteínas codificadas por los genes relacionados con los marcadores P73 y P51982 podrían estar implicadas en la resistencia al hongo *Ascochyta lentis*. Para poder detectar el polimorfismo en estas secuencias se utilizó una técnica relativamente nueva, la desnaturalización de alta resolución (High Resolution Melting, HRM), con la que se pudo abordar el objetivo de determinar la posición de estos genes en el mapa genético de lenteja.

4.2.1 PCR específica.

Como se ha mencionado previamente, de las 115 parejas de cebadores probadas, solo se obtuvieron 6 marcadores polimórficos que presentaban diferencias de longitud (Tabla 4.7), estas 6 parejas de cebadores fueron diseñadas sobre secuencias exónicas de lenteja y están orientados para amplificar zonas intrónicas. La posible localización de intrones se determinó por la comparación de secuencias expresadas en lenteja con las secuencias homólogas correspondientes del genoma de *Medicago truncatula*. De acuerdo con la anotación del genoma, los genes homólogos de *Medicago* presentarían las funciones que se indican en la Tabla 4.7. Estos 6 marcadores se estudiaron en los 94 individuos de las líneas RILs F₇ proveniente del cruce de los parentales Lupa x *Lens culinaris* ssp. *orientalis*. Los 6 marcadores presentaron la segregación 1:1 esperada en las líneas RIL (Tabla 4.8). En la Figura 4.13 se muestra un ejemplo de segregación del marcador P670.

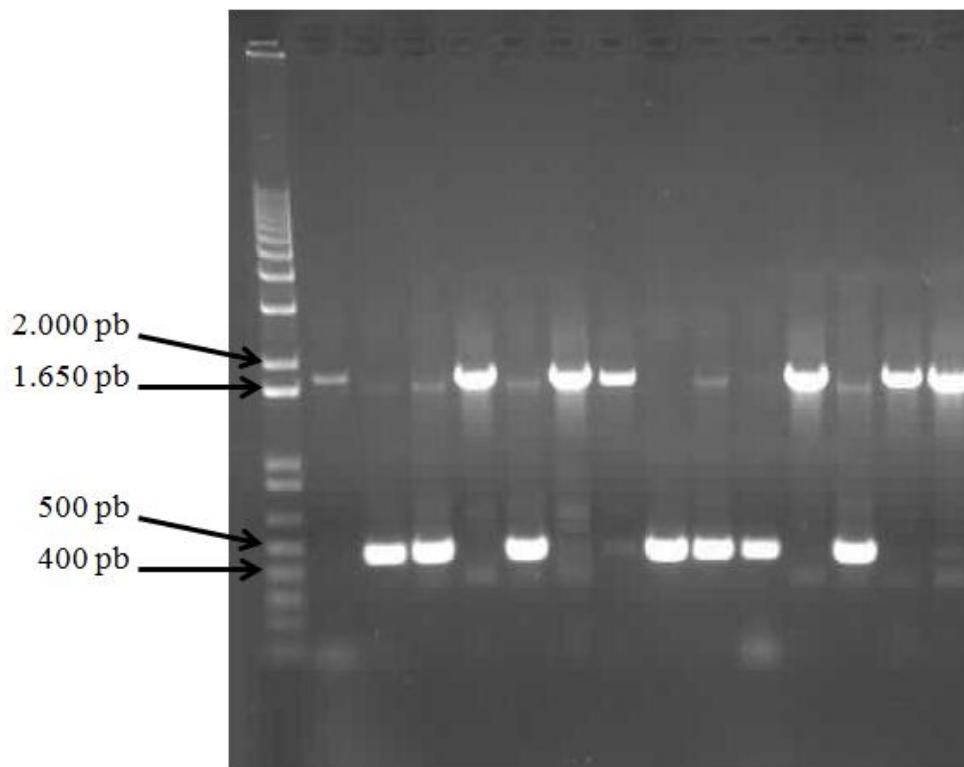
Tabla 4.7. Relación de marcadores de PCR específica y tamaños de los amplicones que se producen en cada uno de los parentales (Lupa y *Lens culinaris* ssp. *orientalis*).

Marcador de PCR específica	Posible función del gen	Tamaño	
		Lupa	<i>L. c. ssp. orientalis</i>
P453	Esterasa/lipasa APG	2.000	1.800
P670	Subunidad 6B de citocromo C oxidasa	1.800	500
P707	Proteína de unión al ARN	2.000-850	500
P51263	Subunidad TIM22 de una translocasa mitocondrial	1.800	1.650
P51529	Alcohol deshidrogenasa	2.500	2.500-200
P51300	Proteasa Cl-ATP dependiente	1.800	2.000

Tabla 4.8. Relación de marcadores con las segregaciones correspondientes observadas y valores de chi-cuadrado en el supuesto de segregación 1:1. Parentales Lupa y *Lens culinaris* ssp. *orientalis*.

Marcador	Nombre	Segregación		χ^2
		alelo Lupa	alelo <i>L. c.</i> ssp. <i>orientalis</i>	
PCR específica	P453	37	42	0,3165
	P670	48	42	0,4000
	P707	46	44	0,0444
	P51263	46	47	0,0108
	P51529	41	48	0,5506
	P51300	49	43	0,3913
CAPS	Apirasa 2B	40	44	0,1905
	Dehidrinasa	41	49	0,7111
	P460	39	53	2,1304
	P500	44	47	0,0990
	P50814	48	42	0,4000
	P52052	40	54	2,0851
SNP mediante HRM	Convicilina	36	57	4,7419*
	Apirasa 2A	39	48	0,9310
	P73	10	11	0,0476
	P51982	49	43	0,3913

* Marcador con segregación distorsionada

**Figura 4.13.** Producto de PCR específica del marcador P670 (relacionado con el gen codificante para la subunidad 6B de citocromo C oxidasa). Primer carril el marcador 1kb Plus DNA, segundo carril parental LUPA, tercer carril parental *Lens culinaris* ssp. *orientalis* y del cuarto al último carril las líneas RIL 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

4.2.2 Análisis de secuencias de restricción amplificadas y polimórficas (CAPS).

Se procedió al estudio de los productos de amplificación obtenidos a partir de las parejas de cebadores que habían producido un amplicón de banda única y nítida, seleccionándose 22 parejas de cebadores. Para ello se utilizaron nueve endonucleasas de restricción de corte frecuente que reconocen 4 nucleótidos (*AluI*, *DpnII*, *HaeIII*, *HinP1I*, *HpaII*, *HpyCH4IV*, *NlaIII*, *MseI* y *Taq^αI*). Se eligieron endonucleasas de este tipo porque así se aumenta la probabilidad de encontrar polimorfismos. Se encontró un total de 6 marcadores polimórficos que presentaron patrones de bandas específicos en cada uno de los parentales (Tabla 4.9 y Figura 4.14 para un ejemplo).

Tabla 4.9. Relación de marcadores CAPS obtenidos en el estudio con enzimas de restricción (Parentales Lupa y *Lens culinaris* spp. *orientalis*)

Marcador CAPS	Tamaño del amplicón (pb)	Enzima utilizada	Secuencia diana (5'→3')	Bandas específicas (pb)	
				Lupa	<i>L. c. ssp. orientalis</i>
Apirasa 2B	2.400	<i>Taq^αI</i>	TCGA	1.700 y 700	2.400
Dehidrina	575	<i>HpaII</i>	CCGG	426 y 149	575
P460	1.000	<i>NlaIII</i>	CATG	*300 y 150	*300 y 200
P500	900	<i>MseI</i>	TTAA	*650	*500
P50814	2.000	<i>HinP1I</i>	GCGC	2.000	1.500 y 500
P52052	200	<i>MseI</i>	TTAA	200	150 y 50

*Se observaron bandas adicionales difusas que no se han tenido en consideración.

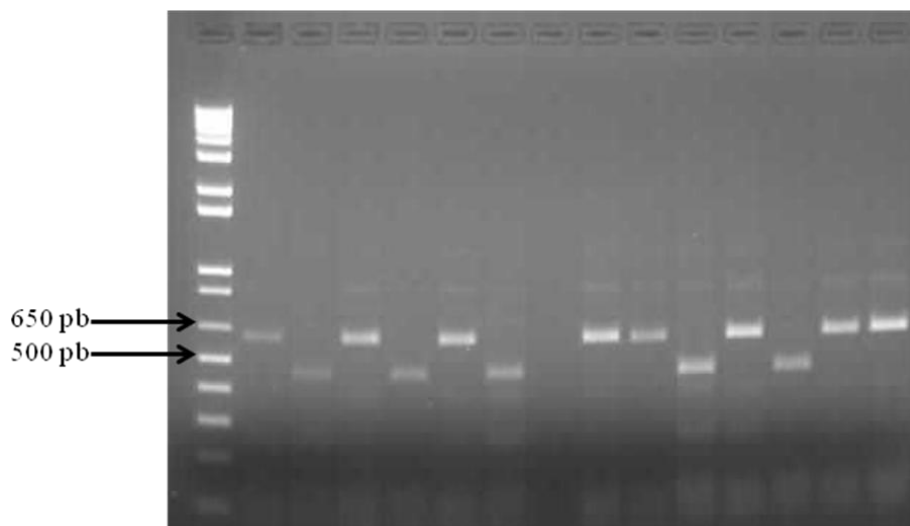


Figura 4.14. Producto de PCR del marcador P500 (gen codificante para la uridilato kinasa) digerido con la enzima de restricción *MseI*. Primer carril el marcador 1kb Plus DNA, segundo carril el parental Lupa, tercer carril el parental *Lens culinaris* spp. *orientalis* y del cuarto al último carril las líneas RIL 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, y 12.

Posteriormente, se analizaron estos 6 marcadores CAPS en las 94 líneas RIL. De esta forma se obtuvieron marcadores correspondientes a secuencias codificantes para apirasa tipo 2B, dehidrina, P460 (proteína hipotética), P500 (uridilato kinasa), P50814 (proteína hipotética) y P52052 (proteína no caracterizada altamente conservada en leguminosas), observándose una segregación 1:1 para todos ellos (Tabla 4.8).

4.2.3 Desnaturalización de alta resolución (High Resolution Melt, HRM).

Dentro de las 16 parejas de cebadores que produjeron amplicones de banda única y en las que no se detectó polimorfismo con las enzimas de restricción, se encontraban cuatro secuencias que podrían estar relacionadas con la calidad de la semilla y la resistencia a factores de estrés. Estos fueron, el gen codificante para convicilina (proteína de reserva), la apirasa tipo 2A, P73 y P51982 (posibles genes que pudieran estar relacionados con la resistencia al hongo *Ascochyta lentis*). Debido a ello, se clonaron los cuatro productos de amplificación en el vector pGEM[®]-T, se procedió a la transformación de *E. coli* y se secuenciaron para comprobar si existían o no diferencias en las secuencias nucleotídicas. Se compararon las secuencias de los parentales para convicilina, apirasa tipo 2A, P73 y P51982 (Figura 4.15, alineamiento de las secuencias del gen codificante para la convicilina y Apéndice 2 el resto de marcadores). Una vez alineadas las secuencias obtenidas a partir de los parentales se comprobó que tenían un valor de identidad mayor del 95%, encontrándose un máximo de 6 SNPs para cada gen, si bien no resultaron adecuados para su análisis como CAPS, por lo que se diseñaron nuevos cebadores específicos que amplificasen una región no mayor de 250 pb que incluyera al menos un SNP para utilizarlos en un análisis HRM y así poder identificar patrones de curvas específicas para los parentales en cada uno de los genes estudiados (en la Figura 4.15 se muestra el resultado obtenido para el gen convicilina y en el Apéndice 2 para el resto de marcadores). Posteriormente, se analizó cada uno de los marcadores con la técnica HRM en los 94 individuos de las líneas RIL (Figura 4.16), obteniéndose en todos ellos la segregación esperada 1:1 (Tabla 4.8).

Lupa	AGTGAATAC	AAATAATGGC	GACCACAATC	AAATCGCGAT	TTCCACTTTT	GTTGTTGCTG	GGAATTATAT	TCCTGGCCTT	CGTCTGTGTT	GCTTATGCAA	100
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	AGTGAATAC	AAATAATGGC	GACCACAATC	AAATCGCGAT	TTCCACTTTT	GTTGTTGCTG	GGAATTATAT	TCCTGGCCTT	CGTCTGTGTT	GCTTATGCAA	100
Lupa	ATGACGATGA	AGGTTTCAGAA	CCTAGGGTAC	CAGGACAAAG	AGAAAAGAGG	CGCCAAGAGG	GTGAGAAAAGC	GGAGCAAAGC	CGAGAACAAA	GTCCTGGACA	200
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	ATGACGATGA	AGGTTTCAGAA	CCTAGGGTAC	CAGGACAAAG	AGAAAAGAGG	CGCCAAGAGG	GTGAGAAAAGC	GGAGCAAAGC	CGAGAACAAA	GTCCTGGACA	200
Lupa	ATGGAGACCT	TCGCATGGAA	AGGAAGAAGA	TGAAGAAGAG	AAGGAACAAA	AGGAAGCTCA	ATCCGGACGT	GAAAAATGGG	AAAGAAAGGA	AGATGAGGAA	300
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	ATGGAGACCT	TCGCATGGAA	AGGAAGAAGA	TGAAGAAGAG	AAGGAACAAA	AGGAAGCTCA	ATCCGGACGT	GAAAAATGGG	AAAGAAAGGA	AGATGAGGAA	300
Lupa	AAAGTAGTAG	AAGAAGAAGA	AGGAGAGTGG	AGAGGAAGCC	AACGTCATGG	AGATCCTGAA	GAAAGGTCAA	GGCAAAGGCA	TAGAGAGGAG	AAAACAAAAA	400
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	AAAGTAGTAG	AAGAAGAAGA	AGGAGAGTGG	AGAGGAAGCC	AACGTCATGG	AGATCCTGAA	GAAAGGTCAA	GGCAAAGGCA	TAGAGAGGAG	AAAACAAAAA	400
Lupa	GGCAAGTAGA	AGAACAGACG	GAGGAAAAAG	ACAGGCCTA	TCAACATGAA	GGAAAGGAGG	AAGAAACATC	GTCAGAGTCA	CAAGAACGAA	GAAACCCCTT	500
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	GGCAAGTAGA	AGAACAGACG	GAGGAAAAAG	ACAGGCCTA	TCAACATGAA	GGAAAGGAGG	AAGAAACATC	GTCAGAGTCA	CAAGAACGAA	GAAACCCCTT	500
Lupa	TTTATTCAAG	TCTAACAAAGT	TCCTCACACT	ATNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	GTTTCAGACTT	ATTTGAAAAA	600
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	TTTATTCAAG	TCTAACAAAGT	TCCTCACACT	ATTTGAAAAA	GAAAAATGGT	ACATTTCGTC	CCTACAAAGG	TTTGATAAAC	GTTTCAGACTT	ATTTGAAAAA	600
Lupa	CTCCAAAAC	ATCGTCTTGT	GGATATAGA	GCCAAACCC	ACTCCATTTT	CCTTCCTCAA	CACATAGATG	CTGAATTTAT	CGTTGTAGTA	CTCAGTGGTA	700
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	CTCCAAAAC	ATCGTCTTGT	GGATATAGA	GCCAAACCC	ACTCCATTTT	CCTTCCTCAA	CACATAGATG	CTGAATTTAT	CGTTGTAGTA	CTCAGTGGTA	700
Lupa	AAATTTATTT	TTCTTTATAT	AACATTTTAT	TGTAAAGAAT	TTAAATTTAA	GTTGAACCTC	AATAATCAAA	TCTTTTGTTT	TAAAGAAATA	TTGACTAAACT	800
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	AAATTTATTT	TTCTTTATAT	AACATTTTAT	TGTAAAGAAT	TTAAATTTAA	GTTGAACCTC	AATAATCAAA	TCTTTTGTTT	TAAAGAAATA	TTGACTAAACT	800
Lupa	TTGGTTGGT	TTGATTTATA	TGTAACACAG	GAAAGCCAT	ATTGACAATG	TTGAGTCCCA	ACGATAGAAA	TTCTTATAAT	CTTGAGCGTG	GTGATGCCAT	900
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	TTGGTTGGT	TTGATTTATA	TGTAACACAG	GAAAGCCAT	ATTGACAATG	TTGAGTCCCA	ACGATAGAAA	TTCTTATAAT	CTTGAGCGTG	GTGATGCCAT	900
Lupa	CAAAGTCCCT	GCAGGAGCAA	CATCTTATTT	AGTTAACCCA	GATGACGAAG	AAGATCTTAG	AGTGGTCGAT	TTTGTAATA	CTTGGAATAG	GCCTGGTAAA	1.000
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	CAAAGTCCCT	GCAGGAGCAA	CATCTTATTT	AGTTAACCCA	GATGACGAAG	AAGATCTTAG	AGTGGTCGAT	TTTGTAATA	CTTGGAATAG	GCCTGGTAAA	1.000
Lupa	TTTGAGGTAT	ATAAATTTTT	ATTCGAAAGC	TTTATTCTCT	TTATATTACT	TTGACTTTTG	TCTAGATCAA	AAAAATGATC	CATATCATTT	TTCCATCAGG	1.100
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	TTTGAGGTAT	ATAAATTTTT	ATTCGAAAGC	TTAATTCTCT	TTATATTACT	TTGACTTTTG	TCTAGATCAA	AAAAATGATC	CATATCATTT	TTCCATCAGG	1.100
Lupa	CGTTTGACCT	ATCTGCAAA	AGAAGACAAG	ACTTACGAGG	ATTCAGCAAG	AGTGTTTTAG	AGGCCTCCTT	AAATGTAAGT	ATGCAAGCAA	TACATTTTAT	1.200
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	CGTTTGACCT	ATCTGCAAA	AGAAGACAAG	ACTTACGAGG	ATTCAGCAAG	AGTGTTTTAG	AGGCCTCCTT	AAATGTAAGT	ATGCAAGCAA	TACATTTTAT	1.200
Lupa	GATTATTGTG	TACATTTTTT	ATCAATTGTT	TAGTAAATAT	AACCGTTGTA	ATTTGTATCC	TTGTTTCGAA	ATATAGACTA	AATATGATAC	CATAGAGAAG	1.300
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	GATTATTGTG	TACATTTTTT	ATCAATTGTT	TAGTAAATAT	AACCGTTGTA	ATTTGTATCC	TTGTTTCGAA	ATATAGACTA	AATATGATAC	CATAGAGAAG	1.300
Lupa	GTTCTCTTAG	AAGAACAAGA	GAACGAACCT	CACCAAAGGA	GAGATCGGAA	AGGCAGACCA	CAAGGACAAG	AAAAACATGC	AATAGTCAAA	GTGTCAAGGG	1.400
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	GTTCTCTTAG	AAGAACAAGA	GAACGAACCT	CACCAAAGGA	GAGATCGGAA	AGGCAGACCA	CAAGGACAAG	AAAAACATGC	AATAGTCAAA	GTGTCAAGGG	1.400

Figura 4.15. Alineamiento de secuencias obtenidas del producto de amplificación del gen convicilina. Los SNPs encontrados están encuadrados en amarillo y los cebadores utilizados para la el análisis mediante desnaturización de alta resolución (HRM) están encuadrados en rojo y gris.

Lupa	AACAAATTGA	GGAAGTGC	AGACTTGCCA	AATCAAGCTC	AAAGAAAAGC	TTACCATCTG	AATTTGAACC	ATTCAACTTG	AGAAGCCAAA	ACCCAAAATA	1.500
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	AACAAATTGA	GGAAGTGC	AGACTTGCCA	AATCAAGCTC	AAAGAAAAGC	TTACCATCTG	AATTTGAACC	ATTCAACTTG	AGAAGCCAAA	ACCCAAAATA	1.500
Lupa	TTCCAACAAG	TTTGGCAAGT	TTTTTGAGGT	TACTCCGGAG	AAAAAATATC	CTCAACTCCA	AGATTTAGAT	TTATTGGTCA	GTTCTGTGGA	GATTAACGAG	1.600
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	TTCCAACAAG	TTTGGCAAGT	TTTTTGAGGT	TACTCCGGAG	AAAAAATATC	CTCAACTCCA	AGATTTAGAT	TTATTGGTCA	GTTCTGTGGA	GATTAACGAG	1.600
Lupa	GTATGGACAC	AACATCAAGT	ATAAAAAAAA	TGTTATTTTC	AATCACAGAA	TTTTAATTAT	ATTACATAGA	TATGTTAATA	CATCTTGGCT	TAAATTTTTT	1.700
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	GTATGGACAC	AACATCAAGT	ATAAAAAAAA	TGTTATTTTC	AATCACAGAA	TTTTAATTAT	ATTACATAGA	TATGTTAATA	CATCTTGGCT	TAAATTTTTT	1.700
Lupa	AGGGAGGTCT	ATTGTTGCCA	CACTATAATT	CAAGGGCTAT	AGTTGTGCTA	TTGGTTAATG	AAGGAAAAGG	AAACCTTGAA	CTTGTGGGTT	TTAAAAATGA	1.800
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	AGGGAGGTCT	ATTGTTGCCA	CACTATAATT	CAAGGGCTAT	AGTTGTGCTA	TTGGTTAATG	AAGGAAAAGG	AAACCTTGAA	CTTGTGGGTT	TTAAAAATGA	1.800
Lupa	GCAACAAGAG	AGGGAAGATA	ACAAAGAGAG	AAATAATGAG	GTGCAGAGGT	ATGAGGCTAG	ACTGTCTCCA	GGTGATGTTG	TTATCATTCC	AGCAGGTCAC	1.900
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	GCAACAAGAG	AGGGAAGATA	ACAAAGAGAG	AAATAATGAG	GTGCAGAGGT	ATGAGGCTAG	ACTGTCTCCA	GGTGATGTTG	TTATCATTCC	AGCAGGTCAC	1.900
Lupa	CCAGTTTCCA	TCAGTGCTTC	GTCAAATTTG	AATTTGCTTG	GATTTGGTAT	CAATGCCGAG	AACAATGAGA	GAAACTTCCT	AACAGGTATT	AAGCGAATAT	2.000
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	CCAGTTTCCA	TCAGTGCTTC	GTCAAATTTG	AATTTGCTTG	GATTTGGTAT	CAATGCCGAG	AACAATGAGA	GAAACTTCCT	AACAGGTATT	AAGCGAATAT	2.000
Lupa	TAGTTAGTAA	ATCTTGACTA	AATGATAATG	ATTTGAATTT	GATATTTTGA	ATTTGGTGAT	TGAACATTTG	AAGGCTCGGA	C EACAATGTG		2.090
<i>Lens. c. ssp. orientalis</i>	TAGTTAGTAA	ATCTTGACTA	AATGATAATG	ATTTGAATTT	GATATTTTGA	ATTTGGTGAT	TGAACATTTG	AAGGCTCGGA	T EACAATGTG		2.090

Figura 4.15 (continuación). Alineamiento de secuencias obtenidas del producto de amplificación del gen convicilina. Los SNPs encontrados están encuadrados en amarillo y los cebadores utilizados para la desnaturalización de alta resolución (HRM) están encuadrados en rojo y gris.

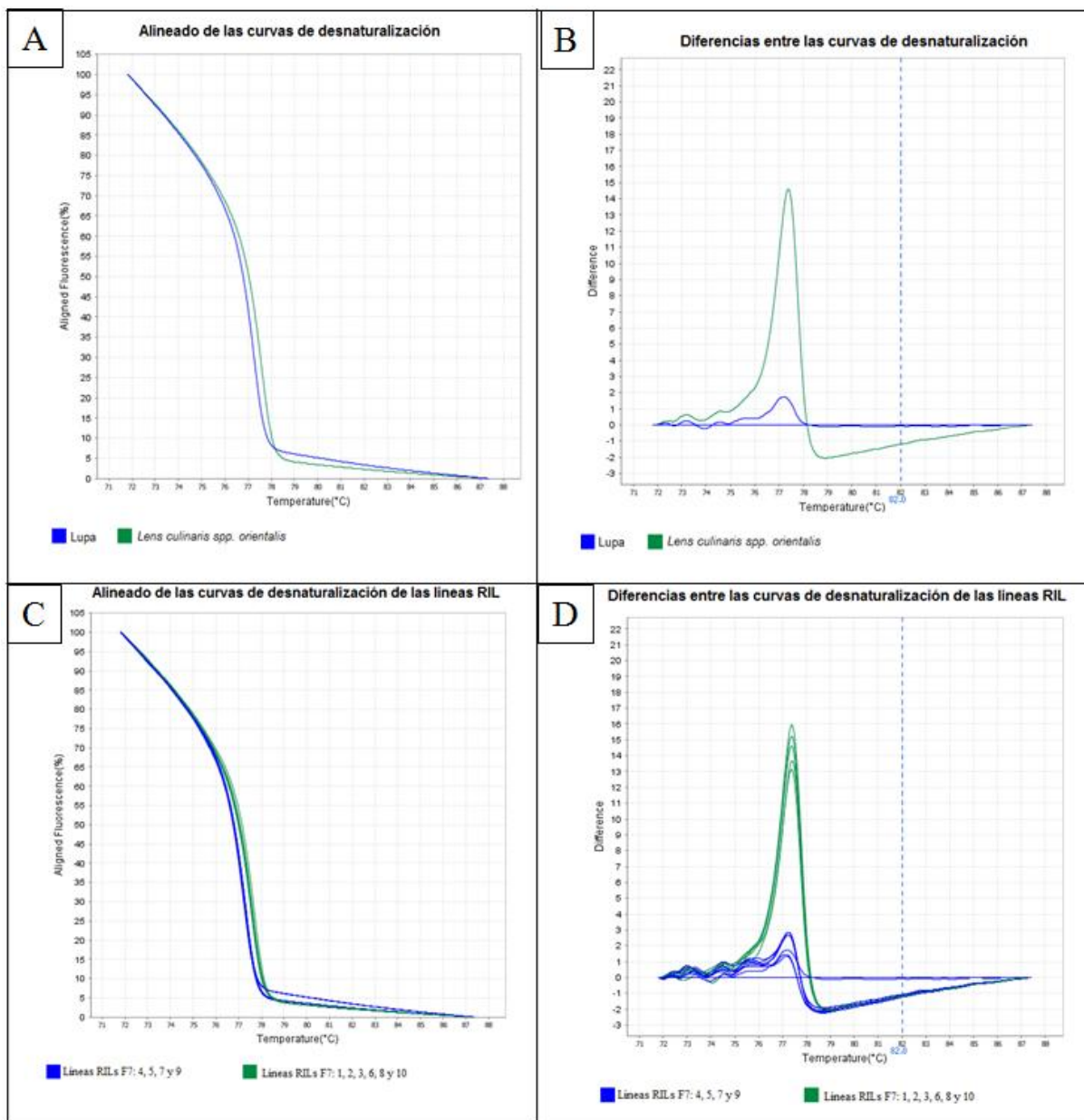


Figura 4.16. Comparación de curvas de desnaturalización para el gen codificante de la convicilina entre los parentales *Lupa* y *Lens culinaris* ssp. *orientalis* y los individuos de las líneas RIL. (A) Se comparan las curvas de desnaturalización de los parentales. Debido a la diferencia en la cinética de desnaturalización se forman dos curvas que permiten diferenciar claramente un parental de otro. (B) Se observa la diferencia entre estas curvas, cada una de ellas con un patrón característico. (C) y (D) Curvas de desnaturalización de individuos de las líneas RIL 4,5 ,7 y 9 (que presentan una curva de desnaturalización muy similar a *Lupa*) y 1, 2, 3, 6, 8 y 10 (que presentan una curva de desnaturalización muy similar a *L. c. spp. orientalis*).

4.2.4. Discusión general de marcadores.

Los estudios con marcadores de ADN suelen indicar una baja variabilidad en la lenteja cultivada, situación que se ha achacado a la domesticación. En un estudio reciente (Alo *et al.*, 2011) se estima que la especie cultivada muestra una reducción de variabilidad genética de al menos el 40% en relación a la que presentan las poblaciones de *L. c. ssp. orientalis*. Este nivel de variabilidad se refleja generalmente en los bajos rendimientos obtenidos cuando se realiza una búsqueda de marcadores polimórficos para su utilización en el análisis genético. Como ejemplos se pueden citar el trabajo de Barrios (2012) que analizó 423 loci SSR, de los cuales sólo 23 (5%) resultaron polimórficos entre los parentales BGE016365 e ILL1918, y de 104 cebadores utilizados para obtener marcadores ISSR, sólo se obtuvo un conjunto de 17 loci que mostraban segregación, o el estudio de De la Puente (2012) que analizó 191 ESTs, de los cuales sólo 12 (6%) fueron polimórficos entre *L. c. ssp. culinaris* y *L. c. ssp. orientalis*. Estas observaciones son las que llevaron en un primer momento a realizar mapas genéticos con cruzamientos interespecíficos utilizando loci genómicos anónimos con técnicas que produjeran un alto número de marcadores por reacción, como RAPD, ISSR, AFLP, MFLP, etc. La dificultad de relacionar estos marcadores cuando se analizan en distintos laboratorios ha conducido a la falta de un mapa consenso en el que ir integrando toda la información.

La incorporación de marcadores fácilmente transferibles (SSRs, EST-SSRs, ITAPs, ESTs, SNPs) ha estado limitada, hasta recientemente, debido a que la detección de polimorfismo suele requerir de un proceso laborioso de cribado y secuenciación. De manera progresiva se han ido publicando datos sobre este tipo de marcadores como se indicó en la Introducción, pero no ha sido hasta los 2-3 últimos años cuando se ha abordado la búsqueda de marcadores utilizando técnicas de transcriptómica, con un elevado rendimiento. Así Kaur *et al.* (2011) diseñan cebadores para amplificar 2393 EST-SSRs; Verma *et al.* (2013) proporcionan información de 5673 SSRs génicos; Sharpe *et al.* (2013) describen más de 20000 SNPs génicos, entre los que escogen 1536 como los más adecuados para la realización de mapas debido a su mayor grado de variación en las muestras analizadas, y Yilmaz Temel *et al.* (2014) obtuvieron cerca de 51000 posibles SNPs, de los que seleccionaron 500 para su validación y mapeo. En el Área de Genética de la Universidad de León se han realizado recientemente varios análisis de transcriptoma que han proporcionado alrededor de 15500 posibles SNPs en las líneas analizadas, de los cuales se han elegido 1000 que están en proceso de validación.

Se puede deducir de lo anterior el notable incremento de datos genéticos y genómicos en lenteja, y por tanto ya se dispondría de un conjunto lo suficientemente amplio de marcadores

génicos de distintos tipos para poder construir mapas fácilmente comparables que permitan construir un mapa de referencia en lenteja.

En este trabajo, de las 115 parejas de cebadores que se analizaron, un total de 99 (86,09%) dio lugar a amplicones en los parentales analizados, pero una gran mayoría produjo patrones con una amplificación muy ineficiente que producía bandas muy tenues (24 parejas) o bien a patrones con varias bandas (26 parejas). Sin descartar errores en el diseño de los cebadores y/o condiciones de PCR, las amplificaciones ineficientes podrían deberse a un mal apareamiento de los cebadores, puesto que su secuencia se basó en la mayor parte de los casos en información disponible en varias accesiones de lenteja, entre las que no estaban los parentales utilizados, y en 7 parejas se utilizaron directamente secuencias diseñadas para amplificar *Vicia*. En cuanto a las amplificaciones de varios fragmentos, podría deberse a que se tratara de genes duplicados o pertenecientes a familias multigénicas, ya que si se toma *Medicago* como referencia, al menos el 20% de los genes están duplicados (Young *et al.*, 2011). Sharpe *et al.* (2013) también han encontrado indicaciones de duplicaciones génicas, aunque para sus marcadores SNP sólo el 3% sugería esta posibilidad, quizás debido a que los SNPs analizados suelen estar situados en las zonas 3'UTR, que muestran mayor divergencia entre genes duplicados que las zonas codificantes. En un estudio de transcriptoma de varios cultivares de lenteja realizado en el Área de Genética con objeto de buscar nuevos polimorfismos, los datos preliminares indican alrededor de un 6% de secuencias duplicadas (García y Sáenz de Miera, comunicación personal, datos sin publicar).

El número de marcadores polimórficos estudiados en los individuos de las líneas RILs ha sido de 16. De éstos, 6 son del tipo PCR específica, 6 son CAPS y 4 son SNPs analizados mediante la técnica de HRM. Estos marcadores fueron integrados a la plantilla de marcadores polimórficos estudiados en el Área de Genética y descritos por De la Puente (2012); esta plantilla está compuesta por 92 ISSR, 2 SSR, 3 marcadores morfológicos (*Yc*, color del cotiledón; *Scp*, patrón de moteado de la semilla y *Gs*, color del tallo), 3 marcadores relacionados con resistencia a patógenos, 1 EST y 2 relacionados con la presencia de retrotransposones.

Los cebadores fueron diseñados para incluir en los amplicones intrones que aumentasen la probabilidad de encontrar SNPs o variaciones de longitud de los amplificados, en ocasiones entre los parentales las secuencias de los intrones diferían en varias posiciones lo que daba como resultado que la enzima de restricción utilizada en los marcadores CAPS corte en numerosos puntos, produciendo muchos fragmentos distintos, algunos de los cuales eran tan pequeños que no era posible observarlos en los geles.

Los marcadores SNPs son los más abundantes en el genoma, estando presente en mayor número en las regiones no codificantes, y se han analizado en varias leguminosas empleando diferentes técnicas como matrices (chips) de ADN, PCR específica de alelo, CAPS y ensayos de extensión del cebador, etc. En este trabajo se ha empleado una técnica diferente para la detección de SNPs, la desnaturalización de alta resolución (HRM) que aunque hasta el momento no se había utilizado para la construcción de mapas de ligamiento en lenteja, sí había demostrado su utilidad para genotipar variedades con objeto de identificarlas (Bosmali *et al.*, 2012). Las aplicaciones de la técnica HRM en otras leguminosas incluyen el desarrollo de marcadores para genes concretos de interés en mejora (Legrand *et al.*, 2013; Pavan *et al.*, 2013), el mapeo genético (Croxford *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2012) o la validación de SNPs encontrados en trabajos de secuenciación (Li *et al.*, 2012).

La eficacia de la técnica HMR se comprueba en el hecho de que en los casos de las secuencias para convicilina, apirasa tipo 2A, P73 y P51982 la zona amplificada difería en uno o dos SNPs (Figura 4.15 y Apéndice 2) y aun así se distinguieron claramente los alelos procedentes de cada parental.

El éxito tenido en la localización de marcadores genéticos polimórficos en este trabajo ha sido relativamente bajo (16 de 119), aunque comparable al de trabajos previos (De la Puente 2012). Otros trabajos como el de Phan *et al.* (2007) describen un rendimiento más alto, de alrededor del 35%, si bien en estos casos se disponía de las secuencias de los parentales para todos los marcadores. Es previsible que el grado de polimorfismo detectable pueda aumentarse significativamente si se utilizan técnicas más resolutivas para analizar SNPs que no se basen exclusivamente en diferencias de longitud o en polimorfismos que sean detectables mediante enzimas de restricción, como las de tipo HRM.

Con respecto a los restantes marcadores, ISSRs en su mayoría, analizados en la población RIL, se han revisado y utilizado resultados obtenidos progresivamente en el Área de Genética que ya fueron discutidos por De la Puente (2012). Solamente destacar que la utilización de 20 cebadores elegidos por su repetibilidad en los patrones de bandas ha permitido el estudio de 82 marcadores, resultado bastante superior al de Tanyolac *et al.* (2010), quienes utilizando 18 cebadores elegidos, obtuvieron únicamente 23 marcadores polimórficos, aunque en su trabajo comparaban dos parentales de *L. c. culinaris*, y no como en este caso, dos parentales pertenecientes a subespecies distintas.

4.3. MAPA DE LIGAMIENTO.

Para realizar el mapa de ligamiento se utilizaron los 16 marcadores genéticos que presentaron diferencias entre los parentales, así como datos de marcadores anónimos (principalmente de tipo ISSR) obtenidos con anterioridad en el Área de Genética para las mismas líneas RIL. Los resultados previos fueron revisados para eliminar errores de genotipado, y cuando se consideró necesario se repitieron reacciones de PCR en algunas líneas RIL para confirmar la presencia/ausencia de determinados fragmentos. Esto proporcionó 104 marcadores adicionales que mostraron la segregación mendeliana esperada 1 (presencia): 1 (ausencia).

Como se indicó en Materiales y Métodos, para realizar el mapa genético se utilizaron dos programas informáticos MAPMAKER/EXP v.3.0b (Lander *et al.*, 1987) y CarthaGene 1.3.beta (de Givry *et al.*, 2005), utilizando en ambos casos los mismos parámetros para crear los grupos de ligamiento (LOD = 3 y una distancia máxima de 30 cM, teniendo en cuenta la función de mapa de Kosambi). Cuando los mapas obtenidos mediante ambos programas diferían en la posición de algún marcador, se escogió aquel que presentó un valor de "log-likelihood" más alto. El orden final se confirmó mediante los comandos "ripple" en MAPMAKER o "flips" en CarthaGene.

El mapa genético obtenido consta de 102 marcadores, distribuidos en 9 grupos de ligamiento, con una cobertura total de 628 cM y una distancia media entre marcadores de 6,63 cM (Tabla 4.10 y Figura 4.17). El grupo de ligamiento 1 (GL1) incluye 13 marcadores, el grupo GL2 está formado por 38, el grupo GL3 por 9, el grupo GL4 por 14, el grupo GL5 por 16, los grupos GL6 y GL7 están compuestos de 2 marcadores moleculares cada uno, el grupo GL8 por 3 y el grupo GL9 por 5.

De los 16 nuevos marcadores estudiados, 12 pudieron ser incluidos en alguno de los 9 grupos de ligamiento y 4 se comportaron como independientes (Tabla 4.11). Se incluyó el marcador "convicilina" debido al interés de localizar en el mapa este locus, aunque su segregación se apartó de la esperada 1:1. Además, el mapa de ligamiento contiene 79 marcadores polimórficos ISSR (denominados UBC y numerados según el cebador utilizado procedente de la colección proporcionada por la Universidad de British Columbia), 2 marcadores SSR (SSR_80 y SSR_90), 3 loci morfológicos (*Yc*, *Scp* y *Gs*), 2 marcadores presuntamente relacionados con genes de resistencia a patógenos (Pto_1 y Pto_2) y 2 marcadores relacionados con secuencias de retrotransposones (PBS6_1 y BS1_6_1).

Tabla 4.10. Resumen del mapa de ligamiento con la línea RIL del cruce de *Lupa x Lens culinaris* spp. *orientalis*.

Grupo de Ligamiento	Marcadores moleculares (%)	Distancia total en cM	Distancia promedio en cM
1	13 (12,75)	46,1	3,84
2	38 (37,25)	221,9	6,00
3	9 (8,82)	84,8	10,60
4	14 (13,73)	148,3	11,41
5	16 (15,69)	88,2	5,88
6	2 (1,96)	15,1	15,10
7	2 (1,96)	0,6	0,60
8	3 (2,94)	1,9	0,95
9	5 (4,90)	21,1	5,28
Total	102 (100)	628	6,63

Tabla 4.11. Marcadores génicos no asignados a ninguno de los grupos de ligamiento.

Marcador	Posible función del gen	Tipo de Marcador
P453	Esterasa/lipasa APG	PCR específica
P670	Subunidad 6B de citocromo C oxidasa	PCR específica
P51263	Subunidad TIM22 de una translocasa mitocondrial	PCR específica
P50814	Proteína hipotética en <i>Medicago truncatula</i>	CAPS

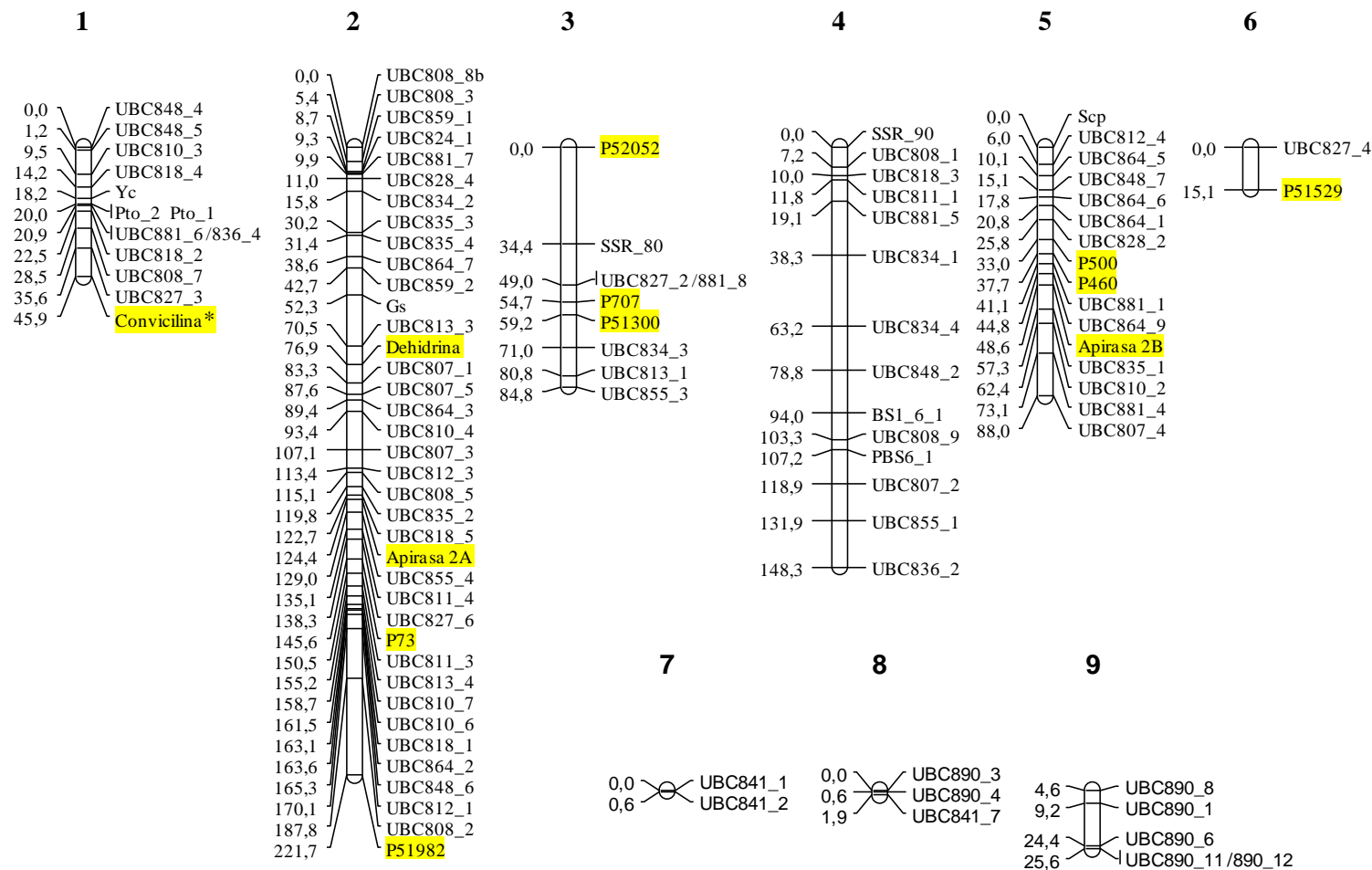


Figura 4.17. Mapa de ligamiento basado en marcadores moleculares analizados en las líneas RIL proveniente del cruce *Lupa* x *Lens culinaris* spp. *orientalis*, con un valor de LOD=3.0. Se resaltan los nuevos marcadores incluidos (fondo amarillo) junto con los obtenidos anteriormente para este cruzamiento por el Área de Genética de la Universidad de León. Con (*) se indica el único marcador cuya segregación no se ajustó a la proporción 1:1 esperada.

El último mapa disponible hasta la fecha utilizando la misma población segregante presentaba 10 grupos de ligamiento (De la Puente, 2012), con una distribución de marcadores poco homogénea. El principal cambio observado ha consistido en la unión de tres grupos de ligamiento previos para formar un nuevo grupo de ligamiento GL4 y la aparición de uno nuevo (GL6). Esta reducción de los grupos de ligamiento concuerda con la premisa de que a medida que se vaya saturando el mapa genético, el número de grupos de ligamiento debe aproximarse al número de cromosomas haploide. Debido a que la lenteja tiene un número haploide de cromosomas de 7, esta reducción aún no es suficiente, más si tenemos en cuenta que todavía varios grupos presentan un número de loci muy reducido y además un número relativamente elevado de marcadores (18) no pudo asignarse a ningún grupo, por lo que se debe de continuar con la saturación del mapa.

La distribución de los marcadores entre los grupos de ligamiento no ha sido homogénea: hay 5 grupos que tienen 9 o más marcadores, siendo el GL2 el que contiene la mayor cantidad de marcadores (37,25%), y 4 pequeños grupos que contienen 2, 3 ó 5 marcadores. También se puede observar que en algunos grupos aparecen regiones con alta densidad de marcadores en determinadas zonas, generalmente centrales, mientras que los extremos muestran una cobertura menos densa. De acuerdo a Vallejos *et al.* (1992), las diferencias de las densidades de los marcadores en distintas zonas del genoma pueden tener origen evolutivo y deberse a distintos grados de conservación de las secuencias de ADN, ya que los segmentos cromosómicos altamente saturados de marcadores se corresponderían con regiones de genoma con un alto grado de diferenciación entre los parentales utilizados para la elaboración del mapa, mientras que los segmentos cromosómicos con menor densidad equivaldrían a zonas con secuencias conservadas en ambos acervos genéticos. La existencia de diferencias en la frecuencia de sobrecruzamiento también podría influir en las densidades de marcadores encontradas a lo largo del ligamiento. Tanksley *et al.* (1992) explicaron estas observaciones describiendo que en los centrómeros y en las regiones teloméricas la recombinación es 10 veces menor que en otras zonas del genoma, por lo que en ellas los marcadores aparecerían más cercanos.

A la hora de comparar con los mapas obtenidos a partir de cruzamientos con los mismos parentales que los de nuestra población segregante, se dispone de los obtenidos por Durán *et al.* (2004), que incluye marcadores RAPD, ISSR, SSR, AFLP y marcadores morfológicos, y por De la Puente *et al.* (2013), que tomando como base el de Durán *et al.*, introdujo 31 nuevos marcadores, la mayoría de ellos génicos. Para la elaboración de estos dos mapas se analizó la misma población F_2 a partir de la cual se obtuvo el conjunto de RILs utilizado en este trabajo, por lo que deben estar segregando los mismos marcadores y la construcción

de un mapa consenso a través de marcadores comunes debería ser un proceso sencillo. Puesto que en la presente Tesis se pretendía mapear determinados genes relacionados con resistencia a *Ascochyta* y con calidad de la semilla, se optó por revisar y utilizar los datos disponibles hasta la fecha para la población RIL, con el objeto de utilizarlos como esqueleto en el que mapear dichos genes. Una dificultad encontrada ha sido la pérdida de la información sobre los tamaños concretos de los marcadores ISSRs mapeados por Durán *et al.*, por lo que se ha supuesto que si al comparar dos grupos de ligamiento coincidían marcadores obtenidos con los mismos cebadores, habría una correspondencia entre ambos, aunque el número del marcador no sea exactamente el mismo.

Al comparar los marcadores morfológicos y los ISSR que están presentes en este trabajo y el mapa de De la Puente *et al.* (2013), que representa una ampliación del publicado por Durán *et al.* (2004) (Tabla 4.12 y Figura 4.18) observamos que nuestro GL1 se correspondería con el grupo de ligamiento 2 de De la Puente (GL II y IX para Durán *et al.*), el GL2 se corresponde al grupo de ligamiento 4 y 6 de De la Puente (GL IV y VI para Durán *et al.*), el GL4 se relacionaría con su GL5 (GL V para Durán *et al.*) y el GL5 se corresponde con el grupo de ligamiento 1 de De la Puente (GL I para Durán *et al.*).

Tabla 4.12. Comparación de marcadores morfológicos (*Yc*, *Gs* y *Scp*) y marcadores ISSR entre los mapas de ligamiento obtenidos a partir de RILs y F₂ procedentes del mismo cruzamiento.

Presente estudio RILs		De la Puente <i>et al.</i> (2013) (basado en Durán <i>et al.</i> , 2004) F ₂	
GL	Marcador	GL	Marcador
1	<i>Yc</i>	II	<i>Yc</i>
1	UBC836_4	II	UBC836-2
2	<i>Gs</i>	IV	<i>Gs</i>
2	UBC807_3	VI	UBC807-3
2	UBC808_2	VI	UBC808-1
2	UBC827_6	VI	UBC827-3
2	UBC835_2	VI	UBC835-3
4	UBC808_1	V	UBC808-2
4	UBC855_1	V	UBC855-3
5	<i>Scp</i>	I	<i>Scp</i>
5	UBC864_5	I	UBC864-4/3
5	UBC864_6	I	UBC864-5
5	UBC835_1	I	UBC835-1

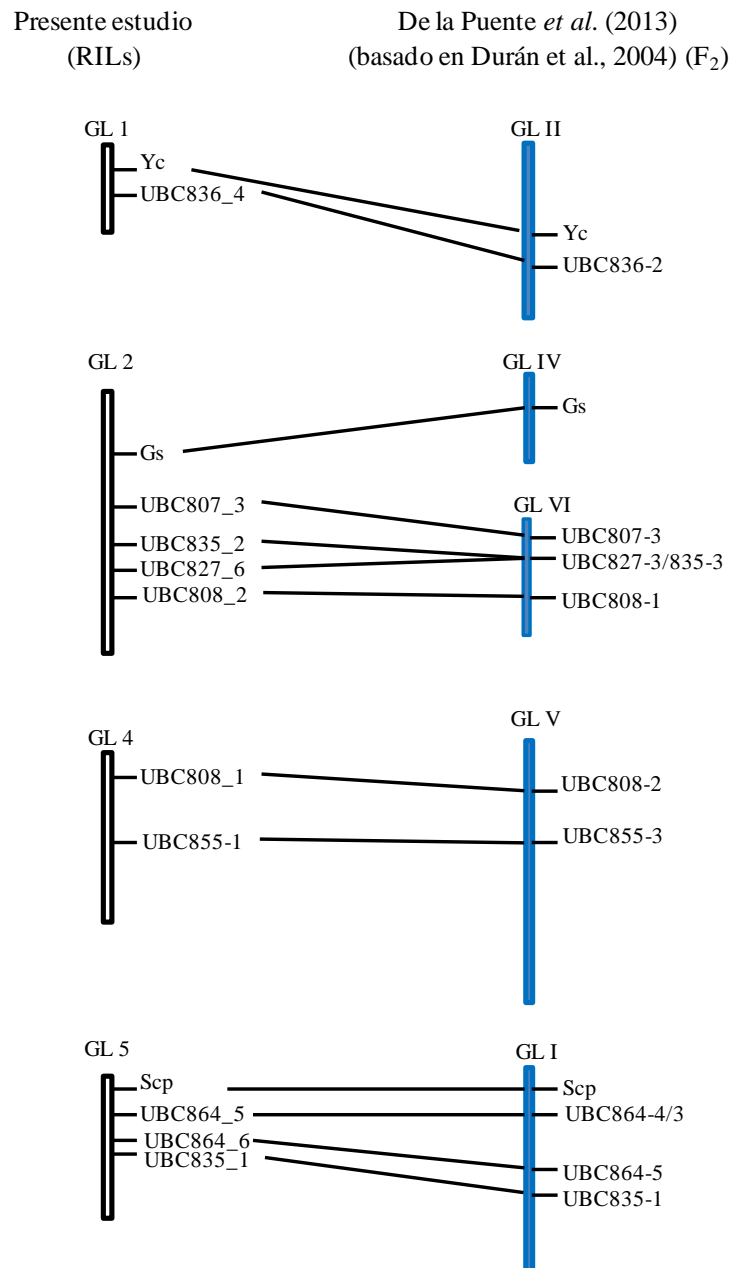


Figura 4.18. Relaciones existentes entre marcadores del estudio de De la Puente *et al.* (2013) que coinciden con los incluidos en el mapa de marcadores polimórficos en el presente estudio.

Cuando se comparan los tamaños de los genomas obtenidos en este estudio (628 cM) y los de Durán *et al.* (2172 cM) y De la Puente *et al.* (2234 cM) se aprecia una diferencia notable, que en parte sería debida al mayor número de marcadores mapeados en su caso (161 y 190, respectivamente) que en el nuestro (102), pero en la que también influyen de manera importante el tipo de población, de marcadores y el algoritmo utilizado en la búsqueda del mejor orden. Mientras que los autores citados mapearon una población F₂, en nuestro caso se han utilizado líneas RILs; puesto que en ambos casos los marcadores más abundantes en el mapa han sido de tipo dominante, al no ser posible distinguir los homocigotos

dominantes de los heterocigotos en la F_2 , se disminuye la precisión en la estimación de las distancias génicas, hecho especialmente notable cuando los marcadores analizados están en fase de repulsión, para los que la detección del ligamiento es muy ineficiente (Nuez, 2000); en las líneas RIL esto es irrelevante por ser líneas homocigotas lo que da más fiabilidad a la situación de los marcadores. Adicionalmente, en las RIL el cálculo de las frecuencias de recombinación está basado en varias rondas de recombinación y esto tiene como consecuencia la dificultad de detectar ligamiento cuando los marcadores están a más de 20 cM de distancia (Paran *et al.*, 1995; Burr *et al.*, 1998), limitándose la formación de grupos de ligamiento con marcadores muy alejados entre sí. Por otro lado, Durán *et al.* (2004) y De la Puente *et al.* (2013) utilizaron para la ordenación de los loci la metodología basada en máxima verosimilitud implementada en el programa Mapmaker/EXP; como se indicó en Material y Métodos, en este trabajo se han utilizado varios métodos y algunos de ellos optimizaban el orden según el criterio SARF (minimum Sum of Adjacent Recombination Frequencies), lo que lleva a grupos de ligamiento más compactos. La drástica influencia de la metodología se pone de manifiesto en los resultados obtenidos por Barrios (2012), el cual llegaba con los mismos datos a mapas de 578,5 cM o de 2284,8 cM en función del algoritmo utilizado.

Cuando se compara el mapa obtenido en el presente trabajo con otros previos, independientemente del cruzamiento, del tipo de población segregante o de la metodología empleada en la construcción del mapa, generalmente se observa una serie de características comunes entre ellos, como un mayor número de grupos de ligamiento que de cromosomas, distribuciones desiguales de los marcadores que conllevan la aparición de unos pocos grupos grandes y muchos con un limitado número de marcadores, o la aparición de zonas de alta densidad de loci separadas por huecos relativamente grandes.

El tamaño de los mapas construidos a partir de otros cruces intersubspecíficos *L. c. ssp. culinaris* x *L. c. ssp. orientalis* ha sido variable; así el publicado por Eujayl *et al.* (1998) utilizando 177 marcadores cubre una longitud de 1073 cM, el de Hamwieh *et al.* (2005) basado en 283 marcadores es de 751 cM, y el mapa de Gupta *et al.* (2012) en el que se incluyen 199 loci es de 3843 cM. Este último, al igual que los de Durán *et al.* (2004) y De la Puente *et al.* (2013), está realizado a partir de una F_2 con una mayoría de marcadores dominantes, lo que de nuevo indicaría los efectos conjuntos de la población segregante utilizada y del tipo de herencia sobre la longitud total del mapa.

Para los mapas realizados con cruces entre parentales de lenteja cultivada, los resultados también son variables, aunque con un rango más reducido que en los obtenidos de

cruzamientos intersubespecíficos. El mayor tamaño (1868 cM) es el descrito por Tullu *et al.* (2008), y el menor (432,8 cM) el de Yilmaz Temel *et al.* (2014).

El mapa más completo publicado hasta la fecha (Sharpe *et al.*, 2013, ampliado por Fedoruk *et al.*, 2013) consta de 7 grupos de ligamiento que parecen corresponder con los 7 cromosomas de lenteja; la longitud total estimada es de 697 cM, variando los grupos entre 57 y 150 cM, con una densidad de 1,2 cM entre marcadores. En nuestro mapa existen muy pocos loci comunes analizados en ambos casos, como los morfológicos *Yc* y *Scp* y el microsatélite SSR80, que permiten relacionar nuestros grupos 1, 3 y 5 con los LG1, LG2, LG6 de Sharpe *et al.* (2013) que representarían los cromosomas equivalentes en lenteja.

Phan *et al.* (2007) y Ellwood *et al.* (2008) encontraron que entre lenteja y *M. truncatula* existía una relación de colinealidad clara en la posición de marcadores génicos, si bien la existencia de reordenamientos cromosómicos habría dado lugar a que el número de cromosomas fuera diferente en las dos especies. Sharpe *et al.* (2013) han publicado el estudio más amplio de sintenia compartida entre estas especies, pudiendo relacionar los grupos de ligamiento (cromosomas) de lenteja con los de *Medicago*, de modo que los grupos 1 a 5 se corresponderían con los cromosomas 1 a 5 de *Medicago*, el grupo 6 se alinearía con el cromosoma 7 de *Medicago*, y el grupo 7 con el cromosoma 8. Las diferencias más notables entre ambas especies radican en que el cromosoma 6 de *Medicago* es colineal con la parte central del grupo de ligamiento 2 de lenteja, mientras que el resto sería equiparable al cromosoma 2 de *Medicago*, y que un extremo del grupo de ligamiento 1 de lenteja se corresponde con un extremo del cromosoma 5 de *Medicago* y un extremo del grupo de ligamiento 5 se corresponde con un extremo del cromosoma 1, lo que indicaría la presencia de una translocación recíproca.

Este alto nivel de sintenia nos permite relacionar provisionalmente nuestros grupos de ligamiento con los cromosomas de *M. truncatula* gracias a los marcadores génicos utilizados en nuestro mapa. En la Tabla 4.13 se presentan las localizaciones de los marcadores génicos utilizados y las correspondencias con los grupos de ligamiento obtenidos por Sharpe *et al.* (2013), a partir de las cuales se ha inferido el cromosoma equivalente en *M. truncatula*. Puesto que los marcadores se diseñaron para amplificar en lenteja una secuencia homóloga a genes concretos de localización conocida de *M. truncatula* se puede comprobar si las equivalencias de Sharpe *et al.* se mantienen en nuestro mapa.

Tabla 4.13. Localizaciones de los marcadores génicos y su correspondencia con los grupo de ligamiento obtenidos por Sharpe *et al.* (2013) y los cromosomas de *Medicago truncatula*.

Marcador	GL en el presente trabajo	GL equivalente en Sharpe <i>et al.</i> (2013)	Cromosoma equivalente en <i>M. truncatula</i> según Sharpe <i>et al.</i> (2013)	Gen homólogo al marcador en <i>M. truncatula</i>	Localización cromosómica del gen homólogo en <i>M. truncatula</i>
P453	-	-	-	Medtr8g014910	8
P670	-	-	-	Medtr5g064600	5
P50814	-	-	-	Medtr1g061600	1
P51263	-	-	-	Medtr5g094300	5
Convicilina	GL1	GL1	1 o 5	Medtr7g079740*	7
Dehidrina	GL2	-	-	Medtr3g117290	3
P73	GL2	-	-	Medtr2g098160	2
P51982	GL2	-	-	Medtr4g127710	4
Apirasa 2A	GL2	-	-	Medtr6g032810	6
P707	GL3	GL2	2 o 6	Medtr5g008890	5
P51300	GL3	GL2	2 o 6	Medtr4g069800	4
P52052	GL3	GL2	2 o 6	Medtr4g012800	4
Apirasa 2B	GL5	GL6	7	Medtr7g085090	7
P460	GL5	GL6	7	Medtr7g078820	7
P500	GL5	GL6	7	Medtr7g080410	7
P51529	GL6	-	-	Medtr7g099040	7

- marcador independiente. *Este gen en realidad codifica una vicilina.

Como se puede ver en la tabla, la relación entre nuestro GL5 con el GL6 de Sharpe *et al.* (2013) y éste a su vez con el cromosoma 7 de *M. truncatula* es bastante consistente para todos los marcadores con la excepción del marcador convicilina; sin embargo el resto de las relaciones son mucho más dudosas puesto que los genes homólogos de *Medicago* están distribuidos por varios cromosomas que no corresponden con los predichos a partir de las relaciones establecidas en Sharpe *et al.* Esto pudiera deberse a que no todos los loci conservan la colinealidad ya que Sharpe *et al.* también encuentran casos en los que el locus homólogo en *Medicago* no se sitúa en el cromosoma predicho. Así, aunque la mayoría de los marcadores del GL1 están localizados en los cromosomas 1 y 5 de *M. truncatula*, existen

casos en el que los homólogos están en los cromosomas 3, 6 ó 7. Por otro lado, es posible que haya reordenaciones entre diferentes genotipos de lenteja, cambiando la sintenia; esto explicaría que Phan *et al.* (2007) encontraran que su grupo de ligamiento 1 fuera colineal con los cromosomas 4 y 7 de *M. truncatula*.

A pesar de los esfuerzos realizados para la obtención de mapas en lenteja y relacionarlos con mapas de otras leguminosas (para una revisión, Kaló *et al.*, 2011) todavía se carece de un mapa de referencia, si bien en los últimos años se ha publicado un elevado número de marcadores génicos que muy probablemente serán cartografiados en los mapas que están realizándose. Es previsible que de este modo se produzca un avance significativo en la utilización de los datos genéticos y genómicos, tanto de la propia lenteja como de especies relacionadas, para la localización e identificación de genes de interés agronómico, lo que permitiría diseñar programas de mejora más rápidos y productivos.

4.4. ANÁLISIS DE LOCI DE CARACTERÍSTICAS CUANTITATIVAS (QTLs).

Previo al análisis de QTLs, se evaluaron en la población RIL F₇ los caracteres morfológicos peso de las semillas, diámetro de las semillas y resistencia al hongo *Ascochyta lentis*. Cuando se obtuvieron estos datos, se procedió a realizar el análisis de QTLs por tres métodos distintos: marcador simple, mapeo por intervalo y mapeo por intervalo compuesto.

Peso de las semillas.

Para este carácter se ha utilizado el peso de 100 semillas de cada línea RIL, obteniéndose un peso promedio de 2176 mg siendo 461 mg el menor valor y 4975 mg el mayor. Para observar si estos datos siguen una distribución normal se realizó la prueba estadística W descrita por Shapiro y Wilk (1965). El análisis demuestra que estos datos no se ajustan a una distribución normal (Figura 4.19), lo que puede deberse a que existen 3 líneas que son muy diferentes al resto (outliers o valores atípicos).

Para comprobar esta hipótesis, se eliminaron los valores atípicos y se observó que esta característica ahora muestra una distribución normal (Figura 4.20). Los parentales Lupa y *L. c. ssp. orientalis* tuvieron un peso de 3327 mg y 1586 mg respectivamente.

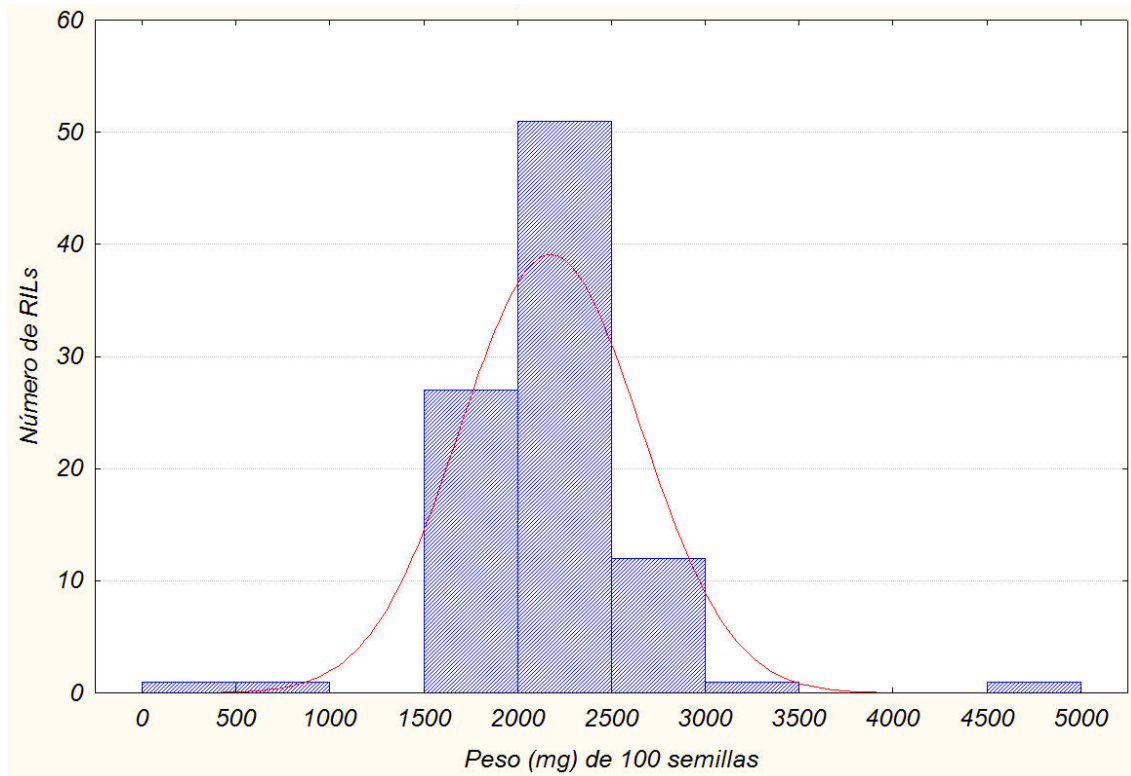


Figura 4.19. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk $W=0,818$, $p<0,001$ para el peso (mg) de 100 semillas de las líneas RILs.

— Distribución esperada en caso de normalidad

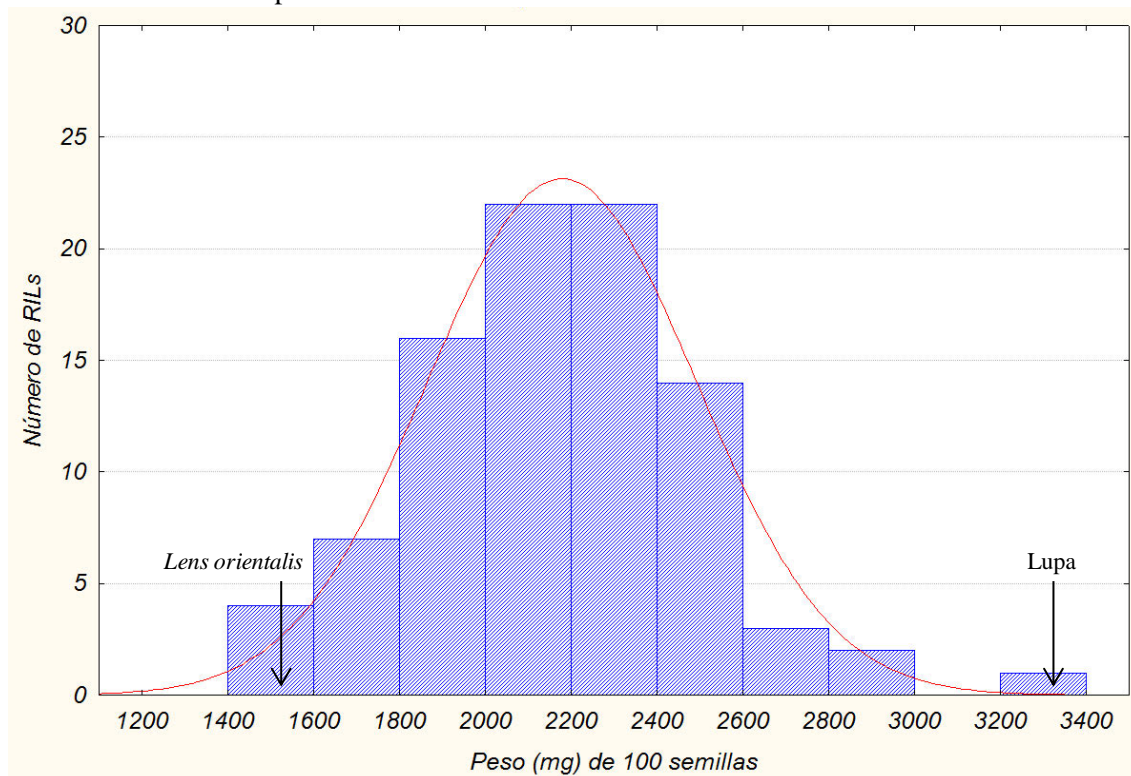


Figura 4.20. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk $W=0,986$, $p=0,420$ para el peso (mg) de 100 semillas en los individuos de las líneas RILs. En esta gráfica se han eliminado los valores atípicos.

— Distribución esperada en caso de normalidad

Diámetro de las semillas.

El diámetro de las semillas de las líneas RILs se obtuvo midiendo 10 semillas. La media para este carácter fue de 3,9 mm, la semilla de menor tamaño tenía 2,0 mm y la de mayor 5,5 mm. Al realizar la prueba estadística *W* descrita por Shapiro y Wilk (1965) para observar si este carácter seguía una distribución normal, el resultado fue significativo (Figura 4.21), lo que podía deberse nuevamente al efecto de los valores atípicos.

Al eliminar estos valores, se observa que los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 4.22).

Resistencia al hongo *Ascochyta lentis*.

Para evaluar la resistencia al hongo *Ascochyta lentis*, primero se sembraron las semillas de las líneas parentales y de las RIL y al día 15 se infectaron con el hongo. El día 15 después de la infección se tomaron los datos de resistencia utilizando la escala propuesta por Ford *et al.* (1999). Mediante la prueba estadística *W* de Shapiro y Wilk (1965) se analizó si este carácter seguía una distribución normal, encontrándose un resultado significativo (Figura 4.23), lo que puede deberse a que la escala numérica no responde en realidad un carácter continuo con distribución normal subyacente, es decir que la diferencia de susceptibilidad entre dos puntuaciones sucesivas, por ejemplo 1 y 3 podría no ser equivalentes a la diferencia entre otras dos, por ejemplo 3 y 5. Se probaron diferentes transformaciones para la normalización de los datos puesto que la metodología de detección de QTLs presupone este tipo de distribución, sin embargo en ningún caso se consiguió una mejora, por lo que se optó por utilizar los datos originales.

De acuerdo con la escala de Ford *et al.* a Lupa se le asignó un valor de 5 (moderadamente susceptible) mientras que a *L. orientalis* un valor de 1 (resistente).

El 4% de los individuos de la población fueron resistentes a la infección, el 9% moderadamente resistentes, la mayoría de individuos de esta población (62%) resultaron ser moderadamente susceptibles, el 20% fueron susceptibles y el 3% altamente susceptibles. Un 2% de las líneas RIL no pudieron ser evaluados ya que sus semillas no germinaron.

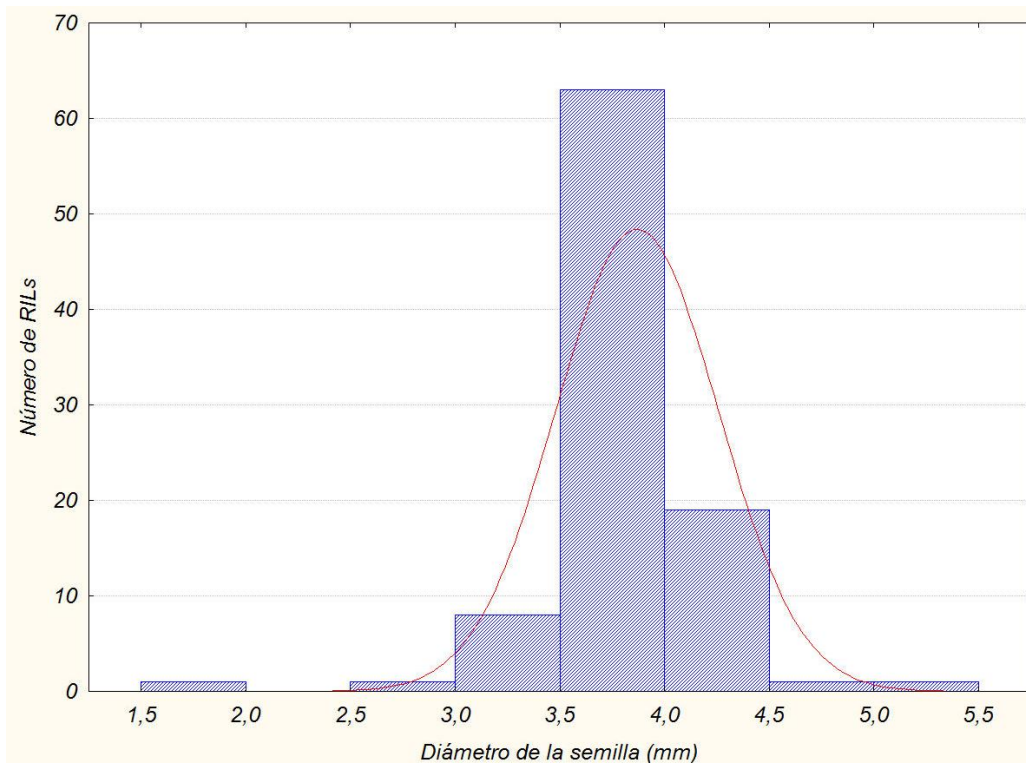


Figura 4.21. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk $W=0,853$, $p<0,001$ para el diámetro (mm) de las semillas en los individuos de las líneas RILs.

— Distribución esperada en caso de normalidad

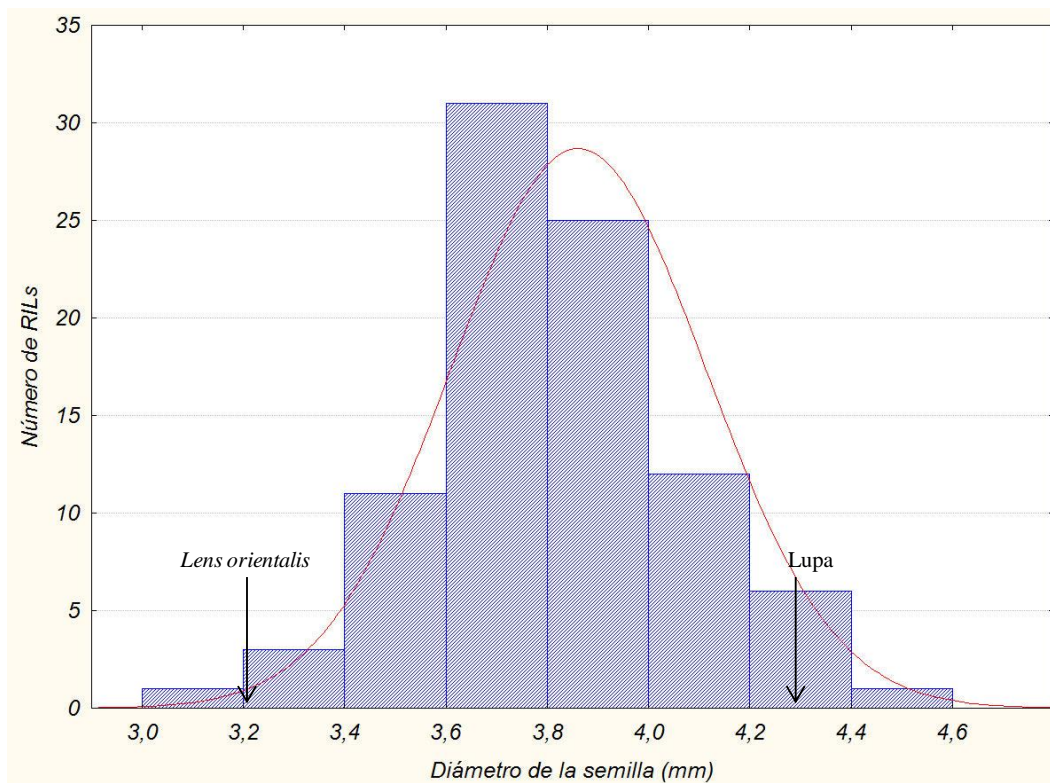


Figura 4.22. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk $W=0,979$, $p=0,153$ para el diámetro de las semillas en los individuos de las líneas RILs. En esta grafica se han eliminado los valores atípicos.

— Distribución esperada en caso de normalidad

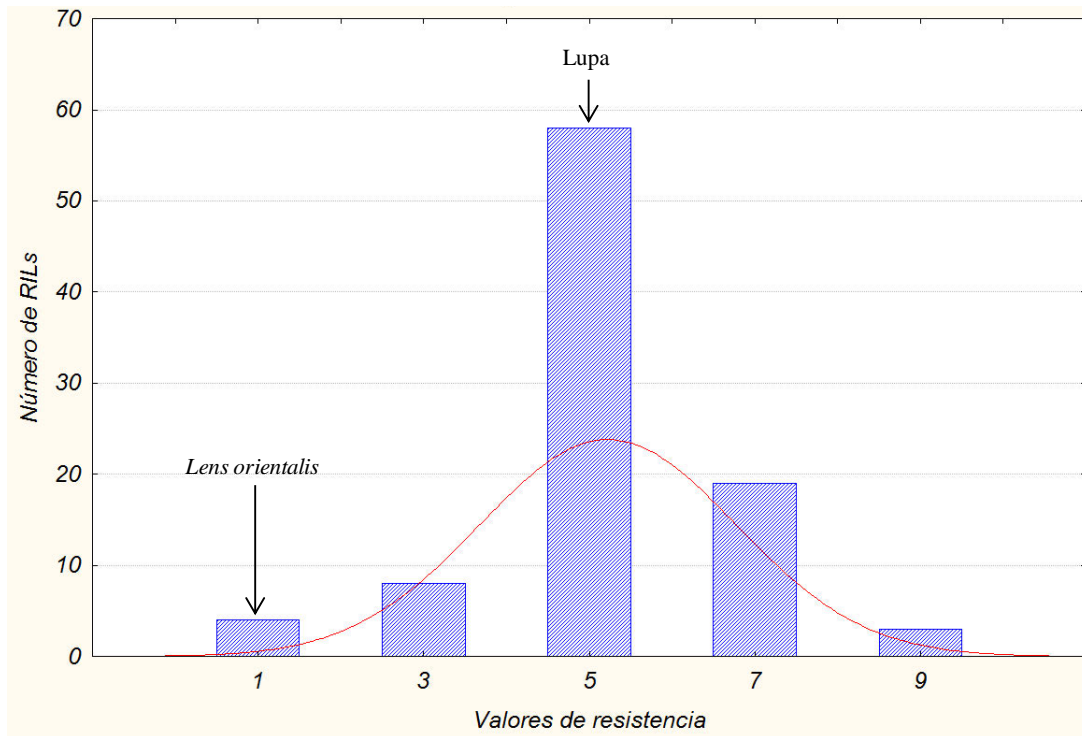


Figura 4.23. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk $W=0,805$, $p<0,001$ para la resistencia al hongo *Ascochyta lentis* en los individuos de las líneas RILs. Los valores de resistencia siguen la escala propuesta por Ford *et al.* (1999)

Análisis de correlación de los caracteres.

Para analizar las posibles correlaciones que pudieran existir entre el peso de la semillas, diámetro de las semillas y la resistencia al hongo *A. lentis*, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson y las graficas de correlación lineal. Se realizaron graficas y tablas con valores atípicos (Tabla 4.14 y Figura 4.24) y sin ellos (Tabla 4.15 y Figura 4.25).

Cuando se realizó el análisis de los coeficientes de correlación incluyendo valores atípicos (Tabla 4.14 y Figura 4.24), se observó una correlación no significativa entre peso-resistencia (0,174), pero entre diámetro-resistencia (0,214) existía una correlación significativa, que podría estar influenciada por los valores atípicos incluidos en el cálculo de este coeficiente. La correlación entre diámetro-peso resultó ser más elevada (0,817) que la del diámetro-resistencia.

Tabla 4.14. Correlaciones (Pearson) para las características fenotípicas evaluadas incluyendo los valores atípicos.

	Diámetro	Peso
Peso	0,815	
Resistencia	0,214	0,174

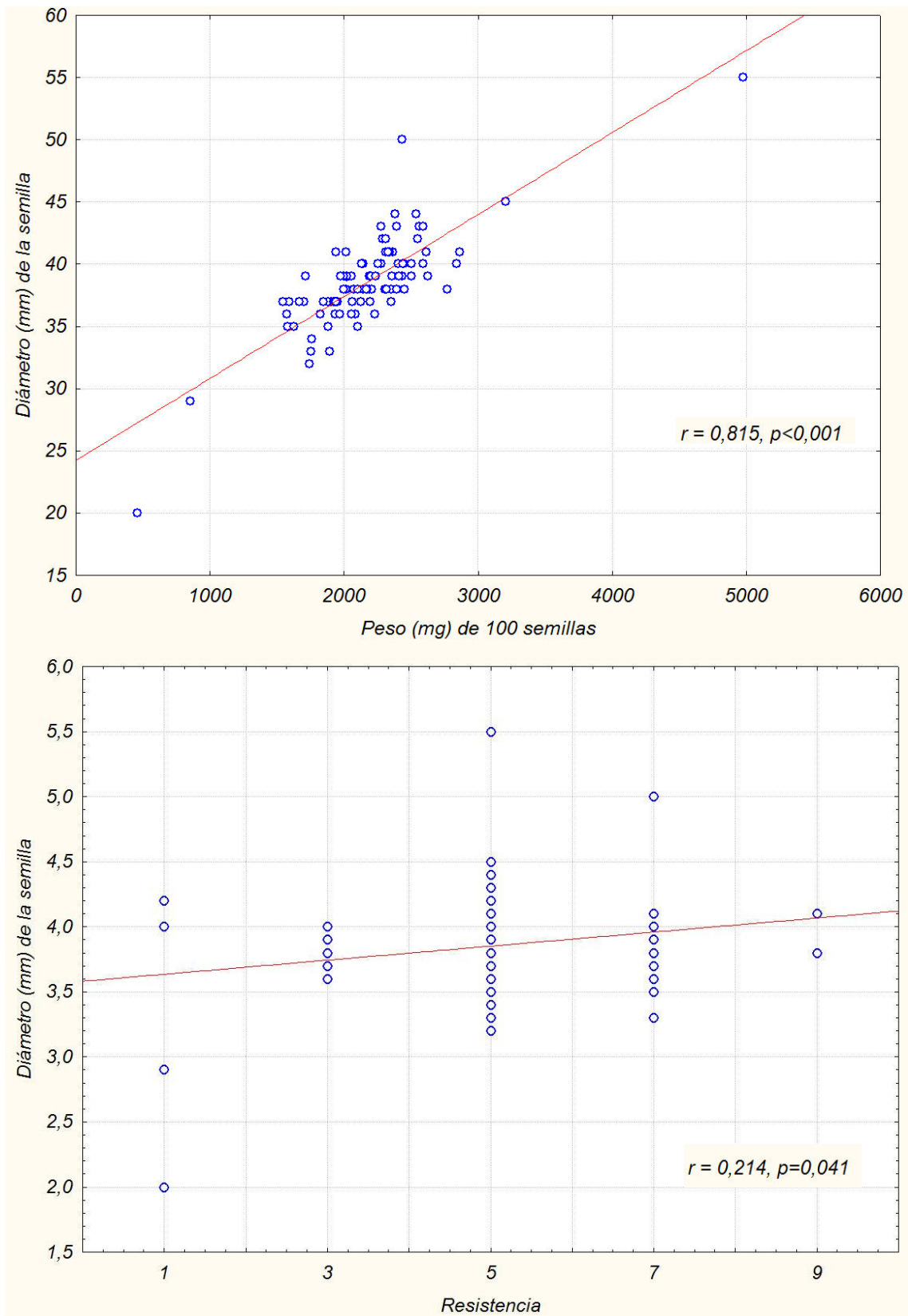


Figura 4.24. Rectas de regresión lineal del peso, diámetro y resistencia incluyendo valores atípicos. “r” es el valor del coeficiente de correlación de Pearson.

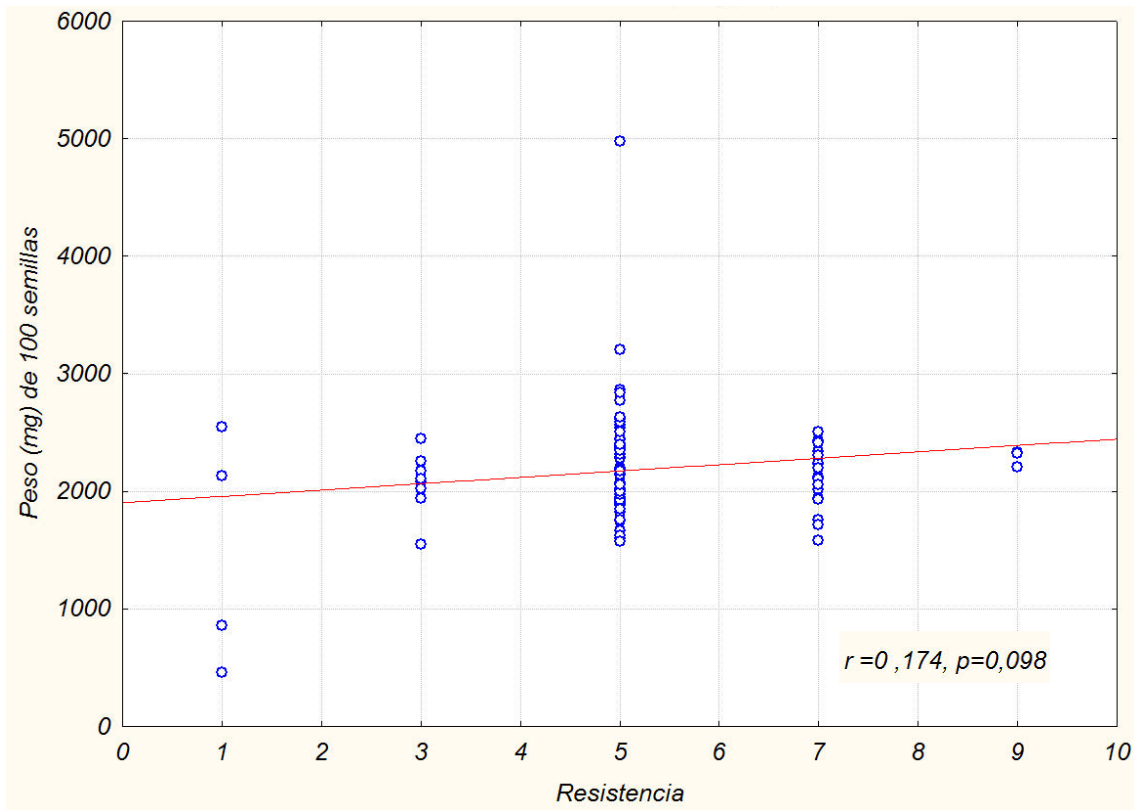


Figura 4.24 (Continuación). Rectas de regresión lineal del peso, diámetro y resistencia incluyendo valores atípicos. “r” es el valor del coeficiente de correlación de Pearson.

Al eliminar los valores atípicos del análisis (Tabla 4.15 y Figura 4.25), algunas relaciones varían. La relación peso-resistencia se hace aún menos significativa (0,061) mientras que la relación significativa encontrada entre diámetro- resistencia se convierte en no significativa (cambia de 0,214 a 0,061). Los caracteres diámetro y peso siguen manteniendo una correlación significativa (0,676)

Tabla 4.15. Correlaciones (Pearson) para las características fenotípicas evaluadas excluyendo los valores atípicos.

	Diámetro	Peso
Peso	0,676	
Resistencia	0,061	0,014

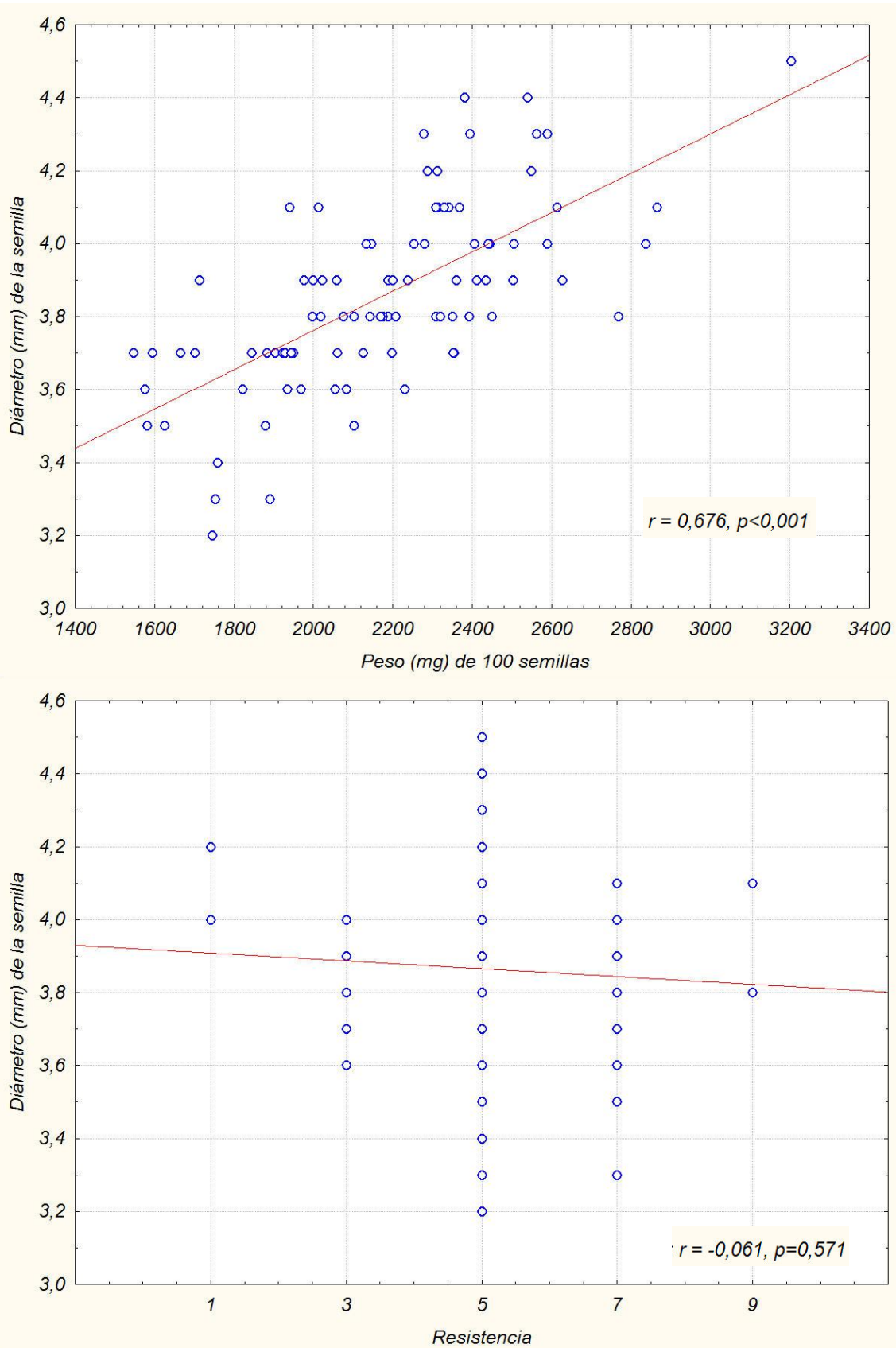


Figura 4.25. Rectas de regresión lineal del peso, diámetro y resistencia excluyendo valores atípicos. “r” es el valor del coeficiente de correlación de Pearson.

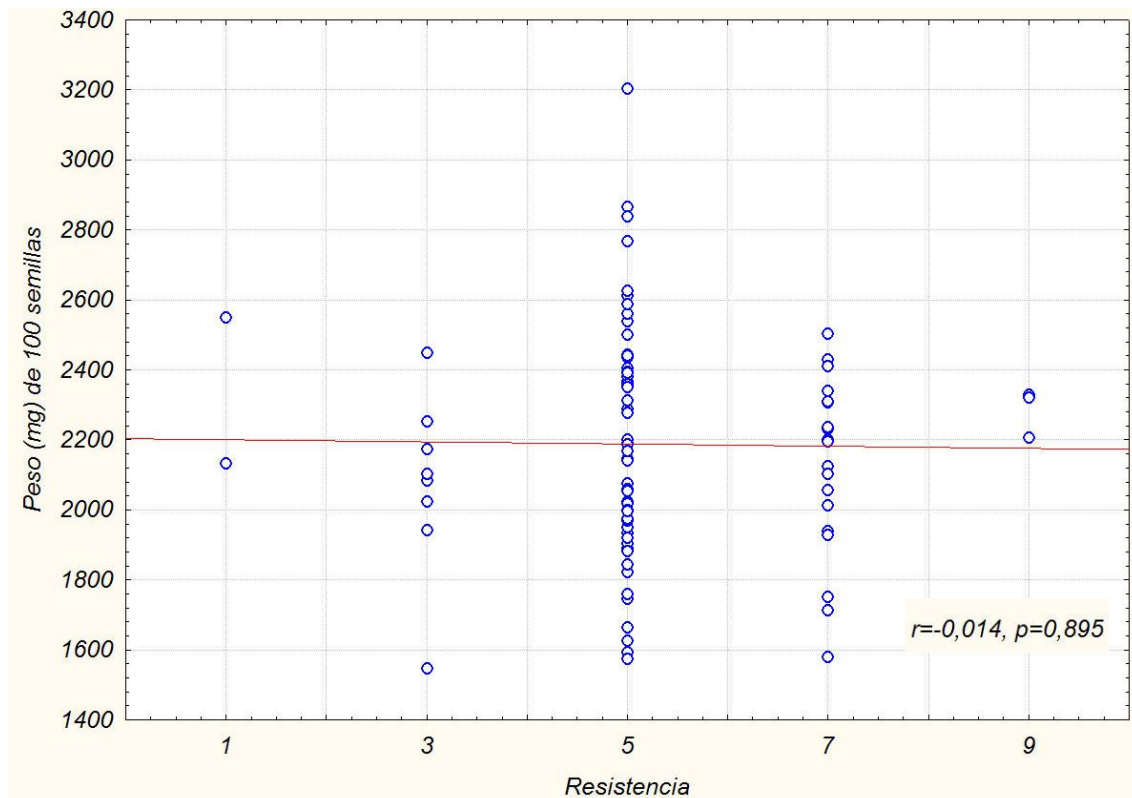


Figura 4.25 (Continuación). Rectas de regresión lineal del peso, diámetro y resistencia excluyendo valores atípicos. “r” es el valor del coeficiente de correlación de Pearson.

Fratini *et al.* (2007) realizaron una evaluación de estas características en las semillas de una población $F_{2:3}$ del cruce de Lupa x *L. c. ssp. orientalis*. La correlación fenotípica en este caso fue significativa aunque más baja de lo esperado (0,340). Por el contrario, en este trabajo se ha encontrado una correlación altamente significativa (0,815 con valores atípicos y 0,676 sin valores atípicos) (Tablas 4.23 y 4.24), que contrasta con los resultados obtenidos por Fratini *et al.* (2007). Esta diferencia pudiera deberse a las condiciones ambientales en las que se obtuvieron las distintas descendencias, ya que mientras que el diámetro de la semilla suele ser muy constante, el grosor (y por tanto el peso) muestra una variación importante relacionada con las condiciones ambientales (Fedoruk *et al.*, 2013). Cuando estos dos caracteres se han analizado en otros cruzamientos, las correlaciones también han resultado significativas (por ejemplo 0,885 en Gopesh *et al.*, 2013) lo que sugiere que existe una fuerte asociación entre el peso y el diámetro de la semilla.

Con los datos obtenidos de los caracteres morfológicos y el mapa de ligamiento se pudieron localizar QTLs sobre ciertas regiones del genoma. El análisis de QTLs se realizó con el programa QTL cartographer v2.5 (Wang *et al.*, 2005) utilizando tres modelos: Análisis de marcador simple, análisis de mapeo por intervalo y análisis de mapeo por intervalo compuesto.

El valor de LOD utilizado como umbral para declarar como significativa la presencia de un QTL es uno de los parámetros más importantes en el análisis de QTLs, ya que su número puede variar en función de dicho valor (Lin *et al.*, 1998). Los valores umbrales de LOD utilizados han estado entre 2,0 y 3,0 y en cada análisis se determinó mediante la realización de 1.000 permutaciones de los datos.

4.4.1. Análisis por marcador simple.

Este método se ha utilizado con aquellos marcadores que no se incluyeron en ningún grupo de ligamiento.

La Tabla 4.16 muestra la probabilidad para los marcadores independientes de que las líneas RIL homocigotas para los alelos del parental Lupa se puedan considerar iguales a las homocigotas para los alelos de *L. c. ssp. orientalis*. Cuando las diferencias son significativas existe la posibilidad de que haya un QTL estrechamente ligado a dicho marcador. También, en esta Tabla se observa la importancia relativa del QTL para una característica (R^2). Este valor representa la proporción de la varianza fenotípica total explicada por un marcador para una determinada característica.

El análisis de regresión simple muestra 4 marcadores independientes asociados con posibles QTLs para el peso de la semilla, destacando el ISSR UBC859_3 que explica un 7,82% de la varianza fenotípica. Los marcadores P453, P670 y UBC864_8 explican respectivamente el 2,9%, el 4,5% y el 3,5% de la varianza fenotípica observada. En todos los casos esta característica se ve incrementada por la presencia de los alelos del parental Lupa (los valores de b_1 son positivos).

Para el diámetro de la semilla, se encontraron 4 marcadores independientes asociados a posibles QTLs que explican desde un 4% hasta un 8% de la varianza fenotípica. Destacan los ISSR UBC859_3 y UBC855_2 que explican respectivamente un 8,2% y 6,0% de esta variación. Esta característica también se incrementa por los alelos del parental Lupa.

La resistencia al hongo *A. lentis* presenta 2 marcadores independientes asociados a posibles QTLs. El marcador ISSR UBC864_8 explica un 5,2% de la varianza fenotípica mientras que el marcador posiblemente relacionado con la resistencia Pto_3 explica un 4% de la varianza fenotípica. En este caso los efectos de los alelos no siempre van en el sentido esperado; así mientras que para el locus Pto_3 el valor de la susceptibilidad aumenta con la presencia de los alelos de Lupa (el parental susceptible), para el marcador UBC864_8, la presencia de los alelos de Lupa disminuye la susceptibilidad al hongo, mientras que la presencia de los alelos del parental resistente (*L. c. orientalis*) aumenta la susceptibilidad.

Tabla 4.16. Estudio de QTLs por medio del análisis de marcador simple. Se muestra el efecto aditivo de cada alelo del parental Lupa (b1) entre los marcadores independientes y los caracteres estudiados y la importancia relativa de un QTL para una característica (R^2). En amarillo se resaltan los valores significativos.

Marcador	Peso		Diámetro		Resistencia	
	b1	R^2	b1	R^2	b1	R^2
UBC810_5	-3,01	0,000	0,18	0,002	-0,20	0,016
UBC813_2	66,65	0,013	0,57	0,008	0,17	0,016
UBC864_8	107,20*	0,035	1,09**	0,055	-0,35*	0,052
UBC841_5	-50,32	0,002	-0,38	0,002	0,33	0,050
UBC890_5	-63,65	0,010	-0,62	0,015	-0,20	0,013
UBC836_1	53,94	0,032	0,75	0,084	-0,29	0,024
UBC836_3	-92,68	0,005	-0,36	0,000	0,15	0,000
UBC808_4	28,62	0,003	0,17	0,001	0,12	0,003
UBC859_3	151,59**	0,078	1,30***	0,082	-0,23	0,022
UBC828_5	24,09	0,008	0,43	0,026	0,03	0,001
UBC841_3	2,74	0,000	-0,32	0,011	-0,30	0,051
UBC841_6	-52,76	0,013	-0,26	0,007	-0,02	0,003
UBC855_2	56,24	0,017	0,92*	0,060	-0,04	0,002
UBC890_9	-91,17	0,017	-0,76	0,016	0,13	0,011
Pto_3	-30,84	0,000	-0,01	0,002	0,34*	0,040
EST_216	-3,95	0,013	-0,05	0,006	-0,01	0,000
PBS6_2	70,82	0,042	0,53	0,047	-0,00	0,001
P50814	74,50	0,022	0,20	0,002	-0,23	0,023
P453	114,90*	0,029	0,68	0,016	-0,18	0,021
P670	124,32*	0,045	0,89*	0,041	0,14	0,011
L51263	20,41	0,004	0,26	0,004	-0,24	0,027

Niveles de significancia al 5%, 1% y 0,1% están indicados por *, **y *** respectivamente.

4.4.2. Análisis de mapeo por intervalo.

Para este análisis se utilizaron los marcadores que están presentes en el mapa de ligamiento. Para la identificación de los QTLs se utilizó como valor LOD el obtenido después de 1.000 permutaciones para una probabilidad del 5%.

La Figura 4.26 muestra la situación de los 3 posibles QTLs para el peso de la semilla: QPS1 (QTL **Peso de la Semilla 1**), QPS2 y QPS3, con valores de LOD de 2,9; 2,7 y 2,1 respectivamente. Los dos primeros se encuentran en el grupo de ligamiento 2, en los intervalos flanqueados por los marcadores UBC859_1 y Gs (QPS1), y UBC818_1 y UBC808_2 (QPS2) (Figura 4.26 A). QPS3 se localiza en el grupo de ligamiento 9, en el intervalo UBC890_8 - UBC890_6. En los tres QTLs, el valor aditivo de los alelos de Lupa fue positivo, lo que indica que estos alelos incrementan el valor del carácter, en este caso el peso de la semilla (Figura 4.26 A).

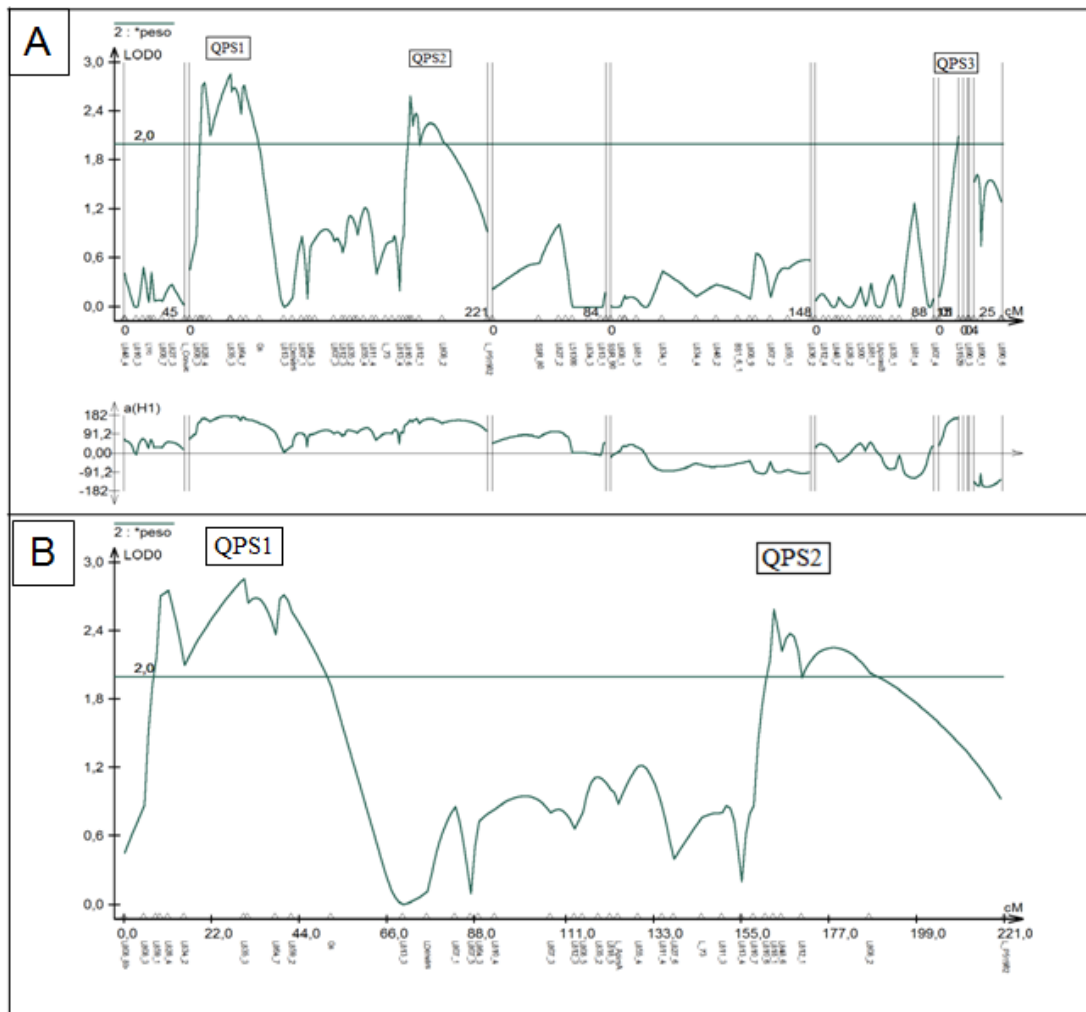


Figura 4.26. Posibles QTLs relacionados con la característica peso de la semilla mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo. En la parte superior de (A) se muestran todos los grupos de ligamiento y en la parte inferior el efecto aditivo de los alelos del parental Lupa, en (B) se muestra solo el grupo de ligamiento 2.

En la Figura 4.27 se muestra los posibles QTLs para el diámetro de la semilla con LOD igual o mayor a 2,2. Aunque a partir de las gráficas se pueden considerar hasta 6 posibles QTLs, sólo vamos a referirnos a los dos con valores de LOD más altos (2,3 y 3,6) que también se detectan con el método de mapeo por intervalo compuesto. Ambos QTLs se encuentran en el grupo de ligamiento 2 y aparecen en los intervalos UBC859_1 - Gs (QDS1: QTL diámetro de la semilla 1) y UBC818_1 - L51982 (QDS2). De nuevo, los valores aditivos indican que los alelos de Lupa tienen el efecto de incrementar el diámetro de la semilla.

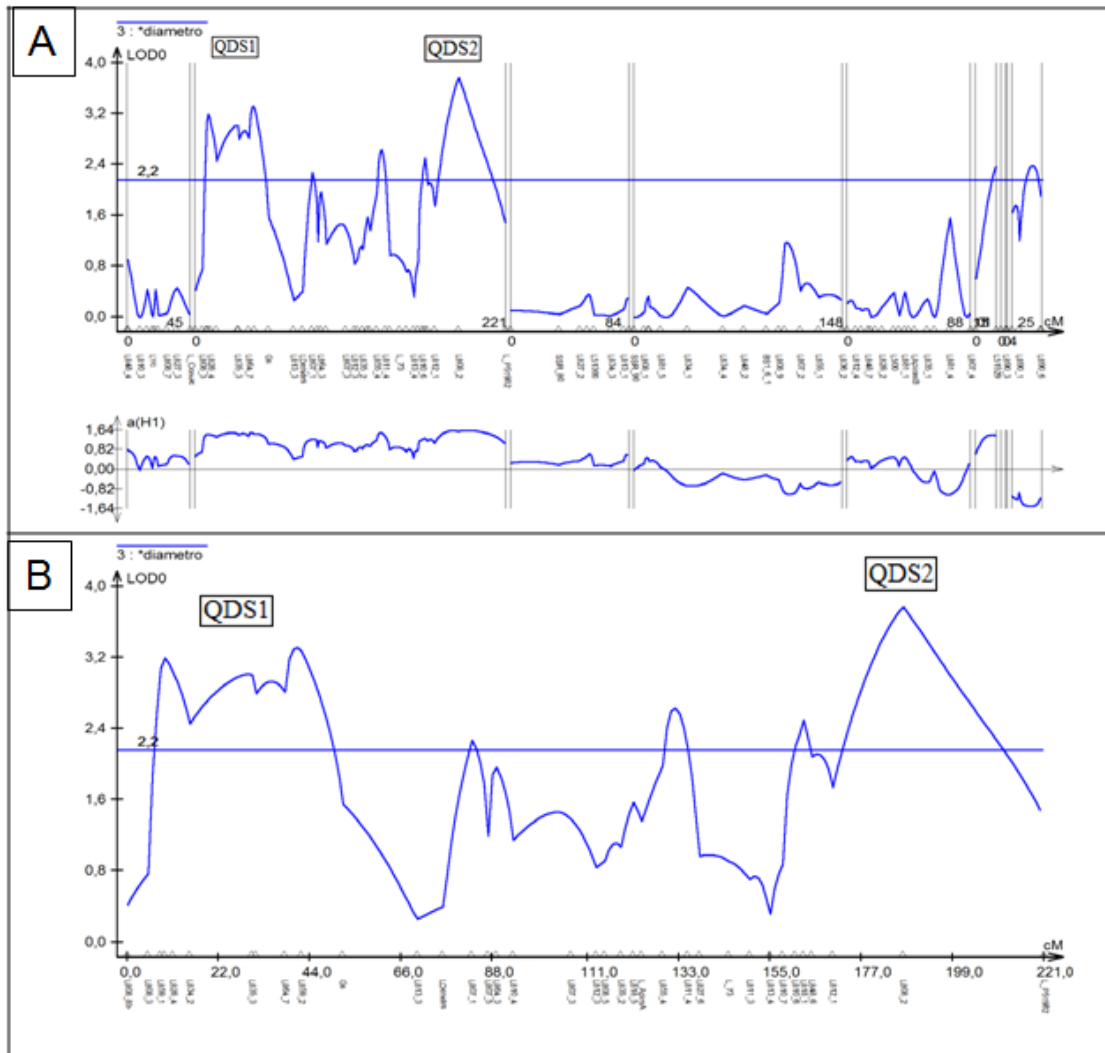


Figura 4.27. Posibles QTLs relacionados con la característica diámetro de la semilla mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo. En la parte superior de (A) se muestran todos los grupos de ligamiento y en la parte inferior el valor aditivo de los alelos del parental Lupa. En (B) se muestra solo el grupo de ligamiento 2.

Con el método de intervalo simple no se obtuvo ningún posible QTL relacionado con la característica resistencia al hongo *A. lentis* (Figura 4.28). Esto se debe a que ningún pico superó los valores umbrales de LOD necesarios ($\text{LOD} \geq 2,6$).

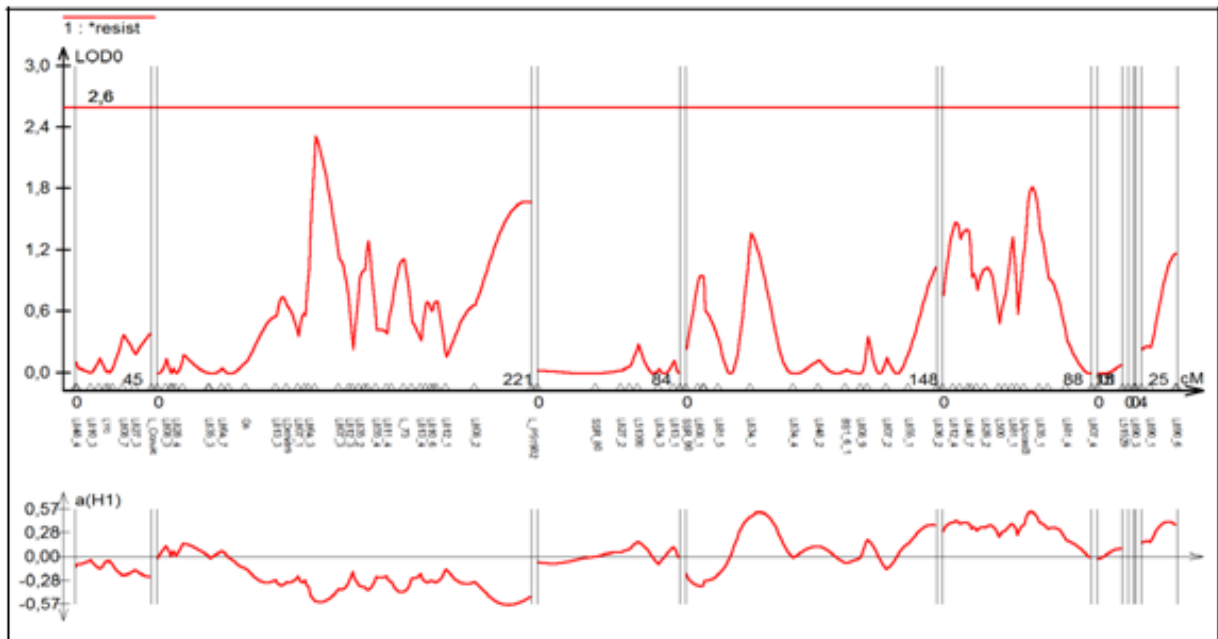


Figura 4.28. Análisis la característica resistencia al hongo *Ascochyta lentis* mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo. En la parte superior se muestran todos los grupos de ligamiento y en la parte inferior el efecto aditivo de los alelos del parental Lupa.

El mapeo por intervalo utilizado para este estudio, permitió detectar y localizar QTLs para las características peso y diámetro de la semilla (Figura 4.29). Dos posibles QTLs del diámetro y del peso se encuentran en el mismo grupo de ligamiento (GL2) y los análisis señalan que el QPS1 se encuentra en el mismo intervalo que el QDS1 (UBC859_1 - Gs), mientras que QPS2 se encuentra en un intervalo (UBC818_1 - P51982) muy similar al de QDS2 (UBC818_1 - UBC808_2). Los perfiles de LOD para ambos caracteres están muy relacionados (Figura 4.29, A) lo que indicaría que los mismos genes serían los principales responsables del fenotipo de ambas características o bien que los genes sean diferentes pero su localización cromosómica sea próxima.

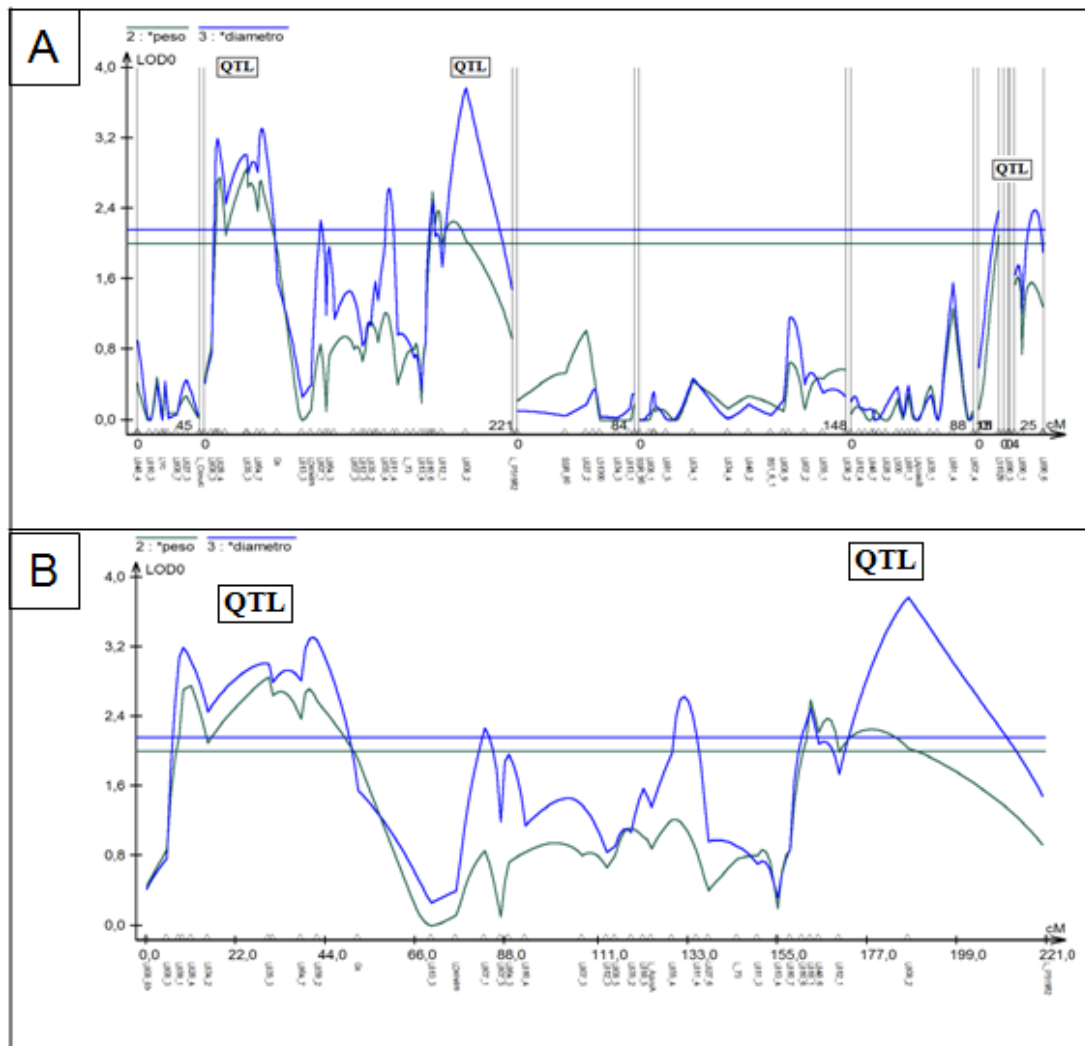


Figura 4.29. Posibles QTLs relacionados con la característica peso y diámetro de la semilla mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo. En (A) se muestran todos los grupos de ligamiento y en (B) el grupo de ligamiento 2.

4.4.3. Análisis de mapeo por intervalo compuesto.

La Figura 4.30 muestra los 3 posibles QTLs para el peso de la semilla. Dos de ellos se encuentran en los intervalos UBC808_3 - UBC835_3 (QPESO1 - QTL del **peso 1**) y UBC810_6 - UBC808_2 (QPESO2), ambos en el grupo de ligamiento 2, mientras que QPESO3 (intervalo UBC890_8 - UBC890_1) se encuentra en el grupo de ligamiento 9. En la Tabla 4.17 se muestran las características principales de estos tres QTLs: grupo de ligamiento, valores de LOD máximos, porcentaje de la varianza explicada (R^2) y valores aditivos de los alelos del parental Lupa. Se puede observar que en todos los casos los alelos de Lupa aumentan el peso, siendo QPESO2 el de mayor efecto, tanto en el porcentaje de varianza que explica (33,9%) como en el efecto de los alelos (cada alelo de Lupa aumentaría el peso de 100 semillas en 501,9 mg). Los efectos de los otros dos QTLs,

aunque menos acusados, también son importantes puesto que cada uno explica aproximadamente un 10% de la varianza.

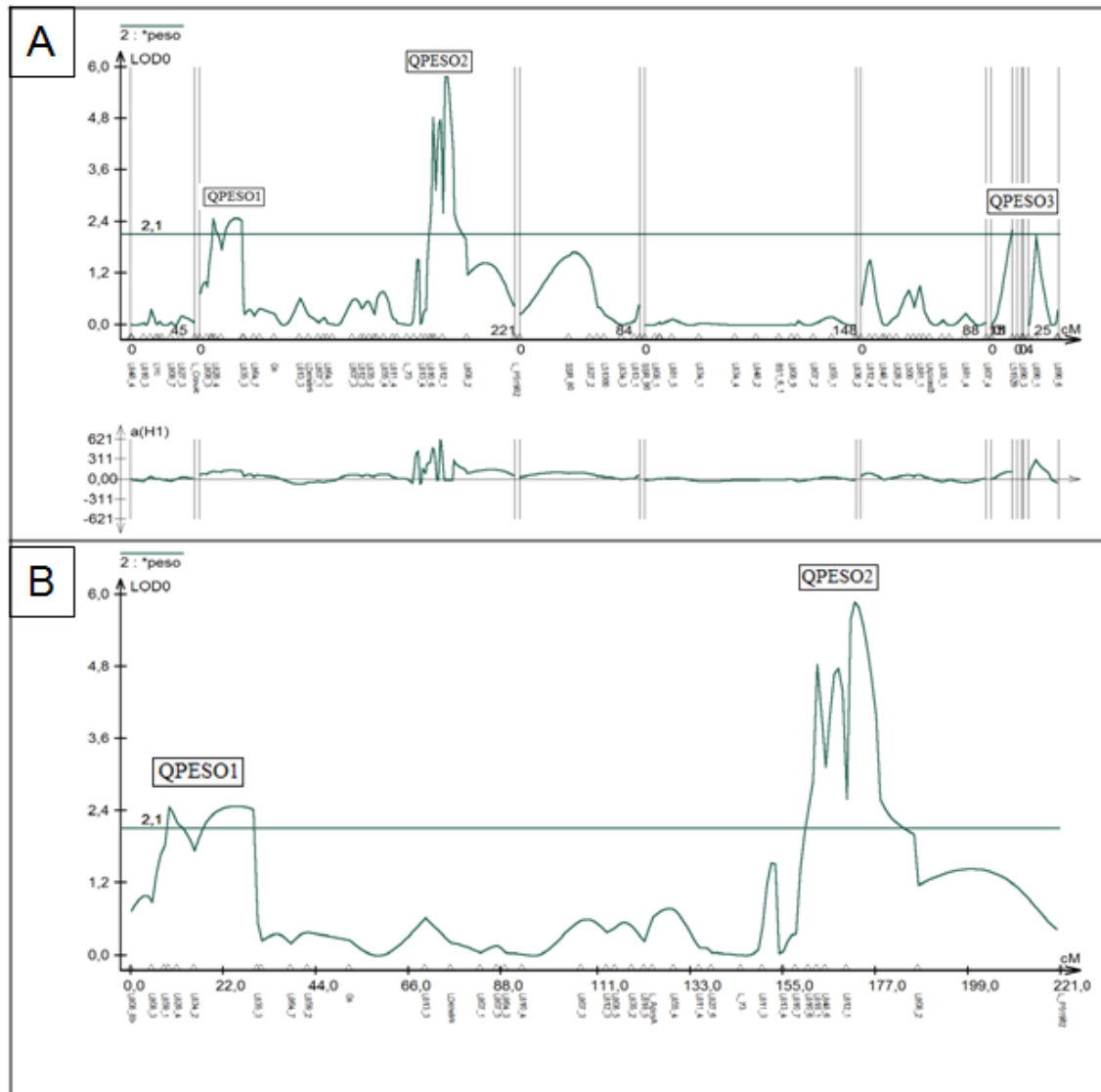


Figura 4.30. Posibles QTLs relacionados con la característica peso de la semilla mediante el modelo de análisis de mapeo por intervalo compuesto. En la parte superior de (A) se muestran todos los grupos de ligamiento y en la parte inferior el valor aditivo, en (B) solo se muestra el grupo de ligamiento 2.

Tabla 4.17. Características de los QTLs de Peso. G.L.: grupo de ligamiento; LOD: valor máximo de LOD en el intervalo; R^2 representa el porcentaje de la varianza fenotípica explicada por la presencia de dicho QTL; A: efecto aditivo de los alelos del parental Lupa.

QTL	Intervalo	G.L	LOD	R^2 (%)	A
QPES01	UBC808_3 - UBC835_3	2	2,4	8,7	144,1
QPES02	UBC810_6 - UBC808_2	2	2,9	33,9	501,9
QPES03	UBC890_8 - UBC890_1	9	2,1	7,9	310,3

En la Figura 4.31 se observan 2 posibles QTLs que influyen en el diámetro de la semilla, situados en los intervalos UBC808_3 - UBC835_3 (QDIAM1, **QTL diámetro 1**) y UBC812_1 - P51982 (QDIAM2), ambos presentes en el grupo de ligamiento 2 con valores de probabilidad significativos (LOD=4,7; 5,8). En la Tabla 4.18 se observa que los alelos de Lupa incrementan el diámetro de la semilla, aumentando QDIAM1 y QDIAM2 en 0,15 y en 0,16 mm respectivamente el diámetro de las semillas. Además, QDIAM2 y QDIAM1 explican el 17% y 14% de la variación fenotípica.

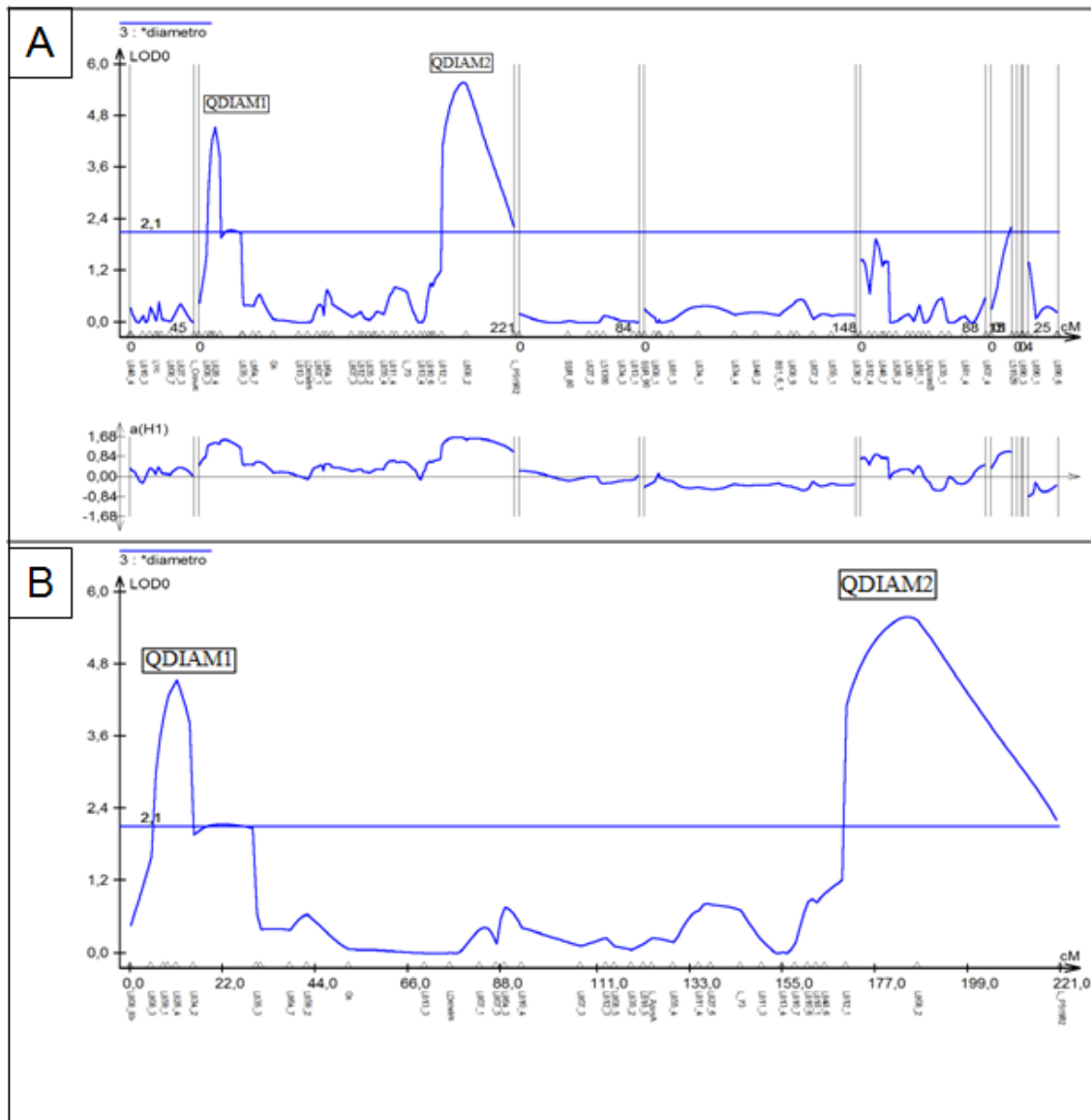


Figura 4.31 Posibles QTLs relacionados con la característica diámetro de la semilla mediante el modelo de análisis de mapeo por intervalo compuesto. En la parte superior de (A) se muestran todos los grupos de ligamiento y en la parte inferior el valor aditivo, en (B) solo se muestra el grupo de ligamiento 2.

Tabla 4.18. Características de los QTLs de Diámetro. G.L.: grupo de ligamiento; LOD: valor máximo de LOD en el intervalo; R^2 representa el porcentaje de la varianza fenotípica explicada por la presencia de dicho QTL; A: efecto aditivo de los alelos del parental Lupa.

QTL	Intervalo	G.L	LOD	R^2 (%)	A
QDIAM1	UBC808_3 - UBC835_3	2	4,7	14,0	0,15
QDIAM2	UBC812_1 - P51982	2	5,8	16,7	0,16

La Figura 4.32 muestra los dos posibles QTLs para resistencia. Estos se sitúan en los intervalos UBC808_1 - UBC818_3 (QRESIS1: **QTL resistencia 1**) y UBC834_1 - UBC834_4 (QRESIS2) (Figura 4.32 B), ambos localizados en el grupo de ligamiento 4. Los valores aditivos de la Tabla 4.19 demuestran que para QRESIS1 cada alelo de Lupa disminuye la susceptibilidad a *Ascochyta* en 0,6 puntos, mientras para que en QRESIS2 cada alelo de Lupa aumenta la susceptibilidad en 0,8 puntos. QRESIS1 y QRESIS2 explican el 10% y el 22% de la variación fenotípica respectivamente.

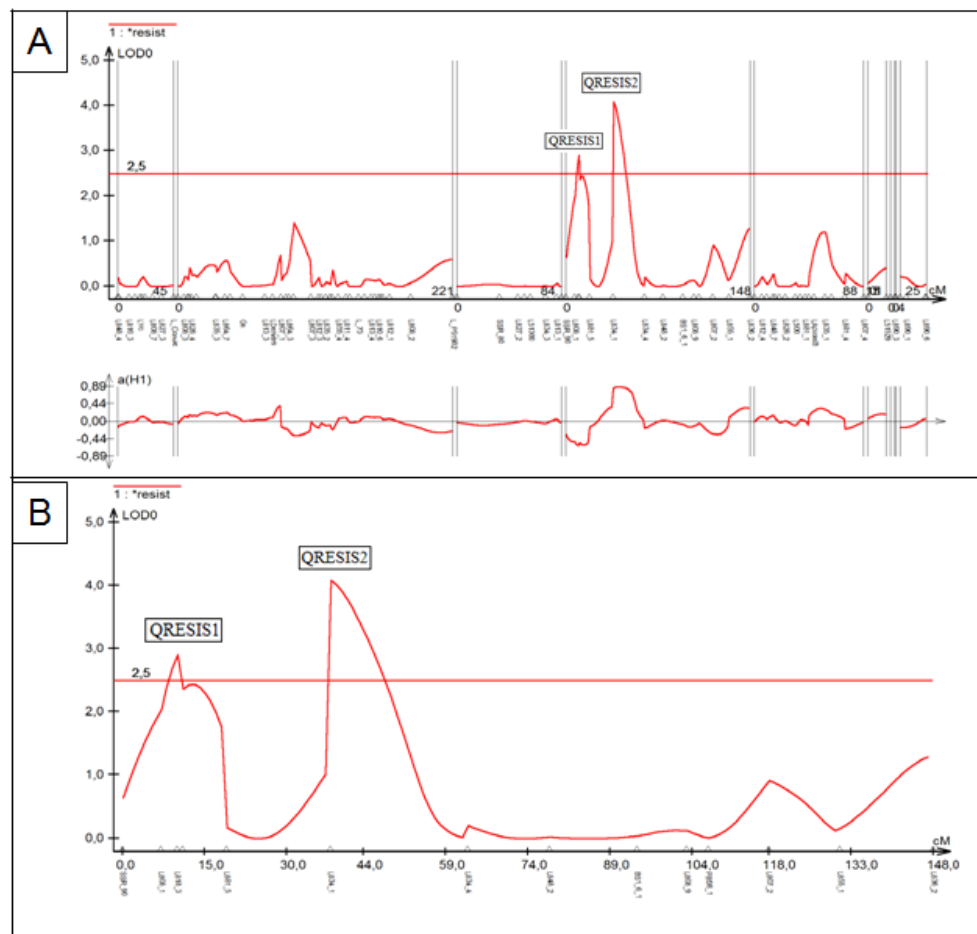


Figura 4.32. Posibles QTLs relacionados con la característica resistencia al hongo *Ascochyta lentis* mediante el modelo de análisis de mapeo por intervalo compuesto. En la parte superior de (A) se muestran todos los grupos de ligamiento y en la parte inferior el valor aditivo, en (B) solo el grupo de ligamiento 4.

Tabla 4.19. Características de los QTLs de Resistencia. G.L.: grupo de ligamiento; LOD: valor máximo de LOD en el intervalo; R² representa el porcentaje de la varianza fenotípica explicada por la presencia de dicho QTL; A: efecto aditivo de los alelos del parental Lupa.

QTL	Intervalo	G.L	LOD	R ² (%)	Aditividad
QRESIS1	UBC808_1 - UBC818_3	4	2,9	10,18	-0,6071
QRESIS2	UBC834_1 - UBC834_4	4	4,1	21,73	0,8463

Los resultados del análisis de QTLs con los dos métodos de intervalos (simple y compuesto) han proporcionado resultados similares; sólo para aquellos QTLs cuyo valor de LOD sobrepasaba ligeramente el nivel de significación con uno de los dos métodos se han encontrado algunas diferencias, como por ejemplo para algunos posibles QTLs para el carácter "diámetro de la semilla" que no se detectan con el método de intervalos compuesto. Puesto que este último tipo de análisis se considera más potente, en la discusión sólo nos referiremos a aquellos QTLs que se detectan en ambos casos, con la excepción de los dos QTLs significativos detectados para resistencia a *Ascochyta* y que sólo aparecen con el método de intervalos compuesto.

4.4.4. Análisis de QTLs de peso y diámetro de las semillas.

El tamaño de las semillas es una de las características más importantes de la lenteja, ya que determina su valor económico en función de las preferencias de los consumidores y productores (Fratini y Pérez de la Vega, 2011). Por esta causa, el conocimiento del control genético de este rasgo se ha abordado en varias ocasiones comprobándose que se trata de un carácter cuantitativo determinado por varios QTLs.

A la hora de estudiar el tamaño de las semillas, se suele recurrir a tomar datos sobre características fáciles de cuantificar como el peso de 100 o 1000 semillas, y con menos frecuencia a otros rasgos cuya medición es más laboriosa, como el diámetro y el grosor de la semilla.

4.4.4.1. QTLs para peso de la semilla.

Para el peso de la semilla se han detectado 3 QTLs, dos de ellos ligados en el GL2 y otro en el GL9, que en conjunto explican aproximadamente el 50% de la varianza encontrada en las líneas RIL, siendo especialmente relevante el denominado QPESO2, responsable de más de un 30% de la variación. Además existen 4 marcadores independientes que explicarían un 20% adicional si su comportamiento fuera aditivo. En todos ellos los valores aditivos van en la dirección esperada, de modo que el parental con mayor peso de semilla (Lupa) presenta alelos que incrementan el peso en relación a los alelos del parental silvestre.

En el estudio realizado en la $F_{2:3}$ de este mismo cruzamiento, utilizando el mapa genético de Durán *et al.* (2004), también se detectaron 3 QTLs, todos ellos en grupos de ligamiento diferentes (GLI, GLIII y GLVI), aunque en conjunto sólo explicaban alrededor del 20% de la varianza (Fratini *et al.*, 2007). Al comparar las localizaciones en el mapa genético, se encuentran coincidencias ya que nuestro grupo de ligamiento 2 es equivalente al GLVI, y nuestro GL9 pudiera corresponder con un segmento del GLIII ya que en ambos aparecen marcadores obtenidos con el cebador UBC890; sin embargo no se han detectado QTLs significativos en el equivalente al GLI de Fratini *et al.* (GL5 en el presente trabajo). La presencia de este último QTL también ha sido descrita en por Tahir y Muehlbauer (1995).

Otros estudios realizados en lenteja dan resultados variables respecto al número de QTLs implicados, como 1 (Barrios, 2013), 2 (Sakar, 1983; Barrios, 2013), 3 (Tahir y Muehlbauer, 1995), 5 (Tahir *et al.*, 1994; Saha *et al.*, 2013). Estas diferencias se deberían a los cruzamientos y poblaciones empleados y a las metodologías de detección.

No ha sido posible relacionar los QTLs descritos en la literatura con los encontrados en el presente trabajo por la ausencia de marcadores comunes, aunque en varios cruzamientos interespecíficos diferentes (*L. c. culinaris* x *L. c. orientalis*; *L. c. culinaris* x *L. ervoides*) el análisis de marcadores simples indica que al menos uno de ellos estaría ligado al marcador morfológico Gs (Abbo *et al.*, 2005), por lo que sería equivalente a uno de los localizados en nuestro GL2 (posiblemente QPESO1). También de manera recurrente se encuentran QTLs para peso de la semilla en la zona del locus Yc (Barrios 2012; Saha *et al.*, 2013), aunque en este cruzamiento ni Fratini *et al.* (2007), ni en este trabajo se han detectado. Es destacable que en el garbanzo también se haya descrito un QTL común que controlaría el peso de la semilla y la concentración de un carotenoide responsable del color del cotiledón (Abbo *et al.*, 2005).

El peso de la semilla es una característica que se ha analizado en otras leguminosas, como *Vicia*, *Pisum* o *Medicago*. En estas, el número de QTLs encontrado también es variable en función de los cruzamientos y ambientes probados, pero de manera general podemos concluir que siempre se detectan uno o dos QTLs que explican una gran parte de la varianza. Así en *Vicia faba* se ha identificado un QTL situado en el cromosoma 6 responsable de un 30% de la variación (Vaz Patto *et al.*, 1999); en guisante, Burstin *et al.* (2007) encontraron 9 zonas del genoma en las que localizan varios QTLs, que explican entre el 10 y el 30% de la varianza; en *Medicago truncatula* hay al menos tres QTLs, localizados en los cromosomas 5, 6 y 7, que explican entre el 10 y el 15% de la variación (Sankaran *et al.*, 2009), si bien en otros cruzamientos se han detectado QTLs situados en los cromosomas 1, 2, 5, 7 y 8 (Vandecasteele *et al.*, 2011). La existencia de macro- y

microsintenia del genoma de la lenteja con el de las especies citadas anteriormente ha sido demostrada en varios trabajos (para una revisión, Kaló *et al.*, 2011; Cruz-Izquierdo *et al.*, 2012), por lo que los resultados sobre QTLs de una especie pueden tener utilidad en otra. Uno de los ejemplos más recientes ha sido la utilización de la colinealidad entre los marcadores de *M. truncatula* que delimitan el QTL para peso de semilla situado en el cromosoma 5 y los que flanquean el QTL de *Pisum sativum* detectado por Burstin *et al.* (2007) en el grupo de ligamiento 1. Esta información ha sido crucial para determinar que el gen candidato subyacente a dichos QTLs codificaría para una subtilasa con el papel de controlar el número de células de los cotiledones (D'Erfurth *et al.*, 2012).

4.4.4.2. QTLs para diámetro de la semilla.

En la población analizada, esta característica ha mostrado una correlación positiva significativa ($r=0,676$, $p<0,001$) con el peso de la semilla, lo que sugiere una base genética subyacente común. Los estudios de QTLs también muestran resultados similares, tanto en el análisis de marcadores individuales (Tabla 4.16) como en los que se basan en el mapeo por intervalos (Tabla 4.20; Figura 4.33).

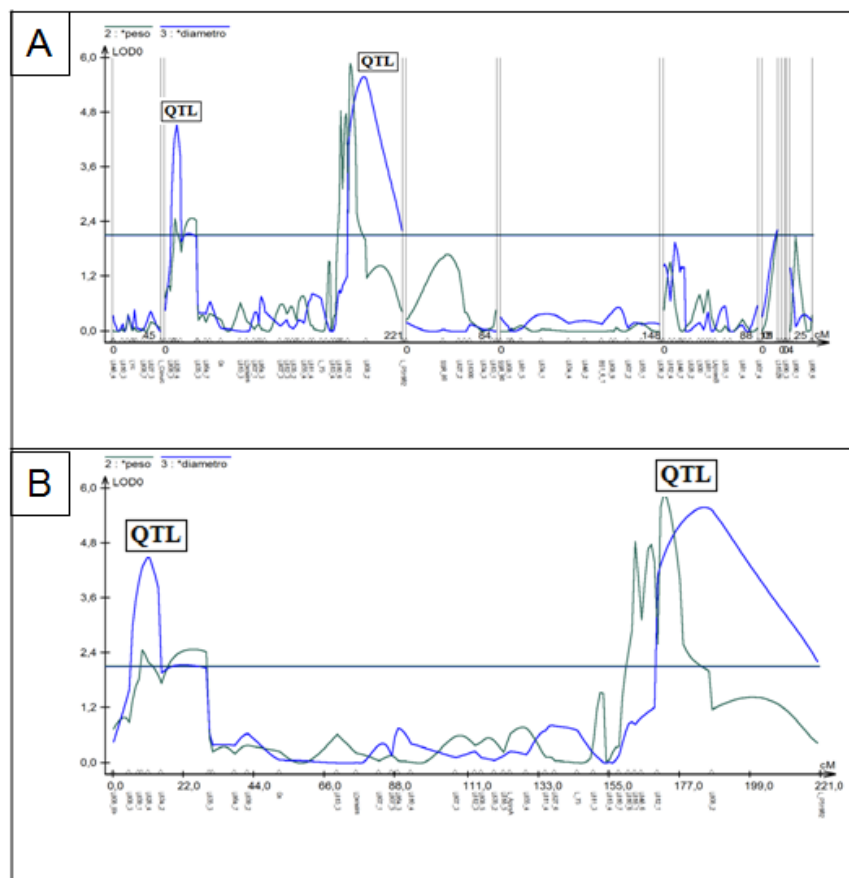


Figura 4.33. Posibles QTLs relacionados con las características peso y diámetro de la semilla mediante el modelo de análisis de marcador por intervalo compuesto (A y B). En (A) se muestran todos los grupos de ligamiento y en (B) solo el grupo de ligamiento 2.

Tabla 4.20. Intervalos de los QTLs de peso (QPS-QPESO) y diámetro (QDS-QDIAM) de la semilla en el GL2.

QTL	Mapeo por intervalo	QTL	Mapeo por intervalo compuesto
QPS1-QDS1	UBC808_3 - UBC835_3	QPESO1 - QDIAM1	UBC808_3 - UBC835_3
QPS2	UBC818_1 - UBC808_2	QPESO2	UBC810_6 - UBC808_2
QDS2	UBC818_1 - P51982	QDIAM2	UBC812_1 - UBC835_3
QPS3	UBC890_8 - UBC890_6	QPESO3	UBC890_8 - UBC890_1

Los QTLs para el diámetro de la semilla se encuentran prácticamente en la misma posición en el GL2 (Figura 4.34 y Tabla 4.20), y de los marcadores independientes analizados, 3 de los 4 que muestran una relación significativa también son comunes con los encontrados para el peso. La mayor diferencia ha residido en el QTL para el peso detectado en el GL9 que no ha resultado significativo para el diámetro, aunque el valor de LOD casi alcanzaba el valor umbral. En la Figura 4.33 también se observa que los máximos valores de LOD no son exactamente coincidentes, aunque debido a la imprecisión de las localizaciones, no se puede desechar la hipótesis de que son los mismos los genes subyacentes a ambos caracteres. El efecto aditivo de los dos QTLs es similar y en conjunto explican un 30% de la varianza, siendo en ambos casos el alelo procedente del parental con las semillas de mayor tamaño (Lupa) el relacionado con un mayor diámetro en las RILs.

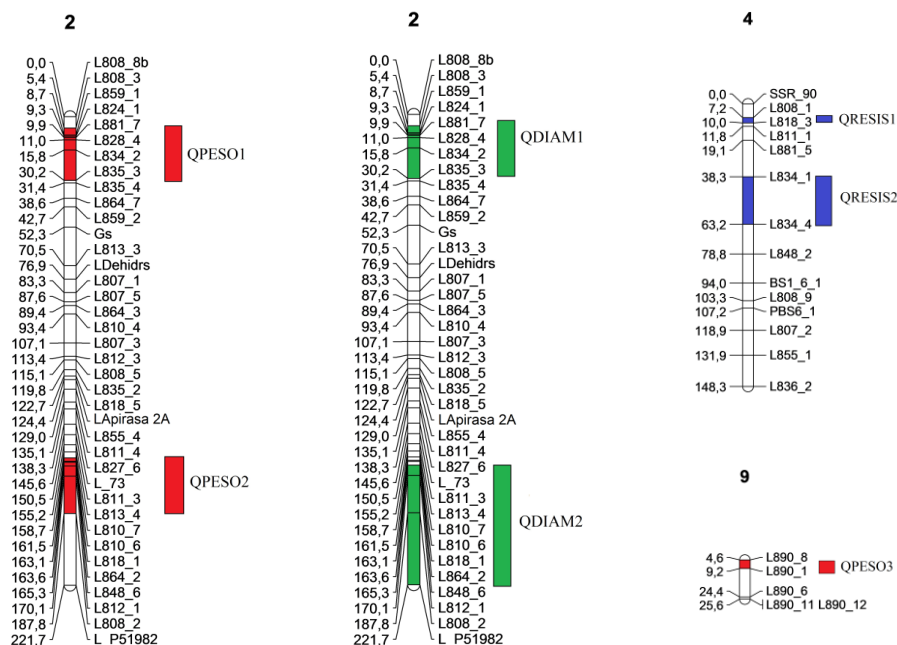


Figura 4.34. Posibles QTLs ligados a marcadores polimórficos para las características peso de la semilla (rojo), diámetro de la semilla (verde) y resistencia al hongo *Ascochyta lentis* (azul) en los GL2 (2), GL4 (4) y GL9 (9). Los análisis se realizaron por mapeo por intervalo compuesto con el programa WinQTL cartographer v2.5 (Wang et al., 2005).

En el estudio realizado por Fratini *et al.* (2007) en la población $F_{2:3}$ de este mismo cruzamiento se detectaron 3 QTLs que en conjunto explicaban un 37% de la varianza, dos de ellos en los mismos grupos de ligamiento que los encontrados para el peso de la semilla (GLI y GLIII), aunque en posiciones lo suficientemente separadas como para considerar que los genes subyacentes son diferentes, y uno en un grupo de ligamiento distinto (GLV). Si consideramos las relaciones entre el mapa en la generación $F_{2:3}$ y el obtenido en las líneas RILs, se deberían haber encontrado QTLs en los GL equivalentes (al menos en GL5 y GL4, y posiblemente en el GL9). Como se puede ver, los QTLs en ambas poblaciones segregantes han sido completamente distintos, aunque en el GL9 el valor LOD ha estado al límite de resultar significativo. Si bien esta falta de relación en la posición de los QTLs en diferentes generaciones resulta difícil de explicar, puesto que en general los QTLs de mayor efecto suelen detectarse independientemente de la generación analizada, ya se había descrito en el caso de QTLs relacionados con características de semillas de guisantes (Irzykowska y Wolko, 2004). Las diferencias entre los resultados obtenidos en poblaciones F_2 y RILs pueden deberse a cuatro causas según Díaz-Ruiz *et al.* (2010): a) el papel de los efectos dominantes o sobredominantes presentes en F_2 pero ausentes en RILs debido a la homocigosis de estas líneas; b) el limitado poder estadístico al utilizar una mayoría de marcadores dominantes en F_2 ; c) efectos ambientales y/o de interacciones GxE; d) debido a la homogeneidad de cada línea RIL, en estas poblaciones se consigue mayor precisión en la medida de los caracteres que en las $F_{2:3}$.

Fedoruk *et al.* (2013) encontraron 3 QTLs para el diámetro de la semilla que se manifestaban de manera estable en varios ambientes, y que en conjunto eran responsables de un 60% de la variación. El QTL más importante se localizaba en el GL1, en la región en la que mapeaba el locus responsable del color del cotiledón Yc , y los otros dos estaban situados en los GL2 y GL7. En nuestros resultados no se han encontrado QTLs en los grupos de ligamiento relacionados (GL1 y GL3).

Saha *et al.* (2013) también han descrito la existencia de 3 QTLs para el diámetro de la semilla, todos ellos situados en grupos de ligamiento diferentes, y dos de ellos colocalizan con los QTLs descritos para peso de la semilla. Una característica diferencial en relación al presente trabajo y al de Fedoruk *et al.* (2013) reside en la distribución bimodal que presenta el rasgo en su población segregante, lo que sugiere la presencia de un gen mayor a cuyo efecto se superpone el de dos QTLs con menor efecto. Aunque es casi imposible relacionar la mayoría de los grupos de ligamiento de Saha *et al.* con los de Fedoruk *et al.* o con los del presente trabajo, en los tres casos se ha mapeado el locus Yc , y sólo en los resultados de Fedoruk *et al.* aparece un QTL para el diámetro de la semilla cercano a dicho locus, aunque

en varios casos (Barrios, 2013; Saha *et al.*, 2013) se ha encontrado un QTL relacionado con el peso de la semilla, pero no con el diámetro de la misma, en dicha posición.

En las especies más relacionadas con la lenteja, las semillas son más redondeadas (*Pisum*, *Vicia sativa*) o irregulares (*Lathyrus*, *Vicia faba*), por lo que el diámetro de la semilla está directamente relacionado con el tamaño y peso, o bien no es un parámetro con significado a la hora de caracterizar las semillas, de ahí la falta de datos comparables en la bibliografía.

Sobre los genes candidatos que podrían jugar un papel en el diámetro de la semilla Fedoruk (2013) ha realizado una comparación de las secuencias de los marcadores relacionados con los QTLs correspondientes con el genoma de Medicago. Uno de ellos mapeaba a unas 600 kpb del gen homólogo del de guisante *Rug3* (Medtr1g102010), gen que participa en la regulación de la síntesis de almidón en las semillas en desarrollo. En otro caso el marcador mapeaba a unas 200 kpb de un gen relacionado con el transporte de sacarosa (Medtr4g131920), que es homólogo a genes de guisante y haba que controlan el desarrollo de la semilla (Borisjuk *et al.*, 2008).

La tendencia a que colocalicen juntos QTLs de caracteres correlacionados supone desde un punto de vista práctico una dificultad para realizar programas de selección dirigidos exclusivamente a uno de los rasgos. En el caso de peso y diámetro de semilla en lenteja este fenómeno sería ventajoso si se desea aumentar el tamaño de la semilla manteniendo la forma lenticular característica, pero otras colocalizaciones de QTLs pueden ser más problemáticas. Así de manera recurrente se describen QTLs relacionados con tamaño y peso de semilla que colocalizan con los relacionados con tiempo de floración o genes que actúan pleiotrópicamente sobre dichos rasgos (Jofuku *et al.* 1994; Watanabe *et al.*, 2004; Ohto *et al.*, 2005; He *et al.*, 2010; Pérez-Vega *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). Ciñéndose a los casos más recientes encontrados en lenteja podemos señalar que Barrios (2013) describe una región situada en su grupo de ligamiento 12 en la que aparecen QTLs relacionados con peso de semilla y floración, además de con otro tipo de características como tolerancia a heladas; Fedoruk *et al.* (2013) describen un único QTL estable en distintos ambientes y años para "días hasta la floración" que colocaliza con el QTL para diámetro de semilla situado en la zona del locus *Yc*, Saha *et al.* (2013) detectan 3 QTLs para "días hasta el 50% de la floración", dos de los cuales están en la misma posición que QTLs para peso y diámetro de semilla. En todos los casos los alelos que aumentan el tamaño de la semilla, también incrementan el tiempo de floración, por lo que la selección de variedades de floración rápida iría asociada a lentejas más pequeñas.

En el presente trabajo no se ha analizado ninguna característica relacionada con la floración, aunque en la población F₂, Fratini *et al.* (2007) no encontraron relación entre los QTLs para peso o diámetro de semilla y tiempo hasta la floración.

4.4.4.3. QTLs para resistencia a *Ascochyta*.

Con respecto a la respuesta al hongo *A. lentis*, se han detectado dos QTLs en el grupo de ligamiento 4 y dos marcadores independientes que muestran relación con esta característica. En todos los casos la significación estadística ha sido débil, y de hecho para los QTLs esta significación sólo aparece cuando se utiliza el método de intervalos compuesto, por lo que estos resultados hay que tomarlos más como indicativos que como definitivos.

Es de destacar que de los dos marcadores independientes, uno de ellos (Pto_3) se obtuvo con cebadores diseñados para amplificar secuencias análogas a genes de resistencia y que la presencia del alelo procedente del parental Lupa incrementa la susceptibilidad al patógeno (valor aditivo 0,341); sin embargo una vez clonado, secuenciado y analizadas las homologías con *Medicago* y *Glycine*, su posible función no está clara (De la Puente *et al.*, 2013).

Los dos QTLs detectados explican respectivamente el 10% y 21% de la varianza fenotípica observada. En uno de ellos (QRESIS1) el valor aditivo no muestra la dirección esperada; un valor aditivo de -0,61 (Tabla 4.19) indica que un individuo homocigoto para los alelos de Lupa para este QTL presentaría un valor de susceptibilidad 1,2 puntos más bajo que si fuera homocigoto para los alelos correspondientes a *L. c. spp. orientalis*, y por tanto el parental que aportaría resistencia sería el parental silvestre. Esto resulta sorprendente y difícil de explicar, dado que partimos de la noción de que *L. c. spp. orientalis* es el parental resistente a *Ascochyta* en nuestro cruzamiento. Sin embargo, en casi todos los estudios de caracteres cuantitativos se encuentran QTLs con efectos contrarios a los esperados, que se suelen explicar por el hecho de que en un genotipo dado siempre existirán diferentes QTLs con distintos efectos (tanto positivos como negativos) que en conjunto resultan en el fenotipo observado; es decir, un genotipo susceptible puede contener QTL con alelos que proporcionen resistencia, y similarmente, un genotipo resistente puede tener alelos que confieren susceptibilidad. La consecuencia genética es que en las descendencias aparecerán individuos con fenotipos transgresivos (más y menos resistentes que cualquiera de los parentales), fenómeno que también aparece en los resultados del presente trabajo. Este hecho ha sido descrito en profundidad en muchas plantas cultivadas como el tomate (de Vicente y Tanksley, 1993) o en animales como el ratón (Mollah e Ishikawa, 2013), y

también se ha descrito en lenteja (Tahir *et al.*, 1994; Abbo *et al.*, 2005; Rubeena *et al.* 2006; Tullu *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2012; Barrios, 2013; Saha *et al.*, 2013).

Los resultados del análisis de QTLs para resistencia a *Ascochyta* en otros trabajos han diferido en varios aspectos de los del presente trabajo. Así, Rubeena *et al.* (2006) y Gupta *et al.* (2012) detectaron de 1 a 3 QTLs con efectos limitados en sus poblaciones (generalmente alrededor del 10%), aunque dependía del cruzamiento. Por otra parte Tullu *et al.* (2006) detectaron un único QTL que explicaba el 41% de la variación por lo que habrían localizado un gen con gran efecto en la resistencia. La correspondencia entre los QTLs detectados en distintos trabajos no se ha podido realizar debido a la falta de marcadores genéticos comunes.

Sobre los posibles genes candidatos que pudieran subyacer a los dos QTLs no ha sido posible establecer hipótesis alguna debido a que ninguno de los nuevos marcadores genéticos, desarrollados en este trabajo a partir de datos de cambio de expresión en respuesta a la infección con *Ascochyta*, aparecen en el grupo de ligamiento 4. Aunque no alcanzaran el límite de significación, tampoco se observan máximos de valores LOD en las posiciones donde mapean los marcadores genéticos (Figura 4.32). Analizando estos marcadores de modo individual, sólo P51982 muestra un valor significativo del coeficiente de regresión ($b_1=-0,398$, $p=0,015$), explicando un 7,8% de la varianza, si bien el valor aditivo presenta un signo contrario al esperado, ya que los alelos del parental Lupa disminuyen la susceptibilidad. Es destacable que este mismo marcador también aparece relacionado con la resistencia a *Ascochyta* en *Vicia faba*, explicando hasta el 25% de la varianza (Dra. Eva Madrid, comunicación personal).

La capacidad que permiten los nuevos mapas genéticos de detectar y localizar QTLs y de identificar marcadores estrechamente ligados a ellos representa un gran avance ya que esta información puede ser utilizada en programas de mejora mediante el uso de selección asistida por marcadores (MAS). Este uso depende de variables como el número de QTLs identificados para cada carácter dado, el efecto que cada uno tiene sobre el carácter, el tamaño de la región cromosómica implicada, la posición y disponibilidad de marcadores polimórficos asociados a estos QTLs. En cualquier caso, antes de plantearse la utilización de los marcadores en un programa MAS es necesario proceder a la validación de los QTLs en varios ambientes y fondos genéticos, y mapear intensivamente las zonas genómicas correspondientes para reducir lo más posible las regiones cromosómicas responsables de los efectos sobre la característica.

Los datos obtenidos hay que considerarlos como preliminares, ya que es necesario seguir saturando el mapa genético, incluir marcadores génicos que permitan establecer relaciones entre los diferentes resultados publicados, tanto en lenteja como en leguminosas relacionadas, y analizar las características cuantitativas en diferentes ambientes.

4.5. ESTUDIO DE GENES DE RESISTENCIA.

Para poder llevar a cabo el estudio de cambios de expresión de algunos genes presuntamente relacionados con resistencia y ver la respuesta al hongo *Ascochyta lentis*, se infectaron plantas resistentes (WA8649090 y ILL323) y susceptibles (Mala y Precoz) a este hongo y posteriormente se analizaron las respuestas al día 1 y 15 después de la infección.

Como se indicó en Materiales y Métodos, se sembró el hongo en placas PDA/AGAR (Figura 4.35), se aislaron las esporas y se prepararon a una concentración de 2×10^5 esporas/ml utilizando la cámara de recuento Thoma (Figura 4.36). Para reducir la tensión superficial del agua y lograr una mejor infección se utilizó Tween 20 (0,01% v/v), tanto para la solución con esporas como para el agua utilizada para las muestras control.

Se recolectaron las hojas de cada variedad al día 1 y 15 después de la infección (2 muestras control y 2 infectadas para cada periodo de infección), no observándose lesiones en las hojas el día 1 (1 en la escala de Ford *et al.*, 1999) pero estas fueron comunes en las hojas de las plantas susceptibles analizadas el día 15 (7 en la escala de Ford *et al.*) pero no en las plantas resistentes analizadas (1 en la escala de Ford *et al.*, 1999) (Figura 4.37). Las hojas fueron colectadas e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido, se pulverizaron y conservaron a -80°C hasta su utilización.

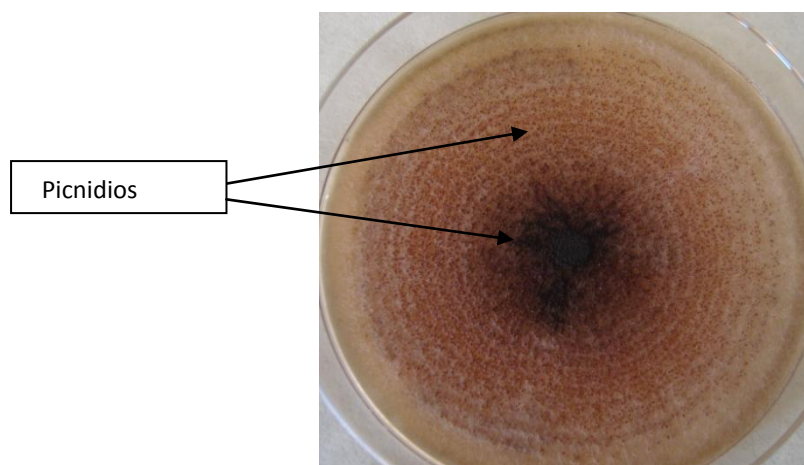


Figura 4.35. Hongo *Ascochyta lentis* sembrado en medio PDA/AGAR (50% W/W) al día 21. La siembra se realizó en el centro de la placa.

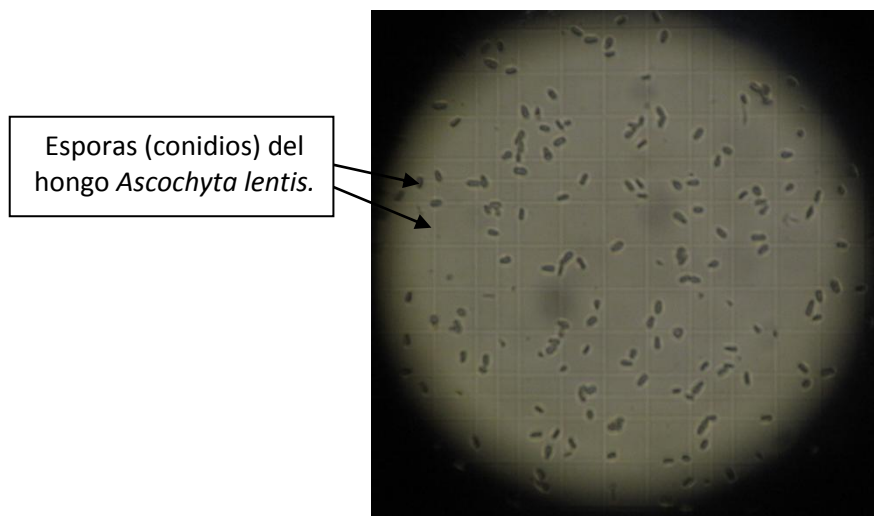


Figura 4.36. Conteo de esporas en la cámara de recuento Thoma. En esta figura se observa un solo campo, compuesto por 16 cuadrículas, el conteo se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante de la placa.

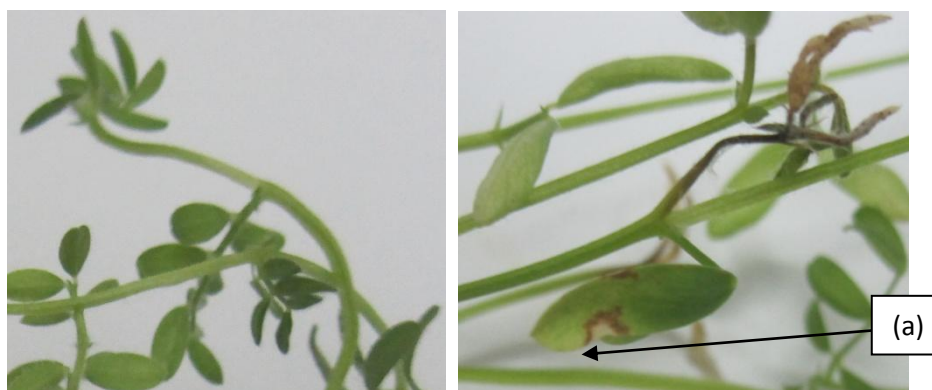


Figura 4.37. Plantas de lenteja variedad Mala al día 15 de infección. A la izquierda planta control y a la derecha planta infectada. (a) Lesión causada por el hongo *Ascochyta lentis*.

4.5.1. Aislamiento del ARN de plantas de lenteja control e infectadas con el hongo *Ascochyta lentis*.

Para el aislamiento del ARN se utilizó el kit RNA Pure Link (de la casa comercial Life technologies) con el que se obtuvo un ARN poco degradado (Figura 4.38).

A partir de este ARN se obtuvo ADNc, con el que se analizaron los cambios de expresión de diferentes genes en respuesta al hongo *A. lentis*.

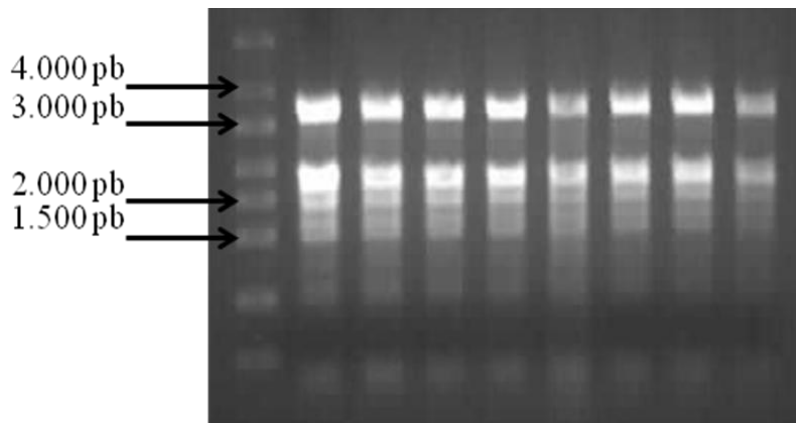


Figura 4.38. Producto de extracción de ARN del género *Lens* utilizando el kit RNA Pure Link. Primer carril RiboRuler™ High Range Ladder. ARN de diferentes muestras al día 15 de infección (Mala control, ILL323 control, Precoz control, WA8649090 control, Mala infectada, ILL323 infectada, Precoz infectada, y WA8649090 infectada) cargadas consecutivamente.

4.5.2. Análisis de la expresión de posibles genes de resistencia al hongo *Ascochyta lentis*.

Teniendo en cuenta que las diferencias en las respuestas de defensa entre las plantas resistentes (ILL323 y WA 8649090) y susceptibles (Mala y Precoz), después de la infección por el hongo *Ascochyta lentis* se pueda deber a la expresión diferencial de algunos genes, se eligieron varios genes basándose en los datos obtenidos previamente en el Área de Genética mediante la técnica del SuperSAGE. Se diseñaron cebadores para estos genes (Tabla 4.21) y se probó su especificidad empleando una PCR convencional en Mala e ILL323 (Figura 4.39 y 4.40), obteniéndose bandas nítidas y únicas, y de un tamaño igual o inferior a los 300 pares de bases (Figura 4.41). Posteriormente, se realizaron las amplificaciones qPCR para comparar los niveles de expresión de estos genes en plantas resistentes y susceptibles y comprobar si existían patrones comunes a estos fenotipos. Para estimar los cambios en la expresión de estos genes se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que supone una eficiencia de reacción de PCR óptima e idéntica tanto para el gen de interés como para el gen de referencia. En este trabajo, se calcularon las eficiencias de amplificación en todas las reacciones mediante el programa LinRegPCR v2013.0 (Ruijter *et al.*, 2009), eliminando del análisis aquellas con eficiencias menores al 80% de la que presentaban los genes de referencia.

En la Tabla 4.22 y en las Figuras 4.42 y 4.43, se observan las variaciones en los niveles de expresión de los genes analizados. Al observar las repuestas al patógeno, existen casos en que los cambios de expresión son similares en plantas resistentes y susceptibles, y se mantienen a los 15 días después de la infección. Así en el marcador P75 se da un

incremento en la expresión mientras que en P46, P53 y P73 ocurre generalmente una disminución, aunque no siempre se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas.

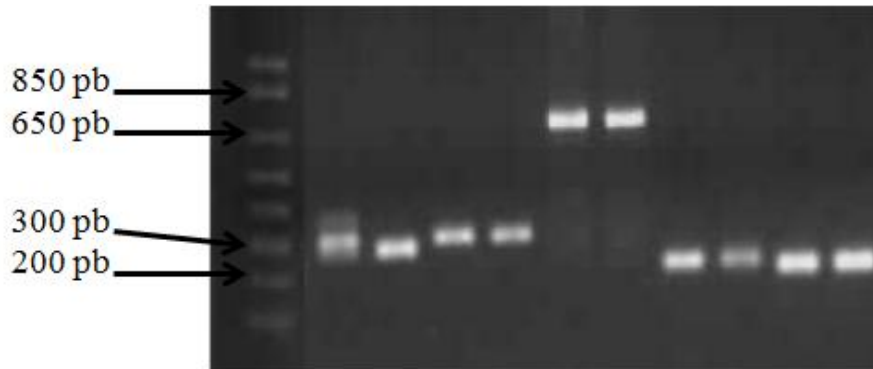


Figura 4.39. PCR convencional de las muestras Mala e ILL323. Primer carril 1Kb Plus DNA leader, segundo y tercer carril marcador P43, cuarto y quinto carril marcador P46, sexto y séptimo carril marcador P53, octavo y noveno carril marcador P73 y décimo y décimo primer carril marcador P75.

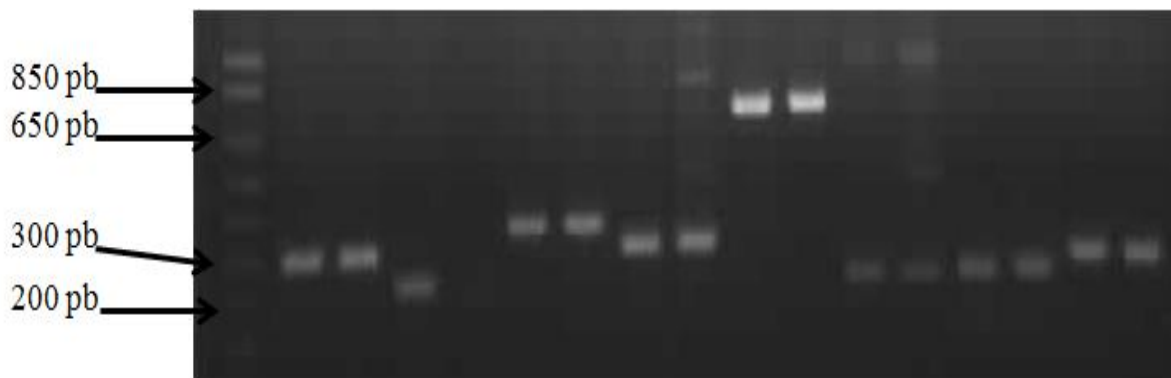


Figura 4.40. PCR convencional de las muestras Mala e ILL323. Primer carril 1Kb Plus DNA leader, segundo y tercer carril marcador P98, cuarto y quinto carril marcador 179, sexto y séptimo carril marcador P260, octavo y noveno carril marcador P51982, décimo y décimo primer carril marcador P52010, décimo segundo y décimo tercer carril marcador P52014, décimo cuarto y décimo quinto carril marcador P52052 y décimo sexto y décimo séptimo carril marcador P52059.



Figura 4.41. PCR para el el gen de la tubulina un día 1 después de la infección Primer carril 1Kb Plus DNA leader, del segundo al décimo sexto carril muestras control amplificadas para el gen de referencia β -tubulina en las muestras Mala, ILL323, Precoz y WA8649090 (tres replicas para cada muestra) y del décimo séptimo al vigésimo octavo carril muestras Mala, ILL323, Precoz y WA8649090 infectadas con el hongo *A. lentis* (tres replicas para cada muestra).

Tabla 4.21. Cebadores utilizados en las reacciones de qPCR.

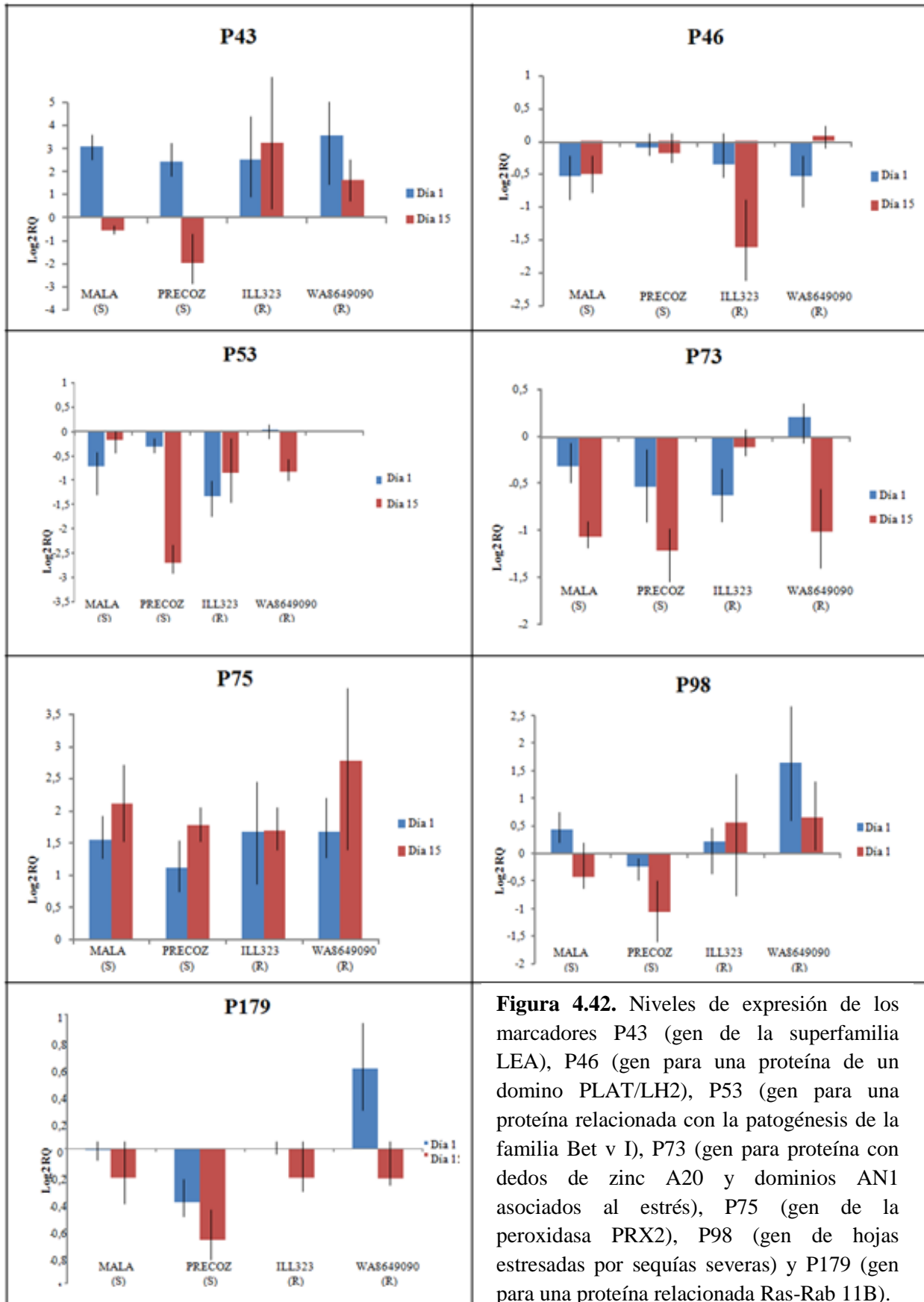
Marcador	Secuencia	Tamaño	Homólogo en <i>Medicago truncatula</i> (Mt4.0v1) y posible función
P43	F-GGCTCGCTCTTCACTAACG R-TCTGGAACCCATGAAACCTT	20 20	Medtr7g108745: gen de la superfamilia LEA-3
P46	F-TATCTTCGTCGCAACCGTTA R-TGCCCCGCTCAAATAGTTA	20 20	Medtr3g087510: gen para una proteína de un dominio PLAT/LH2
P53	F-TCATGGTGAAGACTGGCATC R-TTGTCGATATCTCCACCAAACA	20 22	Medtr8g045640: gen para una proteína relacionada con la patogénesis de la familia Bet v I
P73	F-GTTAGTTGCTTCCGGCTCAG R-TGCGGTAATCAAATGGACAA	20 20	Medtr2g098160: gen para una proteína relacionada con estrés y que presenta dedos de zinc de tipo A20 y AN1.
P75	F-CCCTCTTCCACCCTTCCTAC R-GTTGGATCAGGTTTGCCAGT	20 20	Medtr2g029750: gen de la peroxidasa (PRX2)
P98	F-AAGATCGTGAAAGGGCTCAA R-GCTTCCACCAGCATTATTCC	20 20	Medtr7g056410: gen similar a algunos con expresión en hojas estresadas por sequías severas
P179	F-CGTTGAATTGCGAACTCGTA R-GGTTTCGCAGTTCTTTCAGC	20 20	Medtr2g075950: gen para proteína relacionada Ras-Rab 11B
P260	F-TATGGCTATGCTGCTCCTGA R-GTTTGGCCATTTCGATTA	20 20	Medtr5g087270: gen codificante de quinasa serina/treonina
P51982	F-ATAATGCCGGTAATGCTGCT R-AGACGAGCATCAGCTGGAAC	20 20	Medtr4g127710: gen de la ATPasa en membrana plasmática y posible rol en reconocimiento a patógenos
P52010	F-CCTCTTGGACTGCTCGTCTC R-CCATTGGATGCTCTTCATCA	20 20	Medtr1g083780: gen que codifica una proteína que induce deshidratación similar a Di19 procedente del gen AT3G05700 de <i>Arabidopsis</i>
P52014	F-CATGCAGCAAGGTTTGACAT R-GCCTGAGCCGTCAAAGTT	20 18	Medtr8g096910: gen de la taumatina (similar a PR5a)
P52052	F-CATGGCTAACATCCAGAAGAAA R-CCACTTTTCTTGAGGCCAGA	22 20	Medtr4g012800: gen de una proteína hipotética
P52059	F-ATGACAGCAACGTCGTTTGA R-AAAACTTTGGTTGAACAAGAACG	20 23	Medtr5g023170: gen codificante de una proteína asociada a la senescencia con actividad sulfurtransferasa y relacionada con la rodanasa

Tabla 4.22. Valores de nivel de cambio o *foldchange*, (\log_2) de diferentes variedades resistentes y susceptibles al hongo *A. lentis*.

Marcador	Muestra	FOLDCHANGE día 1 (\log_2)	FOLDCHANGE día 15 (\log_2)
P43	MALA (S)	3,068	-0,554
	PRECOZ(S)	2,411	-1,989
	ILL323(R)	2,535	3,211
	WA8649090(R)	3,584	1,595
P46	MALA (S)	-0,531	-0,495
	PRECOZ(S)	-0,097	-0,180
	ILL323(R)	-0,346	-1,614
	WA8649090(R)	-0,541	0,071
P53	MALA (S)	-0,725	-0,182
	PRECOZ(S)	-0,333	-2,715
	ILL323(R)	-1,351	-0,858
	WA8649090(R)	0,025	-0,854
P73	MALA (S)	-0,320	-1,068
	PRECOZ(S)	-0,530	-1,224
	ILL323(R)	-0,626	-0,117
	WA8649090(R)	0,202	-1,015
P75	MALA (S)	1,546	2,104
	PRECOZ(S)	1,113	1,784
	ILL323(R)	1,676	1,695
	WA8649090(R)	1,663	2,774
P98	MALA (S)	0,428	-0,429
	PRECOZ(S)	-0,237	-1,075
	ILL323(R)	0,216	0,552
	WA8649090(R)	1,635	0,652
P179	MALA (S)	-0,013	-0,220
	PRECOZ(S)	-0,403	-0,680
	ILL323(R)	-0,004	-0,220

Marcador	Muestra	FOLDCHANGE día 1 (Log ₂)	FOLDCHANGE día 15 (Log ₂)
	WA8649090(R)	0,593	-0,222
P260	MALA (S)	0,190	0,074
	PRECOZ(S)	0,537	-0,956
	ILL323(R)	0,901	-0,252
	WA8649090(R)	1,617	0,230
P51982	MALA (S)	-0,087	0,507
	PRECOZ(S)	0,099	1,058
	ILL323(R)	0,561	-1,285
	WA8649090(R)	1,245	-0,430
P52010	MALA (S)	0,468	-0,281
	PRECOZ(S)	0,269	-0,258
	ILL323(R)	-0,132	-0,676
	WA8649090(R)	1,305	-0,576
P52014	MALA (S)	0,844	3,798
	PRECOZ(S)	-2,359	-0,230
	ILL323(R)	5,621	3,652
	WA8649090(R)	-1,447	3,973
P52052	MALA (S)	0,962	-0,917
	PRECOZ(S)	0,258	-1,182
	ILL323(R)	0,193	0,771
	WA8649090(R)	0,271	-0,319
P52059	MALA (S)	-0,977	-0,202
	PRECOZ(S)	-0,554	-1,620
	ILL323(R)	0,853	-1,374
	WA8649090(R)	2,675	-0,607

En fondo blanco se presentan los valores no significativos, en fondo rojo la sobreexpresión significativa y en fondo verde la infraexpresión significativa.



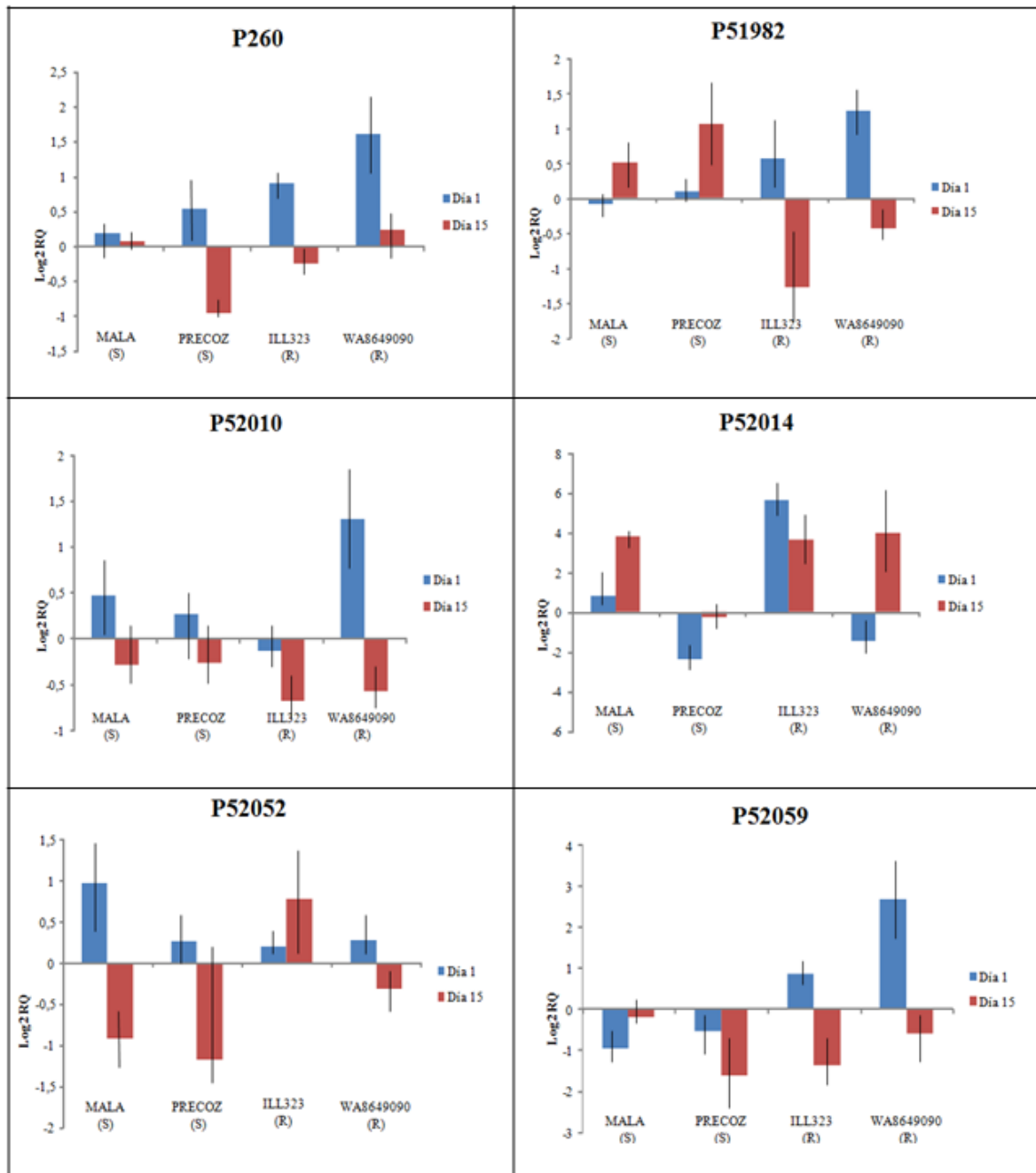


Figura 4.43. Niveles de expresión de los marcadores P260 (gen quinasa serina/treonina), P51982 (gen de la ATPasa- H^+ en membrana plasmática y posible papel en reconocimiento a patógenos), P52010 (Medtr1g083780: gen que codifica una proteína que induce deshidratación similar a Di19 procedente del gen AT3G05700 de *Arabidopsis*), P52014 (gen para taumatina (similar a PR5a)), P52052 (gen de una proteína hipotética) y P52059 (gen codificante de una proteína asociada a senescencia con actividad sulfurtransferasa y relacionada con la rodanasa).

El marcador P75 analiza la expresión de un gen homólogo al gen Medtr2g029750 de *M. truncatula*, que codifica para la peroxidasa PRX2. Las peroxidasas son de las primeras proteínas PR que se inducen en respuesta al ataque de patógenos y proveen una rápida defensa frente a ellos (Mydlarz y Harvell, 2007) mediante la formación de barreras estructurales y/o la generación de un ambiente tóxico para el patógeno gracias a la producción masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bolwell y Wojtaszek, 1997; Bolwell *et al.*, 1998; Blee *et al.*, 2001; Almagro *et al.*, 2009). El incremento de la expresión de P75 puede causar un incremento de ROS, lo que a su vez provocaría una difusión de H₂O₂ a través de la membrana plasmática que actuaría como una molécula señalizadora para la activación de otros mecanismos de defensa.

Más difícil de explicar resulta la disminución de la expresión de los marcadores P46 y P53 puesto que analizan los homólogos en lenteja a los genes de *M. truncatula* Medtr3g087490 y Medtr8g045640. Este último codifica para una proteína relacionada con la patogénesis de la familia Bet v I, y está anotado funcionalmente como un gen de respuesta de defensa, por lo que se esperaría que su expresión aumentara, al menos en las plantas resistentes. El gen Medtr3g087490 codifica una proteína inducida por elicitador que presenta un dominio PLAT/LH2, cuya función propuesta es la de interaccionar con lípidos o proteínas unidas a la membrana. Si bien las funciones de estas proteínas son desconocidas, muchas de ellas se inducen por diferentes tipos de estrés (Marchler-Bauer *et al.*, 2013), aunque en este caso parece que la expresión del gen correspondiente no cambia significativamente o se reprime.

El marcador P73 amplifica un homólogo al gen Medtr2g098160, codificante de una proteína que contiene motivos relacionados con los dedos de zinc de tipo A20 y AN1. Las proteínas de este tipo parecen inducirse y conferir tolerancia a condiciones de estrés abiótico, como frío, deshidratación o salinidad (Vij y Tyagi, 2006; Giri *et al.*, 2013), pero su respuesta en condiciones de estrés biótico no está claro.

Para otros marcadores, los cambios de expresión muestran diferencias entre los genotipos susceptibles y los resistentes, por lo que podrían participar en el resultado final de la respuesta. Entre ellos estarían P43, P260, P51982, P52010 y P52059.

Después de 1 día de la infección, P43 muestra un incremento de expresión similar en los genotipos resistentes y susceptibles, pero mientras que en los resistentes este aumento se mantiene a los 15 días, en las variedades susceptibles la expresión disminuye. Este marcador analiza el gen homólogo a Medtr7g108745 y codificaría para una proteína de la familia LEA (late embryogenesis abundant). Como su nombre indica, este tipo de proteínas se acumulan durante la formación de la semilla y están asociadas a procesos de

deshidratación, ya sean normales en el desarrollo o producidos por distintos tipos de estreses abióticos como sequía, salinidad o heladas (Battaglia y Covarruvias, 2013). El papel de estas proteínas en repuestas a estreses bióticos está menos establecido, aunque hay datos en *Arabidopsis* que señalan una relación entre la presencia de proteínas LEA y cambios en la expresión de genes PR, relacionados con respuestas de defensa (Hanin *et al.*, 2011), o en maíz algunos genes para proteínas LEA incrementan su expresión en respuesta a infecciones bacterianas, y cuando se sobreexpresan en tabaco transgénico aumentan la expresión de genes PR y la tolerancia a *Pseudomonas syringae* (Liu *et al.*, 2013).

Según los datos obtenidos en lenteja, el gen P43 aumenta su expresión en respuesta a la infección por *Ascochyta* en todos los genotipos, pero parece que sólo en los resistentes este incremento se mantiene en el tiempo, lo que sugiere un papel en la resistencia.

Las características del cambio de expresión de P260 son menos evidentes que en el caso anterior, si bien en los genotipos resistentes se incrementa claramente la expresión 1 día después de la infección, mientras que en los susceptibles o bien no hay cambios o el aumento es limitado. Después de 15 días no existen diferencias significativas en relación a los controles o existe una disminución de la expresión, y no aparecen diferencias entre resistentes y susceptibles. El marcador P260 se corresponde con el gen de lenteja homólogo a Medtr5g079840 que según las anotaciones codificaría para una proteína quinasa serina/treonina. Los dominios quinasa serina/treonina son característicos de los genes R en plantas (por ejemplo, *Pto* en tomate; *Pbs1* en *Arabidopsis*; *Xa21*, *Xa26* y *Pi-d2* en arroz; *Rpg1* en cebada), y están involucrados en el reconocimiento del patógeno y en la transmisión de la señal que pone en marcha la respuesta de defensa (Hulbert *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003; Sun y Gubler 2004; Chen y Fernando, 2006). En el análisis de otros genotipos de lenteja resistentes a *Ascochyta*, también se ha observado un incremento en la expresión de genes codificantes de este tipo de proteínas (Mustafa *et al.*, 2009).

El comportamiento del marcador P51982 muestra diferencias notables entre los genotipos susceptibles y resistentes. Mientras que en estos últimos su expresión está incrementada al día de la infección para infraexpresarse a los 15 días, en las variedades susceptibles no se observan cambios después de 1 día y a los 15 días aparece sobreexpresión. P51982 analiza el gen homólogo a Medtr4g127710 que codifica una ATPasa-H⁺ de membrana plasmática. Estas proteínas son las principales responsables de establecer el potencial de membrana en plantas (Elmore y Coaker, 2011), y adicionalmente participan en los procesos de respuesta a diversos estímulos, entre ellos al ataque de patógenos. Así en la revisión de Elmore y Coaker (2011) se recogen resultados que indican que las ATPasas-H⁺ de

membrana plasmática participarían en el reconocimiento temprano de patógenos y posteriormente cooperarían con proteínas de señalización. La importancia de la función de estas proteínas en la resistencia a la infección viene señalada por el hecho de que existen ejemplos de organismos patógenos que presentan mecanismos para manipular la actividad ATPasa-H⁺ de modo que se incremente la susceptibilidad de la planta. Si las ATPasas-H⁺ de membrana plasmática cooperan en el reconocimiento temprano del ataque por patógenos y en la señalización, resulta lógico esperar que en los genotipos resistentes los genes correspondientes aumenten su expresión poco después del ataque, de modo que se ponga en marcha la maquinaria que proporcione inmunidad. En los genotipos susceptibles los datos indican que hay un retardo entre el ataque del hongo y los cambios de expresión, por lo que es posible que para ese momento, el patógeno ya no pueda ser contenido.

P52010 presenta una disminución significativa de expresión a los 15 días en los genotipos resistentes, mientras que en los susceptibles no existen cambios significativos, aunque tienden también a una menor expresión. El gen homólogo de *M. truncatula* para este marcador es Medtr1g083780 que codifica para una proteína que se induce por la deshidratación similar a la denominada Di19 procedente del gen AT3G05700 de *Arabidopsis*. Esta proteína pertenece a una familia más amplia, la de aquéllas que contienen dos dominios de tipo dedos de zinc Cys2/His2 (C2H2), y los datos sugieren que participa en la regulación de la transcripción de determinados genes en condiciones de estrés por deshidratación o salinidad (Rodríguez Milla *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013). Entre los genes regulados por Di19 se encuentran varios que producen proteínas PR, lo que sugiere que en algunos casos estas proteínas PR participan tanto en respuestas de defensa frente a patógenos como de respuesta a estreses abióticos (Liu *et al.*, 2013). Si el gen analizado en lenteja, tuviera la misma función que el de *Arabidopsis*, resulta contradictorio que sean los genotipos resistentes los que presentan una disminución de expresión significativa después de 15 días de la infección, ya que llevaría asociada una disminución de proteínas de defensa frente al patógeno, aunque en uno de ellos sí aparece un incremento claro a las 24 h de la infección.

Por último, el marcador P52059, después de 1 día de la infección presenta un incremento de expresión en los genotipos resistentes, mientras que en los susceptibles disminuye ligeramente. Este marcador analiza la expresión del gen homólogo a Medtr5g023170 codificante de una proteína asociada a la senescencia con actividad sulfurtransferasa y relacionada con la rodanasa. Estas enzimas se encuentran en todos los organismos, y en concreto en las plantas pueden localizarse en el núcleo, citoplasma, cloroplasto o mitocondria a lo largo de todo el ciclo vital (si bien suele incrementarse su actividad a

medida que la planta envejece) por lo que se postulan muchas funciones fisiológicas diferentes. Entre ellas se propone que puedan estar implicadas en los mecanismos de defensa frente a patógenos mediante la producción de compuestos azufrados como tiosulfatos, sulfitos o glutation, aunque también pudiera ocurrir que su función sea proteger a las células sanas de los daños ocasionados por los compuestos ROS que se producen en las primeras etapas de la infección (Papenbrock y Guretzki, 2011). Los patrones de expresión encontrados en los genotipos de lenteja apoyan un papel protector en las primeras etapas de la infección, de modo que si la actividad de estas enzimas no alcanza un cierto nivel, la planta se vuelve susceptible a la infección del patógeno.

Los restantes marcadores (P98, P179, P52014 y P52052) o no muestran cambios significativos o éstos no son coherentes entre genotipos susceptibles y resistentes, por lo que resulta imposible establecer una función relacionada con la respuesta a *Ascochyta*. La expresión de estos marcadores podría deberse a que existen diferentes mecanismos genéticos que controlan la resistencia y la susceptibilidad en estas muestras o a que no intervienen en el proceso de respuesta a la infección (Mustafa *et al.*, 2009).

Expresión de genes en plantas resistentes y susceptibles

Según Mustafá *et al.* (2009), la interacción planta-patógeno en el caso de los hongos necrotróficos tiene tres fases distintas: adhesión y germinación de esporas, penetración en la planta y colonización. La respuesta de la planta incluye reconocimiento, transducción de la señal y activación de las defensas para evitar los daños. La activación de las defensas por parte de la planta se debe principalmente a tres grupos de proteínas: las de reconocimiento, las encargadas de la transducción de estas señales y las responsables de la expresión de la resistencia (Bhadauria *et al.*, 2013).

Las observaciones microscópicas de hojas de lenteja inoculadas con *Ascochyta* muestran que a las 6 h después de la infección las esporas han germinado y están penetrando en las células de la planta (Mustafá *et al.*, 2009); después de 24 h, Roundhill *et al.* (1995) encontraron que el citoplasma mostraba señales de perturbación. Posiblemente los fitopatógenos secretan factores para facilitar la colonización y suprimir las defensas del hospedador, algunos de estos factores funcionarían en el apoplasto y otros serían transportados hasta el citoplasma de las células vegetales (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006). A las 40 horas la membrana plasmática estaba rota y a las 52 horas el núcleo se rompía y la célula era invadida por el hongo. Es posible que los genotipos resistentes puedan ganar esta batalla entre las 24-48 horas después de la infección debido a una expresión temprana de importantes proteínas de defensa. Inmediatamente después del

reconocimiento se daría la transducción de la señal, activando enzimas existentes y genes, empezando así la activación de la defensa, que incluiría generación de especies reactivas de oxígeno, reforzamiento de la pared celular, producción de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas, activación de genes de defensa y muerte celular programada (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Nurnberger y Scheel, 2001).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el día 1 después de la infección se observó que ciertos marcadores incrementan su expresión independientemente del genotipo (P75, gen codificante para una peroxidasa), por lo que su acción parece ser una respuesta general dirigida a reducir a los efectos producidos por la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los compuestos ROS producen una señal que se requiere para las respuestas de defensa en las plantas y esta correlacionada con la resistencia a enfermedades (Baker y Orlandi, 1995; Grant y Loake, 2000; Do *et al.*, 2003). La participación de peroxidasas relacionadas con la producción de ROS ha sido documentada en varios sistemas planta-patógeno (Tornero *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006), pero en los genotipos de lenteja analizados no determina la capacidad de resistir al hongo. En otros casos el aumento de expresión sólo se manifiesta en las variedades resistentes (P260, P51982, P52059), lo que sugiere que estos podrían estar relacionados con el reconocimiento o en respuestas tempranas frente al patógeno (P51982). La posterior activación de las rutas de señalización adecuadas, a través de proteínas fosfatasa y quinasas serina/treonina (P260) y factores de transcripción, pondrían en marcha las respuestas de defensa e inclusive la síntesis de compuestos antimicrobianos (P52059). En ocasiones parece que la resistencia no depende exclusivamente de una activación temprana, sino de que además sea continuada en el tiempo, como en el caso de P43, gen que en los genotipos resistentes sigue sobreexpresándose después de 15 días, mientras que en los susceptibles desaparece esta mayor actividad.

Además de las proteínas indicadas anteriormente, otras muchas podrían intervenir en la transducción de señales y en la defensa, como serían las proteínas de unión a GTP (GTPasas), las que presentan dedos de zinc, las etileno-dependientes, las proteínas de unión al calcio y las proteínas PR (Bhadoria *et al.*, 2013), si bien en el caso de los marcadores estudiados en el presente trabajo, no queda clara su participación. Evidentemente, existen muchas proteínas diferentes que presentan características o dominios similares y no todas participan en los mismos procesos.

Los resultados obtenidos concuerdan con los publicados por Mustafa *et al.* (2009), quienes analizando los cambios de expresión producidos por la infección con *Ascochyta* en un genotipo de lenteja resistente (ILL7537) y uno susceptible (ILL6002) también encontraron

que genes codificantes de proteínas relacionadas con la producción de compuestos ROS y con mecanismos de defensa presentaban una expresión incrementada en ambas variedades, aunque en el genotipo resistente la mayor expresión se observaba muy rápidamente (a partir de las 6 h de la infección), mientras que en el genotipo susceptible transcurrían 3 días. Esto sugiere que la susceptibilidad en el genotipo estudiado se debería a un reconocimiento demasiado tardío del patógeno, de modo que los mecanismos de defensa de la planta ya no serían capaces de contener la infección. Por otra parte, determinados genes codificantes de proteínas PR y quinasas serina/treonina aumentaban su expresión en el genotipo resistente, mientras que en el susceptible disminuía o no presentaba cambios, aunque también se encuentran ejemplos en los que genes que se han relacionado con los mecanismos de defensa frente a patógenos disminuyen su expresión cuando el genotipo resistente es infectado por *Ascochyta*, lo que indica la complejidad de las respuestas de las plantas a la infección por patógenos, en la que participarán componentes específicos y generales que pueden comportarse de manera diferente en función del patógeno concreto que esté actuando. De hecho cuando en lenteja se ha analizado la respuesta a la infección por *Colletotrichum* (causante de la antracnosis) en un genotipo susceptible también se producen cambios de expresión en genes funcionalmente similares a los observados en el caso de *Ascochyta* (Bhadauria *et al.*, 2013), aunque no son exactamente los mismos.

En otras leguminosas también se han analizado cambios de expresión al ser infectadas por *Ascochyta*, y varios genes similares presentan respuestas concordantes con las encontradas en lenteja, como la mayor expresión en genotipos resistentes de genes asociados a la senescencia de tipo DIN1 en garbanzo (Jaiswal *et al.*, 2012), genes codificantes de ATPasas de membrana en *M. truncatula* (Toyoda *et al.*, 2013) o genes relacionados con la producción de radicales libres en guisante (Castillejo *et al.*, 2010; Morkunas *et al.*, 2013).

Si bien los resultados obtenidos sugieren un papel de determinados genes en la respuesta de resistencia/susceptibilidad, no hay que olvidar que un cambio de expresión por sí solo no implica necesariamente que sea la causa de una respuesta concreta y son necesarias más pruebas de la participación de dicho gen en el proceso.

Un apoyo importante de la relación entre un gen y un fenotipo proviene de la colocación del gen con un QTL que explique parte del fenotipo (Rubiales y Fondevilla, 2012). En el trabajo de mapeo de la respuesta a *Ascochyta* no se ha encontrado pruebas de dicha colocación por lo que, al menos en el caso los parentales utilizados, los genes analizados hasta el momento para cambios de expresión no serían los responsables

directos de la respuesta observada, aunque podrían formar parte del complejo de rutas de reconocimiento y señalización necesario para dicha respuesta.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Las secuencias de apirasa han mostrado mayor diversidad que las secuencias de convicilina, el grado de diversidad de las convicilinas hace pensar que estas proteínas cumplen un papel en la semilla más importante que la de ser meros reservorios de aminoácidos. Tanto las secuencias de convicilina como las de apirasa son más diversas que los genes codificantes para otras proteínas.
2. La frecuencia de pares AT en los genes de vicilina y apirasa es muy elevada, superior a la media de las secuencias codificantes de lenteja (EST). Estos nucleótidos son sumamente frecuentes en intrones y condicionan el uso de tripletes de las regiones exónicas en las secuencias estudiadas. En los intrones de apirasa se han detectado varios microsatélites basados en la repetición (TA)_n que también contribuyen al alto contenido en pares AT.
3. Existen dos copias parálogas de genes codificantes para convicilina en un mismo individuo (IRQ62), las secuencias de otras muestras corresponden a una u otra copia. La posición filogenética de los genes parálogos respecto a *L. c. orientalis* indica que la duplicación de la que proceden se produjo antes de la domesticación de la lenteja.
4. Los genes de convicilina no tienen una señal filogenética suficiente ya que las dos muestras de *Lens culinaris* spp. *orientalis* se encuentran mezcladas con las lentejas cultivadas.
5. Las apirasas de tipo 1 de lenteja forman un grupo monofilético y están relacionadas con las apirasas de tipo 1 de *Pisum sativum* y *Vicia faba*, con las que forman un grupo monofilético. Las secuencias de apirasa tipo 1 de la tribu *Viceae*, incluida lenteja parecen ortólogas entre sí y ortólogas al gen *Apy1.1* de *M. truncatula*. No se han detectado, o no existen, copias de apirasa en lenteja ortólogas a otras apirasa de tipo 1 de *Medicago*.
6. La información filogenética proporcionada por los genes de apirasa y convicilina muestran que la domesticación de la lenteja no es un proceso sencillo, y que en ella podrían estar implicadas diferentes formas silvestres de lenteja, dado que las formas cultivadas no forman grupos monofiléticos. Este resultado apoya la hipótesis de Alo y colaboradores en la que proponen que distintas formas silvestres, hoy consideradas especies diferentes, han participado en el origen de la lenteja cultivada.

7. El éxito obtenido en la obtención de marcadores génicos polimórficos en este trabajo ha sido bajo (16 de 115), aunque comparable al de trabajos previos realizados en este mismo cruzamiento. El grado de polimorfismo detectado puede aumentarse significativamente si se utilizan técnicas de análisis de SNPs que no se basen exclusivamente en diferencias de longitud o en polimorfismos que sean detectables mediante enzimas de restricción, como las de tipo HRM.
8. Se ha obtenido un mapa genético formado por 9 grupos de ligamiento, cubriendo una longitud de 628 cM. Se han incluido 12 marcadores de tipo génico, en un armazón revisado de 79 ISSRs, 2 SSR, 3 marcadores morfológicos, 2 relacionados con genes de resistencia a patógenos y 2 relacionados con retrotransposones.
9. Se han detectado 3 QTLs para el peso de la semilla, dos en el grupo de ligamiento 2 y uno en el grupo de ligamiento 9. En conjunto explican un 50% de la variación encontrada, siendo especialmente relevante el denominado QPESO2, flanqueado por los marcadores UBC810_6 - UBC808_2.
10. Para el carácter diámetro de la semilla, se han encontrado 2 QTLs en el grupo de ligamiento 2 que explican un 30% de la varianza. Estos dos QTLs colocalizan con los encontrados para el peso de la semilla, por lo que ambos caracteres pudieran estar bajo el control de los mismos genes.
11. La resistencia a *Ascochyta* está determinada en parte por 2 QTLs detectados en el grupo de ligamiento 4, aunque los resultados obtenidos con el análisis de marcador simple indica que otras regiones no mapeadas también participarían en la respuesta a este hongo.
12. Para validar el papel que algunos genes pudieran tener sobre la respuesta a *Ascochyta*, se analizaron los cambios de expresión en genotipos resistentes y susceptibles. Algunos marcadores incrementaron su expresión independientemente del genotipo (P75, gen codificante para una peroxidasa), por lo que su acción parece ser una respuesta general dirigida a reducir a los efectos producidos por la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS). Para otros marcadores (P43, P260, P51982, P52010 y P52059), los cambios de expresión muestran diferencias entre los genotipos susceptibles y los resistentes, por lo que podrían participar en el resultado final de la respuesta.

13. No se han encontrado marcadores génicos que colocalizen con los QTLs relacionados con la respuesta a *Ascochyta*, por lo que los genes analizados para cambios de expresión no serían los responsables directos de la respuesta observada, aunque podrían formar parte del complejo de rutas de reconocimiento y señalización necesario para dicha respuesta.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbo, S.; Molina, C.; Jungmann, R.; Grusak, M.A.; Berkovitch, Z.; Reifen, R.; Kahl, G.; Winter, P. y Reifen, R. 2005. Quantitative trait loci governing carotenoid concentration and weight in seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 111: 185-195.
- Almagro, L.; Gómez Ros, L.V.; Belchi-Navarro, S.; Bru, R.; Ros Barceló, A. y Pedreño, M.A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 60: 377-390.
- Alo, F.; Furman, B.J.; Akhunov, E.; Dvorak, J. y Gepts, P. 2011. Leveraging genomic resources of model species for the assessment of diversity and phylogeny in wild and domesticated lentil. *Journal of Heredity* 102: 315-329.
- Arumuganathan, K. y Earle, E. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208-218.
- Bagga, S.; Sutton, D.; Kemp, J.D. y Sengupta-Gopalan, C. 1992. Constitutive expression of β -phaseolin gene in different tissues of transgenic alfalfa does not ensure phaseolin accumulation in non-seed tissues. *Plant Molecular Biology* 19: 951-958.
- Baker, C.J. y Orlandi, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299-321.
- Banedoch-Jones, J.; Spencer, D.; Higgins, T.J.V. y Millerd, A. 1981. The role of glycosylation in storage protein synthesis in developing pea seeds. *Planta* 153: 201-209.
- Barrat, D.H.P. 1986. Regulation of storage protein accumulation by abscisic acid in *Vicia faba* L. cotyledons cultured in Vitro. *Annals of Botany* 57: 245-256.
- Barrat, D.H.P.; Whitford, P.N.; Cook, S.K.; Butcher, G. y Wang, T.L. 1989. An analysis of seed development in *Pisum sativum*. VIII. Does abscisic acid prevent precocious germination and control storage protein synthesis. *Journal of Experimental Botany* 40: 1009-1014.
- Barrios, A. 2012. Adaptación a la siembra invernal y tolerancia al frío en lenteja (*Lens culinaris*). Mapeo de QTLs involucrados. Tesis doctoral. Universidad de León, León, España.
- Barulina, E. I. 1930. Lentil of USSR and other countries: A botanico-agronomical monograph. *Trudy Prikl. Botany and Genetics* 40: 265-304, (cf. S. K. Sharma and R. K. Chahota, 2004. Current status of interspecific hybridization in genus *Lens*. *Journal of Lentil Research* 1: 15-18).
- Battaglia, M y Covarrubias, A. Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in legumes. 2013. *Frontiers in Plant Science* 4:190.
- Beachy, R.N.; Jarvis, N.P. y Barton, K.A. 1981. Biosynthesis of subunits of soybean 7S storage protein. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 19-27.
- Bennett, M.D. y Leitch, I.J. 2012. Angiosperm DNA C-values database (release 8.0, Dec. 2012) <http://www.kew.org/cvalues/>.

- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L. y Lubert, S. 2002. Biochemistry, 5th edition. New York: W H Freeman.
- Bhadauria, V; Bett, K.E.; Zhou, T.; Vandenberg, A.; Wei, Y. y Banniza, S. 2013. Identification of *Lens culinaris* defense genes responsive to the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. BMC Genetics 14: 1-9.
- Blee, K.A.; Jupe, S.C.; Richard, G.; Zimmerlin, A.; Davies, D.R. y Bolwell, G.P. 2001. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. Plant Molecular Biology 47: 607-620.
- Bollini, R. J.; Lilley, G.G. y Higgins, T.J.V. 1984. Macrozin, a novel storage globulin from seeds of *Macrozamia communis* L. Johnson. Australian Journal of Plant Physiology 11: 69-77.
- Bolwell, G.P.; Davies, D.R.; Gerrish, C.; Auh, C.K. y Murphy, T.M. 1998. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by Rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. Plant Physiology 116: 1379-1385.
- Bolwell, G.P y Wojtaszek, P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence a broad perspective. Physiological and Molecular Plant Pathology 51: 347-366.
- Boopathi, M.N. 2013. Genetic mapping and marker assisted selection: Basics, practice and benefits. Capítulo 2: Mapping population development. pp. 23-37. Springer.
- Borisjuk, L.; Rolletschek, H.; Radchuk, R.; Weschke, W.; Wobus, U. y Weber, H. 2008. Seed development and differentiation: A role for metabolic regulation. Plant Biology 6: 375-386.
- Borroto, K. y Dure, L. 1987. The globulin seed storage proteins of flowering plants are derived from two ancestral genes. Plant Molecular Biology 8: 113-131.
- Bosmali, I.; Ganopoulos, I.; Madesis, P. y Tsaftaris, A. 2012. Microsatellite and DNA-barcode regions typing combined with High Resolution Melting (HRM) analysis for food forensic uses: A case study on lentils (*Lens culinaris*). Food Research International 46: 141-147.
- Boulter, D.; Evans, I.M.; Ellis, J.R.; Shirsat, A.; Gatehouse, J.A y Croy, R.D.D. 1987. Differential gene expression in the development of *Pisum sativum*. Plant Physiology and Biochemistry 25: 283-289.
- Bown, D.; Ellis, T.H.N. y Gatehouse, J.A. 1988. The sequence of a gene encoding convicilina from pea (*Pisum sativum* L.) shows that convicilina differs from vicilina by an insertion near N-terminus. Biochemical Journal 251: 717-726.
- Burr, B; Burr, F.A.; Thompson, K.H.; Albertson, M.C. y Stuber, C.W. 1998. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. Genetics 118: 519-526.
- Burstin, J.; Marget, P.; Huart, M.; Moessner, A.; Mangin, B.; Duchene, C.; Desprez, B.; Munier-Jolain, N. y Duc, G. 2007. Developmental genes have pleiotropic effects on plant morphology and source capacity, eventually impacting on seed protein content and productivity in pea. Plant Physiology 144: 768-781.

- Bustos, M.M.; Begum, D.; Kalkan, F.A.; Batraw, M.J. y Hall, T.C. 1991a. Positive and negative cis-acting DNA domains are required for spatial and temporal regulation of gene expression by a seed storage protein promoter. *EMBO Journal* 10: 1469-1479.
- Bustos, M.M.; Kalkan, F.A.; VandenBosch, K.A. y Hall, T.C. 1991b. Differential accumulation of four phaseolin glycoforms transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 16: 381-395.
- Camiolo, S.; Farina, L. y Porceddu, A. 2012. The relation of codon bias to tissue-specific gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 192: 642-649.
- Cannon, S.B.; McCombie, W.R.; Sato, S.; Tabata, S.; Denny, R.; Palmer, L.; Katari, M.; Young, N.D. y Stacey, G. 2003. Evolution and microsynteny of the apyrase gene family in three legume genomes. *Molecular Genetic and Genomics* 270: 347-361.
- Carvalho, D.; Anastacio, Q. y Luciana, M. 2006. Proteins and isozymes electrophoresis in seeds of Desti (*Leguminosae caesalpinioidea*) artificially aged. *Revista Arv* 30: 19-21.
- Casey, R.; Domoney, C. y Ellis, T.H.N. 1986. Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surv. Plant Molecular and Cellular Biology* 3: 1-95.
- Castillejo, M.A.; Curto, M.; Fondevilla, S.; Rubiales, D. y Jorrín, J.V. 2010. Two-dimensional electrophoresis based proteomic analysis of the Pea (*Pisum sativum*) in response to *Mycosphaerella pinodes*. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 58: 12822-12832.
- Chen, Y.R.; Datta, N. y Roux, S.J. 1987. Purification and partial characterization of a calmodulin stimulated nucleotide triphosphatase from pea nuclei. *Journal of Biological Chemistry* 262: 10689-10694.
- Chen, Y. y Fernando, W.G.D. 2006. Induced resistance to Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease of canola (*Brassica napus*) caused by a weakly virulent isolate of *Leptosphaeria biglobosa*. *Plant Disease* 90: 1059-1064.
- Chisholm, S.T.; Coaker, G.; Day, B. y Staskawicz, B.J. 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814.
- Chivasa, S.; Murphy, A.M.; Hamilton, J.M.; Lindsey, K.; Carr, J.P. y Slabas, A.R. 2009. Extracellular ATP is a regulator of pathogen defence in plants. *Plant Journal* 60: 436-448.
- Chowdhury, M.A.; Andrahennadi, C.P.; Slinkard, A.E. y Vandenberg, A. 2001. RAPD and SCAR markers for resistance to Ascochyta blight in lentil. *Euphytica* 118: 331-337.
- Chrispeels, M.J.; Higgins, T.J.V. y Spencer, D. 1982. Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons. *Journal of Cell Biology* 93: 306-313.
- Cohn, J.R.; Uhm, T.; Ramu, S.; Nam, Y.W.; Kim, D.J.; Penmetsa, R.V.; Wood, T.C.; Denny, R.L.; Young, N.D.; Cook, D.R. y Stacey, G. 2001. Differential regulation of a family of apyrase genes from *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 125: 2104-2119.
- Collard, B.C.Y.; Jahufer, M.Z.Z.; Brouwer, J.B. y Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.

- Croxford, A.E.; Rogers, T., Caligari, P.D.S. y Wilkinson, M.J. 2008. High-resolution melt analysis to identify and map sequence-tagged site anchor points onto linkage maps: a white lupin (*Lupinus albus*) map as an exemplar. *New Phytologist* 180: 594-607.
- Croy, R.R.D.; Gatehouse, J.A.; Evans, I.M. y Boulter, D. 1980. Characterization of the storage protein subunits synthesized *in vitro* by polyribosomes and RNA for developing pea (*Pisum sativum* L.). II. Vicilins. *Planta* 148: 387-400.
- Cruz-Izquierdo, S.; Ávila, C.M.; Satovic, Z.; Palomino, C.; Gutierrez, N.; Ellwood, V.; Phan, H.T.T.; Cubero, J.I. y Torres, A.M. 2012. Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: stability of QTLs for flowering and yield-related traits. *Theoretical and Applied Genetics* 125: 1767-1782.
- Cubero, J.I.; Pérez de la Vega, M. y Fratini, R. 2009. Origin, phylogeny, domestication and spread. In: *The Lentil: Botany, production and uses*. Erskine, W., Muehlbauer, F., Sarker, A. and Sharma, S. (eds.). CABI International, Cambridge, MA, USA. Pp. 13-33.
- Danielsson, C.E. 1949. Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae. *Biochemical Journal* 44: 387-400.
- Danzmann, G. y Gharbi, K. 2001. Gene mapping in fishes, a means to an end. *Genetica* 111: 3-23.
- Davidson, J.A. y Kimber, R.B.E. 2007. Integrated disease management of Ascochyta blight in pulse crops. *European Journal of Plant Pathology* 119: 99-110.
- D'Erfurth, I.; Le Signor, C.; Aubert, G.; Sanchez, M.; Vernoud, V.; Darchy, B.; Lherminier, J.; Bourion, V.; Bouteiller, N.; Bendahmane, A.; Buitink, J.; Prospero, J.M.; Thompson, R.; Burstin, J. y Gallardo, J. 2012. A role for an endosperm-localized subtilase in the control of seed size in legumes. *New Phytologist* 196: 738-751.
- De Almeida Costa, G.E.; da Silva Queiroz-Monici, K.; Reis, A.M.P.M. y de Oliveira, A.C. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry* 94: 327-330.
- De la Puente, R. 2012. Mapa genético y análisis de secuencias nucleotídicas de interés en *Lens*. Tesis doctoral. Universidad de León, León, España.
- De la Puente, R.; García, P.; Polanco, C. y Pérez de la Vega, M. 2013. Short communication. An improved intersubspecific genetic map in *Lens* including functional markers. *Spanish Journal of Agricultural Research* 11: 132-136.
- De Vienne, D. y Causse, M. 2003. Mapping and characterising quantitative trait loci. In: *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Dominique de Vienne (eds). Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. Pp. 89-124.
- Deshpande, S.S. 1992. Food legumes in human nutrition: A personal storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15:3-24.
- Díaz-Ruiz, R.; Torres, A.M.; Satovic, Z.; Gutiérrez, M.V.; Cubero, J.I. y Román, B. 2010. Validation of QTLs for *Orobanche crenata* resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) across environments and generations. *Theoretical and Applied Genetics* 120: 909-919.

- Do, H.M.; Hong, J.K.; Jung, H.W.; Kim, S.H.; Ham, J.H. y Hwang, B.K. 2003. Expression of peroxidase like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 196-205.
- Doerge, R.W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics* 3: 43-52.
- Domoney, C. y Case, R. 1983. Cloning and characterization of complementary DNA for convicilina, a major seed storage protein in *Pisum sativum* L. *Planta* 159: 446-453.
- Doyle, J.J., M.A., Schuler, W.D. Godette, V. Zenger, R.N. Beachy y J.L. Slightom. 1986. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. *Journal of Biological Chemistry* 261: 9228-9238.
- Durán, Y. y Pérez de la Vega, M. 2004. Assessment of genetic variation and species relationships in a collection of *Lens* using RAPD and ISSR. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2: 538-544.
- Duret, L. y Mouchiroud, D. 1999. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 4482-4487.
- Edwards, K.J. 1998. Polimerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLPs). In *Molecular tools for screening Biodiversity*. A. Karp, PG Isaac y DS Ingram (eds.) Chapman and Hall 8: 132-134.
- Efron, B. 1979. Bootstrap methods: Another look at jackknife. *Annals of Statistics* 7: 1-26.
- Ellis, T.H.N.; Domoney, C.; Castleton, J.; Cleary, W y Davis, R. 1986. Vicilin genes of *Pisum*. *Molecular and General Genetics* 205: 164-169.
- Ellwood, S.R.; Phan, H.T.T.; Jordan, M.; Hane, J.; Torres, A.M.; Avila, C.M.; Cruz-Izquierdo, S. y Oliver, R.P. 2008. Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation of genome structure with *Lens culinaris*. *BMC Genomics* 9: 380-391.
- Elmore, J.M. y Coaker, G. 2011. The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions. *Molecular Plant* 4: 416-427.
- Eujayl, I.; Baum, M.; Erskine, W.; Pehu, E. y Muehlbauer, F.J. 1997. The use of RAPD markers for lentil genetic mapping and the evaluation of distorted F₂ segregation. *Euphytica* 96: 405-412.
- Eujayl, I.; Baum, M.; Powell, W.; Erskine, W. y Pehu, E. 1998. A genetic linkage map of lentil (*Lens* spp.) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 97:83-89.
- FAOSTAT. 2012. <http://faostat.fao.org/>.
- Fedoruk, M.J.; Vandenberg, A. y Bett, K.B. 2013. QTL Analysis of seed quality characteristics in Lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris* Medik.) using SNP markers. *The Plant Genome* 6: 1-10.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.

- Ferguson, M.E.; Maxted, N.; Slagreen, M.W. y Robertson, L.D. 2000. A reassessment of the taxonomy of *Lens* Mill. (Leguminosae, Papilionodeae, Viciae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 41-49.
- Ferreira, A.; Da Silva, M.F.; Da Costa, E.; Silva, L. y Cruz, C.D. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics and Molecular Biology* 29: 182-192.
- Ford, R.; Pang, E.C.K. y Taylor P.W.J. 1999. Genetics of resistance to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) of lentil and the identification of closely linked RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 93-98.
- Fratini, R.; Durán, Y.; García, P. y Pérez de la Vega, M. 2007. Identification of quantitative trait loci (QTL) for plant structure, growth habit and yield in lentil. *Spanish Journal of Agricultural Research* 5: 348-356.
- Fratini, R. y Pérez de la Vega, M. 2011. Genetics of economic traits in lentil: Seed traits and adaptation to climatic variations. *Grain legumes* 57. Pp. 18-20.
- Fujiwara, T.; Hirai, M.Y.; Chino, M.; Kmeda, Y. y Naito, S. 1992. Effects of sulfur nutrition on expression of soybean seed storage protein genes in transgenic petunia. *Plant Physiology* 99: 263-268.
- Gabriel, S.B.; Schaffner, S.F.; Nguyen, H.; Moore, J.M.; Roy, J.; Blumenstiel, B.; Higgins, J.; De Felice, M.; Lochner, A.; Faggart, M; Liu Cordero, S.N.; Rotimi, C.; Adeyemo, A.; Cooper, R., Ward, R.; Lander, E.S.; Daly, M.J. y Altshuler, D. 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296: 2225-2229.
- Galasso, I. 2003. Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Lens* Miller. *Genome* 46: 1118-1124.
- Gale, M.D. 1994. Genetic markers, maps and wheat breeding. *Journal of the Royal Agricultural Society of England* 155: 162-176.
- García, P.; Sáenz de Miera, L.E.; Vaquero, F.; Vences, F.J.; Polanco, C.; González, A.I.; Jüngling, R.; Frank, A.; Horres, R.; Krezdorn, N.; Rotter, B.; Winter, P.; Kahl, G. y Pérez de la Vega, M. 2012. Análisis de los cambios en el transcriptoma de lenteja en respuesta a la infección con *Ascochyta lentis* mediante SuperSAGE. *Actas de Horticultura* 62: 133-134.
- Gatehouse, J.A.; Croy, R.R.D. y Boulter, R. 1984. The syntesis and structure of pea storage proteins. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 1: 287-314.
- Gatehouse, J.A.; Evans, I.M.; Croy, R.R.D. y Boutler, D. 1986. Differential expression of genes during legume seed development. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 314: 367-384.
- Ghavidel, R.A. y Prakash, J. 2007 The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *Journal of Food and Nutrition Sciences* 40: 1292-1299.
- Giri, J.; Dansana, P. K.; Kothari, K. S.; Sharma, G.; Vij, S. y Tyagi, A. K. 2013. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants. *Bioessays* 35: 639-648.

- Goodstein, D.M.; Shu, S.; Howson, R.; Neupane, R.; Hayes, R.D; Fazo, J.; Mitros, T.; Dirks, W.; Hellsten, U.; Putnam, N. y Rokhsar, D.S. 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* 40: 1178-1186.
- Grant, J.J. y Loake, G.J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21-30.
- Gundry, C.N.; Vandersteen, J.G.; Reed, G.H.; Pryor, R.J.; Chen, J. y Wittwer, C.T. 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry* 49: 396-406.
- Gupta, D.; Taylor, P.W.J.; Inder, H.T.T.; Phan, H.T.T.; Ellwood, S.R.; Mathur, P.N.; Sarker, A y Ford, R. 2012. Integration of EST-SSR markers of *Medicago truncatula* into intraspecific linkage map of lentil and identification of QTL conferring resistance to ascochyta blight at seedling and pod stages. *Molecular Breeding* 30: 429-439.
- Haldane, J.B.S. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linkage factors. *Journal of Genetics* 8: 299-309.
- Hammond-Kosack, K.E. y Jones, J. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hamwih, A.; Udapa, S.M.; Choumane, W.; Sarker, A.; Dreyer, F.; Jung, C. y Baum, M. 2005. A genetic linkage map of lentil based on microsatellite and AFLP markers and localization of *Fusarium* vascular wilt resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 669-677.
- Hamwih, A.; Udapa, S.M.; Sarker, A.; Jung, C. y Baum, M. 2009. Development of new microsatellite markers and their application in the analysis of genetic diversity in lentils. *Breeding Science* 59: 77-86.
- Han, Y.; Khu, D.M. y Monteros, M. 2012. High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Molecular Breeding* 29:489-501.
- Handa, M. y Guidotti, G. 1996. Purification and cloning of a soluble ATP diphosphohydrolase (Apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochemical and Biophysical Research Communication* 218: 916-923.
- Hanin, M; Brini, F; Ebel, C.H.; Toda, Y; Takeda, S. y Masmoudi, K. 2011. Plant dehydrins and stress tolerance. Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signal and Behavior* 6: 1503-1509.
- Harlan, J. 1992. *Crops and Man* (2nd edición). Am Soc Agron, Madison, Wisconsin, USA, 1992 (ISBN: 978-089118107).
- Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- He, C.; Tian, Y.; Saedler, R.; Efremova, N.; Riss, S.; Khan, M.R.; Yephremov, A. y Saedler, H. 2010. The MADS-domain protein MPF1 of *Physalis floridana* controls plant architecture, seed development and flowering time. *Planta* 231: 767-777.
- He, P.; Li, J.Z.; Zheng, X.W.; Shen, L.S.; Lu, C.F.; Chen, Y. y Zhu, L.H. 2001. Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. *Crop Science* 41: 1240-1246.

- Higgins, T.J.V. y Spencer, D. 1981. Precursor forms of pea vicilin subunits. Modification by microsomal membranes during cell-free translation. *Plant Physiology* 67: 205-211.
- Higgins, T.J.V. y D. Spencer. 1991. The expression of a chimeric cauliflower mosaic virus (CaMV-35S)-pea vicilin gene in tobacco. *Plant Science* 74: 89-98.
- Horneburg, B. 2006. Outcrossing in lentil (*Lens culinaris*) depends on cultivar, location and year, and varies within cultivars. *Plant Breeding* 125: 638-640.
- Hulbert, S.H.; Webb, C.A.; Smith, S.M. y Sun, Q. 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology* 39: 285-312.
- Ibiza Gimeno, V.P. 2011. Nuevas herramientas en la lucha contra las virosis del pimiento. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Inoue, H.; Nojima, H. y Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Irzykowska, L. y Wolko, B. 2004. Interval mapping of QTLs controlling yield-related traits and seed protein content in *Pisum sativum*. *Journal of Applied Genetics* 45: 297-306.
- Iskratsch, T.; Braun, A.; Paschinger, K. y Wilson, I.B.H. 2009. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Analytical Biochemistry* 386: 133-146.
- Jaiswal, P.; Cheruku, J.R.; Kumar, K.; Yadav, S.; Singh, A.; Kumari, P.; Dube, S.C.; Upadhyaya, K.C. y Verma, P.K. 2012. Differential transcript accumulation in chickpea during early phases of compatible interaction with a necrotrophic fungus *Ascochyta blighti*. *Molecular Biology Report* 39: 4635-4646.
- Jeswani, L. M. 1988. Lentil. En *Pulse Crops (Grain Legumes)*. Ed. Por B. Balder, S. Ramanujam y H. K. Jain Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi. Pp. 199-214.
- Jeong, Y.S.; Lee, S.Y.; Choi, I.H., Lim, Y.P.; Hur, Y.; Staud, J.E. y Chung, S.M. 2011. A method for selection of restriction enzymes for sdCAPS marker construction. *Plant Breeding* 130: 401-403.
- Jofuku, K.D.; den Boer, B.G.; van Montagu, M. y Okamoto, J.K. 1994. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell Online* 6: 1211-1225.
- Jones, J. y Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Jun, T.H.; Rouf Mian, M.A.; Kang, S.T. y Michel, A.P. 2012. Genetic mapping of the powdery mildew resistance gene in soybean PI 567301B. *Theoretical and Applied Genetics* 125: 1159-1168.
- Kalo, P.; Choi, H.K.; Ellis, N. y Kiss, G.B. 2011. Synteny and comparative genomics between model and cool season grain legumes. In: Kole C (series ed), Perez de la Vega M, Torres AM, Cubero JI, Kole C (eds) *Genetics, Genomics and breeding in crop plants: cool season food legumes*. Science Pubs Inc, New Hampshire. Pp. 285-302.
- Kanaya, S.; Yamada, Y.; Kinouchi, M.; Kudo, Y. y Ikemura, T. 2001. Codon usage and tRNA genes in eukaryotes: correlation of codon usage diversity with translation efficiency and with CG-dinucleotide usage as assessed by multivariate analysis. *Journal of Molecular Evolution* 53: 290-298.

- Kaur, S.; Cogan, N.; Pembleton, L.W.; Shinozuka, M.; Savin, K.W.; Materne, M. y Forster, J.W. 2011. Transcriptome sequencing of lentil based on second-generation technology permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. *BMC Genomics* 12: 265.
- Kawahara, T.; Toyoda, K.; Kiba, A.; Miura, A., Ohgawara, T.; Yamamoto, M.; Inagaki, Y.; Ichinose, Y. y Shiraishi, T. 2003. Cloning and characterization of pea apyrases: involvement of *PsAPY1* in response to signal molecules from the pea pathogen *Mycosphaerella pinodes*. *Journal of General Plant Pathology* 69: 33-38.
- Kearsey, M.J. y Pooni, H.S. 1998. The genetic analysis of quantitative traits. Stanley Thornes (Publishers) Ltd, United Kingdom. 381 p.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kirkpatrick, S.; Gelatt, C.D. y Vecchi, M.P. 1983. Optimization by simulated annealing. *Science* 220: 671-680.
- Knapp, S.J.; Bridges, W.C. Jr y Birkes, D. 1990. Mapping quantitative trait loci using molecular linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics* 79: 583-592.
- Komoszynski, M. y Wojtczak, A. 1996. Apyrases (ATP diphosphhydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1310: 233-241.
- Kosambi, D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics* 12: 172-175.
- Kyte, J. y Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydrophathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157: 105-132.
- Ladizinsky, G. 1979. The genetics of several morphological markers in lentil. *Journal of Heredity* 70: 135-137.
- Ladizinsky, G. 1986. A new *Lens* from the Middle- East. *Notes from the Royal Botanic Gardens, Edinburgh*. 43: 489-492.
- Ladizinsky, G. 1997. Identification of the lentil wild genetic stock. *Genet Resources and Crop Evolution* 46: 115-118.
- Ladizinsky, G.; Braun, D.; Coshen, D. y Muehlbauer, F.J. 1984. The biological species of the genus *Lens* L. *Botanical Gazette* 145: 253-261. ef. S.K. Sharma and R. K. Chahota, 2004. Current status of interespecific hybridization in genus *Lens*, *Journal of Lentil Research* 1: 15-18.
- Lander, E.S. y Botstein, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLPS linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lawton, M.A.; Tierney, M.A.; Nakamura, I.; Anderson, E.; Komeda, Y.; Dube, P.; Hoffman, N.; Fraley, R.T. y Beachy, B.N. 1987. Expression of soybean β -conglycin gene under the control of the couliflower mosaic virus 35S and 19S promoters in transformed perunia tissues. *Plant Molecular Biology* 22: 873-885.

- Legrand, S.; Marque, G.; Blassiau, C.; Bluteau, A.; Canoy, A.S.; Fontaine, V.; Jaminon, O.; Bahrman, N.; Mautord, J.; Morin, J.; Petit, A.; Baranger, A.; Rivière, N.; Wilmer, J.; Delbreil, B. y Lejeune-Hénaut, I. 2013. Combining gene expression and genetic analyses to identify candidate genes involved in cold responses in pea. *Journal of Plant Physiology* 170: 1148-1157.
- Lev-Yadun, S.; Gopher, A. y Abbo, S. 2000. The cradle of agriculture. *Science* 288: 1602-1603.
- Li, X.; Acharya, A.; Farmer, A.D.; Crow, J.A.; Bharti, A.K.; Kramer, R.S.; Wei, Y.; Han, Y.; Gou, J.; May, G.D.; Monteros, M.J. y Brummer, E.C. 2012. Prevalence of single nucleotide polymorphism among 27 diverse alfalfa genotypes as assessed by transcriptome sequencing. *BMC Genomics* 13: 568.
- Lin, S.Y.; Sasa, T. y Yano, M. 1998. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa*, using backcross inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 997-1003.
- Liu, Y.; Wang, L.; Xing, X.; Sun, L.; Pan, J.; Kong, X.; Zhang, M. y Li, D. 2013. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize *Zea mays* L, is involved in biotic and abiotic stresses. *Plant and Cell Physiology* 54: 944-959.
- Liu, W.X.; Zhand, F.C.; Zhang, W.Z.; Song, L.F.; Wu, W.H.; Chen, Y.F. 2013. Arabidopsis Di19 functions as a transcription factor and modulates PR1, PR2 and PR5 expressions in response to drought stress. *Molecular Plant* 6: 1487-1502.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408.
- Luo, Z.W. y Kearsley, M.J. 1992. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Lycett, G.W.; Croy, R.R.D; Shirsat, A.H. y Boulter, D. 1984. The complete nucleotide sequence of a legumin gene from pea (*Pisum sativum* L.). *Nucleic Acids Research* 12: 4493-4506.
- Lynch, M. y Walsh, B. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Madrid, E.; Palomino, C.; Plötner, A.; Horres, R.; Rotter, B.; Winter, P.; Krezdorn, N. y Torres, A.M. 2013. DeepSuperSage analysis of the *Vicia faba* transcriptome in response to *Ascochyta fabae* infection. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 166-182.
- Marchler-Bauer, A.; Zheng, C.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M.K.; Geer, L.Y.; Geer, R.C.; Gonzales, N.R.; Gwadz, M.; Hurwitz, D.I.; Lanczycki, C.J.; Lu, F.; Lu, S.; Marchler, G.H.; Song, J.S.; Thanki, N.; Yamashita, R.A.; Zhang, D. y Bryant, S.H. 2013. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research* 41: 384-52.
- Martin, G.B.; Bogdanove, A.J. y Sessa, G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 23-61.
- Martínez-Villaluenga, C.; Gulewicz, P.P.; Frías, J.; Gulewicz, K. y Vidal-Valverde, C. 2008. Assessment of protein fractions of three cultivars of *Pisum sativum* L.: effect on germination. *European Food Research Technology* 226: 1465-1478.

- Martino, A.; Mancuso, T. y Rossi, A.M. 2010. Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: A comparison with the TaqMan® method. *Journal of Biomolecular Screening* 15: 623-662.
- Maseka, T.; Vopalensky, V.; Suchomelovab, P. y Pospiseka, M. 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry* 336: 46-50.
- Mayer, M.S. y Bagga, S.K. 2002. The phylogeny of *Lens* (Leguminosae): new insight from ITS sequence analysis. *Plant Systematics and Evolution* 232: 145-154.
- McAlvin, C.B. y Stacey, G. 2005. Transgenic expression of the soybean apyrase in *Lotus japonicus* enhances nodulation. *Plant Physiology* 137: 1456-1462.
- Meyerhof, O. 1945. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *Journal of Biological Chemistry* 157: 105-119.
- Mollah, M.B.R. e Ishikawa, A. 2013. Fine mapping of quantitative trait loci affecting organ weights by mouse intersubspecific subcongenic strain analysis. *Animal Science Journal* 84: 296-302.
- Mollinari, M.; Margarido, G.R.A.; Vencovsky, R. y Garcia, A.A.F. 2009. Evaluation of algorithms used to order markers on genetic maps. *Heredity* 103: 494-502.
- Morkunas, I.; Formela, M.; Marczak, L.; Stobiecki, M. y Bednarski, W. 2013. The mobilization of defence mechanisms in the early stages of pea seed germination against *Ascochyta pisi*. *Protoplasma* 250: 63-75.
- Morton, N.E. 1955. Sequentid tests for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics*. 7: 227-318. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editores F. Nuez y J.M. Carrillo. I.S.B.N.: 84-7721-945-1. Pp. 153-293.
- Muehlbauer, F.J.; Temple, S.R. y Chen, W. 2006. Registration of 'Dylan' chickpea cultivar. *Crop Science* 46: 2705.
- Mustafa, B. M.; Coram, T. E.; Pang, E.C.K.; Taylor, P.W.J.F. y Ford, R. 2009. A cDNA microarray approach to decipher lentil (*Lens culinaris*) responses to *Ascochyta lentis*. *Australasian Plant Pathology* 38: 617-631.
- Mydlarz, L.D. y Harvell, C.D. 2007. Peroxidase activity and inducibility in the see fan coral exposed to a fungal pathogen. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146: 54-62.
- Navarro-Gochicoa, M.; Camut, S.; Niebel, A. y Cullimore, J.V. 2003. Expression of theapyrase- like *APY1* genes in roots of *Medicago truncatula* is induced rapidly and transiently by stress and not by *Sinorhizobium meliloti* or Nod factors. *Plant Physiology* 131: 1124-1136.
- Nei, M y Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and non-synonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3: 418-426.
- Nei, M. y Rooney, A.P. 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics* 39: 121-152.
- Newbury, H.J. y Ford-Lloyd, B.V. 1993. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regulation* 12: 43-51.

- Nguyen, T.T.; Taylor, P.W.J. ; Brouwer, J.B.; Pang, E.C.K. y Ford, R. 2001. A novel source of resistance in lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) to ascochyta blight caused by *Ascochyta lentis*. *Australasian Plant Pathology* 30: 211-215.
- Nuez, F. 2000. Introducción al análisis del ligamiento y cartografía de marcadores simples. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. F. Nuez y J. M. Carrillo (eds.). Editorial de la UPV. Pp. 153-293.
- Nurnberger, T. y Scheel, D. 2001. Signal transmission in plant immune response. *Trends in Plant Science* 6: 372-379.
- Ohto, M.A.; Fischer, R.L.; Goldberg, R.B.; Nakamura, K. y Harada, J.J. 2005. Control of seed mass by *APETALA2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 3123-3128.
- Olson, J.M. y Boehnke, M. 1990. Monte Carlo comparison of preliminary methods for ordering multiple genetic loci. *American Journal of Human Genetics* 47: 470-482.
- Papenbrock, J. y Guretzki, S. Latest news about the sulfurtransferase protein family of higher plants. 2011. *Amino Acids* 41:43-57
- Paran, I.; Goldman, I.; Tanksley, S.D. y Zamir, D. 1995. Recombinant inbred lines for genetic mapping in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 90:542-548
- Pasqualini, S.; Lluch, C. y Antonielli, M. 1991. Seed storage protein in several genetic lines of *Vicia faba*. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 507-515.
- Pavan , S.; Schiavulli, A.; Appiano, M.; Miacola, C.; Visser, R.F.G.; Bai, Y.; Lotti, C. y Ricciardi, L. 2013. Identification of a complete set of functional markers for the selection of er1 powdery mildew resistance in *Pisum sativum* L. *Molecular Breeding* 31:247-253.
- Peever, T.L.; Canihos, Y.; Olsen, L.; Ibanez, A.; Liu, Y.C. y Timmer, L.W. 1999. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola tangelo* and rough lemon in Florida. *Phytopathology* 89: 851-860.
- Percudani, R. 2001. Restricted wobble rules for eukaryotic genomes. *Trends in Genetics* 17: 133-135.
- Pérez-Vega, E.; Pañeda, A.; Rodríguez-Suárez, C.; Campa, A.; Giraldez, R. y Ferreira, J.J. 2010. Mapping of QTLs for morpho-agronomic and seed quality traits in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 7: 1367-1380.
- Pérez de la Vega, M. 1993. Biochemical characterization of populations. En 'Plant Breeding: Principles and Prospects'. M. D. Hayward, N. O. Bosemark & I. Romagosa Eds. Chapman & Hall. London. Pp. 184-200.
- Pérez de la Vega, M.; Fratini, R. y Muehlbauer, F.J. 2011. Lentil in: Genetics, genomics and breeding of cool season grain legumes (Pérez de la Vega, M.; Torres, A.M.; Cubero, J.I. y Kole, C. eds). Science Publishers-CRC Press, Enfield, CT, USA. Pp. 98-150.
- Phan, H.T.T.; Ellwood, S.R.; Hane, J.K.; Ford, R.; Materne, M. y Oliver, R.P. 2007. Extensive macrosynteny between *Medicago truncatula* and *Lens culinaris* ssp. *culinaris*. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 549-558.

- Plotkin, J.B.; Dushoff, J.; Desai, M.M. y Fraser, H.B: 2006. Codon usage and selection on proteins. *Journal of Molecular Evolution* 63: 635-653.
- Plotkin, J.B. y Kudla, G. 2011. Synonymous but not the same: The causes and consequences of codon bias. *Nature Review Genetics* 12: 32-42.
- Posada, D. y Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Ramakers, C.; Ruijter, J.M.; Lekanne Deprez, R.H.; Moorman, A.F.M. 2003. Assumption free analysis of quantitative real-time PCR data. *Neuroscience Letters* 339: 62-66.
- Reddy, M.R.K.; Rathour, R.; Kumar, N.; Katoch, P. y Sharma, T.R. 2010. Cross-genera legume SSR markers for analysis of genetic diversity in *Lens* species. *Plant Breeding* 129: 514-518.
- Rieger, R.; Michealis, A. y Green, M.M. 1982. *Diccionario de Genética y Citogenética Clásica y Molecular*. Alhambra, Madrid.
- Rodríguez, M. y Arencibia, A. 2003. Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas. En « Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas» (ed. Cornide. M. T.) Editorial Félix Varela. Pp. 11-30.
- Rodriguez Milla, M.A.; Townsedn, J.; Chang, I-F. y Cushman, J.C. 2006. The *Arabidopsis AtDi19* gene family encodes a novel type of Cys/His2 zinc-finger protein implicated in ABA-independent dehydration, high-salinity stress and light signaling pathways. *Plant Molecular Biology* 61: 13-30.
- Roundhill, S.J.; Fineran, B.A.; Cole, A.L.J. y Ingerfeld, M. 1995. Structural aspects of ascochyta blight of lentil. *Canadian Journal of Botany* 73: 485-497.
- Rubeena; Ford, R. y Taylor, P.W. 2003. Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*). *Theoretical and Applied Genetics* 107: 910-916.
- Rubeena; Taylor, P.W.; Ades, P.K. y Ford, R. 2006. QTL mapping of resistance in lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) to Ascochyta blight (*Ascochyta lentis*). *Plant Breeding* 125: 506-512.
- Rubiales, D. y Fondevilla, S. 2012. Future prospects for ascochyta blight resistance breeding in cool season food legumes. *Frontiers in Plant Science* 3: 1-27.
- Ruijter, J.M.; Ramakers, C.; Hoogaars, W.; Bakker, O.; van den Hoff, M.J.B.; Karlen, Y. y Moorman, A.F.M. 2009. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*. 37: 45.
- Sakamoto, T.; Danzmann, R.G.; Gharbi, K.; Howar, P. *et al.* 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rate. *Genetics* 155: 1331-1345
- Sakar, D. 1983. Breeding behaviour of characters related to yield and adaptation to mechanical harvesting in lentil (*Lens culinaris* Medik.) [Ph.D. dissertation]. Department of Agronomy and Soils, Washington State University, Washington, DC, USA.

- Sáenz de Miera, L.E. y Pérez de la Vega, M. 1998. A comparative study of vicilin genes in Lens: Negative evidence of concerted evolution. *Molecular Biology and Evolution* 15: 303-311.
- Sáenz de Miera, L.E. y Peréz de la Vega, M. 2001. Evidence that the N-terminal extensión of the Vicieae convicilin genes evolved by intragenic duplication and trinucleotide expansions. *Genome* 44: 1022-1030.
- Sáenz de Miera, L.E.; Ramos, J. y Pérez de la Vega, M. 2008. A comparative study of convicilin storage protein gene sequences in species of the tribe Vicieae. *Genome* 51: 511-523.
- Saha, G.C.; Sarker, A.; Chen, W.; Vandemark, G.J. y Muehlbauer, F.J. 2010. Inheritance and linkage map positions of genes conferring resistance to *Stemphylium* blight in lentil. *Crop Science* 50: 1831-1839.
- Saha, G.C.; Sarker, A.; Chen, W.; Vandemark, G.J. y Muehlbauer, F.J. 2013. Inheritance and linkage map positions of genes conferring agromorphological traits in *Lens culinaris* Medik. *International Journal of Agronomy*. Article ID 618926. doi:10.1155/2013/618926.
- Saiki, R.K. 1990. In *PCR protocols*: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sinisky, J.T.; White, T.J. (eds.) Academic Press Inc. Pp. 13-20.
- Sankaran, R.P.; Huguet, T. y Crusak, M.A. 2009. Identification of QTL affecting seed mineral concentrations and content in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 241-253.
- Schwartz, G. 1978. Estimating the dimensions of a model. *Annals of Statistics* 6: 461-464.
- Sengupta-Gopalan, C.; Reichert, N.A.; Bakker, R.F.; Hall, T.C. y Kemp, J.D. 1985. Developmentally regulated expresion of the bean β -phaseolin gene in tobacco seed. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 82: 3320-3324.
- Shapiro, S.S. y Wilk, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (Complete Samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Sharma, B. 2012. Genes for traits of economic importance in lentil. *Grain legumes*. Pp. 15-17.
- Sharma, S.K.; Dawson, I.K. y Waugh, R. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 647-654.
- Sharma, S.; Knox, M. y Ellis, T. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 751-758.
- Sharpe A., Ramsay L., Sanderson L., Fedoruk M., Clarke W., Li R., *et al.* 2013. Ancient orphan crop joins modern era: Gene-based SNP discovery and mapping in lentil. *BMC Genomics* 14: 192.
- Shibata, K.; Abe, S. y Davies, E. 2001. Structure of the coding region and mRNA variants of the apyrase gene from pea (*Pisum sativum*). *Acta Physiologiae Plantarum* 23: 3-13.

- Shutov, A.D.; Kakhovskaya, I.A.; Bastrygina, A.S.; Bulmaga, V.P.; Horstmann, C. y Müntz, K. 1996. Limited proteolysis of conglycinin and glycinin, the 7S and 11S storage globulins from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Structural and evolutionary implications. *European Journal of Biochemistry* 241: 221-228.
- Silvar, C.; Perovic, D; Casas, A.M.; Igartua, E. y Ordon, F. 2011. Development of a cost-effective pyrosequencing approach for SNP genotyping in barley. *Plant Breeding* 130: 394-397.
- Soller, M. y Beckman, J.S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 67: 25-33.
- Sonante, G.; Galazo, I. y Pignone, D. 2003. ITS sequence analysis and phylogenetic inference in the genus *Lens* Mill. *Annals of Botany* 91: 49-54.
- Steinebrunner, I.; Wu, J.; Sun, Y.; Corbett, A. y Roux, S.J. 2003. Disruption of apyrases inhibits pollen germination in Arabidopsis. *Plant Physiology* 131: 1638-1647.
- Sun, T.P. y Gubler, F. 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55: 197-223.
- Sunyaev, S.; Hanke, J.; Aydin, A.; Wirkner, U.; Zastrow, I.; Reich, J. y Bork, P. 1999. Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. *Journal of Molecular Medicine* 77: 754-760.
- Tahir, M. y Muehlbauer, F.J. 1995. Association of quantitative trait loci with isozyme markers in lentil (*Lens culinaris* L.). *Journal of Genetics and Breeding* 49: 145-150.
- Tahir, M.; Muehlbauer, F.J. y Spaeth, S.C. 1994. Association of isozyme markers with quantitative trait loci in random single seed descent derived lines of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Euphytica* 75: 111-119.
- Takahashi, H.; Toyoda, K.; Hirakawa, Y.; Morishita, K.; Kato, T.; Inagaki, Y.; Ichinose, Y. y Shiraishi, T. 2006. Localization and responsiveness of a cowpea apyrase VsNTPase1 to phytopathogenic microorganisms. *Journal of General Plant Pathology* 72: 143-151.
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Tanksley, S.D.; Ganai, M.W.; Prince, J.P.; de Vicente, M.C.; Bonierbale, M.W.; Brown, P.; Fulton, T.M.; Giovannoni, J.J.; Grandillo, S.; Martin, G.B.; Messeguer, R.; Miller, J.C.; Miller, L.; Paterson, A.H.; Pineda, O.; Roder, M.S.; Wing, R.A.; Wu, W. y Young, N.D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Tanyolac, B.; Ozatay, S.; Kahraman, A. y Muehlbauer, F. 2010. Linkage mapping of lentil (*Lens culinaris*) genome using recombinant inbred lines revealed by AFLP, ISSR, RAPD and some morphologic markers. *Journal of Agricultural Biotechnology Sustainable Development* 2: 1-6.

- Tay, J., y Slinkard, A.E. 1989. Transgressive segregation for Ascochyta resistance in lentil. *Canadian Journal of Plant Science* 69: 547.
- Thavarajah, D.; Thavarajah, P.; Sarker, A y Vanderber, A. 2009a. Lentis (*Lens culinaris* Medikus Subspecies *culinaris*) A whole food for increased iron and zinc intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5413-5419.
- Thavarajah, P.; Thavarajah, D. y Vanderber, A. 2009b. Low phytic acid lentils (*Lens culinaris*): A potential solution for increased micronutrient bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9044-9049.
- Thomas, C.; Rajagopal, A.; Windsor, B.; Dudler, R.; Lloyd, A. y Roux, S.J. 2000. A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. *Plant Cell* 12: 519-533.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. y Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tornero, P.; Chao, R.; Luthin, W.; Goff, S. y Dangl, J. 2002. Large-scale structure, function, analysis, of Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *Plant Cell* 14: 435-450.
- Toyada, K.; Shiobara, Y.; Nagai, H.; Kawakami, E.; Amano, M.; Tanka, K.; Inagaki, Y.; Ichinose, Y. y Shiraishi, T. 2012. Cell wall-associated apyrase, a key player for conditioning susceptibility/resistance in plant-pathogen interactions. *IIIrd International Ascochyta Workshop*. Pp. 67.
- Traverso-Cori, A.; Traverso, S. y Reyes, H. 1970. Different molecular forms of potato apyrase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 137: 133-142.
- Tucci, M.; Capparelli, R.; Costa, A. y Rao, R. 1991. Molecular heterogeneity and genetics of *Vicia faba* seed storage proteins. *Theoretical and Applied Genetics* 81: 50-58.
- Tullu, A.; Banniza, S.; Taran, B.; Warkentin, T. y Vandenberg, A. 2010. Sources of resistance to ascochyta blight in wild species of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 57: 1053-1063.
- Tullu, A.; Taran, B.; Warkentin, T. y Vandenberg, A. 2008. Construction of an intraspecific linkage map and QTL analysis for earliness and plant height in lentil. *Crop Science* 48: 2254-2264.
- Tumeret, N.E.; Thanh, V.H. y Nielsen, N.C. 1981. Purification and characterization of mRNA from soybean seeds. *Journal of Biological Chemistry* 256: 8756-8760.
- Urbano, G.; Porres, J.M.; Frías, J. y Vidal-Valverde, C. 2007. Nutritional value. In: Yadav, S.S., McNeil, D.L. and Stevenson, P.C. (eds) *Lentil: An ancient crop for modern times*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 47-93.
- Vakulabharanam, V. R.; ASlinkard, A.E. y Vandenberg, A. 1997. Inheritance of resistance to Ascochyta blight in lentil and linkage between isozyme. *Food Legume Research Conference III Adelaide, Australia*. Pp. 162.
- Valenzuela, M.A.; López, J.; Depix, M.; Mancilla, M.; Kettlun, A.M.; Catalán, L.; Chiong, M.; Garrido, J. y Traverso-Cori, A. 1989. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 93: 911-919.

- Vallejos, C.E.; Sakiyama, N.S. y Christine, D.C. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131: 733-740.
- Vandecasteele, C.; Teulat-merah, B.; Paven, M.C.; Leprince, O.; Ly Vu, B.; Viau, L.; Ledroit, L.; Pelletier, S.; Payet, N.; Satour, P.; Lebras, C.; Gallardo, K.; Huguet, T.; Limami, A.M.; Prospero, J.M. y Buitink, J. 2011. Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell and Environment* 34: 1473-1487.
- Vasconcelos, EG.; Charlab, R.; Galperin, MY. y Ribeiro, JM. 1998. Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 30583-30590.
- Van Loon, L.C.; Rep, M. y Pieterse, C.M.J. 2006a. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology* 44: 135-162.
- Van Loon, L.C. y Van Kammen, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". *Virology* 40: 199-211.
- Van Oss, H.; Aron, Y. y Ladizinky, G. 1999. Chloroplast DNA variation and evolution in the genus *Lens* Mill. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 452-457.
- Vaz Patto, M.C; Torres, A.M; Koblizkova, A., Macas, J. y Cubero J.I. 1999. Development of a genetic composite map of *Vicia faba* using F₂ populations derived from trisomic plants. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 736-743.
- Verma, P.; Shah, N y Bhatia, S. 2013. Development of an expressed gene catalogue and molecular markers from the de novo assembly of short sequence reads of the lentil (*Lens culinaris* Medik) transcriptoma. *Plant Biotechnology Journal* Pp. 1-12.
- Vidhyasekaran, P. 2008. Fungal pathogenesis in plants and crops. Molecular and host defense mechanisms. Second Edition. CRC Press. 509p.
- Vij, S. y Tyagi, A.K. 2006. Genome-wide analysis of the stress associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger(s) in rice and their phylogenetic relationship with Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics* 276: 565-575.
- Voorrips, R.E. 2002. MapChart: software for the graphical representation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* 93: 77-78
- Xu, C.; Dong, J.; Tong, C.; Gong, X.; Wen, Q. y Zhuge, Q. 2013. Analysis of synonymous codon usage patterns in seven different *Citrus* species. *Evolutionary Bioinformatics* 9: 215-228.
- Yadav, S.S.; McNeil, D. y Stevenson, P.C. 2007. Lentil, an ancient crop for modern times. Springer. P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.
- Ye, G.; McNeil, D.L. y Hill, G.D. 2002. Breeding for resistance to lentil *Ascochyta* blight. *Plant Breeding* 121: 185-191.
- Yilmaz Temel, H.; Göl, D.; Akkale, H.B.; Kahriman, A. y Tanyolaç, M.B. 2014. Single nucleotide polymorphism discovery through Illumina-based transcriptome sequencing and mapping in lentil. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 38. doi:10.3906/tar-1409-70.

- Yoneda, M.; Davies, E.; Morita, E.H. y Abe, S. 2009. Immunohistochemical localization of apyrase during initial differentiation and germination of pea seeds. *Planta* 231: 47-56.
- Young, N.; Debelle, F.; Oldroyd, G.E.D.; Geurts, R.; Cannon, S.B.; Udvardi, M.K.; Benedito, V.A.; Mayer, K.F.X.; Gouzy, J.; Schoof, H.; Van de Peer, Y.; Proost, S.; Cook, D.R.; Meyers, B.C.; Spannagl, M.; Cheung, F.; De Mita, S.; Krishnakumar, V.; Gundlach, H.; Zhou, S.; Mudge, J.; Bharti, A.K.; Murray, J.D.; Naoumkina, M.A.; Rosen, B.; Silverstein, K.A.T.; Tang, H.; Rombauts, S.; Zhao, P.X.; Zhou, P. *et al.* 2011. The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480: 520-524.
- Walker, J.E.; Saraste, M.; Runswick, M.J. y Gay, N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha and beta subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal* 1: 945-951.
- Wang, B.; Jin, S.H.; Hu, H.Q.; Sun, Y.G.; Wang, Y.W.; Han, P. y Hou, B.K. 2012. UGT87A2, an Arabidopsis glycosyltransferase, regulates flowering time via flowering locus c. *New Phytologist* 194: 666-675.
- Wang, D.G.; Fan, J.B.; Siao, C.J.; Berno, A.; Young, P.; Sapolsky, R.; Ghandour, G.; Perkins, N.; Winchester, E.; Spencer, J.; *et al.* 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-1082.
- Wang, N.; Hatcher, D.W.; Toews, R. y Gawalko, E.J. 2009. Influence of cooking and dehulling on nutritional composition of several varieties of lentils (*Lens culinaris*). *Food Science and Technology* 42. Pp. 842-848.
- Wang, S.; Basten, C.J. y Zeng, Z.B. 2012. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).
- Watanabe, S.; Tajuddin, T.; Yamanaka, N.; Hayashi, M. y Harada, K. 2004. Analysis of QTLs for reproductive development and seed quality traits in soybean using recombinant inbred lines. *Breeding Science* 4: 399-407.
- Whittle, C.A.; Malik, M.R. y Krochko, J.E. 2007. Gender-specific selection on codon usage in plant genomes. *BMC Genomics* 169.
- Williams, G.C. 1998. QTL mapping in outbreed pedigrees. In: *Molecular dissection of complex traits*, Paterson, A. H. (ed). USA, CRC Press, New York. Pp. 81-95.
- Wittwer, C.T.; Reed, G.H.; Gundry, C.N.; Vandersteen, J.G. y Pryor, R.J. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49: 853-860.
- Wolf, C.; Hennig, M.; Romanovicz, D. y Steinebrunner, I. 2007. Developmental defects and seedling lethality in apyrase *AtAPY1* and *AtAPY2* double knockout mutants. *Plant Molecular Biology* 64: 657-672.
- Wu, J.; Steinebrunner, I.; Sun, Y.; Butterfield, T.; Torres, J.; Arnold, D.; Gonzalez, A.; Jacob, F.; Reichler, S. y Roux, S.J. 2007. Apyrases (Nucleoside Triphosphate-Diphosphohydrolases) play a key role in growth control in Arabidopsis. *Plant Physiology* 144: 961-975.

- Zeng, Z.B. 1993. Theoretical basics of precision mapping of quantitative trait loci. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10972-10976.
- Zeng, Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136: 1457-1468.
- Zimniak-Przybylska, Z.; Przybylska, J.; Krajewski, P. 2001. Electrophoretic seed globulin patterns and species relationship in the genus *Lens* Miller. Journal of Applied Genetics 42: 435-448.
- Zohary, D. 1999. Monophyletic vs. polyphyletic origin of crops on which agriculture founded in the Near East. Genetic Resources and Crop Evolution 46:133-142.

APÉNDICE

APÉNDICE 7.1. Listado de cebadores empleados para la construcción del mapa de ligamiento.

Código del producto(s) amplificado(s)	Cebador forward 5'-3'	Cebador reverse 5'-3'	Programa de PCR	Amplificación en parentales	Patrón de bandas	Técnica	Polimorfismo en parentales
CVC	CAACACTCGTCRWGYTACATG	CACATTGTCRTCCGADCCTTC	CVC	Sí	bu	CAPS	No
CVC-HRM	TGACTAAACTTTGGTTTGGTTTGA	TTTACCAGGCTATTCAAGGA	HRM-cvc	Sí	bu	HRM	Sí
P23	TGAAGCACCATCAGAAACCA	AAGAGGACACATCTGTGCCA	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P42	TTGGCTCCACCCTATGATTC	CACTTTAGGGTTACGCCACG	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P43	GGCTCGCTCTTTCACCTAACG	TCTGGAACCCATGAAACCTT	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P46	TATCTTCGTCGCAACCGTTA	TGCCCCGCTCAAAATAGTTA	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P53	TCATGGTGAAGACTGGCATC	TTGTGCATATCTCCACCAAACA	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P73	GTTAGTTGCTTCCGGCTCAG	TGCGGTAATCAAAATGGACAA	Q-primers	Sí	bu	HRM	Sí
P75	CCCTCTCCACCCTTCCTAC	GTTGGATCAGGTTTGCCAGT	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P84	TTGAATCAGCTTCCGCTTTT	TGCTAGGGTCTTTGCTGCTT	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P87	AGCTCTTGATTTGGCTTCCA	AAGAAACTGCACCTGCTGCT	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P88	TTGGATGCTGCTAAGACTTTTC	TTTCTTTTACATGTTTCGCTATCAA	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P98	AAGATCGTGAAAGGGCTCAA	GCTTCCACCAGCATTATTCC	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P179	CGTTGAATTGCGAACTCGTA	GGTTTCGCAGTTCTTTCAGC	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P260	TATGGCTATGCTGCTCCTGA	GTTTGGCCCATTCGATTAATA	Q-primers	Sí	bd	PCR específica	No
P51982	ATAATGCCGGTAATGCTGCT	AGACGAGCATCAGCTGGAAC	Q-primers	Sí	bu	HRM	Sí
P52010	CCTCTTGGACTGCTCGTCTC	CCATTGGATGCTCTTCATCA	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P52014	CATGCAGCAAGGTTTGACAT	GCCTGAGCCGTCAAAAGTT	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
P52052	CATGGCTAACATCCAGAAGAAA	CCACTTTTCTTGAGGCCAGA	Q-primers	Sí	bu	CAPS	Sí
P52059	ATGACAGCAACGTCGTTTGA	AAAACCTTGGTTGAACAAGAACG	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
ERTF^a	GAGTCCAACAAGGGTGGGGTCCA	GCAGAAAGGGGATTCTCCTGTGG	Q-primers	No	--	PCR específica	No
HSP^a	GGCAAAGCAGCATCAGTTGCCA	AGAACACCCATCTCTAACCAGTGCCT	Q-primers	No	--	PCR específica	No

a: Cebadores diseñados a partir de secuencias de Vicia faba, procedentes de la universidad de Córdoba.

bu: banda única

bd: banda única débil.

bm: banda múltiple.

Código del producto(s) amplificado(s)	Cebador forward 5'-3'	Cebador reverse 5'-3'	Programa de PCR	Amplificación en parentales	Patrón de bandas	Técnica	Polimorfismo en parentales
PR^a	TGGCCATGCCATGTTGATGCT	AAGTTCGTGATGCGTGCAACAGT	Q-primers	No	--	PCR específica	No
Serk^a	TGTCACCCAATCCACTTGCCAATAGC	TGACGGAGCGTCATCAGTGTT	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
Bcl₂^a	ACCCGCCCGGCAAGTCTATCA	TGGGAGATGAGGCCAGGTGGA	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
bZIP^a	AGCCCCAAATTCTGGCCTCCG	ACCCCACACGTGTAACCCTCCA	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
AKR^a	CAGCTGAAGTCATGGCAGGCA	AACAAGTAACTGGTGTGTTAGCTGCAT	Q-primers	Sí	bu	CAPS	No
AKR1^a	GCGGCGGAACACTCTCAGGA	AACAAGTAACTGGTGTGTTAGCTGCAT	Q-primers	No	--	PCR específica	No
P341	TCGGCGACTTCGATCTACTT	GAAGAAACTCGCCAATCTGC	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P363	GGCTGAGATCAACCAGCTTC	GTTCTGGGAATCCTCATGGA	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P372	CCAGCAAGGGTTGCTCTAAG	CTTCTTGCTGCCTTTTCACC	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P405	TATGGTTGCCATTGGAGGTT	ACCTCGGTTACAGTTCCAG	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P407	CGAAGTTCTCAGGCCTCTTG	TGACATTCCAGCTTCAGTGC	Intrón	No	--	PCR específica	No
P453	TCAGCTGTGCAGCTAGGAAA	CGGAATTTGAAGGGTTTTGA	Intrón	Sí	bd	PCR específica	Sí
P460	GTCAAGCATAACCTCGTGTT	TGCCTCTGGATGATTCCTTC	Intrón	Sí	bu	CAPS	Sí
P467	ATGCCAAGCTGCTTTCTCTT	GCATTTGGGAACACATAGGG	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P469	AGCAAGGTGGAAGGGAAAAT	GGATTTGCTGCCTTGATGAT	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P475	GTGGAAATGCCTGGTCTCAT	AGCACGACATGACGAAACTG	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P500	GAAGCACCCAAAACGTGAAT	TTGTCCCCAGAACATTGACA	Intrón	Sí	bu	CAPS	Sí
P527	GATGTGCTGCGAAAGAAACA	GCCAATTTCCAGAAGAACCA	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P596	CGCAAGCTACGAAACATTGA	CAGCCCCTACCTCTTCATCA	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P601	CCTGGAAACCCTACTGGTCA	AGTGGCTTCCAAAAGCTTGA	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P605	CGCACTTCAAGAGCAAGTACC	CGTGTGAACCATCAACAAGG	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P609	AATGCTTGCTGGGAGCTTTA	ACCACCCTACCAGATTCAG	Intrón	Sí	bu	CAPS	No

a: Cebadores diseñados a partir de secuencias de *Vicia faba*, procedentes de la universidad de Córdoba.
 bu: banda única
 bd: banda única débil.
 bm: banda múltiple.

Código del producto(s) amplificado(s)	Cebador forward 5'-3'	Cebador reverse 5'-3'	Programa de PCR	Amplificación en parentales	Patrón de bandas	Técnica	Polimorfismo en parentales
P622	TCAAACCTCTTGCCACTGTGCG	GCCTCTTGTCTTGGCTTTTG	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P636	CCTCCCTCTTCATCTCAACG	GCCTTCTTGATCTGGCTGAG	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P663	TCCCGAACCCTGTCAACTAC	TTCTGCACCCCAAAGTATCC	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P670	GGAAACTGCCGACAAATCTC	GGCAAAGAGCGCGATAATAC	Intrón	Sí	bm	PCR específica	Sí
P699	GAGAAGGAGAAGGCCGTACC	CTTGGCATTCTCCATCCAT	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P707	ATCGCCGTACTGGTTTTGTC	GCTGAAAGCCCAATCAACAT	Intrón	Sí	bm	PCR específica	Sí
P715	TCTGATTCTGCGTGCACCTC	TCTGCAATTGTCTCCCCTTC	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P738	TTCATACCAGCTGCATTTTCG	GACCCCATTCATTTGGTGAC	Intrón	No	--	PCR específica	No
P739	CAGCAATGGCTTTTGTCTGA	GTCTTCCAAACCAGGTGCAT	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P752	CAGGGTCTCAAATCCCTCAA	CTTGGCAGGCTTTTTAGCAG	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P785	TTCCTGGAGATGTGGAGACC	GCTTCAACCCAAGTGACCAT	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P800	CACTCACACATGCCCAATTC	ATTTGGATTCCGGTCCATCAA	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P802	CATGGCTCAACCCTCAAAGT	GGTGAAATTGAATGCACACG	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P918	TGGGTTTGGAGTCCGTTTAC	CCTCCAATTTCTCCATCCATC	SNP	Sí	bd	PCR específica	No
P1502	GATGGATGGCAATCTGTTAGC	ACCAGCAGATGCAAGATACG	SNP	Sí	bd	PCR específica	No
P3869	TGGTTGCATAAGTGGCTCTG	CCCAAACCAGTCATCTGC	SNP	No	--	PCR específica	No
P4975	CCACCTATTAGCAAGGCTTATGC	CATCATCCACAAGAAATCAGC	SNP	Sí	bd	PCR específica	No
P4597	ACAGAGAATAGTCCGTGCTTCC	TGATCAGCCAACAGAAGATCC	SNP	No	--	PCR específica	No
P50153	CACCGACGATCAAATCACAG	TCTCCAATCATTGCCAACAA	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P50515	CTTCGTTGCGAAAGAAGTCC	CGCAACCAACATAACAATGC	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P50615	AGAGGGACTCACACACCAC	ACATCTCCATTCGTTTTGC	Intrón	No	--	PCR específica	No

bu: banda única
 bd: banda única débil.
 bm: banda múltiple.

Código del producto(s) amplificado(s)	Cebador forward 5'-3'	Cebador reverse 5'-3'	Programa de PCR	Amplificación en parentales	Patrón de bandas	Técnica	Polimorfismo en parentales
P50650	ACCAATAGGGCGATCCTTCT	TTTCGACAAACAGTGCAAGC	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P50772	GATCAAGGCTGCGTTTCTC	GGCATCTTGATCCTCGATTT	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P50814	TACAGCGATTGTTTGCTTGC	TACCCATGCATCTCCACAGA	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P50878	CAGCCACCGATACTTCCATT	TCCTTCCATTTTGTGGATCA	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P51060	TCTTGATTTCTGGGAAGATGG	TCAATGACCGACTTGGAAACA	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P51142	GCGAACAGGTTCTGAAGGAG	TTTCCCTCCGCATAAATCAC	Intrón	No	--	PCR específica	No
P51153	CTGGGCTGTTCTTTGGGATA	CTCGGTCTGAACCAACAGATT	Intrón	No	--	PCR específica	No
P51183	ATGGTCAAAATGGCTCTTCG	CAACAATGGTCCCAGTAAAC	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P51193	CTTCGACGTCAGTGTGCAAT	GCCCTTTTCCAACAAGAACA	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P5867	GATTCATGCCAACCATGGAG	GCATACATGCCACCATAACG	SNP	Sí	bu	CAPS	No
P9536	AAGCTTGATCTCCGCTATGG	AAAGGACCGTCTGTTGATGG	SNP	Sí	bu	CAPS	No
P51194	GGCTGAGATCAACCAGCTTC	ACTTTGCCCTCCTCATCCTT	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51263	CTTTGTAGACGCGGGATCTT	GAATTGAAGGGCAGTACCA	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51300	AGCGCTATCAGTTCCTGCAT	CCTGCAAGGAGAAGTGTTC	Intrón	Sí	bd	PCR específica	Sí
P51339	GGTTGCACAATCACCTCCTT	ATGTTCGAGCCTCAGAGTCGT	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51340	CCTGGAATCTGTCCCTGAAA	GTGATAAGGTTCGCGTTCCAT	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51433	GAACCCTCTACGACGGTGAA	GCCTCCGTATGAGCCAATAA	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P51459	ACAGGTGATGGTGTCAACGA	CCATGGAGAGTCTCTGAGC	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51499	TTGCAACAAATTGACCCAAA	TGATTTTCCCACAGCAACA	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P51500	CTTGGAGGCTCATGCATTTT	TTCCAGGATTGGGAGAGATG	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51516	GTGGTGGTCCGGAGCTATT	TCGGTGAGAACGGAGAGTTT	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No

bu: banda única
 bd: banda única débil.
 bm: banda múltiple.

Código del producto(s) amplificado(s)	Cebador forward 5'-3'	Cebador reverse 5'-3'	Programa de PCR	Amplificación en parentales	Patrón de bandas	Técnica	Polimorfismo en parentales
P51529	CCGAATCCAAATCCTCTTCA	GCAAAAAGATCGAAAGCCTTG	Intrón	Sí	bm	PCR específica	Sí
P51535	ACGTCAAGGAAACACCGAAG	CCCATGGTCCACTTAGTGCT	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P51541	TGTTCCAATGATGCTGGTGT	CCACAACGGTTCCTCAAAGT	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51546	GCGTAATTTGGATCGTGGTT	TGCTGTGCCTTCAGTTGTTC	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51555	AGGACCCTCCGGATTGAA	GCACCCTTCTGAATCTTCCA	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P51568	TGGTGTCTAGGTTTGATTGAGAA	TCATGGCAACCACATCATT	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P51600	ACACGCATTCTTTGGTTTC	GTTGCCTTTTCTCCACCAA	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P51619	CGAAGATCCCGAACTTCTTG	AAAGCTTGGGAATGTTGTGG	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P51636	TTGCTGTTGGAGAAGGGAAG	ATCATCCACAGACCCTGGAC	Intrón	Sí	bm	PCR específica	Sí
P51659	CCAAACTTCCGTCTGGTGTT	CGCATTCAAGTTCAATGTGCT	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P51712	GCAATGGCAATATGCAAGAA	GAAGGCAGCAATGTCACTCA	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51726	GATCCAGTTCGTCCTGGTGT	TGCCATAAACCAACAAAT	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P51776	CCGAACTCACCCACCTAC	AGGTCCTTGCAGCCTTAGC	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51791	CATCCCGCACACACAAGTA	ACTCCTCCCTACGCCTCTTC	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No
P51806	TGAACAGTGTTAGGGTTTCTTGTT	TGGCTTATTTGCTTCTTTTCTCA	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P51811	CTCGGATTGTTGACGGAAGT	AGCCTCGCCGTTGAGTAATA	Intrón	No	--	PCR específica	No
P51817	TGTATGGACCCAGCATTGA	GGGATTGGCGCAAAGTAATA	Intrón	No	--	PCR específica	No
P51819	TGCGAAATTCGTTGAAGAGA	GCAGCAGGTTTGGTCTTAGC	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P51840	TCTTCTCCCTTCGACTGCAT	CTTTACCCGCAACGATGTTT	Intrón	Sí	bd	PCR específica	No
P51877	TTGAGCTTCCCAATTCCAAC	GTTTCATCCCATCCAGCAAT	Intrón	No	--	PCR específica	No
P51882	CTCCCGTCGTCAGAAATCAT	AACCCACAAACACCAGAAGC	Intrón	Sí	bm	PCR específica	No

bu: banda única

bd: banda única débil.

bm: banda múltiple.

Código del producto(s) amplificado(s)	Cebador forward 5'-3'	Cebador reverse 5'-3'	Programa de PCR	Amplificación en parentales	Patrón de bandas	Técnica	Polimorfismo en parentales
P51903	CTGGGGCAATTTTGGTCTTA	TGTCTCACCATCAACGGACT	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P51995	TCCTCATTCCCAAACAGGAC	CTGCACTTGCTCCTGCATTA	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
P52030	AGCTCAATCTTTAGGCCACA	TAGGGCGGTGCCTATATCAA	Intrón	Sí	bu	CAPS	No
Apy2A	ACCCAAGAAGGTGCTTTTCA	AAGTGCTACCAAGGCTCCAA	Apy2	Sí	bu	CAPS	No
Apy2A-HRM	CGAATGGCTTTAGGCTTTGT	GCCATATAGCCGCAAGTAACA	HRM-apy	Sí	bu	HRM	Sí
Apy2B	TGCTGGATGGAACACAAGAA	TCTGAAGCTGCCATGGCT	Apy2	Sí	bu	CAPS	Sí
Apy SSR	ATTGAYGGAACCCAAGARAGGT	TCCATCTGCAACTTKTGAG	E-capilar	No	Sí	SSR	No
Dehidrina	ACAATGTCTCAGTATCAAAACC	TCATGATGATGATCTAGTGTCCAG	Q-primer	Sí	bu	CAPS	Sí

bu: banda única
 bd: banda única débil.
 bm: banda múltiple.

APÉNDICE 7.2. Secuencias nucleotídicas utilizadas para HRM. En fondo amarillo se indican los SNPs y en fondo rojo y azul los cebadores.

#P73_Lupa	CTTAGTGGCT TCCGGCTCAG A GGAGAGTCT CGAGAAGAAG CCCAAGGATG GTCCTAAACG GTGCACCAAC TGCAATAAGC GGGTTGGTTT
#P73_Orientalis	CTTAGTGGCT TCCGGCTCAG A GGAGAGTCT CGAGAAGAAG CCCAAGGATG GTCCTAAACG GTGCACCAAC TGCAATAAGC GGGTTGGTTT
#P73_Lupa	GACAGGATTT AATTGTCGAT GTGGTAACCT CTCTCTGGCT GTACATCGCT ACTCAGACAA GCATGA TTGT CCATTGATT ACCGCA
#P73_Orientalis	GACAGGATTT AATTGTCGAT GTGGTAACCT CTCTCTGGCT GTACATCGCT ACTCAGACAA GCATGA TTGT CCATTGATT ACCGCA
#P51982_Lupa	ATAATGCC - G GTAATGCTGC - H GCTAGCCC TTATGGC TG GTCTTGCTCC TAAGACAAAG GTAATAAATT GAATTTATGT CTGTTCTGCA
#P51982_Orientalis	ATAATGCC TG GTAATGCTGC A GCTAGCCC TTATGGCA TG GTCTTGCTCC TAAGACAAAG GTAATAAATT GAATTTATGT CTGTTCTGCA
#P51982_Lupa	CCAGCTGTTT AAGCATTTAG ATTTTAGACG TAACAAGCAT ACTTTAAGGA CTGACTCAA ATTGCCACAC TTTTGCAGGT TCTTAGGGAT
#P51982_Orientalis	CCAGCTGTTT AAGCATTTAG ATTTTAGACG TAACAAGCAT ACTTTAAGGA CTGACTCAA ATTGCCACAC TTTTGCAGGT TCTTAGGGAT
#P51982_Lupa	GGTAAATGGT CTGAGCAGGA AGCTGCTATT TTAGTCCCTG GAGACATCAT TAGCATCAA CTAGGTAGAT ATT STTCCAG CTGATGCTCG
#P51982_Orientalis	GGTAAATGGT CTGAGCAGGA AGCTGCTATT TTAGTCCCTG GAGACATCAT TAGCATCAA CTAGGTAGAT ATT STTCCAG CTGATGCTCG
#P51982_Lupa	TCT
#P51982_Orientalis	TCT
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	ACCCAAGAAG GTGCTTTTCA ATGGGTATGT TTCATGAAT TATTAGTGGT TGACTTTAAC TTTTGAATAC ATTTATAAAT TAGTGACGTT
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	ACCCAAGAAG GTGCTTTTCA ATGGGTATGT TTCATGAAT TATTAGTGGT TGACTTTAAC TTTTGAATAC ATTTATAAAT TAGTGACGTT
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	GAGCATATAG CTTCCAATTC CAATGGCTTT TGATAGAAAG AACCGGGAGA AGAATATTCT CCCTCTTTTT TTACATGGAT TCTTACATCA
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	GAGCATATAG CTTCCAATTC CAATGGCTTT TGATAGAAAG AACCGGGAGA AGAATATTCT CCCTCTTTTT TTACATGGAT TCTTACATCA
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	TCAACTAAGA AATGATAATG TAAGTCTTTT GAGACTAATT AGCTAGAAAT AAAATTATAG CCGTCTTCC CCCGAATGCC TTTAGGCTTT
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	TCAACTAAGA AATGATAATG TAAGTCTTTT GAGACTAATT AGCTAGAAAT AAAATTATAG CCGTCTTCC CCCGAATGCC TTTAGGCTTT
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	CTCTACGTTG CACCTTCAGT AAGTACTGTC ATGCAAAGG GACTGTCTGA GTCTGTGATG GTGCTGGTCT TTACTTAAGG AAAATATAGT
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	CTCTACGTTG CACCTTCAGT AAGTACTGTC ATGCAAAGG ACTGTCTGA GTCTGTGATG GTGCTGGTCT TTACTTAAGG AAAATATAGT
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	TCTGCTCTTA ATAGAGTAAT AGTCCATCAA CAATTGAATG CAT TGTTACT TCGGCTATA TGGCTTCTTT TATTTTCTTG AATAGTGAAC
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	TCTGCTCTTA ATAGAGTAAT AGTCCATCAA CAATTGAATG CAT TGTTACT TCGGCTATA TGGCTTCTTT TATTTTCTTG AATAGTGAAC
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	GGTCTTTATA AACTAGTCCA ACTAAGAAAG TTTGACAATG TTGGATTATT GAATATAAGA CGAAGTATA CATGTTTTTA AGTGGACTTG
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	GGTCTTTATA AACTAGTCCA ACTAAGAAAG TTTGACAATG TTGGATTATT GAATATAAGA CGAAGTATA CATGTTTTTA AGTGGACTTG
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	TTTTCTGCGT GTTCTTTATA ACCTACTACA ATAGTTACAC TATTAGTTTT CTATTTCTG CTTAAGTCAT TAATTAGGAT TTGAGACTCG
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	TTTTCTGCGT GTTCTTTATA ACCTACTACA ATAGTTACAC TATTAGTTTT CTATTTCTG CTTAAGTCAT TAATTAGGAT TTGAGACTCG
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	GGTCTTATT TTTTATTCAA --TAATTGCT GTCAGGATTT T CATGTTTAC T-TCCTTGCC TGTCATTACT TTTT-GAATA TGGATCCGAA
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	GGTCTTATT TTTTATTCAA GATAATTGCT GTCAGGATTT - CATGTTNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	AACAGATGAT AAAATCACTT AATAAATTAC ATGCTATCCT GCATAAAAGG AAAGCAAAA ACCAACAGAA TGAAATATCC TGTCTATAT
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	NNNNNNNNN NNNNNNNNN NAT-AATTAC ATGCTATCCT GCATAAAAGG AAAGCAAAA ACCAACAGAA TGAAATATCC TGTCTATAT
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	TAGTGTATT TACATATTTA CTTCAACAAT AGTTATCCAC ACAGATGGTT TAGGTTCCAA AACAATTGTC TTTCTTTGT TAGACGTTCT
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	TAGTGTATT TACATATTTA CTTCAACAAT AGTTATCCAC ACAGATGGTT TAGGTTCCAA AACAATTGTC TTTCTTTGT TAGACGTTCT
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	TCTAAATAAT TTGTTAGTTG GTATACAAAT TTATTGAAGT TTCAAATGAG GGCAGTGATC T-AGACCATA TTGTTATAAG AAAAAAAGGC
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	TCTAAATAAT TTGTTAGTTG GTATACAAAT TTATTGAAGT TTCAAATGAG GGCAGTGATC T-AGACCATA TTGTTATAAG AAAAAAAGGC
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	TATTTTCACA AGAGACAGTC GAGTACCAAC TCTATACATA GACATTCATT TGAGAAACGA TCAAACCAT TTGATCATT AATACAAGTT
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	TATTTTCACA AGAGACAGTC GAGTACCAAC TCTATACATA GACATTCATT TGAGAAACGA TCAAACCAT TTGATCATT AATACAAGTT
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	GAGCAACCAA ATATTGTTGA AGTAGACAAT ATATATACCA TCCTAGCAA TAAATTCATA CTACATAGCA AGGAAACATA TTCAGAGCAT
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	GAGCAACCAA ATATTGTTGA AGTAGACAAT ATATATACCA TCCTAGCAA TAAATTCATA CTACATAGCA AGGAAACATA TTCAGAGCAT
#Apirasa_tipo_2A_Lupa	TTAGTTTGT TCCTTTTCT TTTGTTTTAT TCTAGGTGAC TATTAACCTAC C
#Apirasa_tipo_2A_Orientalis	TTAGTTTGT TCCTTTTCT TTTGTTTTAT TCTAGGTGAC TATTAACCTAC C

APÉNDICE 7.3. Secuencias nucleotídicas.

7.3.1. Secuencias nucleotídicas de convicilinas alineadas en formato MEGA

Región 5' no codificante;

```
#NIGRICAN GCACAAGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CCTTATGTAC TATCACTATA AATAACCCCT ATCTTACCTT TATTTTCATCA
#ORIEB_BG GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#ORIEB_ILWGCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#IRN_1323 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#IRN_1349 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#IRN_0370 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#TUR_144 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#TUR_918 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#TUR_590 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#IRQ_52 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#SIR_60 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#IRQ_62A GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#IRQ_62B GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#SIR_780 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#SIR_4400 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#ESP_ALPO GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#YUG_323 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#COL_1645 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#CHL_1827 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#UKR_92 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#MAR_96 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#ESP_MALA GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#GRC_296 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#ETI_3467 GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
#PER GCACAATGTA GACAAATGTC CATCGACGTT ATTCATCTAG CTTTATGTAC TATCACTATA AATATCCCTC GTCTTACCTT TATTTTCATCA
```

```
#NIGRICAN TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAA-T
#ORIEB_BG TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#ORIEB_ILWTCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#IRN_1323 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#IRN_1349 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#IRN_0370 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#TUR_144 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#TUR_918 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#TUR_590 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#IRQ_52 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#SIR_60 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#IRQ_62A TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#IRQ_62B TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#SIR_780 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#SIR_4400 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#ESP_ALPO TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#YUG_323 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#COL_1645 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#CHL_1827 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#UKR_92 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#MAR_96 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#ESP_MALA TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#GRC_296 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#ETI_3467 TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
#PER TCCAAAGTTT GAATCAGTGA AATACAAAATT
```

Exón 1;

```
#NIGRICAN ATG GCT ACT ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#ORIEB_BG ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#ORIEB_ILWATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#IRN_1323 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#IRN_1349 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#IRN_0370 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#TUR_144 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#TUR_918 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#TUR_590 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#IRQ_52 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#SIR_60 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#IRQ_62A ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#IRQ_62B ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#SIR_780 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#SIR_4400 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#ESP_ALPO ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#YUG_323 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#COL_1645 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#CHL_1827 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#UKR_92 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#MAR_96 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#ESP_MALA ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#GRC_296 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#ETI_3467 ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
#PER ATG GCT ACC ACA ATC AAA TCG CGA TTT CCA CTT TTG TTG TTG CTG GGA ATT ATA TTC CTG GCC TTC GTC TGT GTT GCT TAT GCA AAT GAC
```



```
#ESP_MALA ATC ATT CCA GCA GGT CAC CCA GTT TCC ATC AGT GCT TCG TCA AAT TTG AAT TTG CTT GGA TTT GGT ATC AAT GCC GAG AAC AAT GAG AGA
#GRC_296 ATC ATT CCA GCA GGT CAC CCA GTT TCC ATC AGT GCT TCG TCA AAT TTG AAT TTG CTT GGA TTT GGT ATC AAT GCC GAG AAC AAT GAG AGA
#ETI_3467 ATC ATT CCA GCA GGT CAC CCA GTT TCC ATC AGT GCT TCG TCA AAT TTG AAT TTG CTT GGA TTT GGT ATC AAT GCC GAG AAC AAT GAG AGA
#PER ATC ATT CCA GCA GGT CAC CCA GTT TCC ATC AGT GCT TCG TCA AAT TTG AAT TTG CTT GGA TTT GGT ATC AAT GCC GAG AAC AAT GAG AGA

#NIGRICAN AAC TTC CTA ACA G
#ORIEN_BG AAC TTC CTA ACA G
#ORIEN_ILWAAC TTC CTT ACA G
#IRN_1323 AAC TTC CTA ACA G
#IRN_1349 AAC TTC CTA ACA G
#IRN_0370 AAC TTC CTA ACA G
#TUR_144 AAC TTC CTA ACA G
#TUR_918 AAC TTC CTA ACA G
#TUR_590 AAC TTC CTA ACA G
#IRQ_52 AAC TTC CTA ACA G
#SIR_60 AAC TTC CTA ACA G
#IRQ_62A AAC TTC CTA ACA G
#IRQ_62B AAC TTC CTA ACA G
#SIR_780 AAC TTC CTA ACA G
#SIR_4400 AAC TTC CTA ACA G
#ESP_ALPO AAC TTC CTA ACA G
#YUG_323 AAC TTC CTA ACA G
#COL_1645 AAC TTC CTA ACA G
#CHL_1827 AAC TTC CTA ACA G
#UKR_92 AAC TTC CTA ACA G
#MAR_96 AAC TTC CTA ACA G
#ESP_MALA AAC TTC CTA ACA G
#GRC_296 AAC TTC CTA ACA G
#ETI_3467 AAC TTC CTA ACA G
#PER AAC TTC CTA ACA G
```

Intrón 5:

```
#NIGRICAN GTATTAAGCG AATATTGTGA TAATTAGTTA GTAAGTCTCG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAAAA TTT
#ORIEN_BG GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#ORIEN_ILWGTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#IRN_1323 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#IRN_1349 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#IRN_0370 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#TUR_144 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#TUR_918 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#TUR_590 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#IRQ_52 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#SIR_60 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#IRQ_62A GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#IRQ_62B GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#SIR_780 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#SIR_4400 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#ESP_ALPO GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#YUG_323 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#COL_1645 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#CHL_1827 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#UKR_92 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#MAR_96 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#ESP_MALA GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#GRC_296 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#ETI_3467 GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
#PER GTATTAAGCG AATA----- --TTAGTTA GTAAATCTTG ACTAAATGAT AATGATTGA ATTTGATATT TGAATTTGG TGATTGAACA TTT
```

7.3.2. Secuencias nucleotídicas de apirasa alineadas en formato MEGA

Exón 1:

```
#IRQ_ILL52 GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#CHL_72 GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ESP_ALPO GCA ATC ACT CCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ESP_LUPA GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#SIR_60 GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#IND_3042 GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ESP_ILL323 GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ESP_MALA GCA ATC ACC TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ODEMENSIS --- --- --- --- --- --- -- TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#TOMENTOSUS --- --- --- --- --- --- -- TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ESP_913 GCC GCG GGA TTC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ITL_343 GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#COL_1645 GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#UKR_92 CCG CGG GAT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ETP_3467 GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ORIEN_BG GCA ATC ACC TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ORIEN_3 GCA ATC ACC TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#ESP_WA GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#LBN_191 GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#IRAQ_52 GCA ATC ACC TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT
#NIGRICANS GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAC AAC CTA CTC ACC AAT AGA AAG ACT TTC CTA AAA CAA GAA ACT ATT
#ERVOIDES GCA ATC ACT TCC TCC CAA TAC TTA GGA AAC AAT AAC CTA CTC ACC CAT AGA AAG ATT TTC CTA AAA CAA GAA GCT ATT

#IRQ_ILL52 TCC TCT TAC GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#CHL_72 TCC TCT TAC GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#ESP_ALPO TCC TCT TAC GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#ESP_LUPA TCC TCT TAC GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#SIR_60 TCC TCT TAC GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#IND_3042 TCC TCT TAT GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#ESP_ILL323 TCC TCT TAC GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#ESP_MALA TCC TCT TAC GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#ODEMENSIS TCC TCT TAC GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#TOMENTOSUS TCC TCT TAC GCT GTC GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#ESP_913 TCC TCT TAC GCT GTT GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
#ITL_343 TCC TCT TAC GCT GTT GTA TTT GAT GCT GGT AGC ACT GGT AGT CGC ATT CAT GTT TAC CAT TTT GAC CAA AAC TTG AAT
```



```
#ORIEN_3 GAA GAT GTG GTC CCT GAG GAT CTT CAA CCC AAG ACG CCT GTT AGA CTT GGG
#ESP_WA GAA GAT GTG GTC CCT GAG GAT CTT CAA CCC AAG ACG CCT GTT AGA CTT GGG
#LBN_191 GAA GAT GTG GTC CCT GAG GAT CTT CAA CCC AAG ACA CCT GTT AGA CTT GGG
#IRAQ_52 GAA GAT GTG GTC CCT GAG GAT CTT CAA CCC AAG ACA CCT GTT AGA CTT GGG
#NIGRICANS GAA GAT GTG GTC CCT GAG GAT CTT CAA CCC AAG ACA CCT GTT AGA CTA GGG
#ERVOIDES GAA GAT GTG GTC CCT GAG GAT CTT CAA CCC AAG ACA CCT GTT AGA CTT GGG
```

Intron 2;

```
#IRQ_ILL52 GTGAGTTTTT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#CHL_72 GTGAGTTTTT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ESP_ALPO GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ESP_LUPA GTGAGTTTTT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#SIR_60 GTGAGTTTTT TGAAAATTTG AACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#IND_3042 GTGAGTTTTT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ESP_ILL323 GTGAGTTTTT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ESP_MALA GTGAGTTTTT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ODEMENSIS GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#TOMENTOSUS GTGAGTTTTT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ESP_913 GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ITL_343 GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#COL_1645 GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#UKR_92 GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ETP_3467 GTGAGTTCCT TGAAAATTTG AACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AA-TATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ORIEN_BG GTGAGTTCCT TGAAAATTTG AACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ORIEN_3 GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#ESP_WA GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
#LBN_191 GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GA----- ----- ----- ---CCTAAGTA AGATGTAAGA
#IRAQ_52 GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GA----- ----- ----- ---CTAAGTA AGATGTAAGA
#NIGRICANS GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GA----- ----- ----- ---CCTAAGTA AGATGTAAGA
#ERVOIDES GTGAGTTCCT TGAAAATTTA GACTCTGTCCG ATAACAAAAT CAAAAAACTC AAATATGTGA ATCCTAAGTA AGATGTAAGA
```

```
#IRQ_ILL52 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#CHL_72 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ESP_ALPO TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ESP_LUPA TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#SIR_60 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#IND_3042 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ESP_ILL323 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ESP_MALA TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ODEMENSIS TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#TOMENTOSUS TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ESP_913 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ITL_343 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#COL_1645 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CCG
#UKR_92 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ETP_3467 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CCG
#ORIEN_BG TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ORIEN_3 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#ESP_WA TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
#LBN_191 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAT GAAAATAATG CAG
#IRAQ_52 TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAT GAAAATAATG CAG
#NIGRICANS TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAT GAAAATAATG CAG
#ERVOIDES TATCGGTGGT TCTTTTGACG AGTTTATAC GAAAATGATG CAG
```

Exón 3;

```
#IRQ_ILL52 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AACAGATATT GCAATCG
#CHL_72 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_ALPO GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_LUPA GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#SIR_60 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#IND_3042 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_ILL323 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_MALA GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ODEMENSIS GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#TOMENTOSUS GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_913 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ITL_343 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#COL_1645 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#UKR_92 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ETP_3467 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ORIEN_BG GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ORIEN_3 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_WA GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#LBN_191 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#IRAQ_52 GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#NIGRICANS GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ERVOIDES GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
```

Intron 3;

```
#IRQ_ILL52 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#CHL_72 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ESP_ALPO GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ESP_LUPA GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#SIR_60 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#IND_3042 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ESP_ILL323 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ESP_MALA GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ODEMENSIS GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#TOMENTOSUS GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ESP_913 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ITL_343 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#COL_1645 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#UKR_92 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ETP_3467 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ORIEN_BG GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ORIEN_3 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ESP_WA GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#LBN_191 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGAATAGG T-CTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#IRAQ_52 GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGAATAGG T-CTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#NIGRICANS GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGAATAGG T-CTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
#ERVOIDES GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TTAGATCTAGG TT-TTCCGCTC TTTTGATTAA GCTTAATTTT
```

```
#ERVOIDES   GTAACCATAA GTTAAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGACTGCGG TTCTTCCGTC TTTCGATTAA GCTTAATTTT

#IRQ_ILL52  GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#CHL_72     GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#ESP_ALPO   GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#ESP_LUPA   GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#SIR_60     GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#IND_3042   GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#ESP_ILL323 GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#ESP_MALA   GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#ODEMENSIS  GTGCTCATAA TTAATTGCTA TAG
#TOMENTOSUS GTGCTCATAA TTAATTGCTA TAG
#ESP_913    GTGCTCATAA TTAATTGCTA TAG
#ITL_343    GTGCTCATAA TTAATTGCTA TAG
#COL_1645   GTGCTCATAA TTAATTGCTA TAG
#UKR_92     GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#ETP_3467   GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#ORIEN_BG   GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#ORIEN_3    GTGCTTATAA TTAATTGCTA TAG
#ESP_WA     GTGCTCATAA TTAATTGCCA TAG
#LBN_191    GTGCTCATAA TTAATTACTA TGG
#IRAQ_52    GTGCTCATAA TTAATTACTA TAG
#NIGRICANS  GTGCTCATAA TTAATTGCTA TAG
#ERVOIDES   GTGCTCATAA TTAATTGCTA TAG
```

Exón 4;

```
#IRQ_ILL52  GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#CHL_72     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_ALPO   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_LUPA   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#SIR_60     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#IND_3042   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_ILL323 GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_MALA   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ODEMENSIS  GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#TOMENTOSUS GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_913    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ITL_343    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#COL_1645   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#UKR_92     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ETP_3467   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ORIEN_BG   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ORIEN_3    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_WA     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#LBN_191    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#IRAQ_52    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#NIGRICANS  GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ERVOIDES   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTT AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
```

```
#IRQ_ILL52  TTCTTATCTC TGG
#CHL_72     TTCTTATCTC TGG
#ESP_ALPO   TTCTTATCTC TGG
#ESP_LUPA   TTCTTATCTC TGG
#SIR_60     TTCTTATCTC TGG
#IND_3042   TTCTTATCTC TGG
#ESP_ILL323 TTCTTATCTC TGG
#ESP_MALA   TTCTTATCTC TGG
#ODEMENSIS  TTCTTATCTC TGG
#TOMENTOSUS TTCTTATCTC TGG
#ESP_913    TTCTTATCTC TGG
#ITL_343    TTCTTATCTC TGG
#COL_1645   TTCTTATCTC TGG
#UKR_92     TTCTTATCTC TGG
#ETP_3467   TTCTTATCTC TGG
#ORIEN_BG   TTCTTATCTC TGG
#ORIEN_3    TTCTTATCTC TGG
#ESP_WA     TTCTTATCTC TGG
#LBN_191    TTCTTATCTC TGG
#IRAQ_52    TTCTTATCTC TGG
#NIGRICANS  TTCTTATCTC TGG
#ERVOIDES   TTCTTATCTC TGG
```

Intrón 4;

```
#IRQ_ILL52 GT----- -AT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#CHL_72 GT----- -ATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_ALPO GT----ATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_LUPA GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATTTGACTAA
#SIR_60 GT----ATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#IND_3042 GT----- -AT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_ILL323 GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_MALA GT----- -ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT A-----
#ODEMENSIS GT----- -ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#TOMENTOSUS GT----- -ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_913 GT----- -AT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ITL_343 GT----- -AT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#COL_1645 GT----- -AT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#UKR_92 GT----- ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ETP_3467 GT----- -ATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ORLEN_BG GT----- -ATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ORLEN_3 GT----- -ATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_WA GT----- -AT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#LBN_191 GT----- ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#IRAQ_52 GT----- -ATATATAT AAATGACTAA
#NIGRICANS GT----- ATATATATAT ATATGACTGA
#ERVOIDES GT----- -AT ATGACTAA
```

```
#IRQ_ILL52 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACGTT
#CHL_72 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ESP_ALPO TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ESP_LUPA TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#SIR_60 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#IND_3042 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ESP_ILL323 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ESP_MALA --AAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ODEMENSIS TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#TOMENTOSUS TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ESP_913 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ITL_343 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#COL_1645 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#UKR_92 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ETP_3467 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ORLEN_BG TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ORLEN_3 TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ESP_WA TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#LBN_191 TCATACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATAC--T TGACTGTGTT TTTACACCTT
#IRAQ_52 TCATACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATAC--T TGACTGTGTT TTTACACCTT
#NIGRICANS TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
#ERVOIDES TCAAACTCAA GATTTTGTTT GATATATATT AATCTATTTT GTCACATTTA TTTATACATT TGACTGTGTT TTTACACCTT
```

```
#IRQ_ILL52 GTCTTAATAG
#CHL_72 GTCTTAATAG
#ESP_ALPO GTCTTAATAG
#ESP_LUPA GTCTTAATAG
#SIR_60 GTCTTAATAG
#IND_3042 GTCTTAATAG
#ESP_ILL323 GTCTTAATAG
#ESP_MALA GTCTTAATAG
#ODEMENSIS GTCTTAATAG
#TOMENTOSUS GTCTTAATAG
#ESP_913 GTCTTAATAG
#ITL_343 GTCTTAATAG
#COL_1645 GTCTTAATAG
#UKR_92 GTCTTAATAG
#ETP_3467 GTCTTAATAG
#ORLEN_BG GTCTTAATAG
#ORLEN_3 GTCTTAATAG
#ESP_WA GTCTTAATAG
#LBN_191 GTCTTAATAG
#IRAQ_52 GTCTTAATAG
#NIGRICANS GTCTTAATAG
#ERVOIDES GTCTTAATAG
```

Exón 5;

```
#IRQ_ILL52 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#CHL_72 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ESP_ALPO GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ESP_LUPA GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#SIR_60 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#IND_3042 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ESP_ILL323 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ESP_MALA GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ODEMENSIS GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#TOMENTOSUS GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ESP_913 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ITL_343 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#COL_1645 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#UKR_92 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ETP_3467 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ORLEN_BG GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ORLEN_3 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ESP_WA GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#LBN_191 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#IRAQ_52 GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#NIGRICANS GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
#ERVOIDES GTGACAGTTA ACTATGCATT GGGAAATTTG GGGAAAAAGT ACACAAAAAC AGTTGGAGTA ATAGATCTTG GAGGTGGATC
```

```
#IRQ_ILL52 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#CHL_72 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ESP_ALPO AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ESP_LUPA AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#SIR_60 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#IND_3042 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
```


#IRQ_ILL52 CGACTTCGAA G
 #CHL_72 CGACTTCGAA G
 #ESP_ALPO CGACTTCGAA G
 #ESP_LUPA CGACTTCGAA G
 #SIR_60 CGACTTCGAA G
 #IND_3042 CGACTTCGAA G
 #ESP_ILL323 CGACTTCGAA G
 #ESP_MALA CGACTTCGAA G
 #ODEMENSIS CGACTTCGAA G
 #TOMENTOSUS CGACTTCGAA G
 #ESP_913 CGACTTCGAA G
 #ITL_343 CGACTTCGAA G
 #COL_1645 CGACTTCGAA G
 #UKR_92 CGACTTCGAA G
 #ETP_3467 CGACTTCGAA G
 #ORIEN_BG CGACTTCGAA G
 #ORIEN_3 CGACTTCGAA G
 #ESP_WA CAACTTCGAA G
 #LBN_191 CAACTTCGAA G
 #IRAQ_52 CAACTTCGAA G
 #NIGRICANS CGACTTCGAA G
 #ERVOIDES CGACTTCGAA G

Exón 6;

#IRQ_ILL52 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #CHL_72 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_ALPO GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_LUPA GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #SIR_60 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #IND_3042 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_ILL323 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_MALA GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ODEMENSIS GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #TOMENTOSUS GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_913 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ITL_343 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #COL_1645 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #UKR_92 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ETP_3467 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ORIEN_BG GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ORIEN_3 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_WA GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #LBN_191 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #IRAQ_52 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #NIGRICANS GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ERVOIDES GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA

#IRQ_ILL52 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #CHL_72 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ESP_ALPO ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ESP_LUPA ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #SIR_60 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #IND_3042 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ESP_ILL323 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ESP_MALA ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ODEMENSIS ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #TOMENTOSUS ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ESP_913 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ITL_343 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #COL_1645 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #UKR_92 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ETP_3467 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ORIEN_BG ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ORIEN_3 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ESP_WA ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #LBN_191 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #IRAQ_52 ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #NIGRICANS ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCGATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG
 #ERVOIDES ATTCGTAAG CTCCTAAGTT GAATTATCCT TGTCCATATC AGAATTGCAC TTTTGGTGGG ATTTGGAATG GTGGAAGAGG

#IRQ_ILL52 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #CHL_72 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ESP_ALPO AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ESP_LUPA AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #SIR_60 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #IND_3042 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ESP_ILL323 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ESP_MALA AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ODEMENSIS AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #TOMENTOSUS AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ESP_913 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ITL_343 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #COL_1645 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #UKR_92 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ETP_3467 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ORIEN_BG AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ORIEN_3 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG TAGAT
 #ESP_WA AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG AAGAT
 #LBN_191 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG AAGAT
 #IRAQ_52 AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG AAGAT
 #NIGRICANS AAATGGACAG AAAAATCTTT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG AAGAT
 #ERVOIDES AAATGGACAG AAAAATCTGT TTACTTCTTC ATCTTTCTTT TACCTACCTG AAGAT


```
#IRQ_ILL52 TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#CHL_72 TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ESP_ALPO TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ESP_LUPA TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#SIR_60 TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#IND_3042 TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ESP_ILL323 TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ESP_MALA TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ODEMENSIS TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#TOMENTOSUS TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ESP_913 TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ITL_343 TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#COL_1645 TATACCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#UKR_92 TATATCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ETP_3467 TATATCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ORIE_N_BG TATATCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ORIE_N_3 TATATCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ESP_WA TATATCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#LBN_191 TATATCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#IRAQ_52 TATATCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#NIGRICANS TATATCAATA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
#ERVOIDES TATATCAGTA TGTGTTACTC GTTGATGGAT TTG
```

Intrón 7;

```
#IRQ_ILL52 GTAAGTTTGG ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#CHL_72 GTAAGTTTGG ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ESP_ALPO GTAAGTTTGG ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ESP_LUPA GTAAGTTTGG ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#SIR_60 GTAAGTTTGG ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#IND_3042 GTAAGTTTGG ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ESP_ILL323 GTAAGTTTGG ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ESP_MALA GTAAGTTTGG ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ODEMENSIS GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG GAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#TOMENTOSUS GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ESP_913 GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ITL_343 GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#COL_1645 GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#UKR_92 GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ETP_3467 GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ORIE_N_BG GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ORIE_N_3 GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#ESP_WA GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#LBN_191 GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#IRAQ_52 GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
#NIGRICANS GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTT TTCATGAAAT AATTGGTTCC ATTTGTTGGC AG
#ERVOIDES GTAAGTTTGA ATTTATGAGAG TAGATATAAAA CTAAGGTGAT TATTAATGTA TTCATGAAAT AATTGATTCC ATTTGTTGGC AG
```

Exón 8;

```
#IRQ_ILL52 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#CHL_72 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_ALPO GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_LUPA GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#SIR_60 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#IND_3042 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_ILL323 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_MALA GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ODEMENSIS GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#TOMENTOSUS GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_913 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ITL_343 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#COL_1645 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#UKR_92 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ETP_3467 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ORIE_N_BG GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ORIE_N_3 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_WA GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#LBN_191 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#IRAQ_52 GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#NIGRICANS GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ERVOIDES GCCTTGATCC ATTCGAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
```

APENDICE 7.4. Resultados de convicilina y apirasa obtenidos con el programa MEGA.

7.4.1. Porcentaje de nucleótidos presentes en la secuencia completa y en los intrones del gen de la convicilina de muestras procedentes de diferentes países.

	Exones y intrones						Intrones					
	T	C	A	G	TA	Total	T	C	A	G	TA	Total
NIGRICANS	27,43	15,67	35,86	21,03	63,29	2016,00	43,09	9,48	35,05	12,37	78,14	485,00
ORIEN BG	27,75	15,53	35,64	21,08	63,39	2054,00	43,00	9,92	34,44	12,65	77,43	514,00
ORIEN ILW	27,90	15,53	35,44	21,13	63,34	2054,00	43,19	9,92	34,24	12,65	77,43	514,00
IRN 1323	27,85	15,43	35,78	20,93	63,63	2054,00	43,00	9,92	34,63	12,45	77,63	514,00
IRN 1349	27,75	15,53	35,64	21,08	63,39	2054,00	43,19	9,73	34,63	12,45	77,82	514,00
IRN 370	27,87	15,47	35,65	21,01	63,52	2056,00	43,02	9,88	34,69	12,40	77,71	516,00
TUR 144	27,90	15,38	35,59	21,13	63,49	2054,00	43,19	9,73	34,63	12,45	77,82	514,00
TUR 918	27,85	15,38	35,78	20,98	63,63	2054,00	43,19	9,73	34,63	12,45	77,82	514,00
TUR 590	27,80	15,53	35,59	21,08	63,39	2054,00	43,00	9,92	34,44	12,65	77,43	514,00
SIR 780	27,90	15,48	35,54	21,08	63,44	2054,00	43,19	9,92	34,63	12,26	77,82	514,00
SIR 4400	27,80	15,53	35,64	21,03	63,44	2054,00	43,19	9,92	34,44	12,45	77,63	514,00
ESP ALPO	27,90	15,29	35,88	20,93	63,78	2054,00	43,19	9,73	34,63	12,45	77,82	514,00
YUG 323	27,90	15,38	35,69	21,03	63,58	2054,00	43,00	9,92	34,24	12,84	77,24	514,00
COL 1645	27,90	15,43	35,74	20,93	63,63	2054,00	43,19	9,92	34,44	12,45	77,63	514,00
CHL 1827	27,95	15,38	35,74	20,93	63,68	2054,00	43,19	9,73	34,63	12,45	77,82	514,00
UKR 92	27,85	15,38	35,78	20,98	63,63	2054,00	43,00	9,73	34,82	12,45	77,82	514,00
MAR 96	27,81	15,54	35,66	20,99	63,47	2053,00	43,00	9,92	34,63	12,45	77,63	514,00
ESP MALA	27,80	15,43	35,93	20,84	63,73	2054,00	42,80	9,92	34,82	12,45	77,63	514,00
GRC 296	27,92	15,52	35,75	20,82	63,67	2056,00	42,83	10,08	34,69	12,40	77,52	516,00
ETI 3467	27,70	15,68	35,74	20,89	63,44	2054,00	42,80	10,31	34,82	12,06	77,63	514,00
PERU	27,85	15,43	35,78	20,93	63,63	2054,00	43,19	9,73	34,63	12,45	77,82	514,00
IRQ 62B	27,85	15,43	35,59	21,13	63,44	2054,00	43,00	9,92	34,24	12,84	77,24	514,00
IRQ 52	27,88	15,47	35,52	21,12	63,41	2055,00	43,11	9,90	34,56	12,43	77,67	515,00
IRQ 62A	27,99	15,41	35,59	21,01	63,58	2051,00	43,05	9,78	34,64	12,52	77,69	511,00
SIR 60	27,99	15,36	35,59	21,06	63,58	2051,00	43,05	9,59	34,83	12,52	77,89	511,00
Promedio	27,84	15,46	35,69	21,01	63,53	2052,40	43,07	9,85	34,60	12,48	77,67	512,80

7.4.2. Porcentaje de nucleótidos presentes en la secuencia completa y en los intrones del gen de la apirasa de muestras procedentes de diferentes países.

	Exones y intrones						Intrones					
	T	C	A	G	TA	Total	T	C	A	G	AT	Total
Ps Apy1	34,28	16,29	31,23	18,20	65,51	1934,00	43,94	11,09	30,95	14,01	74,89	685,00
ERVOIDES	33,80	15,95	31,69	18,57	65,48	1944,00	42,40	11,29	32,13	14,18	74,53	691,00
NIGRICANS	33,77	15,81	31,99	18,43	65,76	1910,00	43,07	10,50	31,51	14,92	74,58	657,00
ODEMENSIS	33,69	15,92	31,90	18,49	65,59	1947,00	41,90	11,22	32,67	14,20	74,57	704,00
TOMENTOSUS	33,76	15,69	32,01	18,53	65,77	1937,00	41,90	11,08	32,67	14,35	74,57	704,00
ORIEN BG	33,94	15,67	32,21	18,17	66,16	1965,00	42,56	10,67	33,01	13,76	75,56	712,00
ORIEN 3	33,84	15,78	32,26	18,12	66,11	1965,00	42,42	10,67	33,15	13,76	75,56	712,00
LBN 191	34,12	15,65	31,66	18,58	65,78	1911,00	43,01	10,64	32,52	13,83	75,53	658,00
IRQ 52B	34,12	15,65	31,66	18,58	65,78	1911,00	43,01	10,64	32,52	13,83	75,53	658,00
IRQ 52A	33,94	15,72	31,74	18,60	65,69	1909,00	42,99	10,82	32,47	13,72	75,46	656,00
ESP 913	33,93	15,86	31,72	18,49	65,65	1942,00	42,24	11,47	32,51	13,79	74,75	689,00
ESP WA	33,86	15,93	31,86	18,35	65,72	1946,00	41,99	11,54	32,61	13,85	74,60	693,00
ITL 343	33,95	15,87	31,84	18,34	65,79	1941,00	42,30	11,19	32,56	13,95	74,85	688,00
COL 1645	34,04	15,86	31,77	18,33	65,81	1942,00	42,53	11,32	32,37	13,79	74,89	689,00
ETP 3467	33,94	15,75	32,21	18,09	66,16	1962,00	42,45	10,86	33,15	13,54	75,60	709,00
ESP MALA	34,06	15,63	32,13	18,17	66,19	1970,00	42,82	10,46	33,05	13,67	75,87	717,00
UKR 92	34,20	15,37	32,35	18,08	66,55	1997,00	42,88	10,22	33,87	13,04	76,75	744,00
IRQ ILL52	34,15	15,45	32,35	18,05	66,50	2000,00	42,70	10,17	33,73	13,39	76,44	747,00
IND 3042	34,03	15,64	32,28	18,04	66,32	2001,00	42,25	10,83	33,42	13,50	75,67	748,00
CHL 72	34,28	15,40	32,29	18,04	66,57	2007,00	42,71	10,34	33,55	13,40	76,26	754,00
ESP ALPO	34,29	15,38	32,51	17,82	66,80	2015,00	42,78	10,24	33,99	12,99	76,77	762,00
SIR 60	34,34	15,41	32,36	17,89	66,70	2012,00	42,89	10,13	33,82	13,16	76,71	760,00
ESP ILL323	34,36	15,32	32,52	17,80	66,88	2017,00	42,93	10,08	34,03	12,96	76,96	764,00
ESP LUPA	34,51	15,27	32,33	17,90	66,83	2017,00	43,19	10,08	33,77	12,96	76,96	764,00
Promedio	34,05	15,67	32,04	18,23	66,09	1962,58	42,66	10,72	32,95	13,67	75,58	711,04

7.4.3. Número de aminoácidos codificados en el gen de la convicilina

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Total
NIGRICANS	24	2	22	74	22	27	10	19	34	47	1	31	23	29	48	36	17	28	3	13	510
ORIEN BG	22	1	22	73	23	30	11	19	35	47	1	32	24	28	48	39	12	31	3	12	513
ORIEN ILW	22	1	22	72	23	32	11	19	36	47	1	32	24	28	47	38	12	31	3	12	513
IRN 1323	22	1	22	74	23	30	11	19	35	47	1	32	24	28	47	38	12	31	3	13	513
IRN 1349	22	1	23	72	22	31	11	19	36	47	1	31	24	28	47	39	12	31	3	13	513
IRN 370	23	1	22	73	24	30	11	19	36	46	1	32	24	28	47	39	11	31	3	12	513
TUR 144	22	1	21	72	23	33	11	19	36	47	1	32	24	28	47	37	12	31	3	13	513
TUR 918	21	1	21	74	23	31	11	19	36	46	1	32	24	28	47	39	12	31	3	13	513
TUR 590	23	1	22	74	23	30	11	19	35	47	1	32	23	28	47	39	12	30	3	13	513
SIR 780	22	1	22	73	23	31	11	19	36	47	1	31	24	28	47	38	12	31	3	13	513
SIR 4400	22	1	22	73	23	30	11	19	35	47	1	32	24	28	48	39	12	31	3	12	513
ESP ALPO	22	1	22	73	23	30	11	19	36	47	1	32	23	28	47	39	13	30	3	13	513
YUG 323	22	1	22	73	23	30	11	19	36	47	1	32	23	28	47	39	12	31	3	13	513
COL 1645	22	1	22	73	23	30	11	19	36	47	1	32	24	28	47	38	12	31	3	13	513
CHL 1827	22	1	22	72	23	30	11	19	36	47	1	32	24	28	47	38	12	32	3	13	513
UKR 92	22	1	22	74	23	30	12	19	35	47	1	32	24	28	46	38	12	31	3	13	513
MAR 96	23	1	21	73	22	30	11	19	35	47	1	32	24	28	47	39	12	31	3	12	511
ESP MALA	22	1	22	72	23	30	11	19	37	47	1	32	24	28	47	38	12	31	3	13	513
GRC 296	22	1	22	72	25	30	11	19	36	45	1	33	24	28	47	39	12	31	3	12	513
ETI 3467	22	1	22	73	23	30	11	18	36	47	1	32	24	28	47	39	13	31	3	12	513
PERU	22	1	22	73	23	30	11	19	36	47	1	32	24	28	47	38	12	31	3	13	513
IRQ 62B	22	1	22	73	23	31	11	19	36	47	1	32	24	28	46	38	12	31	3	13	513
IRQ 52	22	1	22	73	24	30	11	18	36	46	1	32	24	27	48	39	12	32	3	12	513
IRQ 62A	22	1	21	73	23	29	11	19	36	47	1	31	24	28	48	39	12	32	3	13	513
SIR 60	22	1	22	73	23	29	11	18	36	47	1	31	25	27	48	39	12	32	3	13	513
Promedio	22,16	1,04	21,88	72,96	23,04	30,16	11,00	18,88	35,72	46,80	1,00	31,84	23,88	27,96	47,16	38,44	12,24	30,96	3,00	12,68	512,80

7.4.4. Porcentaje de aminoácidos codificados por el gen de la convicilina.

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Total
NIGRICANS	4,71	0,39	4,31	14,51	4,31	5,29	1,96	3,73	6,67	9,22	0,20	6,08	4,51	5,69	9,41	7,06	3,33	5,49	0,59	2,55	510
ORIEN BG	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	5,85	2,14	3,70	6,82	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,36	7,60	2,34	6,04	0,58	2,34	513
ORIEN ILW	4,29	0,19	4,29	14,04	4,48	6,24	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,41	2,34	6,04	0,58	2,34	513
IRN 1323	4,29	0,19	4,29	14,42	4,48	5,85	2,14	3,70	6,82	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,41	2,34	6,04	0,58	2,53	513
IRN 1349	4,29	0,19	4,48	14,04	4,29	6,04	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,04	4,68	5,46	9,16	7,60	2,34	6,04	0,58	2,53	513
IRN 370	4,48	0,19	4,29	14,23	4,68	5,85	2,14	3,70	7,02	8,97	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,60	2,14	6,04	0,58	2,34	513
TUR 144	4,29	0,19	4,09	14,04	4,48	6,43	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,21	2,34	6,04	0,58	2,53	513
TUR 918	4,09	0,19	4,09	14,42	4,48	6,04	2,14	3,70	7,02	8,97	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,60	2,34	6,04	0,58	2,53	513
TUR 590	4,48	0,19	4,29	14,42	4,48	5,85	2,14	3,70	6,82	9,16	0,19	6,24	4,48	5,46	9,16	7,60	2,34	5,85	0,58	2,53	513
SIR 780	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	6,04	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,04	4,68	5,46	9,16	7,41	2,34	6,04	0,58	2,53	513
SIR 4400	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	5,85	2,14	3,70	6,82	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,36	7,60	2,34	6,04	0,58	2,34	513
ESP ALPO	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	5,85	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,24	4,48	5,46	9,16	7,60	2,53	5,85	0,58	2,53	513
YUG 323	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	5,85	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,24	4,48	5,46	9,16	7,60	2,34	6,04	0,58	2,53	513
COL 1645	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	5,85	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,41	2,34	6,04	0,58	2,53	513
CHL 1827	4,29	0,19	4,29	14,04	4,48	5,85	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,41	2,34	6,24	0,58	2,53	513
UKR 92	4,29	0,19	4,29	14,42	4,48	5,85	2,34	3,70	6,82	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	8,97	7,41	2,34	6,04	0,58	2,53	513
MAR 96	4,50	0,20	4,11	14,29	4,31	5,87	2,15	3,72	6,85	9,20	0,20	6,26	4,70	5,48	9,20	7,63	2,35	6,07	0,59	2,35	511
ESP MALA	4,29	0,19	4,29	14,04	4,48	5,85	2,14	3,70	7,21	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,41	2,34	6,04	0,58	2,53	513
GRC 296	4,29	0,19	4,29	14,04	4,87	5,85	2,14	3,70	7,02	8,77	0,19	6,43	4,68	5,46	9,16	7,60	2,34	6,04	0,58	2,34	513
ETI 3467	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	5,85	2,14	3,51	7,02	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,60	2,53	6,04	0,58	2,34	513
PERU	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	5,85	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	9,16	7,41	2,34	6,04	0,58	2,53	513
IRQ 62B	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	6,04	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,24	4,68	5,46	8,97	7,41	2,34	6,04	0,58	2,53	513
IRQ 52	4,29	0,19	4,29	14,23	4,68	5,85	2,14	3,51	7,02	8,97	0,19	6,24	4,68	5,26	9,36	7,60	2,34	6,24	0,58	2,34	513
IRQ 62A	4,29	0,19	4,09	14,23	4,48	5,65	2,14	3,70	7,02	9,16	0,19	6,04	4,68	5,46	9,36	7,60	2,34	6,24	0,58	2,53	513
SIR 60	4,29	0,19	4,29	14,23	4,48	5,65	2,14	3,51	7,02	9,16	0,19	6,04	4,87	5,26	9,36	7,60	2,34	6,24	0,58	2,53	513
Promedio	4,32	0,20	4,27	14,23	4,49	5,88	2,15	3,68	6,97	9,13	0,20	6,21	4,66	5,45	9,20	7,50	2,39	6,04	0,59	2,47	512,80

7.4.5. Porcentaje de aminoácidos codificados por el exón 1 del gen de convicilina.

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Total
NIGRICANS	3,96	0,44	3,96	19,38	5,29	4,41	2,64	3,08	7,49	6,61	0,44	3,52	4,41	6,61	11,45	5,29	3,08	3,96	1,32	2,64	227
ORIEN BG	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	6,99	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,79	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
ORIEN ILW	3,49	0,44	3,93	18,34	5,24	6,11	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
IRN 1323	3,49	0,44	3,93	19,21	5,24	5,68	3,06	3,06	6,99	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
IRN 1349	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
IRN 370	3,93	0,44	3,93	18,78	5,68	5,68	3,06	3,06	7,42	6,11	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,18	4,37	1,31	1,75	229
TUR 144	3,49	0,44	3,49	18,78	5,24	6,11	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
TUR 918	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
TUR 590	3,93	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	3,93	1,31	1,75	229
SIR 780	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	2,62	3,93	6,99	11,35	6,99	2,62	4,37	1,31	1,75	229
SIR 4400	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	6,99	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,79	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
ESP ALPO	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,49	6,99	11,35	6,55	3,06	4,37	1,31	1,75	229
YUG 323	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
COL 1645	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
CHL 1827	3,49	0,44	3,93	18,34	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,80	1,31	1,75	229
UKR 92	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,49	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	10,92	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
MAR 96	3,49	0,44	3,93	18,78	4,80	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,99	2,62	4,37	1,31	1,75	229
ESP MALA	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
GRC 296	3,49	0,44	3,93	18,34	5,68	5,68	3,06	3,06	7,86	6,11	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
ETI 3467	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	2,62	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	3,06	4,37	1,31	1,75	229
PERU	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
IRQ 62B	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
IRQ 52	3,49	0,44	3,93	18,78	5,68	5,68	3,06	3,06	7,42	6,11	0,44	3,06	3,93	6,55	11,79	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
IRQ 62A	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
SIR 60	3,49	0,44	3,93	18,78	5,24	5,68	3,06	3,06	7,42	6,55	0,44	3,06	3,93	6,99	11,35	6,55	2,62	4,37	1,31	1,75	229
Promedio	3,55	0,44	3,91	18,77	5,28	5,66	3,06	3,04	7,39	6,50	0,44	3,06	3,93	6,95	11,39	6,54	2,66	4,35	1,31	1,78	228,92

7.4.6. Porcentaje de aminoácidos codificados por los exones 2 al 5 del gen de la convicilina.

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Total
NIGRICANS	5,28	0,35	4,58	10,56	3,87	5,63	1,41	4,23	6,34	11,27	0,00	8,10	4,58	4,93	7,75	8,45	3,52	6,69	0,00	2,46	284,00
ORIEN BG	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,42	2,11	7,37	0,00	2,81	285,00
ORIEN ILW	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,96	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,07	2,11	7,37	0,00	2,81	285,00
IRN 1323	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,07	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
IRN 1349	4,91	0,00	4,91	10,18	3,86	5,96	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,42	5,26	4,21	7,37	8,42	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
IRN 370	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,42	2,11	7,37	0,00	2,81	285,00
TUR 144	4,91	0,00	4,56	10,18	4,21	6,32	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	7,72	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
TUR 918	4,56	0,00	4,21	10,88	4,21	5,96	1,40	4,21	7,02	10,88	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,42	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
TUR 590	4,91	0,00	4,56	10,88	4,21	5,61	1,40	4,21	6,67	11,23	0,00	8,77	4,91	4,21	7,37	8,42	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
SIR 780	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,96	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	7,72	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
SIR 4400	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,42	2,11	7,37	0,00	2,81	285,00
ESP ALPO	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,42	2,11	7,02	0,00	3,16	285,00
YUG 323	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	4,91	4,21	7,37	8,42	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
COL 1645	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,07	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
CHL 1827	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,07	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
UKR 92	4,91	0,00	4,56	10,88	4,21	5,61	1,40	4,21	6,67	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,07	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
MAR 96	5,30	0,00	4,24	10,60	4,24	5,65	1,41	4,24	6,71	11,31	0,00	8,83	5,30	4,24	7,42	8,13	2,12	7,42	0,00	2,83	283,00
ESP MALA	4,91	0,00	4,56	10,18	4,21	5,61	1,40	4,21	7,37	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,07	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
GRC 296	4,91	0,00	4,56	10,53	4,56	5,61	1,40	4,21	6,67	10,88	0,00	9,12	5,26	4,21	7,37	8,42	2,11	7,37	0,00	2,81	285,00
ETI 3467	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,42	2,11	7,37	0,00	2,81	285,00
PERU	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,07	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
IRQ 62B	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,96	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,02	8,07	2,11	7,37	0,00	3,16	285,00
IRQ 52	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,61	1,40	3,86	7,02	11,23	0,00	8,77	5,26	4,21	7,37	8,42	2,11	7,72	0,00	2,81	285,00
IRQ 62A	4,91	0,00	4,21	10,53	4,21	5,26	1,40	4,21	7,02	11,23	0,00	8,42	5,26	4,21	7,72	8,42	2,11	7,72	0,00	3,16	285,00
SIR 60	4,91	0,00	4,56	10,53	4,21	5,26	1,40	3,86	7,02	11,23	0,00	8,42	5,61	3,86	7,72	8,42	2,11	7,72	0,00	3,16	285,00
Promedio	4,93	0,01	4,54	10,53	4,20	5,68	1,40	4,19	6,95	11,21	0,00	8,72	5,22	4,23	7,40	8,25	2,16	7,36	0,00	3,02	284,88

7.4.7. Número de aminoácidos codificados por el gen de la apirasa

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Total
Ps mRNA	34	6	23	19	16	35	5	23	31	41	4	26	20	15	11	30	23	27	2	25	416
Ps Apy1	34	6	23	19	16	35	5	23	31	41	4	26	20	15	11	30	23	27	2	25	416
ORIEN BG	35	6	22	19	14	34	6	25	31	40	4	26	18	16	13	29	24	28	2	25	417
NIGRICANS	35	6	22	20	14	33	4	25	33	40	4	25	20	15	12	29	25	27	2	26	417
ODEMENSIS	34	6	22	19	14	34	5	24	31	41	4	26	19	15	14	27	23	28	2	25	413
TOMENTOSUS	34	6	22	19	14	34	5	24	31	41	4	26	18	15	13	27	23	28	2	24	410
ERVOIDES	36	6	21	19	16	36	6	25	32	40	4	25	19	15	11	30	23	28	2	23	417
IRQ ILL52	35	6	23	19	14	34	5	24	30	40	5	26	18	17	13	29	24	28	2	25	417
ESP ALPO	35	6	22	19	14	34	5	25	31	41	4	26	19	16	13	28	24	28	2	25	417
CHL 72	35	6	22	20	15	34	6	25	30	39	4	26	18	16	13	29	24	28	2	25	417
IRQ 60	35	6	22	19	14	34	5	25	30	41	4	26	18	16	13	29	24	28	2	25	416
UKR 92	34	6	23	19	14	34	5	24	31	40	4	26	20	16	14	29	23	28	2	25	417
ITL 343	35	6	22	19	14	34	4	25	30	40	4	27	19	16	14	29	24	28	2	25	417
COL 1645	35	6	23	19	14	34	4	25	30	40	4	27	19	16	14	29	24	28	2	24	417
ETP 3467	35	6	22	19	13	34	5	24	31	41	4	26	19	16	13	29	24	28	2	26	417
ESP MALA	35	6	22	19	14	34	5	25	31	41	4	26	18	16	13	29	24	28	2	25	417
ESP WA	36	6	22	19	14	34	4	25	31	41	4	27	19	16	13	28	23	28	2	25	417
LBN 191	36	6	22	19	15	34	5	26	29	39	4	26	19	16	14	29	23	29	2	24	417
ESP 913	36	6	22	19	15	35	4	24	30	41	4	27	18	16	14	28	23	28	2	25	417
IRAQ 52A	36	6	22	19	15	34	4	25	30	39	4	26	19	16	14	29	23	29	2	25	417
IRQ 52B	36	6	22	19	16	34	4	25	30	38	4	26	19	16	14	29	23	29	2	25	417
IND 3042	37	6	22	19	14	34	5	25	31	41	4	26	18	16	13	29	24	26	2	25	417
ESP ILL323	35	6	22	19	14	34	5	25	31	41	4	26	18	16	13	29	24	28	2	25	417
ORIEN 3	35	6	22	19	14	34	5	25	31	41	4	26	18	16	13	29	24	28	2	25	417
V. faba	34	6	23	19	15	34	5	23	31	41	5	25	21	16	11	30	23	28	3	25	418
ESP LUPA	35	6	22	19	14	34	5	25	30	41	4	26	18	16	14	29	24	28	2	25	417
Medicago Apy1.1	37	6	23	17	19	34	8	22	34	38	6	23	20	16	11	28	20	28	2	22	414
Medicago Apy1.4	31	6	20	23	17	35	8	22	29	40	6	25	19	15	12	30	26	30	2	19	415
Medicago Apy1.2	39	6	22	19	20	34	7	18	33	40	4	24	18	17	12	31	19	30	2	22	417
Medicago Apy1.3	35	6	22	24	17	34	6	20	30	44	3	21	20	15	12	30	22	30	2	25	418
Medicago Apy1.5	31	6	22	23	13	36	5	23	31	40	1	21	21	17	9	31	24	31	2	28	415
Lcc Apy2A	33	5	28	19	16	33	6	13	22	40	8	11	15	14	18	38	15	29	2	18	383
Ps Apy2 AF305783	38	6	28	21	17	37	7	16	27	42	8	11	19	15	20	37	16	30	2	21	418
Lcc Apy2B	30	6	16	16	11	28	3	8	23	25	6	10	9	9	9	20	12	21	3	18	283
Ps APY2 AB071370	43	6	26	24	16	37	8	12	36	40	6	17	15	10	13	37	14	31	3	22	416
Medicago Apy2	44	6	28	23	15	39	7	12	30	41	6	13	14	14	16	35	14	32	3	22	414
Promedio	35,36	5,97	22,56	19,58	14,92	34,31	5,31	22,36	30,36	40,00	4,44	23,69	18,31	15,36	13,06	29,67	22,08	28,28	2,11	24,00	411,72

7.4.8. Porcentaje de aminoácidos codificados por los exones del gen de la apirasa.

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Total
Ps mRNA	8,17	1,44	5,53	4,57	3,85	8,41	1,20	5,53	7,45	9,86	0,96	6,25	4,81	3,61	2,64	7,21	5,53	6,49	0,48	6,01	416,00
Ps Apy1	8,17	1,44	5,53	4,57	3,85	8,41	1,20	5,53	7,45	9,86	0,96	6,25	4,81	3,61	2,64	7,21	5,53	6,49	0,48	6,01	416,00
ORIEN BG	8,39	1,44	5,28	4,56	3,36	8,15	1,44	6,00	7,43	9,59	0,96	6,24	4,32	3,84	3,12	6,95	5,76	6,71	0,48	6,00	417,00
NIGRICANS	8,39	1,44	5,28	4,80	3,36	7,91	0,96	6,00	7,91	9,59	0,96	6,00	4,80	3,60	2,88	6,95	6,00	6,47	0,48	6,24	417,00
ODEMENSIS	8,23	1,45	5,33	4,60	3,39	8,23	1,21	5,81	7,51	9,93	0,97	6,30	4,60	3,63	3,39	6,54	5,57	6,78	0,48	6,05	413,00
TOMENTOSUS	8,29	1,46	5,37	4,63	3,41	8,29	1,22	5,85	7,56	10,00	0,98	6,34	4,39	3,66	3,17	6,59	5,61	6,83	0,49	5,85	410,00
ERVOIDES	8,63	1,44	5,04	4,56	3,84	8,63	1,44	6,00	7,67	9,59	0,96	6,00	4,56	3,60	2,64	7,19	5,52	6,71	0,48	5,52	417,00
IRQ ILL52	8,39	1,44	5,52	4,56	3,36	8,15	1,20	5,76	7,19	9,59	1,20	6,24	4,32	4,08	3,12	6,95	5,76	6,71	0,48	6,00	417,00
ESP ALPO	8,39	1,44	5,28	4,56	3,36	8,15	1,20	6,00	7,43	9,83	0,96	6,24	4,56	3,84	3,12	6,71	5,76	6,71	0,48	6,00	417,00
CHL 72	8,39	1,44	5,28	4,80	3,60	8,15	1,44	6,00	7,19	9,35	0,96	6,24	4,32	3,84	3,12	6,95	5,76	6,71	0,48	6,00	417,00
IRQ 60	8,41	1,44	5,29	4,57	3,37	8,17	1,20	6,01	7,21	9,86	0,96	6,25	4,33	3,85	3,13	6,97	5,77	6,73	0,48	6,01	416,00
UKR 92	8,15	1,44	5,52	4,56	3,36	8,15	1,20	5,76	7,43	9,59	0,96	6,24	4,80	3,84	3,36	6,95	5,52	6,71	0,48	6,00	417,00
ITL 343	8,39	1,44	5,28	4,56	3,36	8,15	0,96	6,00	7,19	9,59	0,96	6,47	4,56	3,84	3,36	6,95	5,76	6,71	0,48	6,00	417,00
COL 1645	8,39	1,44	5,52	4,56	3,36	8,15	0,96	6,00	7,19	9,59	0,96	6,47	4,56	3,84	3,36	6,95	5,76	6,71	0,48	5,76	417,00
ETP 3467	8,39	1,44	5,28	4,56	3,12	8,15	1,20	5,76	7,43	9,83	0,96	6,24	4,56	3,84	3,12	6,95	5,76	6,71	0,48	6,24	417,00
ESP MALA	8,39	1,44	5,28	4,56	3,36	8,15	1,20	6,00	7,43	9,83	0,96	6,24	4,32	3,84	3,12	6,95	5,76	6,71	0,48	6,00	417,00
ESP WA	8,63	1,44	5,28	4,56	3,36	8,15	0,96	6,00	7,43	9,83	0,96	6,47	4,56	3,84	3,12	6,71	5,52	6,71	0,48	6,00	417,00
LBN 191	8,63	1,44	5,28	4,56	3,60	8,15	1,20	6,24	6,95	9,35	0,96	6,24	4,56	3,84	3,36	6,95	5,52	6,95	0,48	5,76	417,00
ESP 913	8,63	1,44	5,28	4,56	3,60	8,39	0,96	5,76	7,19	9,83	0,96	6,47	4,32	3,84	3,36	6,71	5,52	6,71	0,48	6,00	417,00
IRAQ 52A	8,63	1,44	5,28	4,56	3,60	8,15	0,96	6,00	7,19	9,35	0,96	6,24	4,56	3,84	3,36	6,95	5,52	6,95	0,48	6,00	417,00
IRQ 52B	8,63	1,44	5,28	4,56	3,84	8,15	0,96	6,00	7,19	9,11	0,96	6,24	4,56	3,84	3,36	6,95	5,52	6,95	0,48	6,00	417,00
IND 3042	8,87	1,44	5,28	4,56	3,36	8,15	1,20	6,00	7,43	9,83	0,96	6,24	4,32	3,84	3,12	6,95	5,76	6,24	0,48	6,00	417,00
ESP ILL323	8,39	1,44	5,28	4,56	3,36	8,15	1,20	6,00	7,43	9,83	0,96	6,24	4,32	3,84	3,12	6,95	5,76	6,71	0,48	6,00	417,00
ORIEN 3	8,39	1,44	5,28	4,56	3,36	8,15	1,20	6,00	7,43	9,83	0,96	6,24	4,32	3,84	3,12	6,95	5,76	6,71	0,48	6,00	417,00
V. faba	8,13	1,44	5,50	4,55	3,59	8,13	1,20	5,50	7,42	9,81	1,20	5,98	5,02	3,83	2,63	7,18	5,50	6,70	0,72	5,98	418,00
ESP LUPA	8,39	1,44	5,28	4,56	3,36	8,15	1,20	6,00	7,19	9,83	0,96	6,24	4,32	3,84	3,36	6,95	5,76	6,71	0,48	6,00	417,00
Medicago Apy1.1	8,94	1,45	5,56	4,11	4,59	8,21	1,93	5,31	8,21	9,18	1,45	5,56	4,83	3,86	2,66	6,76	4,83	6,76	0,48	5,31	414,00
Medicago Apy1.4	7,47	1,45	4,82	5,54	4,10	8,43	1,93	5,30	6,99	9,64	1,45	6,02	4,58	3,61	2,89	7,23	6,27	7,23	0,48	4,58	415,00
Medicago Apy1.2	9,35	1,44	5,28	4,56	4,80	8,15	1,68	4,32	7,91	9,59	0,96	5,76	4,32	4,08	2,88	7,43	4,56	7,19	0,48	5,28	417,00
Medicago Apy1.3	8,37	1,44	5,26	5,74	4,07	8,13	1,44	4,78	7,18	10,53	0,72	5,02	4,78	3,59	2,87	7,18	5,26	7,18	0,48	5,98	418,00
Medicago Apy1.5	7,47	1,45	5,30	5,54	3,13	8,67	1,20	5,54	7,47	9,64	0,24	5,06	5,06	4,10	2,17	7,47	5,78	7,47	0,48	6,75	415,00
Lcc Apy2A	8,62	1,31	7,31	4,96	4,18	8,62	1,57	3,39	5,74	10,44	2,09	2,87	3,92	3,66	4,70	9,92	3,92	7,57	0,52	4,70	383,00
Ps Apy2 AF305783	9,09	1,44	6,70	5,02	4,07	8,85	1,67	3,83	6,46	10,05	1,91	2,63	4,55	3,59	4,78	8,85	3,83	7,18	0,48	5,02	418,00
Lcc Apy2B	10,60	2,12	5,65	5,65	3,89	9,89	1,06	2,83	8,13	8,83	2,12	3,53	3,18	3,18	3,18	7,07	4,24	7,42	1,06	6,36	283,00
Ps APY2 AB071370	10,34	1,44	6,25	5,77	3,85	8,89	1,92	2,88	8,65	9,62	1,44	4,09	3,61	2,40	3,13	8,89	3,37	7,45	0,72	5,29	416,00
Medicago Apy2	10,63	1,45	6,76	5,56	3,62	9,42	1,69	2,90	7,25	9,90	1,45	3,14	3,38	3,38	3,86	8,45	3,38	7,73	0,72	5,31	414,00
Promedio	8,59	1,45	5,48	4,76	3,62	8,33	1,29	5,43	7,37	9,72	1,08	5,75	4,45	3,73	3,17	7,21	5,36	6,87	0,51	5,83	411,72

7.4.9. Uso de codones en el exón 1 del gen de la convicilina. Entre paréntesis el uso relativo de los distintos tripletes que codifican para el mismo aminoácido.

UUU(F)	6,0 (1,09)	UCU(S)	1,0 (0,42)	UAU(Y)	4,0 (1,98)	UGU(C)	0,9 (1,84)
UUC(F)	5,0 (0,91)	UCC(S)	2,0 (0,82)	UAC(Y)	0,0 (0,02)	UGC(C)	0,1 (0,16)
UUA(L)	2,0 (0,81)	UCA(S)	4,9 (1,96)	UAA(*)	0,0 (0,00)	UGA(*)	0,0 (0,00)
UUG(L)	2,8 (1,15)	UCG(S)	3,0 (1,20)	UAG(*)	0,0 (0,00)	UGG(W)	3,0 (1,00)
CUU(L)	3,9 (1,56)	CCU(P)	5,0 (2,22)	CAU(H)	4,0 (1,14)	CGU(R)	5,0 (1,15)
CUC(L)	3,0 (1,21)	CCC(P)	2,0 (0,91)	CAC(H)	3,0 (0,86)	CGC(R)	3,0 (0,68)
CUA(L)	1,1 (0,44)	CCA(P)	2,0 (0,87)	CAA(Q)	14,8(1,86)	CGA(R)	3,0 (0,70)
CUG(L)	2,1 (0,84)	CCG(P)	0,0 (0,00)	CAG(Q)	1,1 (0,14)	CGG(R)	0,0 (0,00)
AUU(I)	2,9 (1,26)	ACU(T)	0,1 (0,05)	AAU(N)	3,0 (0,87)	AGU(S)	2,0 (0,79)
AUC(I)	2,0 (0,88)	ACC(T)	1,0 (0,63)	AAC(N)	4,0 (1,13)	AGC(S)	2,0 (0,82)
AUA(I)	2,0 (0,86)	ACA(T)	4,0 (2,63)	AAA(K)	8,9 (1,12)	AGA(R)	8,1 (1,86)
AUG(M)	1,0 (1,00)	ACG(T)	1,0 (0,68)	AAG(K)	7,0 (0,88)	AGG(R)	7,0 (1,61)
GUU(V)	2,0 (0,79)	GCU(A)	4,0 (1,99)	GAU(D)	5,9 (1,32)	GGU(G)	4,0 (1,23)
GUC(V)	1,0 (0,40)	GCC(A)	2,0 (0,99)	GAC(D)	3,0 (0,68)	GGC(G)	0,0 (0,01)
GUA(V)	6,0 (2,39)	GCA(A)	1,1 (0,53)	GAA(E)	31,4(1,46)	GGA(G)	8,8 (2,73)
GUG(V)	1,0 (0,42)	GCG(A)	1,0 (0,49)	GAG(E)	11,5(0,54)	GGG(G)	0,1 (0,02)

7.4.10. Uso de codones en el gen de la apirasa. Entre paréntesis el uso relativo de los distintos tripletes que codifican para el mismo aminoácido.

UUU(F)	10,4(1,40)	UCU(S)	9,8 (1,98)	UAU(Y)	14,7(1,23)	UGU(C)	2,1 (0,70)
UUC(F)	4,5 (0,60)	UCC(S)	4,1 (0,83)	UAC(Y)	9,2 (0,77)	UGC(C)	3,9 (1,30)
UUA(L)	6,7 (1,01)	UCA(S)	6,4 (1,29)	UAA(*)	0,0 (0,00)	UGA(*)	0,0 (0,00)
UUG(L)	9,2 (1,38)	UCG(S)	1,7 (0,34)	UAG(*)	0,0 (0,00)	UGG(W)	2,1 (1,00)
CUU(L)	12,9(1,94)	CCU(P)	7,4 (1,63)	CAU(H)	2,7 (1,01)	CGU(R)	2,8 (1,27)
CUC(L)	6,2 (0,93)	CCC(P)	1,3 (0,29)	CAC(H)	2,6 (0,99)	CGC(R)	1,4 (0,63)
CUA(L)	3,3 (0,50)	CCA(P)	8,7 (1,92)	CAA(Q)	10,4(1,36)	CGA(R)	1,2 (0,56)
CUG(L)	1,6 (0,24)	CCG(P)	0,8 (0,17)	CAG(Q)	4,9 (0,64)	CGG(R)	1,2 (0,56)
AUU(I)	13,3(1,79)	ACU(T)	8,2 (1,49)	AAU(N)	13,7(1,16)	AGU(S)	5,2 (1,05)
AUC(I)	3,3 (0,44)	ACC(T)	3,3 (0,60)	AAC(N)	9,9 (0,84)	AGC(S)	2,5 (0,51)
AUA(I)	5,7 (0,77)	ACA(T)	9,2 (1,66)	AAA(K)	16,5(1,09)	AGA(R)	4,3 (1,95)
AUG(M)	4,5 (1,00)	ACG(T)	1,4 (0,25)	AAG(K)	13,9(0,91)	AGG(R)	2,3 (1,03)
GUU(V)	4,5 (1,89)	GCU(A)	17,1(1,93)	GAU(D)	21,0(1,87)	GGU(G)	10,9(1,27)
GUC(V)	4,5 (0,47)	GCC(A)	2,1 (0,24)	GAC(D)	1,5 (0,13)	GGC(G)	2,5 (0,29)
GUA(V)	4,5 (0,96)	GCA(A)	15,2(1,71)	GAA(E)	12,4(1,27)	GGA(G)	15,8(1,84)
GUG(V)	4,5 (0,67)	GCG(A)	1,0 (0,11)	GAG(E)	7,2 (0,73)	GGG(G)	5,1 (0,6)

7.4.11. Número de sustituciones sinónimas (bajo la diagonal) y número de sustituciones sinónimas por cada 1000 sitios sinónimo (sobre la diagonal) entre muestras procedentes de diferentes países para el gen de la convicilina utilizando el modelo Nei-Gojobori Modificado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 NIGRICANS		25	23	25	27	22	25	24	27	27	25	25	24	24	24	25	25	25	24	24	25	25	23	20	21
2 ORIEN_BG	76.24		4	4	6	3	4	3	6	6	0	4	3	3	3	4	4	4	4	3	4	4	4	9	8
3 ORIEN_ILW	70.12	11.93		4	6	3	4	3	6	6	4	4	3	3	3	4	4	4	4	3	4	4	4	7	8
4 IRN_1323	76.34	11.94	11.94		4	3	2	1	4	4	4	2	1	1	1	2	2	2	2	3	2	2	4	9	8
5 IRN_1349	82.19	17.86	17.86	11.92		5	4	3	6	6	6	4	3	3	3	4	4	4	4	5	4	4	6	11	10
6 IRN_370	67.21	8.96	8.96	8.97	14.91		3	2	5	5	3	3	2	2	2	3	3	3	1	2	3	3	1	6	5
7 TUR_144	76.10	11.91	11.90	5.96	11.89	8.95		1	4	4	4	2	1	1	1	2	2	2	2	3	2	2	4	9	8
8 TUR_918	73.25	8.95	8.95	2.99	8.94	5.98	2.98		3	3	3	1	0	0	0	1	1	1	2	2	1	1	3	8	7
9 TUR_590	82.44	17.91	17.91	11.96	17.88	14.96	11.92	8.96		6	6	4	3	3	3	4	4	4	4	5	4	4	6	11	10
10 SIR_780	82.40	17.91	17.90	11.95	17.87	14.95	11.92	8.96	17.93		6	4	3	3	3	4	4	4	4	5	4	4	6	11	10
11 SIR_4400	76.24	0.00	11.93	11.94	17.86	8.96	11.91	8.95	17.91	17.91		4	3	3	3	4	4	4	4	3	4	4	4	9	8
12 ESP_ALPO	76.41	11.96	11.95	5.99	11.93	8.98	5.97	2.99	11.97	11.96	11.96		1	1	1	2	2	2	2	3	2	2	4	9	8
13 YUG_323	73.28	8.96	8.96	2.99	8.94	5.98	2.98	0.00	8.97	8.96	8.96	2.99		0	0	1	1	1	1	2	1	1	3	8	7
14 COL_1645	73.28	8.96	8.96	2.99	8.94	5.98	2.98	0.00	8.97	8.96	8.96	2.99	0.00		0	1	1	1	1	2	1	1	3	8	7
15 CHL_1827	73.21	8.95	8.95	2.99	8.93	5.98	2.98	0.00	8.96	8.96	8.95	2.99	0.00	0.00		1	1	1	1	2	1	1	3	8	7
16 UKR_92	76.41	11.96	11.95	5.99	11.93	8.98	5.97	2.99	11.97	11.96	11.96	5.99	2.99	2.99	2.99		2	2	2	3	2	2	4	9	8
17 MAR_96	76.41	11.96	11.95	5.99	11.93	8.98	5.97	2.99	11.97	11.96	11.96	5.99	2.99	2.99	2.99	5.99		2	2	3	2	2	4	9	8
18 ESP_MALA	76.34	11.94	11.94	5.98	11.92	8.97	5.96	2.99	11.96	11.95	11.94	5.99	2.99	2.99	2.99	5.99	5.99		2	3	2	2	4	9	8
19 GRC_296	71.83	11.96	11.95	5.99	11.93	2.99	5.97	4.49	11.97	11.96	11.96	5.99	2.99	2.99	2.99	5.99	5.99	5.99		3	2	2	2	7	6
20 ETI_3467	73.25	8.95	8.95	8.96	14.90	5.98	8.94	5.97	14.94	14.93	8.95	8.97	5.98	5.98	5.97	8.97	8.97	8.96	8.97		3	3	3	8	7
21 PERU	76.34	11.94	11.94	5.98	11.92	8.97	5.96	2.99	11.96	11.95	11.94	5.99	2.99	2.99	2.99	5.99	5.99	5.98	5.99	8.96		2	4	9	8
22 IRQ_62B	76.32	11.94	11.94	5.98	11.92	8.97	5.96	2.99	11.96	11.95	11.94	5.98	2.99	2.99	2.99	5.98	5.98	5.98	5.98	8.96	5.98		4	9	8
23 IRQ_52	70.10	11.92	11.92	11.94	17.85	2.99	11.90	8.95	17.91	17.90	11.92	11.95	8.95	8.95	8.94	11.95	11.95	11.94	5.97	8.95	11.94	11.93		7.0	6.0
24 IRQ_62A	60.96	26.83	20.86	26.86	32.73	17.91	26.78	23.86	32.83	32.81	26.83	26.89	23.87	23.87	23.85	26.89	26.89	26.86	20.91	23.86	26.86	26.85	20.85		3.0
25 SIR_60	63.98	23.83	23.83	23.86	29.74	14.92	23.79	20.87	29.83	29.81	23.83	23.89	20.88	20.88	20.86	23.89	23.89	23.86	17.91	20.87	23.86	23.86	17.87	8.93	

7.4.12. Número de sustituciones no sinónimas (bajo la diagonal) y número de sustituciones no sinónimas por cada 1000 sitios no sinónimo (sobre la diagonal) entre muestras procedentes de diferentes países para el gen de la convicilina utilizando el modelo Nei-Gojobori Modificado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 NIGRICANS		36	37	37	39	37	39	39	38	38	36	37	36	36	37	37	39	37	39	36	36	37	38	38	39
2 ORIEN_BG	30,79		3	3	5	3	5	5	5	4	0	5	3	2	3	4	5	3	5	2	2	3	4	4	5
3 ORIEN_ILW	31,65	2,50		4	6	4	4	6	6	3	3	6	4	3	4	5	6	4	6	3	3	4	5	5	6
4 IRN_1323	31,64	2,50	3,33		4	4	4	4	4	3	3	4	2	1	2	3	4	2	6	3	1	2	5	5	6
5 IRN_1349	33,38	4,17	5,00	3,33		6	6	6	6	5	5	6	4	3	4	5	6	4	8	5	3	4	7	7	8
6 IRN_370	31,63	2,50	3,33	3,33	5,00		6	6	6	5	3	6	4	3	4	5	6	4	4	3	3	4	3	5	6
7 TUR_144	33,38	4,17	3,33	3,33	5,00	5,00		6	6	3	5	6	4	3	4	5	6	4	8	5	3	4	7	7	8
8 TUR_918	33,35	4,16	5,00	3,33	5,00	4,99	5,00		6	5	5	6	4	3	4	5	6	4	8	5	3	4	7	7	8
9 TUR_590	32,49	4,16	5,00	3,33	5,00	4,99	5,00	4,99		5	5	6	4	3	4	5	6	4	8	5	3	4	7	7	8
10 SIR_780	32,50	3,33	2,50	2,50	4,17	4,16	2,50	4,16	4,16		4	5	3	2	3	4	5	3	7	4	2	3	6	6	7
11 SIR_4400	30,79	0,00	2,50	2,50	4,17	2,50	4,17	4,16	4,16	3,33		5	3	2	3	4	5	3	5	2	2	3	4	4	5
12 ESP_ALPO	31,63	4,16	4,99	3,33	5,00	4,99	5,00	4,99	4,99	4,16	4,16		4	3	4	5	5	4	8	5	3	4	7	7	8
13 YUG_323	30,78	2,50	3,33	1,66	3,33	3,33	3,33	3,33	1,66	2,50	2,50	3,33		1	2	3	4	2	6	3	1	2	5	5	6
14 COL_1645	30,78	1,67	2,50	0,83	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	1,66	1,67	2,50	0,83		1	2	3	1	5	2	0	1	4	4	5
15 CHL_1827	31,65	2,50	3,33	1,67	3,33	3,33	3,33	3,33	3,33	2,50	2,50	3,33	1,67	0,83		3	4	2	6	3	1	2	5	5	6
16 UKR_92	31,63	3,33	4,16	2,50	4,16	4,16	4,16	4,16	4,16	3,33	3,33	4,16	2,50	1,66	2,50		5	3	7	4	2	3	6	6	7
17 MAR_96	33,42	4,17	5,01	3,34	5,01	5,00	5,01	5,01	5,00	4,17	4,17	4,17	3,34	2,50	3,34	4,17		4	8	5	3	4	7	7	8
18 ESP_MALA	31,64	2,50	3,33	1,66	3,33	3,33	3,33	3,33	3,33	2,50	2,50	3,33	1,66	0,83	1,67	2,50	3,34		6	3	1	2	5	5	6
19 GRC_296	32,91	4,16	4,99	4,99	6,66	3,33	6,66	6,24	6,66	5,83	4,16	6,65	4,99	4,16	4,99	5,82	6,67	4,99		5	5	6	5	7	8
20 ETI_3467	30,79	1,67	2,50	2,50	4,17	2,50	4,17	4,16	4,16	3,33	1,67	4,16	2,50	1,66	2,50	3,33	4,17	2,50	4,16		2	3	4	4	5
21 PERU	30,78	1,67	2,50	0,83	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	1,66	1,67	2,50	0,83	0,00	0,83	1,66	2,50	0,83	4,16	1,66		1	4	4	5
22 IRQ_62B	31,64	2,50	3,33	1,66	3,33	3,33	3,33	3,33	3,33	2,50	2,50	3,33	1,66	0,83	1,67	2,50	3,34	1,66	4,99	2,50	0,83		5	5	6
23 IRQ_52	32,51	3,33	4,17	4,16	5,83	2,50	5,83	5,83	5,83	5,00	3,33	5,83	4,16	3,33	4,16	4,99	5,84	4,16	4,16	3,33	3,33	4,16		6	5
24 IRQ_62A	32,51	3,33	4,17	4,16	5,83	4,16	5,83	5,83	5,83	5,00	3,33	5,83	4,16	3,33	4,16	4,99	5,84	4,16	5,83	3,33	3,33	4,16	5,00		3
25 SIR_60	33,37	4,17	5,00	5,00	6,67	5,00	6,67	6,66	6,66	5,83	4,17	6,66	5,00	4,16	5,00	5,83	6,68	5,00	6,66	4,16	4,16	5,00	4,17	2,50	

7.4.13. Diferencia entre sustituciones sinónimas por sitio sinónimo y sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (sobre la diagonal) y el cociente entre sustituciones sinónimas y no sinónimas (ω) (debajo de la diagonal) entre muestras procedentes de diferentes países para el gen de la convicilina utilizando el modelo Nei-Gojobori Modificado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 NIGRICANS	45,45	38,47	44,70	48,82	35,58	42,73	39,89	49,95	49,90	45,45	44,79	42,50	42,50	41,56	44,79	42,99	44,70	38,92	42,46	45,55	44,68	37,60	28,45	30,61	
2 ORIEN_BG	2,48	9,43	9,45	13,70	6,46	7,74	4,79	13,75	14,58	0,00	7,79	6,46	7,29	6,45	8,63	7,78	9,45	7,79	7,29	10,28	9,44	8,59	23,49	19,67	
3 ORIEN_ILW	2,22	4,77	8,61	12,86	5,63	8,57	3,95	12,91	15,40	9,43	6,96	5,62	6,46	5,61	7,79	6,95	8,61	6,96	6,45	9,44	8,61	7,75	16,69	18,83	
4 IRN_1323	2,41	4,78	3,59	8,59	5,64	2,63	-0,34	8,63	9,45	9,45	2,66	1,32	2,16	1,32	3,49	2,65	4,31	0,99	6,47	5,15	4,31	7,77	22,70	18,87	
5 IRN_1349	2,46	4,29	3,57	3,58	9,91	6,88	3,94	12,89	13,71	13,70	6,94	5,61	6,44	5,60	7,77	6,93	8,59	5,27	10,73	9,42	8,59	12,02	26,90	23,07	
6 IRN_370	2,12	3,59	2,69	2,70	2,98	3,95	0,99	9,96	10,79	6,46	3,99	2,65	3,49	2,65	4,82	3,98	5,64	-0,33	3,48	6,48	5,64	0,49	13,75	9,93	
7 TUR_144	2,28	2,86	3,57	1,79	2,38	1,79	-2,02	6,92	9,42	7,74	0,97	-0,35	0,48	-0,36	1,80	0,96	2,63	-0,69	4,77	3,46	2,63	6,07	20,95	17,12	
8 TUR_918	2,20	2,15	1,79	0,90	1,79	1,20	0,60	3,97	4,80	4,79	-2,00	-3,33	-2,50	-3,33	-1,17	-2,01	-0,34	-1,75	1,81	0,49	-0,34	3,12	18,03	14,21	
9 TUR_590	2,54	4,30	3,59	3,59	3,58	3,00	2,39	1,79	13,77	13,75	6,98	7,30	6,47	5,63	7,81	6,97	8,63	5,31	10,78	9,46	8,63	12,08	27,00	23,17	
10 SIR_780	2,54	5,38	7,17	4,79	4,29	3,59	4,77	2,15	4,31	14,58	7,80	6,47	7,30	6,46	8,64	7,79	9,45	6,14	11,60	10,29	9,45	12,90	27,81	23,98	
11 SIR_4400	2,48	--	4,77	4,78	4,29	3,59	2,86	2,15	4,30	5,38	7,79	6,46	7,29	6,45	8,63	7,78	9,45	7,79	7,29	10,28	9,44	8,59	23,49	19,67	
12 ESP_ALPO	2,42	2,87	2,39	1,80	2,39	1,80	1,19	0,60	2,40	2,88	2,87	-0,34	0,50	-0,34	1,83	1,82	2,66	-0,66	4,81	3,49	2,66	6,12	21,06	17,23	
13 YUG_323	2,38	3,59	2,69	1,80	2,68	1,80	0,89	0,00	5,39	3,59	3,59	0,90	-0,83	-1,67	0,50	-0,34	1,32	-2,00	3,48	2,16	1,32	4,79	19,71	15,88	
14 COL_1645	2,38	5,38	3,59	3,59	3,58	2,40	1,19	0,00	3,59	5,38	5,38	1,20	0,00	-0,83	1,33	0,49	2,16	-1,17	4,31	2,99	2,16	5,62	20,54	16,72	
15 CHL_1827	2,31	3,58	2,69	1,79	2,68	1,79	0,89	0,00	2,69	3,59	3,58	0,90	0,00	0,00	0,49	-0,35	1,32	-2,00	3,47	2,15	1,32	4,78	19,69	15,86	
16 UKR_92	2,42	3,59	2,87	2,40	2,87	2,16	1,43	0,72	2,88	3,59	3,59	1,44	1,20	1,80	1,20	1,82	3,49	0,17	5,64	4,32	3,49	6,95	21,89	18,06	
17 MAR_96	2,29	2,87	2,39	1,79	2,38	1,79	1,19	0,60	2,39	2,87	2,87	1,44	0,90	1,20	0,90	1,44	2,65	-0,68	4,80	3,48	2,65	6,11	21,04	17,21	
18 ESP_MALA	2,41	4,78	3,59	3,59	3,58	2,70	1,79	0,90	3,59	4,79	4,78	1,80	1,80	3,59	1,79	2,40	1,79	0,99	6,47	5,15	4,31	7,77	22,70	18,87	
19 GRC_296	2,18	2,87	2,39	1,20	1,79	0,90	0,90	0,72	1,80	2,05	2,87	0,90	0,60	0,72	0,60	1,03	0,90	1,20	4,81	1,82	0,99	1,81	15,08	11,25	
20 ETI_3467	2,38	5,38	3,58	3,59	3,58	2,39	2,15	1,43	3,59	4,48	5,38	2,16	2,39	3,59	2,39	2,70	2,15	3,59	2,16	7,30	6,46	5,62	20,53	16,70	
21 PERU	2,48	7,17	4,78	7,18	4,77	3,59	2,39	1,20	4,79	7,18	7,17	2,40	3,59	--	3,59	3,60	2,39	7,18	1,44	5,38	5,15	8,61	23,53	19,70	
22 IRQ_62B	2,41	4,78	3,58	3,59	3,58	2,69	1,79	0,90	3,59	4,78	4,78	1,80	1,80	3,59	1,79	2,40	1,79	3,59	1,20	3,59	7,18	7,77	22,69	18,86	
23 IRQ_52	2,16	3,58	2,86	2,87	3,06	1,20	2,04	1,53	3,07	3,58	3,58	2,05	2,15	2,69	2,15	2,39	2,05	2,87	1,44	2,69	3,58	2,87	15,86	13,70	
24 IRQ_62A	1,88	8,05	5,01	6,45	5,61	4,30	4,59	4,09	5,63	6,57	8,05	4,61	5,73	7,17	5,73	5,38	4,60	6,45	3,59	7,16	8,06	6,45	4,17	6,43	
25 SIR_60	1,92	5,72	4,77	4,78	4,46	2,99	3,57	3,13	4,48	5,11	5,72	3,59	4,18	5,01	4,17	4,10	3,58	4,78	2,69	5,01	5,73	4,77	4,29	3,57	

7.4.14. Número de sustituciones sinónimas (bajo la diagonal) y número de sustituciones sinónimas por cada 1000 sitios sinónimos (sobre la diagonal) entre muestras procedentes de diferentes países para el gen de la apirasa tipo 1 utilizando el modelo Nei-Gojobori Modificado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 V_faba		7	48	48	48	46	46	47	48	46	44	47	45	47	46	48	47	48	44	46	47	49	47	47	46
2 Ps_Apy1	2.17		47	47	47	44	44	45	46	45	43	46	44	46	45	46	45	46	43	45	45	46	46	46	45
3 NIGRICANS	15.93	15.43		18	18	18	19	20	19	17	15	18	14	18	17	19	18	19	15	19	18	21	18	18	17
4 TOMENTOSUS	16.28	15.76	6.07		2	14	8	7	7	10	8	6	8	6	5	7	8	9	5	4	10	8	6	6	5
5 ODEMENSIS	16.12	15.60	6.02	0.67		14	8	9	7	10	8	6	8	6	5	7	8	9	5	6	10	8	6	6	5
6 ERVOIDES	15.32	14.48	5.97	4.74	4.69		13	14	13	15	13	12	12	12	11	13	14	15	9	13	14	17	12	12	11
7 ORIEN_BG	15.14	14.63	6.29	2.71	2.68	4.32		3	6	8	6	5	7	5	4	6	9	10	4	4	9	11	5	5	4
8 ORIEN_3	15.45	14.95	6.62	2.36	3.01	4.64	0.99		9	11	9	8	10	8	7	9	8	9	5	5	8	10	8	8	7
9 IRQ_ILL52	15.81	15.30	6.13	2.20	2.18	4.15	1.83	2.82		10	8	3	7	3	2	5	7	8	4	4	9	9	3	3	2
10 IRQ_52A	15.30	14.79	5.63	3.38	3.35	4.98	2.65	3.64	3.15		2	9	3	9	8	10	11	12	8	8	9	13	9	9	8
11 IRQ_52B	14.64	14.13	4.97	2.71	2.68	4.32	1.99	2.98	2.49	0.66		7	1	7	6	8	9	10	6	6	7	11	7	7	6
12 SIR_60	15.63	15.12	5.96	2.03	2.01	3.98	1.66	2.65	0.83	2.98	2.32		6	2	1	5	6	7	3	3	8	9	2	2	1
13 LBN_191	14.97	14.46	4.64	2.71	2.68	3.99	2.32	3.31	2.16	1.00	0.33	1.99		6	5	7	8	9	5	7	6	11	6	6	5
14 IND_3042	15.62	15.11	5.95	2.03	2.01	3.98	1.66	2.65	0.83	2.98	2.32	0.66	1.99		1	5	6	7	3	3	8	9	2	2	1
15 CHL_72	15.31	14.80	5.63	1.69	1.68	3.66	1.33	2.32	0.50	2.65	1.99	0.33	1.66	0.33		4	5	6	2	2	7	8	1	1	0
16 UKR_92	15.90	15.39	6.23	2.36	2.34	4.26	1.93	2.92	1.77	3.26	2.60	1.60	2.27	1.60	1.27		9	10	4	6	9	9	5	5	4
17 ITL_343	15.60	14.76	5.95	2.70	2.67	4.64	2.98	2.65	2.15	3.64	2.98	1.99	2.65	1.98	1.66	2.92		1	5	7	2	3	6	6	5
18 COL_1645	15.95	15.11	6.28	3.04	3.01	4.98	3.31	2.98	2.49	3.98	3.31	2.32	2.98	2.32	1.99	3.26	0.33		6	8	3	4	7	7	6
19 ETP_3467	14.61	14.10	4.96	1.69	1.67	2.98	1.32	1.65	1.16	2.65	1.99	0.99	1.66	0.99	0.66	1.27	1.65	1.98		4	5	8	3	3	2
20 ESP_MALA	15.29	14.78	6.28	1.35	2.01	4.31	1.33	1.66	1.16	2.65	1.99	0.99	2.32	0.99	0.66	1.93	2.32	2.65	1.32		9	9	3	3	2
21 ESP_WA	15.62	14.78	5.96	3.38	3.35	4.65	2.98	2.65	2.82	2.98	2.32	2.65	1.99	2.65	2.32	2.93	0.66	0.99	1.65	2.98		5	8	8	7
22 ESP_913	16.11	15.27	6.78	2.70	2.67	5.47	3.48	3.14	2.98	4.14	3.48	2.81	3.48	2.81	2.49	2.81	0.83	1.16	2.48	2.81	1.49		9	9	8
23 ESP_ILL323	15.62	15.11	5.95	2.03	2.01	3.98	1.66	2.65	0.83	2.98	2.32	0.66	1.99	0.66	0.33	1.60	1.98	2.32	0.99	0.99	2.65	2.81		2	1
24 ESP_LUPA	15.61	15.10	5.95	2.03	2.01	3.98	1.66	2.65	0.83	2.98	2.32	0.66	1.99	0.66	0.33	1.60	1.98	2.32	0.99	0.99	2.65	2.81	0.66		1
25 ESP_ALPO	15.29	14.78	5.62	1.69	1.67	3.65	1.33	2.32	0.50	2.65	1.99	0.33	1.66	0.33	0.00	1.27	1.65	1.99	0.66	0.66	2.32	2.48	0.33	0.33	

7.4.15. Número de sustituciones no sinónimas (bajo la diagonal) y número de sustituciones no sinónimas por cada 1000 sitios no sinónimos (sobre la diagonal) entre muestras procedentes de diferentes países para la apirasa tipo 1 utilizando el modelo Nei-Gojobori Modificado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 V_faba		5	34	34	36	30	36	35	39	33	34	36	35	36	37	38	37	38	35	34	33	42	34	35	35
2 Ps_Apy1	0.48		30	30	32	26	31	30	34	29	30	32	31	32	33	34	33	34	31	30	29	37	30	31	31
3 NIGRICANS	3.59	3.12		15	17	16	17	16	21	14	15	18	16	18	19	20	18	19	17	16	14	22	16	17	17
4 TOMENTOSUS	3.65	3.17	1.61		2	15	3	2	5	11	12	2	13	2	3	1	3	4	3	0	9	2	0	1	0
5 ODEMENSIS	3.84	3.36	1.81	0.21		17	5	4	7	13	14	4	15	4	5	3	5	6	5	2	11	4	2	3	2
6 ERVIDES	3.17	2.69	1.69	1.60	1.81		16	15	20	12	13	17	14	17	18	19	16	17	16	15	12	21	15	16	16
7 ORIEN_BG	3.75	3.27	1.79	0.32	0.53	1.68		1	8	12	13	5	14	5	6	7	6	7	4	3	10	11	3	4	4
8 ORIEN_3	3.64	3.17	1.69	0.21	0.43	1.58	0.11		7	11	12	4	13	4	5	6	5	6	3	2	9	10	2	3	3
9 IRQ_ILL52	4.06	3.59	2.16	0.48	0.69	2.05	0.79	0.68		16	17	7	18	7	8	11	8	9	8	5	14	12	5	6	6
10 IRQ_52A	3.48	3.01	1.48	1.18	1.38	1.26	1.26	1.16	1.63		1	13	2	13	14	15	10	11	12	11	4	15	11	12	12
11 IRQ_52B	3.59	3.11	1.58	1.28	1.49	1.37	1.37	1.26	1.74	0.11		12	3	14	15	16	11	12	13	12	5	16	12	13	13
12 SIR_60	3.81	3.34	1.90	0.21	0.43	1.80	0.53	0.42	0.69	1.37	1.27		14	4	5	8	5	6	5	2	11	10	2	3	3
13 LBN_191	3.69	3.22	1.69	1.39	1.60	1.47	1.47	1.37	1.84	0.21	0.32	1.48		15	16	17	12	13	14	13	6	17	13	14	14
14 IND_3042	3.80	3.33	1.90	0.21	0.43	1.79	0.53	0.42	0.68	1.37	1.47	0.42	1.58		5	8	5	6	5	2	11	10	2	3	3
15 CHL_72	3.90	3.43	2.00	0.32	0.53	1.89	0.63	0.53	0.79	1.47	1.58	0.53	1.68	0.53		9	6	7	6	3	12	11	3	4	4
16 UKR_92	4.03	3.56	2.13	0.11	0.32	2.02	0.75	0.65	1.12	1.60	1.70	0.86	1.81	0.86	0.97		9	10	7	6	13	9	6	7	7
17 IIL_343	3.91	3.43	1.90	0.32	0.53	1.69	0.63	0.53	0.79	1.05	1.16	0.53	1.26	0.53	0.63	0.97		3	6	3	8	7	3	4	4
18 COL_1645	4.01	3.54	2.00	0.43	0.64	1.79	0.74	0.63	0.90	1.16	1.26	0.63	1.37	0.63	0.74	1.07	0.32		7	4	9	8	4	5	5
19 ETP_3467	3.70	3.22	1.79	0.32	0.53	1.69	0.42	0.32	0.79	1.26	1.37	0.53	1.48	0.53	0.63	0.76	0.63	0.74		3	10	11	3	4	4
20 ESP_MALA	3.59	3.12	1.69	0.00	0.21	1.58	0.32	0.21	0.47	1.16	1.26	0.21	1.37	0.21	0.32	0.65	0.32	0.42	0.32		9	8	0	1	1
21 ESP_WA	3.48	3.01	1.48	0.96	1.17	1.26	1.05	0.95	1.42	0.42	0.53	1.16	0.63	1.16	1.26	1.39	0.84	0.95	1.05	0.95		13	9	10	10
22 ESP_913	4.38	3.91	2.27	0.21	0.43	2.16	1.11	1.00	1.26	1.53	1.63	1.00	1.74	1.00	1.11	0.90	0.69	0.79	1.11	0.79	1.32		8	9	9
23 ESP_ILL323	3.59	3.12	1.69	0.00	0.21	1.58	0.32	0.21	0.47	1.16	1.26	0.21	1.37	0.21	0.32	0.65	0.32	0.42	0.32	0.00	0.95	0.79		1	1
24 ESP_LUPA	3.70	3.22	1.79	0.11	0.32	1.69	0.42	0.32	0.58	1.26	1.37	0.32	1.47	0.32	0.42	0.76	0.42	0.53	0.42	0.11	1.05	0.90	0.11		2
25 ESP_ALPO	3.70	3.22	1.79	0.00	0.21	1.68	0.42	0.32	0.58	1.26	1.37	0.32	1.47	0.32	0.42	0.76	0.42	0.53	0.42	0.11	1.05	0.90	0.11	0.21	

7.4.16. Diferencia entre sustituciones sinónimas por sitio sinónimo y sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (sobre la diagonal) y el cociente entre sustituciones sinónimas y no sinónimas (ω) (debajo de la diagonal) entre muestras procedentes de diferentes países para el gen de la apirasa tipo 1 utilizando el modelo Nei-Gojobori Modificado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1 V_faba		1.69	12.34	12.63	12.28	12.15	11.39	11.81	11.75	11.81	11.05	11.82	11.28	11.82	11.41	11.87	11.69	11.94	10.91	11.70	12.14	11.73	12.03	11.91	11.59
2 Ps_Apy1	4.55		12.31	12.59	12.25	11.78	11.36	11.78	11.71	11.78	11.02	11.78	11.24	11.79	11.37	11.83	11.33	11.57	10.88	11.66	11.77	11.36	12.00	11.88	11.56
3 NIGRICANS	4.44	4.95		4.47	4.21	4.28	4.50	4.93	3.97	4.15	3.39	4.05	2.95	4.06	3.63	4.10	4.05	4.28	3.16	4.60	4.48	4.51	4.27	4.16	3.83
4 TOMENTOSUS	4.46	4.98	3.78		0.46	3.13	2.38	2.15	1.72	2.20	1.42	1.81	1.31	1.81	1.37	2.26	2.38	2.61	1.37	1.35	2.42	2.49	2.03	1.92	1.69
5 ODEMENSIS	4.20	4.65	3.33	3.15		2.89	2.15	2.59	1.49	1.96	1.19	1.58	1.08	1.58	1.14	2.02	2.14	2.37	1.14	1.79	2.18	2.25	1.79	1.69	1.46
6 ERVIDES	4.84	5.38	3.54	2.95	2.60		2.63	3.07	2.10	3.72	2.95	2.19	2.51	2.19	1.76	2.24	2.95	3.19	1.30	2.73	3.38	3.31	2.40	2.29	1.96
7 ORIEN_BG	4.04	4.47	3.51	8.43	5.04	2.56		0.89	1.04	1.39	0.62	1.13	0.85	1.13	0.70	1.18	2.35	2.58	0.90	1.01	1.93	2.37	1.34	1.24	0.90
8 ORIEN_3	4.24	4.72	3.92	11.04	7.08	2.94	9.44		2.13	2.49	1.72	2.23	1.95	2.23	1.80	2.28	2.12	2.35	1.34	1.44	1.70	2.14	2.44	2.33	2.00
9 IRQ_ILL52	3.89	4.26	2.84	4.57	3.15	2.02	2.31	4.12		1.52	0.75	0.14	0.32	0.14	-0.29	0.65	1.36	1.59	0.37	0.69	1.40	1.72	0.36	0.25	-0.08
10 IRQ_52A	4.39	4.91	3.81	2.87	2.42	3.94	2.10	3.14	1.93		0.56	1.61	0.78	1.61	1.18	1.66	2.59	2.82	1.38	1.49	2.56	2.61	1.82	1.72	1.39
11 IRQ_52B	4.08	4.54	3.14	2.11	1.80	3.15	1.45	2.36	1.43	6.30		1.05	0.02	0.85	0.41	0.89	1.82	2.05	0.62	0.72	1.79	1.85	1.06	0.95	0.62
12 SIR_60	4.10	4.53	3.13	9.44	4.71	2.22	3.14	6.27	1.21	2.17	1.83		0.51	0.24	-0.20	0.74	1.46	1.69	0.46	0.78	1.49	1.81	0.45	0.35	0.01
13 LBN_191	4.05	4.49	2.75	1.94	1.68	2.70	1.58	2.42	1.17	4.72	1.05	1.35		0.41	-0.02	0.46	1.38	1.61	0.18	0.95	1.36	1.74	0.62	0.51	0.18
14 IND_3042	4.11	4.54	3.14	9.47	4.72	2.22	3.15	6.28	1.21	2.18	1.57	1.57	1.26		-0.19	0.74	1.46	1.69	0.47	0.78	1.49	1.81	0.45	0.35	0.02
15 CHL_72	3.92	4.32	2.81	5.27	3.15	1.93	2.10	4.41	-0.63	1.80	1.26	-0.63	0.99	0.63		0.31	1.02	1.25	0.03	0.35	1.06	1.38	0.02	-0.09	-0.42
16 UKR_92	3.94	4.33	2.93	22.09	7.34	2.11	2.56	4.50	1.57	2.04	1.52	1.86	1.25	1.86	1.32		1.96	2.18	0.51	1.28	1.54	1.92	0.95	0.84	0.51
17 ITL_343	3.99	4.30	3.13	8.40	5.02	2.75	4.71	5.02	2.73	3.45	2.57	3.76	2.09	3.77	2.62	3.02		0.01	1.02	2.00	-0.18	0.14	1.67	1.56	1.23
18 COL_1645	3.98	4.27	3.14	7.10	4.72	2.78	4.50	4.71	2.78	3.43	2.62	3.66	2.18	3.67	2.70	3.04	1.05		1.25	2.23	0.05	0.37	1.90	1.79	1.46
19 ETP_3467	3.95	4.38	2.76	5.25	3.14	1.77	3.14	5.23	1.47	2.09	1.45	1.88	1.12	1.88	1.05	1.68	2.61	2.69		1.01	0.60	1.37	0.68	0.57	0.24
20 ESP_MALA	4.26	4.74	3.73	---	9.43	2.73	4.20	7.86	2.45	2.29	1.57	4.70	1.69	4.71	2.10	2.97	7.32	6.28	4.18		2.03	2.02	0.99	0.89	0.56
21 ESP_WA	4.48	4.91	4.04	3.51	2.86	3.68	2.83	2.79	1.98	7.08	4.41	2.28	3.15	2.29	1.84	2.11	0.78	1.05	1.57	3.14		0.17	1.70	1.59	1.26
22 ESP_913	3.68	3.91	2.99	12.60	6.28	2.53	3.14	3.14	2.36	2.71	2.13	2.80	2.00	2.81	2.25	3.14	1.21	1.47	2.24	3.56	1.13		2.02	1.92	1.59
23 ESP_ILL323	4.35	4.85	3.53	---	9.43	2.52	5.24	12.57	1.75	2.57	1.84	3.13	1.45	3.14	1.05	2.46	6.28	5.50	3.14	---	2.79	3.56		0.56	0.23
24 ESP_LUPA	4.22	4.69	3.32	18.92	6.29	2.36	3.93	8.37	1.43	2.36	1.69	2.09	1.35	2.09	0.79	2.12	4.70	4.40	2.35	9.42	2.51	3.14	6.28		0.12
25 ESP_ALPO	4.14	4.59	3.14	---	7.86	2.17	3.15	7.33	0.86	2.10	1.45	1.04	1.12	1.05	0.00	1.68	3.92	3.77	1.57	6.28	2.20	2.77	3.14	1.57	

APENDICE 7.5. Secuencias de apirasa tipo 1 y 2 alineadas en formato MEGA.

7.5.1. Secuencias de apirasa tipo 1 alineadas en formato MEGA

```

Exón 1;
#IND_3042      ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ESP_ILL323   ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ESP_LUPA     ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ESP_ALPO     ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#IRQ_ILL52    ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#CHL_72       ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#IRQ_60       ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ODEMENSIS    -----      -CCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#TOMENTOSUS   -----      -CTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ESP_MALA     ---GCAATCA  CCTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#COL_1645     ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ITL_343      ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ESP_913      ---GCCGGGG  GATTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ORIE_BG      ---GCAATCA  CCTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ORIE_3       ---GCAATCA  CCTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#UKR_92       ---GCCGGGG  ATTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ETP_3467     ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ESP_WA       ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#LBN_191      ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#IRAQ_52A     ---GCAATCA  CCTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#ERVOIDES     ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#NIGRICANS    ---GCAATCA  CTTACTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAA  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#Ps_Apy1      ---GCAATCA  CCTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAG  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#V_faba       ATGCCCTCAA  TCACCTCCCT  CCAATCTTA  GGAACAACC  TACTCACCAG  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#Medicago_Apy1.1  ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAG  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#Medicago_Apy1.2  ---TCAATTT  CTTACTCCCA  AAATCTTGA  AACAAACAACC  TACTCACCAG  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#Medicago_Apy1.3  ---TCAATTT  CTTACTCCCA  ATACTTGA  AACAAACAACC  TACTCACCAG  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#Medicago_Apy1.4  ---GCAATCA  CTTCTCCCA  ATACTTAGGA  AACAAACAACC  TACTCACCAG  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT
#Medicago_Apy1.5  ---ACAATCT  CTTCTCCCA  ATACTTGA  AACAAACAACC  TACTCACCAG  TAGAAAAGATT  TTCTAAAAAC  AAGAAGCTAT

#IND_3042      TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ESP_ILL323   TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ESP_LUPA     TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ESP_ALPO     TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#IRQ_ILL52    TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#CHL_72       TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#IRQ_60       TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ODEMENSIS    TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#TOMENTOSUS   TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ESP_MALA     TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#COL_1645     TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ITL_343      TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ESP_913      TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ORIE_BG      TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ORIE_3       TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#UKR_92       TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ETP_3467     TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ESP_WA       TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#LBN_191      TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#IRAQ_52A     TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#ERVOIDES     TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#NIGRICANS    TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTGACCAA  AACTTGAATC
#Ps_Apy1      TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TCGATGCTGG  TAGCACCGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTAAACCG  AACCTAGATC
#V_faba       TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TCGATGCTGG  TAGCACCGGT  AGTCGCATTC  ATGTTTACCA  TTTTAAACCG  AACCTAGATC
#Medicago_Apy1.1  TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGCCGTATTC  ATGTTTACCA  TTTTGATCAG  AACTTGAATC
#Medicago_Apy1.2  TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGCCGTATTC  ATGTTTACCA  TTTTGATCAG  AACTTGAATC
#Medicago_Apy1.3  TTCCCTTAT  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  AGCCGTATTC  ATGTTTACCA  TTTTGATCAG  AACTTGAATC
#Medicago_Apy1.4  AACATCTTAC  GCTGTCATAT  TTGATGCTGG  TAGCACTGGT  ACTCGTGTCC  ATGTTTACCA  TTTTGACCG  AACTTGAATC
#Medicago_Apy1.5  AACCTCCTAC  GCTGTCGTAT  TTGATGCTGG  TAGCACCGGT  AGCCGTATTC  ATGTTTACCA  TTTTGATCAG  AACTTGAATC

#IND_3042      TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ESP_ILL323   TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ESP_LUPA     TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ESP_ALPO     TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#IRQ_ILL52    TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#CHL_72       TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#IRQ_60       TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ODEMENSIS    TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#TOMENTOSUS   TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ESP_MALA     TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#COL_1645     TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ITL_343      TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ESP_913      TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ORIE_BG      ACCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ORIE_3       TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#UKR_92       TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ETP_3467     TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ESP_WA       TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#LBN_191      TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#IRAQ_52A     TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#ERVOIDES     TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#NIGRICANS    TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#Ps_Apy1      TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#V_faba       TCCTTCACAT  TGGGAAAGGT  GTTGAGTACT  ATAATAAG
#Medicago_Apy1.1  TTCTTCATAT  TGGCAAGAT  GTTGAGTTT  TTAATAAG
#Medicago_Apy1.2  TTCTTCATAT  TGGTAAAGAT  GTTGAGTTT  TTAATAAG
#Medicago_Apy1.3  TTCTTCATAT  TGGTAAAGAT  GTTGAGTTT  TTAATAAG
#Medicago_Apy1.4  TTCTTCACAT  TGGCAATGAT  ATTGAGTTT  TTGACCAAG
#Medicago_Apy1.5  TTCTTCACAT  TGGCAACGAT  GTTGAGTTT  TTAATAAG

```



```

Intron 1:
#IND_3042      GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ESP_ILL323   GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ESP_LUPA     GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ESP_ALPO     GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#IRQ_ILL52    GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#CHL_72       GTATATA-GC AAACGATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#IRQ_60       GTATATA-GC AAACGATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ODEMENSIS    GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#TOMENTOSUS   GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ESP_MALA     GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#COL_1645     GTATATAAGC AAACAA---- -TATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ITL_343      GTATATAAGC AAACAA---- -TATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ESP_913      GTATATAAGC AAACAATATA ---- -TAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ORLEN_BG     GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ORLEN_3      GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#UKR_92       GTATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ETP_3467    ATATATA-GC AAACAATATA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ESP_WA       GTATATAAGC AAACAATATA TAACAT---- -CACAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#LBN_191      GTATATAAGC AAACAATATA ---- -TAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#IRAQ_52A     GTATATAAGC AAACAA---- -TATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#ERVOIDES     GTATATA-GC AAACAA---- -TATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#NIGRICANS    GTATATA-GC AAAAAA---- -TATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ----- TTACT
#Ps_Apy1      GTAGTAA---- -ACA ATATATAACA TCACAAATTG TTTTCATTAT TATAAAGTAC ATACCACAT ATATTATAT
#V_faba
#Medicago_Apy1.1
#Medicago_Apy1.2
#Medicago_Apy1.3
#Medicago_Apy1.4
#Medicago_Apy1.5

#IND_3042      TCATTGTACT CCTTCTAG
#ESP_ILL323   TCATTGTACT CCTTCTAG
#ESP_LUPA     TCATTGTACT CCTTCTAG
#ESP_ALPO     TCATTGTACT CCTTCTAG
#IRQ_ILL52    TCATTGTACT CCTTCTAG
#CHL_72       TCATTGTACT CCTTCTAG
#IRQ_60       TCATTGTACT CCTTCTAG
#ODEMENSIS    TCATTGTACT CCTTCTAG
#TOMENTOSUS   TCATTGTACT CCTTCTAG
#ESP_MALA     TCATTGTACT CCTTCTAG
#COL_1645     TCATTGTACT CCTTCTAG
#ITL_343      TCATTGTACT CCTTCTAG
#ESP_913      TCATTGTACT CCTTCTAG
#ORLEN_BG     TCATTGTACT CCTTCTAG
#ORLEN_3      TCATTGTACT CCTTCTAG
#UKR_92       TCATTGTACT CCTTCTAG
#ETP_3467    TCATTGTACT CCTTCTAG
#ESP_WA       TCATTGTACT CCTTCTAG
#LBN_191      TCATTGTACT CCTTCTAG
#IRAQ_52A     TCATTGTACT CCTTCTAG
#ERVOIDES     TCATTGTACT CCTTCTAG
#NIGRICANS    TCATTGTACT CCTTCTAG
#Ps_Apy1      TCATTGTACT CCTTCTAG
#V_faba
#Medicago_Apy1.1
#Medicago_Apy1.2
#Medicago_Apy1.3
#Medicago_Apy1.4
#Medicago_Apy1.5

Exón 2:
#IND_3042      ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ESP_ILL323   ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ESP_LUPA     ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ESP_ALPO     ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#IRQ_ILL52    ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#CHL_72       ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#IRQ_60       ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ODEMENSIS    ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#TOMENTOSUS   ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ESP_MALA     ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#COL_1645     ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ITL_343      ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ESP_913      ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ORLEN_BG     ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ORLEN_3      ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#UKR_92       ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ETP_3467    ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ESP_WA       ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#LBN_191      ATAACACCTG GTTTGAGTTC GTACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#IRAQ_52A     ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#ERVOIDES     ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#NIGRICANS    ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AGTCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#Ps_Apy1      ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT AATCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#V_faba       ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATACGCTAAT ATCCAGAAC AGGCTGCAAA ATCTCTCATT CCACTTTTAG AGCAAGCAGA
#Medicago_Apy1.1
#Medicago_Apy1.2   ATAACACCTG GTTTGAGTTC ATATGCAAAAT GATCCGGAAC AAGCTGCAAA ATCTTTGATT CCACCTCTAC AACAGCAGA
#Medicago_Apy1.3   ACAACACCCG GTTTGAGTTC ATACGCGGAT AATCCAGAAC AAGCTGCAAA ATCTTTGATT CCACCTTTAG AGCAAGCAGA
#Medicago_Apy1.4   ACAACACCCG GTTTGAGTTC ATACGCGGAT AATCCAGAAC AAGCTGCAAA ATCTTTGATT CCACCTTTAG AGCAAGCAGA
#Medicago_Apy1.5   ATCAAACCCG GTTTGAGTTC ATATGCGGAT AATCCTGAAC AAGCAGCAAA ATCTCTCCTT CCACCTTTGG AGGAAGCAGA
#Medicago_Apy1.5   ACAACACCCG GTTTGAGTTC ATACGCGAGT AATCCAAAGG AAGCAGCAGA GTCTCTGATT CCACCTTTAG AGCAAGCAGA

```

```

#IND_3042      AGATGCGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ESP_ILL323   AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ESP_LUPA     AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAG  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ESP_ALPO     AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#IRQ_ILL52    AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#CHL_72       AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#IRQ_60       AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ODEMENSIS    AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#TOMENTOSUS   AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ESP_MALA     AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#COL_1645     AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ITL_343      AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ESP_913      AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ORIEEN_BG    AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ORIEEN_3     AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#UKR_92       AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ETP_3467     AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#ESP_WA       AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACGCCTGTT  AGACTTGGG
#LBN_191      AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACACCTGTT  AGACTTGGG
#IRAQ_52A     AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACACCTGTT  AGACTTGGG
#ERVOIDES     AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACACCTGTT  AGACTTGGG
#NIGRICANS    AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACACCTGTT  AGACTAGGG
#Ps_Apy1      AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACACCTGTT  AGACTTGGG
#V_faba       AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TTCAACCCAA  GACACCTGTT  AGACTTGGG
#Medicago_Apy1.1  AAATGTGGTC  CCTATTGATC  TACATCACA  GACACCGATC  AGACTTGGG
#Medicago_Apy1.2  AAGTGTGGTC  CCTGAGGATC  AGCGCTCAA  GACACCGGTT  AGACTTGGG
#Medicago_Apy1.3  AAGTGTGGTC  CCTGAGGATC  AGCGCTCAA  GACACCCATT  AGACTTGGG
#Medicago_Apy1.4  AGATGTGGTC  CCTGAGGATC  TGCAACCCAA  AACACCCGTT  AGCGTGGG
#Medicago_Apy1.5  AAGAGTGGTC  CCTGTTAATC  TGCAACCCAA  AACACCCGTT  AAGCTTGGG

```

Intron 2;

```

#IND_3042      GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ESP_ILL323   GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ESP_LUPA     GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ESP_ALPO     GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#IRQ_ILL52    GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#CHL_72       GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#IRQ_60       GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ODEMENSIS    GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#TOMENTOSUS   GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ESP_MALA     GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#COL_1645     GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ITL_343      GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ESP_913      GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ORIEEN_BG    GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ORIEEN_3     GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#UKR_92       GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ETP_3467     GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ESP_WA       GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#LBN_191      GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#IRAQ_52A     GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#ERVOIDES     GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#NIGRICANS    GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  GACTCTGTCC  ATAACAAAAT  CAAAAAAGTC  AAATATGTGA  -ATCCTAAGT  AAGATGTAAG
#Ps_Apy1      GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  TATTTTCTCT  GTAACAAAAT  CAAATAAGTT  ATTCCAAACA  GATCTTAAAT  AAGATGTAAG
#V_faba       GTGAGTTTTT  TGA AAAATTTA  TATTTTCTCT  GTAACAAAAT  CAAATAAGTT  ATTCCAAACA  GATCTTAAAT  AAGATGTAAG
#Medicago_Apy1.1  -----
#Medicago_Apy1.2  -----
#Medicago_Apy1.3  -----
#Medicago_Apy1.4  -----
#Medicago_Apy1.5  -----

```

```

#IND_3042      ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#ESP_ILL323   ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#ESP_LUPA     ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#ESP_ALPO     ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#IRQ_ILL52    ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#CHL_72       ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#IRQ_60       ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#ODEMENSIS    ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#TOMENTOSUS   ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#ESP_MALA     ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#COL_1645     ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCCG
#ITL_343      ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#ESP_913      ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#ORIEEN_BG    ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#ORIEEN_3     ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#UKR_92       ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#ETP_3467     ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCGG
#ESP_WA       ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#LBN_191      ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  TGAAAATAAT  GCAG
#IRAQ_52A     ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  TGAAAATAAT  GCAG
#ERVOIDES     ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  CGAAAATGAT  GCAG
#NIGRICANS    ATATCGGTGG  TTC TTTTGAC  GAGTTTTTATA  TGAAAATAAT  GCAG
#Ps_Apy1      ---CGCACGT  TCCATTGAC  GAGTTTTTATT  TGAAAATAAT  GCAG
#V_faba       -----
#Medicago_Apy1.1  -----
#Medicago_Apy1.2  -----
#Medicago_Apy1.3  -----
#Medicago_Apy1.4  -----
#Medicago_Apy1.5  -----

```

```

Exón 3;
#IND_3042      GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_ILL323   GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_LUPA     GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_ALPO     GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#IRQ_ILL52    GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AACAGGATAT GCAATCG
#CHL_72       GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#IRQ_60       GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ODEMENSIUS  GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#TOMENTOSUS  GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_MALA     GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#COL_1645     GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ITL_343     GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_913     GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ORIEEN_BG   GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ORIEEN_3    GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#UKR_92      GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ETP_3467    GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ESP_WA      GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#LBN_191     GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#IRAQ_52A    GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#ERVOIDES    GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#NIGRICANS   GCAACTGCAG GCTTAAGGCT TTTGAACGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#Ps_Apy1     GCAACTGCCG GTTTAAGGCT TTTGAATGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#V_faba      GCAACTGCCG GTTTAAGGCT TTTGAATGGA GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#Medicago_Apy1.1 GCAACCCGAG GTTTAAGGCT TTTGAATGGG GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAAGCG
#Medicago_Apy1.2 GCAACAGCAG GTTTAAGGCT TTTGAATGGG GATGCTTCTG AAAAGATATT GCAATCG
#Medicago_Apy1.3 GCAACAGCAG GTTTAAGGCT TTTGAATGGG GATGCTTCTG AAAAATATT GCAATCG
#Medicago_Apy1.4 GCAACCCGAG GTTTGAGGCT TTTGAATGGG GATGCTGCCG AAAAGATATT GCAAGCG
#Medicago_Apy1.5 GCAACAGCAG GTTTAAGGCT TTTGATGGA AATTCTTCCG AATTGATATT GGAAGCG

Intrón 3;
#IND_3042      GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#ESP_ILL323   GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#ESP_LUPA     GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#ESP_ALPO     GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#IRQ_ILL52    GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#CHL_72       GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#IRQ_60       GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#ODEMENSIUS  GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTCGATTAA GCTTAATTTT
#TOMENTOSUS  GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTCGATTAA GCTTAATTTT
#ESP_MALA     GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#COL_1645     GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTCGATTAA GCTTAATTTT
#ITL_343     GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTCGATTAA GCTTAATTTT
#ESP_913     GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTCGATTAA GCTTAATTTT
#ORIEEN_BG   GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#ORIEEN_3    GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#UKR_92      GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#ETP_3467    GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTT-GATTA AGCTTAATTT
#ESP_WA      GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTTGG TTCTTCCGTC TTTCGATTAA GCTTAATTTT
#LBN_191     GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGATGT TAGAAATAGG T-CTTCCGTC CTTCGATTAA GCTTAATTTT
#IRAQ_52A    GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGATGT TAGAAATAGG -TCTTCCGTC CTTCGATTAA GCTTAATTTT
#ERVOIDES    GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TAGATCTGGG TTCTTCCGTC TTTCGATTAA GCTTAATTTT
#NIGRICANS   GTAACCATAA GTTTAATATT CTAATGTTAT AAGTCGAAGT TTGATCTAGG TT-TTCCGTC CTTCGATTAA GCTTAATTTT
#Ps_Apy1     GTAACCATAA GTTTAATTTT TTAACGATAT AATTACAGT TAGATCTAGG TTTTTCGTC TTTCGATFGAG GTTAATTTTG
#V_faba      -----
#Medicago_Apy1.1 -----
#Medicago_Apy1.2 -----
#Medicago_Apy1.3 -----
#Medicago_Apy1.4 -----
#Medicago_Apy1.5 -----

#IND_3042      TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#ESP_ILL323   TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#ESP_LUPA     TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#ESP_ALPO     TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#IRQ_ILL52    TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#CHL_72       TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#IRQ_60       TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#ODEMENSIUS  GTGCTCAT-A ATTAATTGCT ATAG
#TOMENTOSUS  GTGCTCAT-A ATTAATTGCT ATAG
#ESP_MALA     TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#COL_1645     GTGCTCAT-A ATTAATTGCT ATAG
#ITL_343     GTGCTCAT-A ATTAATTGCT ATAG
#ESP_913     GTGCTCAT-A ATTAATTGCT ATAG
#ORIEEN_BG   TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#ORIEEN_3    TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#UKR_92      TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#ETP_3467    TGTGCTTATA ATTAATTGCT ATAG
#ESP_WA      GTGCTCAT-A ATTAATTGCT ATAG
#LBN_191     GTGTTTAT-A ATTAATTACT ATGG
#IRAQ_52A    GTGTTTAT-A ATTAATTACT ATAG
#ERVOIDES    GTGCTCAT-A ATTAATTGCT ATAG
#NIGRICANS   GTGCTCAT-A ATTAATTGCT ATAG
#Ps_Apy1     TGCTTAT-AA TTA----- --AG
#V_faba      -----
#Medicago_Apy1.1 -----
#Medicago_Apy1.2 -----
#Medicago_Apy1.3 -----
#Medicago_Apy1.4 -----
#Medicago_Apy1.5 -----

```

```

Exón 4:
#IND_3042      GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_ILL323   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGACGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_LUPA     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_ALPO     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#IRQ_ILL52    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#CHL_72       GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#IRQ_60       GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ODEMENSIS   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAGGG
#TOMENTOSUS  GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_MALA     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#COL_1645     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ITL_343     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_913     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ORLEN_BG    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ORLEN_3     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#UKR_92      GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ETP_3467    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ESP_WA      GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#LBN_191     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#IRAQ_52A    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#ERVOIDES    GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#NIGRICANS   GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#Ps_Apy1     GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#V_faba      GTAAGGGATA TGCTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCAGATGC AGTTTCTATA ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#Medicago_Apy1.1  GTAAGGGATA TGTTGAGCAA TAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCTGATGC AGTTTCTATT ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#Medicago_Apy1.2  GTAAGGGATA TGTTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCTGATGC AGTTTCTATT ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#Medicago_Apy1.3  GTAAGGGATA TGTTGAGCAA TAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCTGATGC AGTTTCTATT ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#Medicago_Apy1.4  ACAAGGAATA TGTTGAGCAA CAGAAGTACC TTCAATGTTC AACCTGATGC AGTTTCTATT ATTGATGGAA CCCAAGAAGG
#Medicago_Apy1.5  GTGTCGAGTT TGCTCAAAAA GAGAAGCAGC TTTAACGTAC AATCAGATGC AGTAGGAATT ATTGATGGTA CACAAGAAGG

#IND_3042      TTCTTATCTC TGG
#ESP_ILL323   TTCTTATCTC TGG
#ESP_LUPA     TTCTTATCTC TGG
#ESP_ALPO     TTCTTATCTC TGG
#IRQ_ILL52    TTCTTATCTC TGG
#CHL_72       TTCTTATCTC TGG
#IRQ_60       TTCTTATCTC TGG
#ODEMENSIS   TTCTTATCTC TGG
#TOMENTOSUS  TTCTTATCTC TGG
#ESP_MALA     TTCTTATCTC TGG
#COL_1645     TTCTTATCTC TGG
#ITL_343     TTCTTATCTC TGG
#ESP_913     TTCTTATCTC TGG
#ORLEN_BG    TTCTTATCTC TGG
#ORLEN_3     TTCTTATCTC TGG
#UKR_92      TTCTTATCTC TGG
#ETP_3467    TTCTTATCTC TGG
#ESP_WA      TTCTTATCTC TGG
#LBN_191     TTCTTATCTC TGG
#IRAQ_52A    TTCTTATCTC TGG
#ERVOIDES    TTCTTATCTC TGG
#NIGRICANS   TTCTTATCTA TGG
#Ps_Apy1     TTCTTATCTA TGG
#V_faba      TTCTTATCTA TGG
#Medicago_Apy1.1  TTCTTATCTC TGG
#Medicago_Apy1.2  TTCTTATCTA TGG
#Medicago_Apy1.3  TTCTTATCTC TGG
#Medicago_Apy1.4  TTCTTATATG TGG
#Medicago_Apy1.5  TTCTTATTTA TGG

Intron 4:
#IND_3042      GTATATATAT ATATATATAT ATACATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATAAAT-- ----- GACTAA
#ESP_ILL323   GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_LUPA     GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_ALPO     GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#IRQ_ILL52    GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATA----- -AATGACTAA
#CHL_72       GTATAT---- -ATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#IRQ_60       GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ODEMENSIS   GTATAT---- -ATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#TOMENTOSUS  GTATAT---- -ATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_MALA     GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATA----- -GACTAA
#COL_1645     GTATATAT-- ----- -GACTAA
#ITL_343     GTATATAT-- ----- -GACTAA
#ESP_913     GTATATAT-- ----- -GACTAA
#ORLEN_BG    GTATAT---- -ATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ORLEN_3     GTATATATAT ATATATATAT AAAT----- -GACTAA
#UKR_92      GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATAAAT---- -GACTAA
#ETP_3467    GTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AAATGACTAA
#ESP_WA      GTATATAT-- ----- -GACTAA
#LBN_191     GTATATATAT ATA----- -AATGACTAA
#IRAQ_52A    GTATATATAT AAAT----- -GACTAA
#ERVOIDES    GTATAT---- -GTGACTAA
#NIGRICANS   GTATAT---- -ATATATAT A--TGACTGA
#Ps_Apy1     GTATAT---- -GACTAA
#V_faba      -----
#Medicago_Apy1.1  -----
#Medicago_Apy1.2  -----
#Medicago_Apy1.3  -----
#Medicago_Apy1.4  -----
#Medicago_Apy1.5  -----

```



```

#IND_3042 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ESP_ILL323 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ESP_LUPA AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ESP_ALPO AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#IRO_ILL52 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#CHL_72 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#IRO_60 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ODEMENSIS AGTTCAAATG GCATATGCAG TTTCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#TOMENTOSUS AGTTCAAATG GCATATGCAG TTTCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ESP_MALA AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#COL_1645 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ITL_343 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ESP_913 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ORIEEN_BG AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTAGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ORIEEN_3 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTAGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#UKR_92 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ETP_3467 AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ESP_WA AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#LBN_191 AGTTCAAATG GCATATGCAG TTTCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#IRAQ_52A AGTTCAAATG GCATATGCAG TTTCAAAGAA AACGGCTAAA AATGCTCCAC AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#ERVOIDES AGTTCAAATG GCATATGCAG TATCAAAGAA AACAGCTAAA AATGCTCCAA AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#NIGRICANS AGTACAAATG GCATATGCAG TTTCAAAGAA AACAGCTAAA AATGCTCCAA AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#Ps_Apy1 AGTTCAAATG GCGTATGCAG TATCAAAGAA AACTGCTAAA AATGCTCCAA AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#V_faba AGTTCAAATG GCGTATGCAG TATCAAAGAA AACTGCTAAA AATGCTCCAA AAGTTGCAGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#Medicago_Apy1.1 AGTTCAAATG GCATATGCAG TGTCAAAGAA AACAGCTAAA AATGCTCCAA AAGTTGCTGA TGGAGTGTAT CCATACATTA
#Medicago_Apy1.2 GOTTCAAATG GCATATGCAG TGTCAAAGAA AACAGCTAAA AATGCTCCAA AAGTTGCTGA TGGAGTGTAT CCATACATTA
#Medicago_Apy1.3 AGTTCAAATG GCATATGCAG TGTCAAAGAA AACAGCTAAA AATGCTCCAA AAGTTGCTGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#Medicago_Apy1.4 AGTTCAAATG GCATATGCAG TGTCAAAGAA AACAGCTAAA AATGCTCCAA AAGTTGCTGA TGGAGAAGAT CCATACATTA
#Medicago_Apy1.5 AGTTCAAATG GTATATGCAG TCTCAAAGAA AACAGCTAAA AAGTTGCTGA TGGAGAAGAT CCATACATTA

#IND_3042 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ESP_ILL323 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ESP_LUPA AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ESP_ALPO AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#IRO_ILL52 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#CHL_72 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#IRO_60 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ODEMENSIS AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATACG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#TOMENTOSUS AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATACG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ESP_MALA AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#COL_1645 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ITL_343 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ESP_913 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ORIEEN_BG AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACTATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ORIEEN_3 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACTATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#UKR_92 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ETP_3467 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ESP_WA AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#LBN_191 AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#IRAQ_52A AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAAGAAGC ATCTCGAGCC
#ERVOIDES AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG GCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAGAGAAGC ATCTCGAGCC
#NIGRICANS AGAAAAATGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAGAGAAGC ATCTCGAGCC
#Ps_Apy1 AGAAGGTTGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAGAGAAGC ATCTCGAGCC
#V_faba AGAAGGTTGT ACTCAAGGGA ATACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAGAGAAGC ATCTCGAGCC
#Medicago_Apy1.1 AGAAGCTTGT ACTCAAGGGA AAACCATATG ATCTCTATGT TCACAGTTAC TTACACTTTG GTAGAGAAGC ATCTCGAGCC
#Medicago_Apy1.2 AGAAGCTTGT ACTCAAGGGA AAAAATATG ATCTCTATGT TCATAGTTAC TTACACTTTG GTACAGAAGC ATCTCGAGCC
#Medicago_Apy1.3 AGAAGCTTGT ACTCAAGGGA AAAAATATG ATCTCTATGT TCATAGTTAC TTACACTTTG GTAGAGAAGC ATCTCGAGCC
#Medicago_Apy1.4 AGAAGCTTGT ACTCAAGGGA AAGCAATATG ACCCTATGT TCATAGTTAC TTGCGCTTTG GCAAGAAGC AACTCGAGCC
#Medicago_Apy1.5 AAAAATATG ACTTAAAGGA AAGAAATATG ACCCTATGT TCACAGTTAC TTGCGCTTTG GCAAGAAGC ATCTCGTCTT

#IND_3042 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ESP_ILL323 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ESP_LUPA GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ESP_ALPO GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#IRO_ILL52 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#CHL_72 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#IRO_60 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ODEMENSIS GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#TOMENTOSUS GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ESP_MALA GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#COL_1645 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ITL_343 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ESP_913 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ORIEEN_BG GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ORIEEN_3 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#UKR_92 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ETP_3467 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ESP_WA GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#LBN_191 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#IRAQ_52A GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#ERVOIDES GAGATTTTGA AGGTCACCTG CAGTTCGCTT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#NIGRICANS GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCTTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#Ps_Apy1 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#V_faba GAGATTTTGA AACTCACTCC TCGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#Medicago_Apy1.1 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TAGTTCCTCT AACCCCTGCC TTTTAGCTGG ATTTGATG
#Medicago_Apy1.2 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TAATTCCTCT AACCCCTGCA TTTTAGCTGG ATTTGATG
#Medicago_Apy1.3 GAGATTTTGA AGGTCACCTG TAATTCCTCT AACCCCTGCA TTTTAGCTGG ATTTGATG
#Medicago_Apy1.4 CAGGTTTTGA ATGCAACTAA TGGATCTGCT AACCCCTGCA TTTTAGCTGG ATTTGATG
#Medicago_Apy1.5 GAAATTTTTGA AAGTCACTAA TGTTTCCTCT AACCCCTGCA TTTTAGCTGG CTATCATG

```

Intron 5;
 #IND_3042 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATCTGTTGG TAACATTAGG ---TTTTTCT
 #ESP_ILL323 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ESP_LUPA GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ESP_ALPO GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #IRQ_ILL52 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #CHL_72 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #IRQ_60 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ODEMENSIS GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #TOMENTOSUS GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ESP_MALA GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #COL_1645 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ITL_343 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ESP_913 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ORLEN_BG GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ORLEN_3 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #UKR_92 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ETP_3467 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ESP_WA GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #LBN_191 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #IRAQ_52A GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #ERVOIDES GTAAACACAA ATCAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG TATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #NIGRICANS GTAAACACAA ATCAGGGTTT CACTTTGAAG TTTC AATTTG CATATATATA AATATGTTAG TAACATTAGG ---TTTTTTT
 #Ps_Apy1 GTAAACACAA ATTAGGGTTT CACTTCGAAA TTTC AATTTG CATTATAAAT ATGTAAATAA CATTAGTTTT TTTCTTTTT
 #V_faba -----
 #Medicago_Apy1.1 -----
 #Medicago_Apy1.2 -----
 #Medicago_Apy1.3 -----
 #Medicago_Apy1.4 -----
 #Medicago_Apy1.5 -----

#IND_3042 TTCGACTTCG AAG
 #ESP_ILL323 TTCGACTTCG AAG
 #ESP_LUPA TTCGACTTCG AAG
 #ESP_ALPO TTCGACTTCG AAG
 #IRQ_ILL52 TTCGACTTCG AAG
 #CHL_72 TTCGACTTCG AAG
 #IRQ_60 TTCGACTTCG AAG
 #ODEMENSIS TTCGACTTCG AAG
 #TOMENTOSUS TTCGACTTCG AAG
 #ESP_MALA TTCGACTTCG AAG
 #COL_1645 TTCGACTTCG AAG
 #ITL_343 TTCGACTTCG AAG
 #ESP_913 TTCGACTTCG AAG
 #ORLEN_BG TTCGACTTCG AAG
 #ORLEN_3 TTCGACTTCG AAG
 #UKR_92 TTCGACTTCG AAG
 #ETP_3467 TTCGACTTCG AAG
 #ESP_WA TTCGACTTCG AAG
 #LBN_191 TTCGACTTCG AAG
 #IRAQ_52A TTCGACTTCG AAG
 #ERVOIDES TTCGACTTCG AAG
 #NIGRICANS TTCGACTTCG AAG
 #Ps_Apy1 GATTTTATAG G--
 #V_faba -----
 #Medicago_Apy1.1 -----
 #Medicago_Apy1.2 -----
 #Medicago_Apy1.3 -----
 #Medicago_Apy1.4 -----
 #Medicago_Apy1.5 -----

Exón 6;
 #IND_3042 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_ILL323 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_LUPA GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_ALPO GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #IRQ_ILL52 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #CHL_72 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #IRQ_60 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ODEMENSIS GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #TOMENTOSUS GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_MALA GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #COL_1645 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ITL_343 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_913 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ORLEN_BG GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ORLEN_3 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #UKR_92 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ETP_3467 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ESP_WA GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #LBN_191 GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #IRAQ_52A GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #ERVOIDES GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #NIGRICANS GGATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTCCACTTCT GGTGCAAACA TCAATAAATG CAAAAACACA
 #Ps_Apy1 -AATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTACACTTCT GTGCAAACT TTAATAAATG CAAAAACACA
 #V_faba GTATCTATAC ATATTCAGGA GAAGAGTTTA AGGCAACTGC TTACACTTCT TGGGCACAAT TTAATAAATG CAAAAACACA
 #Medicago_Apy1.1 GGACATAC ATATGCTGGA GAGGAGTTTA AGGCCAATGC CCCTGCTTCT GGGGCCAAT TTAATAAATG CAAAAAGATA
 #Medicago_Apy1.2 GGACATAC ATATGCTGGA GAGGAGTTTA AGGCCAATGC CCTAGCTTCT GGGGCCAAT TTAATAAATG CAAAAAGATA
 #Medicago_Apy1.3 GGACATAC ATATGCTGGA GAGGAGTTTA AGGCCAATGC CCCTGCTTCT GGAGCCAAT TTAATAAATG CAAAAAGATA
 #Medicago_Apy1.4 GGACATAC ATATTCAGGA GTGGAGTACA AGGCTTTTTT CCCTGCTTCT GGCTCAAAT TTAATAAATG CAAAAAGATA
 #Medicago_Apy1.5 GGACATATAC ATATTCAGGA GAGGAGTATA AGGCATTTTC TCCTGCTTCT GGCTCAAAT TTAATAAATG CAAAAAGATA

```

#IND_3042      ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ESP_ILL323   ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ESP_LUPA     ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ESP_ALPO     ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#IRQ_ILL52    ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#CHL_72       ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#IRQ_60       ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ODEMENSIS    ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#TOMENTOSUS   ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ESP_MALA     ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#COL_1645     ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ITL_343      ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ESP_913      ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ORLEN_BG     ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ORLEN_3      ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#UKR_92       ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ETP_3467     ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ESP_WA       ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#LBN_191      ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#IRAQ_52A     ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#ERVOIDES     ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#NIGRICANS    ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#Ps_Apy1     ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#V_faba       ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#Medicago_Apy1.1  ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#Medicago_Apy1.2  ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#Medicago_Apy1.3  ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#Medicago_Apy1.4  ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG
#Medicago_Apy1.5  ATTCGTAAG  CTCCTAAGTT  GAATTATCCT  TGTCCATATC  AGAATTGCAC  TTTTGGTGA  ATTTGGAATG  GTGGAAGAGG

```

```

#IND_3042      AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ESP_ILL323   AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ESP_LUPA     AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ESP_ALPO     AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#IRQ_ILL52    AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#CHL_72       AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#IRQ_60       AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ODEMENSIS    AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#TOMENTOSUS   AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ESP_MALA     AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#COL_1645     AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ITL_343      AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ESP_913      AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ORLEN_BG     AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ORLEN_3      AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#UKR_92       AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ETP_3467     AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  TAGAT
#ESP_WA       AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  AAGAT
#LBN_191      AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  AAGAT
#IRAQ_52A     AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  AAGAT
#ERVOIDES     AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  AAGAT
#NIGRICANS    AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  AAGAT
#Ps_Apy1     AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  AAGAT
#V_faba       AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  AAGAT
#Medicago_Apy1.1  AAATGGACAG  AAAAATCTTT  TTACTTCCTC  ATCTTTCTTT  TACCTACCTG  AAGAT
#Medicago_Apy1.2  AAGTGGACAG  AGAAAATCTTT  TTGCTGCTTC  ATTTTCTTTT  TACCTAGCTG  CAGAA
#Medicago_Apy1.3  AAGTGGACAG  AGAAAATCTTT  TTGCTGCTTC  ATTTTCTTTT  TACCTAGCTG  AAGAT
#Medicago_Apy1.4  GAGTGGACAA  AAGAAAATCTTT  TTGTTACTTC  AGCTTTCGCT  TACCTAAGCT  AAGAT
#Medicago_Apy1.5  AAGTGGACAG  AAAAATCTTT  ATGTTACATC  ATCATTTTAT  TACCTGCTTA  CAGGG

```

```

Intron 6;
#IND_3042      GTATG--TAT  ATA-TATATT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ESP_ILL323   GTATG--TAT  ATA-TATATT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ESP_LUPA     GTATGTATAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ESP_ALPO     GTATGTATAT  ATA-TATATT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#IRQ_ILL52    GTATG--TAT  ATA-TATATT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#CHL_72       GTATGTATAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#IRQ_60       GTATGTATAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ODEMENSIS    GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#TOMENTOSUS   GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ESP_MALA     GTATGTATAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#COL_1645     GTATG---T   ATA-TATATT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ITL_343      GTATG---T   ATA-TATATT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ESP_913      GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ORLEN_BG     GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ORLEN_3      GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#UKR_92       GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ETP_3467     GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ESP_WA       GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#LBN_191      GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#IRAQ_52A     GTATG---T   ATA-TATATT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#ERVOIDES     GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#NIGRICANS    GTATG--TAT  ATA-TA--TT  ATCA--TTTC  ATTCAATTTA  GGATTTTACA  TTCATTTTGA  TTTG---ATG  ATATATAATC
#Ps_Apy1     GTATG--TAT  ATAATATA--  TCATTTTTC  TAT-AATTGA  TGATTTT--G  TTTG---ATG  TTTGAAGATG  ---ATAATC
#V_faba       -----
#Medicago_Apy1.1  -----
#Medicago_Apy1.2  -----
#Medicago_Apy1.3  -----
#Medicago_Apy1.4  -----
#Medicago_Apy1.5  -----

```



```

#IND_3042      TCATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ESP_ILL323   TCATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ESP_LUPA     TCATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ESP_ALPO     TCATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#IRQ_ILL52    TCATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#CHL_72       TCACFCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#IRQ_60       TCATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ODEMENSIS   TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#TOMENTOSUS  TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ESP_MALA     TCATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#COL_1645     TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ITL_343      TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ESP_913      TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ORLEN_BG     TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ORLEN_3      TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#UKR_92       TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ETP_3467     TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ESP_WA       TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#LBN_191      TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#IRAQ_52A     TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#ERVOIDES    TAATTCGAGT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#NIGRICANS   TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#Ps_Apy1     TAATTCGAAT  TTTTGCTAAT  TAGTACATTG  TTTTATTTTA  G
#V_faba       -----
#Medicago_Apy1.1  -----
#Medicago_Apy1.2  -----
#Medicago_Apy1.3  -----
#Medicago_Apy1.4  -----
#Medicago_Apy1.5  -----

```

Exón 7;

```

#IND_3042      ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ESP_ILL323   ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ESP_LUPA     ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ESP_ALPO     ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#IRQ_ILL52    ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#CHL_72       ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#IRQ_60       ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCT-AAAG  AAGCTTGTGC
#ODEMENSIS   ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#TOMENTOSUS  ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ESP_MALA     ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#COL_1645     ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ITL_343      ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ESP_913      ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCTGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ORLEN_BG     ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ORLEN_3      ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#UKR_92       ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ETP_3467     ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ESP_WA       ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#LBN_191      ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#IRAQ_52A     ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#ERVOIDES    ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#NIGRICANS   ACTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#Ps_Apy1     ACCGGTATGG  TTGATGCAAG  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#V_faba       ACCGGTATGG  TTGATGCAAG  CACACCTAAT  TTCATACTTC  GGCCGATCGA  TATTGAGACT  AAAGCTAAAG  AAGCTTGTGC
#Medicago_Apy1.1  GTTGGTATGG  TTGATGCAAA  CACACCTAAT  TTCAAAATTC  GTCCTGTGGA  TCTCGTAGT  GAAGCTAAGA  AAGCTTGTGC
#Medicago_Apy1.2  GTTGGTATGG  TTGATGCAAA  TAAACCTAAT  TTCAAAATTC  GACCTGTGGA  TTTTCGAGAGT  GAAGCTAAGA  AAGCTTGTGC
#Medicago_Apy1.3  ATTGGTTTGG  TTGACCCAAA  TACACCTTAT  AGTCTCACAC  TTCGCTCCTG  GGATCTTGAG  ACTGAAGCTA  AGAAAAGCTTG
#Medicago_Apy1.4  GTTGGTATGG  TTGATGCAAA  TAAACCTAAT  T-CCATACTT  CATCCAATAG  ATTTCGAAAT  TGAAGCTAAA  CGAGCTTGTG
#Medicago_Apy1.5  GTTAAATATG  CTGATGCAAA  TAAAGCCCAAT  TCCAAAATTC  GTATCGAGGA  TCTGAAAAC  GGAGCTGAGC  AAGCTTGTGA

```

```

#IND_3042      ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ESP_ILL323   ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ESP_LUPA     ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ESP_ALPO     ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#IRQ_ILL52    ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#CHL_72       ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#IRQ_60       ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ODEMENSIS   ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#TOMENTOSUS  ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  CCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ESP_MALA     ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#COL_1645     ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ITL_343      ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ESP_913      ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ORLEN_BG     ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ORLEN_3      ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#UKR_92       ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ETP_3467     ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ESP_WA       ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#LBN_191      ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#IRAQ_52A     ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#ERVOIDES    GTTAAAATTT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#NIGRICANS   ATTAATAATAT  GTGGATGCAA  AAACAGCTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#Ps_Apy1     GTTAAACTTC  GAGGATGCGA  AATCTACTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#V_faba       GTTAAACTTC  GAGGATGCGA  AATCTACTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#Medicago_Apy1.1  ATTAACCTTC  GAGGATGCGA  AATCTACTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#Medicago_Apy1.2  ATTAACCTTC  GAGGATGCGA  AATCTACTTA  TCCATTTCTT  GATAAGAGAA  ATGAAGCTTC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#Medicago_Apy1.3  TACATTAAT  CTGAGGAGG  CCAATCAACT  TATCCACTTC  CTGTGGATT  TCAATATAGT  AGAATATGTA  TGCATGGATC
#Medicago_Apy1.4  CATTAAACT  TGAGGATGTC  AATCCACTTC  ATCCACGACT  TACAGAAGCA  AAACGCT--C  ATATGTATGC  ATGGATCTTG
#Medicago_Apy1.5  AACAAAATAT  AAGGATGCGA  AAGCCACATA  TCCACTTAT  TATGAGGATA  GTCTT---CC  ATATGTATGC  ATGGATCTTG

```

```
#IND_3042      TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ESP_ILL323   TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ESP_LUPA     TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ESP_ALPO     TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#IRQ_ILL52    TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#CHL_72       TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#IRQ_60       TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ODEMENSIS    TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#TOMENTOSUS   TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ESP_MALA     TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#COL_1645     TATACCAGTA TGTGTTA--- CTTGTTGATG GATTTG
#ITL_343      TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ESP_913      TATACCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ORIEEN_BG    TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ORIEEN_3     TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#UKR_92       TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ETP_3467     TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ESP_WA       TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#LBN_191      TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#IRAQ_52A     TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#ERVOIDES     TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#NIGRICANS    TATATCAATA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#Ps_Apy1      TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#V_faba       TATATCAGTA TGTGTTA--- CTCGTTGATG GATTTG
#Medicago_Apy1.1 TATATCAGTA TGTGTTG--- CTCGTTGATG GATTTG
#Medicago_Apy1.2 TATATCAGTA TGTGTTG--- CTCGTTGATG GATTTG
#Medicago_Apy1.3 TTATATATCA GTACGTGTTG CTCGTTGATG GATTTG
#Medicago_Apy1.4 TATACCAGCA TGTGTTG--- CTCGTTGATG GATTTG
#Medicago_Apy1.5 TTTACCAATA TACATTGTT--- TGTGTTGATG GATTTG
```

Intron 7;

```
#IND_3042      GTAAGTTTGG ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATG CCATTTGTTG GCAG
#ESP_ILL323   GTAAGTTTGG ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ESP_LUPA     GTAAGTTTGG ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ESP_ALPO     GTAAGTTTGG ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#IRQ_ILL52    GTAAGTTTGG ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#CHL_72       GTAAGTTTGG ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#IRQ_60       GTAAGTTTGG ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ODEMENSIS    GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --GAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#TOMENTOSUS   GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ESP_MALA     GTAAGTTTGG ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#COL_1645     GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ITL_343      GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ESP_913      GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ORIEEN_BG    GTAAGTTTGG ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ORIEEN_3     GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#UKR_92       GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ETP_3467     GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ESP_WA       GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#LBN_191      GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#IRAQ_52A     GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#ERVOIDES     GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#NIGRICANS    GTAAGTTTGA ATTATGAGAG --TAGATATA AACTAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGAA ATAATTGATT CCATTTGTTG GCAG
#Ps_Apy1      GTAAGTTTGA GTTATGAGAG TGTAGATGTA A---TAAAGTG ATTATTAATG TTTTCATGCA ATAATTGAAT CCATTTGTTG GCAG
#V_faba       -----
#Medicago_Apy1.1 -----
#Medicago_Apy1.2 -----
#Medicago_Apy1.3 -----
#Medicago_Apy1.4 -----
#Medicago_Apy1.5 -----
```

Exón 7;

```
#IND_3042      GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_ILL323   GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_LUPA     GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_ALPO     GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#IRQ_ILL52    GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#CHL_72       GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#IRQ_60       GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ODEMENSIS    GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#TOMENTOSUS   GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_MALA     GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#COL_1645     GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ITL_343      GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_913      GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ORIEEN_BG    GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ORIEEN_3     GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#UKR_92       GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ETP_3467     GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ESP_WA       GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#LBN_191      GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#IRAQ_52A     GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#ERVOIDES     GCCTTGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#NIGRICANS    GCCTTGATCC ATCGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#Ps_Apy1      GTCTTGATCC ATTGCAAAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#V_faba       GTCTTGATCC ATTGCAAAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATACCAA GATGCTATTG TGGAAAGCTGC ATG
#Medicago_Apy1.1 AT-----CC ATTGCAGAAG ATTACATCGG GGAAGGAAAT TGAATATCAA GATGCTGTTT TGGAAAGCTGC ATG
#Medicago_Apy1.2 GCCTTAGATCC ATTGCAGAAG ATTACATCAG GGAAGGAAAT TGAATATCAA GATGCTGTTT TGGAAAGCTGC ATG
#Medicago_Apy1.3 GCCTTAGACC ATTGCAGAAG ATTACTGCGG GGAAGGAAAT TGAATATCAA GATGCTGTTT TGGAAAGCTGC ATG
#Medicago_Apy1.4 GCCTTAAGTCC ACGAAAAGAG ATTACATGAG GTGAAGGAAAT TCAATATCAG AATGCTGTTT TGGAAAGCTGC ATG
#Medicago_Apy1.5 GCCTTAGACC ATTGCAGAAG ATTACATCAG CAATATCAA TGAATATCAA GATGCCCTTG TGGATGCAGC ATG
```

7.5.2. Secuencias de Apirasa tipo 2 alineadas en formato MEGA

```

#Lcc_Apy2A      --- CCT TCC ACT TCT TCC AAT GAA TCC ATC GAG GAT TAC GCC CTA ACG CAC CGT AAG ATT TCT CCT GAT CGT AAA CTG
#Ps_Apy2_AF305783 ATG CCT TCC ACC TCT TCC CAT GAA TCC ATC GAG GAT TAC GCC TTA ACG CAC CGT AAG ATT TCT CCT GAT CGT AAA CTG
#Medicago_Apy2  --- --- TCG --- AGC TCG AAT TAT GAT TCT GCT GGA GAT TAT GCT CTT CTT AAT CGG AAA CTT TCG CCG GAT AAA AAA
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 ATG COT TCG AGC TCG AAT TAC GAG TCT GCC GGA GAA TAC GCT CTC GTT AAT CGG AAA GTT TCG CCT GAT AAA AAA TCC

#Lcc_Apy2A      TCC GAT TCG TTT GCT GTC GTT TTC GAC GCT GGT AGC TCC GGT AGC CGT GTT CAT GTC TTT CGC TTT GAT CGG AAC CTT
#Ps_Apy2_AF305783 TCC GAT TCG TTT GCT GTC ATT TTC GAC GCT GGT AGC TCC GGT AGC CGT GTC CAT GTC TTT CGC TTT GAT CGG AAC CTT
#Medicago_Apy2  TCT GGT GGC TCT TAT GCT GTT ATT TTT GAT GCT GGT AGC TCT GGT AGC CGT GTT CAT GTT TTT CAT TTT GAT CAG AAT
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 AGT GGC TCA TAT GCC GTC ATT TTC GAC GCC GGT AGC TCT GGC AGC CGC GTT CAT GTT TTC CAT TTC AAT CAT AAT CTA

#Lcc_Apy2A      GAT CTT GTT CAC ATT GGT AAT GAT CTC GAG GTT TTC TTG CAG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 GAT CTT GTT CAC ATT GGT AAC GAT CTC GAG GTT TTC TTG CAG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  TTA GAT CTT GTT CAC ATT GGC AAA GAT CTT GAA CTT TTC GAA CAG CTT AAA CCT GGT TTG AGT GCG TAT GCT CAG AAA
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 GAT CTC GTT CAT ATT GGC AAA GAT CTC GAA CTT TTC GAG CAG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  CCG GAT CAA GCA GCA GAA TCT CTG GTT TCA CTT TTG GAG AAA GCA GAG GGT GTT GTT CCA CGG GAA TTG CGA TCA AAG
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      ATA AAA CCT GGT TTG AGT GCT TAT GCA CAG GAT TCA CGC CAG GCA GCA GAA TCT CTT ATT TCT CTT TTG GAT AAA GCG
#Ps_Apy2_AF305783 ATA AAA CCT GGT TTG AGT GCT TAT GCA CAG GAT CCA CGA CAG GCA GCG GAA TCT CTT ATT TCT CTT TTG GAT AAA GCA
#Medicago_Apy2  ACA CCA GTT CGA ATT GGG GCA ACT GCA GGT TTA AGG GCT TTG GAA GGG GAT GCA TCT GAT AAG ATA TTG AGA GCG GTA
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 CTT AAA CCA GGT TTG AGT GCG TAT GCT AAG AAT CCT AAG GAA GCA GCG GAA TCT CTG ATT TCG CTC TTA GAC AAA GCT

#Lcc_Apy2A      GAA AGT GTC GTT CCT ATG GAA TTT CGC TCC ATG ACA CCG GTT AGA GTT GGG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 GAA AGT GTC GTT CCT ATG GAG TAT CGC CTT ATG ACA CCT GTT AGA GTT GGG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  AGG GAT TTG CTG AAG CAC AGA AGC TCC TTT AAA TCT GAT GCT GAT GCG GTT ACA GTG TTG GAT GGA ACA CAG GAA GGT
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 GAG AGT GTT GTT CCT CGG GAA TTG AGA TCG AAG ACA CCA GTT CGA GTT GGG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  GCT TAT CAA TGG GTT ACA ATT AAC TAT CTA TTA GGA AAC TTG GGA AAA GAT TAT TCA AAG ACC GTT GGG GTA GTT GAT
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  CTT GGA GGT GGA TCT GTT CAA ATG GCA TAT GCC ATC TCT GAG TCT GAG GCT GCC ATG GCT CCA CAA GTA ATG GAT GGA
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      ATC TTG CAA GCG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 ATC TTG CAA GCG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  GAG GAT CCA TAT GTC AAG GAG ATG TTC CTC AGG GGA AGA AAA TAT TAC CTC TAT GTT CAC AGT TAC TTG CGC TAT GGT
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 ATA TTG CAA GCG --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  TTA CTA GCA GCT CGT GCA GAG ATT TTA AAG GTT GCC GGT GAT GCT GAA AAC CCG TGT ATC TTA TCT GGC TCT GAT GGA
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      ACT CTA AAA TCA GAG CCT GAT GCA GTT GCT GTG CTA GAT GGA ACC CAA GAA GGT GCT TTT CAA TGG --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 ACA CTA AAA TCA GAG CCT GGT GCA GTT GCT GTG CTT GAT GGA ACC CAA GAA GGG GCT TTT CAA TGG --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  ACT TAC AAA TAT GGA GGA AAG TCA TTT AAG GCT TCA TCT TCT --- --- GGA GCA AGC TTA AAT GAA TGC AAA AGT GTA
#Lcc_Apy2B      ACA TTG AAA TCT GAT GCT GAT GCG GTT ACG GTG CTG GAT GGA ACA CAA GAA GGT GCT TTT CAA TGG --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 ACG TTG AAA TCT GAT GCT GAT GCG GTT ACA GTG CTG GAT GGA AAC CAA GAA GGT GCT TTT CAA TGG --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  GCT CAC AAG GCT CTC AAA GTC AAC GAG TCA ACA TGT ACA CAC ATG AAG TGC ACT TTT GGT GGG ATA TGG AAT GGT GGA
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  GGT GGG GAT GGA CAG AAA AAC CTA TTT GTT GCC TCA TTT TTC TTT GAC CGG GCT GCC GAG GCT GGT TTT GTT GAT CCA
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  AAC TCA CCA --- GTT GCA ATA GTT CGT CCT GCG GAT TTT GAG GAT GCT GCC AAG CAG GCT TGC CAA ACA AAA CTC GAG
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  AAT GCC AAA TCC ACT TAT CCA CGA GTT GAA GAG GGG AAC --- CTT CCA TAT CTT TGC ATG GAT CTT GTA TAC CAG TAT
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Medicago_Apy2  ACA TTG CTT GTT GAT GGG TTT GGC ATA TAT CCA TGG CAA GAG ATT ACA TTG GTA AAG AAA GTT AAA TAT GAT GAT GCC
#Lcc_Apy2B      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_APY2_AB071370 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

#Lcc_Apy2A      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
#Ps_Apy2_AF305783 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

