



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN DE *S-RNASE*, GEN ESENCIAL
EN LA RESPUESTA DE INCOMPATIBILIDAD SEXUAL EN *NICOTIANA*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB Renata Salcedo Sánchez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Felipe Cruz García
Facultad de Química UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Mayra Furlan Magaril
Instituto de Fisiología Celular

Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez
Instituto de Ecología

Ciudad de México. Septiembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PMDCB/2328/2018

Salcedo Sánchez Renata
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e


Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 17 de septiembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Regulación transcripcional de la expresión de S-RNasa, gen esencial en la respuesta de incompatibilidad sexual en Nicotiana**", dirigida por el/la Dr(a). **Cruz García Felipe**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Reyes Taboada José Luis
VOCAL	Dimitrova Dinkova Tzvetanka
VOCAL	Funes Argüello María Soledad
VOCAL	Sánchez López Rosana
SECRETARIO	Covarrubias Robles Alejandra Alicia

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de septiembre de 2018.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

El presente trabajo se realizó en el Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este proyecto fue dirigido por el Dr. Felipe Cruz-García y se realizó en el Laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica, localizado en el Conjunto E de la Facultad de Química en Ciudad Universitaria, México.

Agradezco especialmente a mi tutor, el Dr. Felipe Cruz-García por todo su apoyo y confianza que me permitieron iniciar y concluir mis estudios de maestría para continuar mi formación académica.

Agradezco a la M. en C. Yuridia Cruz González-Zamora por su apoyo técnico, el cual fue imprescindible para la realización de este trabajo.

Agradezco a Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez del Instituto de Ecología y a la Dra. Mayra Furlan Magaril del Instituto de Fisiología Celular, por formar parte de mi Comité Tutor y por sus valiosas aportaciones al proyecto.

Agradezco a los miembros del Jurado: Dr. José Luis Reyes Taboada, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Dra. María Soledad Funes Argüello, Dra. Rosa Sánchez López y Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles por la revisión y evaluación de esta tesis.

La elaboración de este trabajo fue posible gracias a los recursos obtenidos de los siguientes financiamientos:

PAIP FQ: PIP 5000-9128

CONACYT: 236602

DGAPA: IN217816

Además, durante mis estudios de maestría recibí una beca de excelencia otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

También agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo concedido para presentar este trabajo en XVII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

CONTENIDO

Resumen	1
Antecedentes	3
Diversidad genética, endogamia y sistemas genéticos de autoincompatibilidad	3
Clasificación de los sistemas de Autoincompatibilidad	6
Sistema de AI durante el desarrollo de la flor	13
Componentes de la Regulación Transcripcional	15
Regulación a nivel de secuencia del DNA	15
Regulación epigenética, metilación del DNA y accesibilidad de la cromatina	18
Justificación	30
Hipótesis	30
Objetivos	31
Objetivo general	31
Objetivos particulares	31
Estrategias experimentales	32
Material biológico	32
Clonación de la secuencia promotora de S-RNasa	33
Análisis in silico	35
Determinación del patrón de metilación de los promotores en diferentes etapas del desarrollo del pistilo	36
Resultados y Discusión	40
Clonación de la región 5' del gen S _{C10} -RNasa	40

Análisis in silico de la secuencia ppSc ₁₀ -RNasa	43
Análisis de metilación del DNA de la secuencia ppSc ₁₀ -RNasa	48
Búsqueda de elementos transponibles en la secuencia ppSc ₁₀ -RNasa	55
Conclusiones	75
Perspectivas	76
Apéndice I: Metodología.....	77
Extracción de DNA genómico con CTAB.....	77
Walking de DNA	78
Construcción de Bibliotecas.....	78
DNA walking.....	80
Clonación de las secuencias obtenidas por el método de DNA walking.....	83
Extracción de DNA de geles de agarosa	84
Ligación a plásmido pJET1.2/blunt	84
Transformación de células competentes de E. coli top 10 quimiocompetentes	85
Protocolo mini-preparación de plásmido.....	86
Conversión de DNA con Bisulfito de Sodio.....	86
Apéndice II: Materiales y equipos.....	88
Apéndice III: Programas, plataformas y bases de datos.....	92
Apéndice IV: Secuencias y Oligonucleótidos en formato FASTA	93
Secuencias reportadas en NCBI relacionadas con la Sc ₁₀ -RNASA	93
Oligonucleótidos y Secuencias relacionadas con el protocolo walking de DNA	93
Secuencia de retrotransposón identificada con el servidor Dfam.....	94

Oligonucleótidos y secuencias relacionadas con el protocolo de Clonación a un gen reportero.....	94
Oligonucleótidos y secuencias relacionadas con la construcción del mapa de metilación del promotor de la Sc ₁₀ -RNASA	95
Apéndice V: Predicción de sitios de unión a factores de transcripción con el servidor PlantReg Map	100
Apéndice VI: Identificación de elementos transponibles con el servidor DPTEdb.....	108
Apéndice VII: BLAST en Gypsy Data Base 2.0.....	115
Apéndice VIII: Resultados del perfil de metilación	121
Resultados obtenidos a partir de hoja.....	121
Resultados obtenidos a partir de pistili maduro	126
Resultados obtenidos a partir de pistilo de botón	131
Referencias.....	137

FIGURAS

Figura 1. Morfología de la angiosperma hermafrodita	4
Figura 2. Clasificación de los sistemas de autoincompatibilidad homomórfica.	5
Figura 3. Sistemas de autoincompatibilidad homomórfica.....	6
Figura 4. Modelo de compartimentalización del sistema de AI gametofítica.	12
Figura 5. Acumulación del producto de los genes estilares <i>S-RNasa</i> , <i>HT-B</i> y <i>NaStEP</i>	14
Figura 6. Extracto proteico de pistilo de <i>N. alata</i> en diferentes etapas de desarrollo.....	14
Figura 7. Resumen de los mecanismos de metilación del DNA presentes en células vegetales.....	20
Figura 8. Vía RdDM canónica, modificado de Matzke <i>et al.</i> , 2015.	23
Figura 9. Morfología floral de <i>Linaria vulgaris</i> silvestre y mutante.....	26
Figura 10. Patrón de metilación en el promotor del gen <i>SP11</i> de <i>B. rapa</i> durante el desarrollo de la antera.....	28
Figura 11. Tejidos de <i>Nicotiana alata</i> $S_{C10}S_{C10}$	32
Figura 12. Diagrama del protocolo walking de DNA y mapa del plásmido pJET1.2/blunt.....	33
Figura 13. Análisis in silico	35
Figura 14. Conversión de gDNA con bisulfito de sodio.....	37
Figura 15. Construcción de un mapa de metilación.....	38
Figura 16. PCR primario y secundario del DNA walking de S_{C10} -RNasa.....	42
Figura 17. Predicción del sitio de inicio de la transcripción y caja TATA.	43
Figura 18. Búsqueda de motivos reguladores con MAST del servidor MEME Suit.....	45
Figura 19. Predicción de sitios de unión a factores de transcripción.	46
Figura 20. Predicción de sitio de unión a factores de transcripción relacionados con el desarrollo de órganos florales.	47
Figura 21. Porcentaje de metilación global de la secuencia <i>ppS_{C10}-RNasa</i>	50
Figura 22. Mapas de metilación del DNA de la secuencia <i>ppS_{C10}-RNasa</i>	52
Figura 23. Identificación de TE con el servidor Dfam.....	58
Figura 24. Identificación de TEs con el servidor DPTEdb.....	67
Figura 25. BLASTX de secuencia <i>Gypsy-ppSC10</i> en el servidor Gypsy Data Base 2.0.....	69

Figura 26. BLASTX de secuencia <i>Gypsy-ppSc10</i> en el servidor NCBI.....	69
Figura 27. Identificación de ncRNA en RNACentral.....	72
Figura 28. TSS y caja TATA en la región 5' de <i>ppSc10-RNasa</i>	73

TABLAS

Tabla 1. Factores esenciales del sistema de AI gametofítica no ligados al <i>locus S</i>	9
Tabla 2. Motivos reguladores reportados como importantes para dirigir la expresión específica en pistilo.....	17
Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para DNA walking.....	80
Tabla 4. Plan de etiquetado de tubos para el PCR primario, DNA walking.....	81
Tabla 5. Condiciones de ciclo termal de PCR primario para DNA walking.....	81
Tabla 6. Plan de etiquetado de tubos para el PCR secundario.....	82
Tabla 7. Condiciones de ciclo termal de PCR secundario para DNA walking.....	83
Tabla 8. Cantidad recomendada de productos de PCR para ligación a pJET1.2/blunt.....	85
Tabla 9. Predicción de sitios de unión a factores de transcripción, resultados del PlanRegMap.....	100

Abreviaturas

24nt: 24 nucleótidos

AC: Autocompatible

AGO: ARGONAUTA

AI: Autoincompatibilidad

AIE: Autoincompatibilidad esporofítica

AIG: Autoincompatibilidad gametofítica

CLSY: CLASSY 1

CMT2: Cromometilasa 2

CMT3: Cromometilasa 3

DCL: Dicer-like

DF: Determinante femenina

DM: Determinante masculine

DMRs: Differentially methylated regions

DMS3: DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING3

DRD1: DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1

DRM2: Domains rearranged methyltransferase 2

DRM2: DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2

dsRNA: RNA de doble cadena (double stranded RNA)

gDNA: DNA genómico

GFP: Green fluorescent protein

GSP: Gene specific primer
H: Hoja
HDA6: Histone deacetylase 6
IDP: Parálogos de IND2
IND2: INVOLVED IN DE NOVO METHYLATION 2
JMJ14: JUMONJI 14
KYP: KRIPTONITE o SUVH4
lncRNA: RNA largo no codificante (long non-coding RNA)
LTR: Long Terminal Repeat
MET1: Metiltransferasa 1
MORC: Microrchidia
ncRNA: RNA no codificante
PB: Pistilo de Botón
PM: Pistilo Maduro
RdDM: Metilación de DNA dirigida por RNA (RNA directed DNA methylation)

RDM1: RNA DIRECTED DNA METHYLATION 1
RDR: RNA Polimerasa de dependiente de RNA
SHH1: SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1
siRNA: RNA pequeño interferente (small interfering RNA)
SPT5L: SUPPRESSOR OF TY INSERTION 5-LIKE
SSTFs: factores de transcripción específicos de secuencia
SWI/SNF: SWItch/Sucrose Non Fermentable
TEs: Elementos transponibles
TFs: Factores de transcripción
TSS: Sitio de inicio de la transcripción
UBP26: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 26
UTR: Untranslated región
VIM: Variante de metilación

RESUMEN

Para evitar la endogamia, las angiospermas han evolucionado con un sofisticado mecanismo genético denominado autoincompatibilidad, que se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autofecundación. Este sistema está controlado genéticamente por el *locus* S, que codifica para una S-RNasa de expresión específica en pistilo. La respuesta de rechazo del polen ocurre de manera eficiente durante la antesis, ya que en esta etapa se alcanzan la máxima acumulación de los transcritos de la S-RNasa y de otros genes indispensables para el mecanismo bioquímico.

El sistema de autoincompatibilidad se ha estudiado ampliamente a nivel de su regulación bioquímica pero existen pocos reportes respecto a la regulación transcripcional de los componentes de este sistema, por lo que el presente trabajo se centra en la regulación transcripcional del gen S-RNasa de *N. alata*.

Dado que actualmente la regulación transcripcional se estudia desde una perspectiva global que incluye la regulación en la región promotora y las marcas epigenéticas que coordinan la accesibilidad de la cromatina, para entender los componentes de la regulación transcripcional de la S-RNasa, se clonó una secuencia de aproximadamente 1400 pb y, a través de las predicciones *in silico*, se identificó un sitio de inicio de la transcripción, con un elemento Caja TATA y varios sitios de unión para factores de transcripción relacionados con el desarrollo de órganos florales, respuesta al estrés ambiental y fitohormonas. También se identificó el patrón de metilación del ADN de la hoja, del pistilo de botón y el pistilo maduro.

Los resultados obtenidos indican que las hojas tienen un bajo nivel de metilación del ADN en los tres contextos de secuencia (CG, CHG, CHH), lo que sugiere que la regulación

transcripcional no podría ser dirigida por la metilación del ADN. Por otro lado, la metilación del ADN del pistilo inmaduro fue mayor en ambos contextos CG y CHG, una característica de las regiones promotoras que se asocia comúnmente con el silenciamiento de genes, lo que concuerda con los resultados esperados. Contrariamente, la metilación del ADN en el pistilo maduro fue alta y con un enriquecimiento notable en un contexto de CHH, lo que concuerda con lo reportado en *Zea mays* como “límite heterocromatina-eucromatina” que incluyen niveles altos de metilación de CHH río arriba al sitio de inicio de la transcripción de genes altamente expresados, que además están adyacentes a elementos transponibles y esto concuerda con un incremento en la accesibilidad de la cromatina.

Río arriba del sitio de inicio de la transcripción de la *S-RNasa*, también se identificó un fragmento de retrotransposón LTR de la familia Gypsy de aproximadamente 300 pb en la posición -239 y este segmento corresponde a una secuencia trunca de la retrotranscriptasa reversa.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la regulación transcripcional de la *S-RNasa* es diferente para tejido vegetativo y para tejido de pistilo en diferentes etapas de desarrollo, siendo la metilación del DNA un mecanismo importante para la regulación además de estar implicado un elemento transponible.

ANTECEDENTES

Diversidad genética, endogamia y sistemas genéticos de autoincompatibilidad

Las angiospermas o plantas con flor, conforman aproximadamente el 90% de las especies de plantas (Niklas, 1997). Tal éxito es en parte consecuencia del conjunto de características reproductivas que evolucionaron con la flor como la polinización cruzada por insectos o animales. Dado que el 95% de las angiospermas son hermafroditas (Dellaporta y Calderon-Urrea, 1993), es decir que contienen los órganos masculinos y femeninos en la misma flor (Figura 1a), se incrementa el riesgo de autopolinización y autofecundación. La autopolinización ocurre cuando el polen se deposita sobre el estigma desde las anteras de la misma planta mientras que en la autofecundación los óvulos de una flor son fecundados por su propio polen, estos procesos biológicos favorecen la endogamia (Hiscock y Mcinnis, 2003) y propician que la variabilidad genética en las poblaciones disminuya provocando así depresión endogámica la cual se asocia con la pérdida de aptitud biológica (*fitness*), especialmente si se prolonga durante generaciones. Para evitar los efectos desfavorables que conlleva la endogamia, las plantas han desarrollado adaptaciones fisiológicas y morfológicas que impiden en gran medida la autopolinización y por tanto la autofecundación aunque no todas resuelven el problema de reproducción entre individuos genéticamente relacionados. Esto último ha sido resuelto en muchas especies por medio del sistema genético conocido como Autoincompatibilidad (AI), el cual es más eficiente, pues está basado en un reconocimiento célula-célula y funciona mediante mecanismos bioquímicos que regulan la aceptación o el rechazo del polen, por lo que el polen incompatible (polen propio o de individuos genéticamente muy relacionados) se

rechaza, evitando su germinación en algunos casos, o inhibiendo el crecimiento del tubo polínico de manera específica (Franklin-Tong y Franklin, 2003).

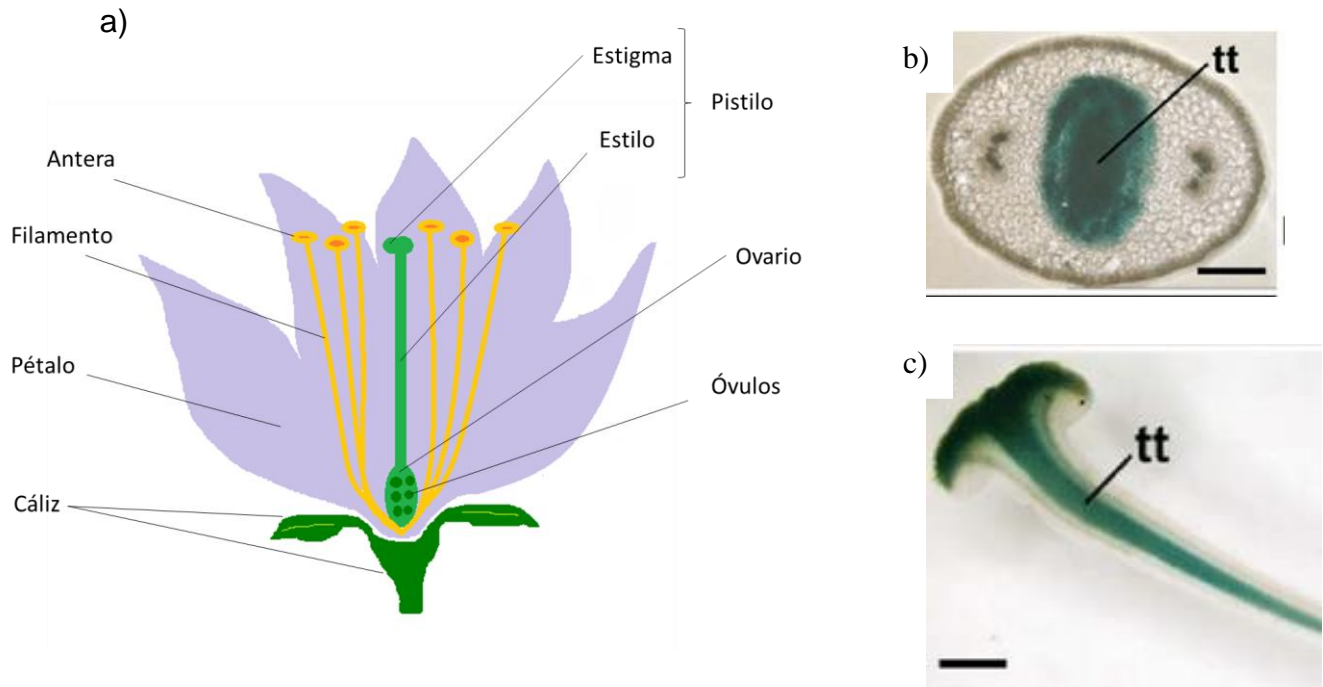


Figura 1. Morfología de la angiosperma hermafrodita

a) Diagrama de la morfología de la flor que incluye los pétalos, el cáliz, los órganos reproductivos femeninos (estigma, estilo, ovario, óvulos) y los órganos reproductivos masculinos (antera y filamento). b) Corte transversal del estilo, por tinción de GUS se muestra el tejido de transmisión (tt) en color azul. c) Corte longitudinal del pistilo, por tinción de GUS se muestra el tejido de transmisión (tt) en color azul. Imágenes (b) y (c) fueron modificadas de (Kubo *et al.*, 2007).

El mecanismo de AI ha contribuido de manera importante en el éxito evolutivo de muchas especies de angiospermas, por lo que se cree que actualmente el 60% de ellas lo presentan (Hiscock y Kües, 1999).

Los mecanismos de AI en plantas homomórficas (donde el pistilo y los estambres se encuentran a la misma altura) se clasifica según los genes involucrados en el sistema, los cuales se expresan de manera específica en los órganos reproductivos.

Se han definido dos clases principales de AI homomórfica a nivel genético: la gametofítica (AIG) y la esporofítica (AIE) (Nettancourt, 2001). Estos sistemas de AI, también se clasifican para su estudio en tres tipos según la familia de plantas en la que se han estudiado: AI tipo Brassicaceae, AI tipo Papaveraceae y AI tipo Solanaceae (Figura 2).

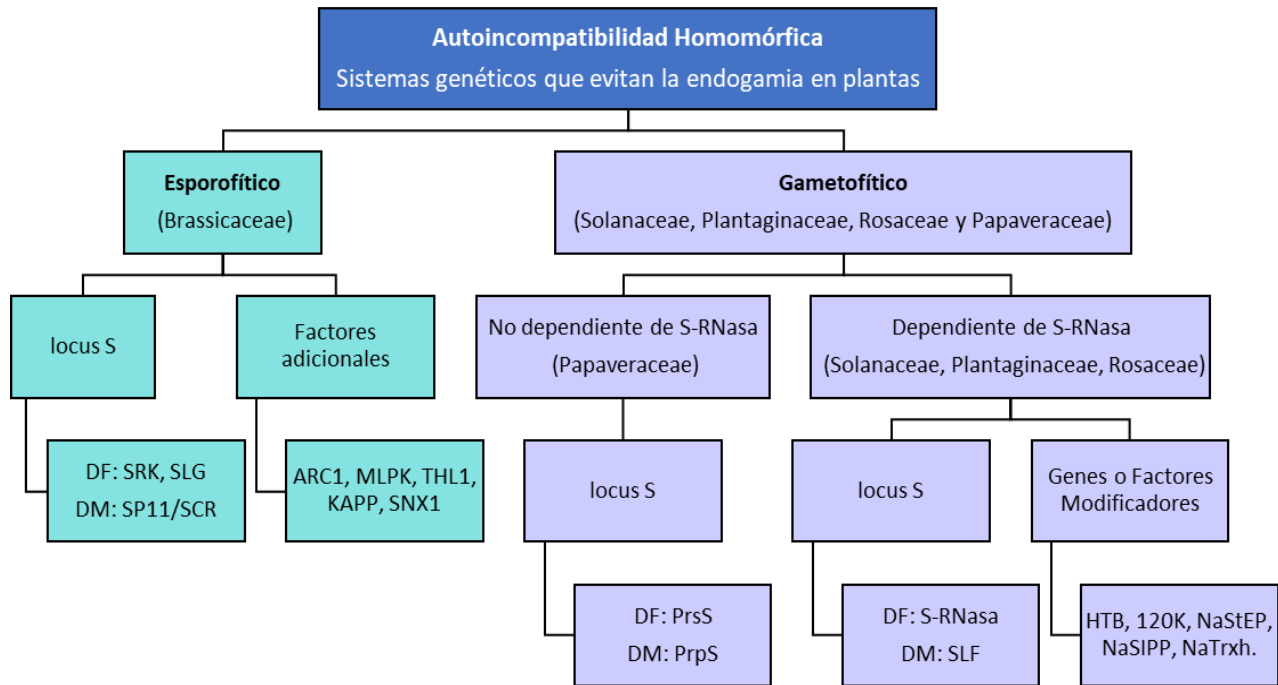


Figura 2. Clasificación de los sistemas de autoincompatibilidad homomórfica.

Los mecanismos de autoincompatibilidad homomórfica se clasifican en esporofítico y gametofítico. El sistema esporofítico de autoincompatibilidad se presenta en la familia Brassicaceae, en este sistema están implicadas las proteínas codificadas en el locus S (*SRK*, *SLG*, *SP11/SCR*) y otras proteínas implicadas en el mecanismo bioquímico. El sistema de autoincompatibilidad gametofítico se clasifica según la participación de una S-RNasa en el mecanismo bioquímico, el sistema no dependiente de S-RNasa se presenta en la familia Papaveraceae y los productos del locus S son PrsS y PrpS, mientras que el sistema dependiente de S-RNasa se presenta en las familias Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae y los productos del locus S son la S-RNasa y SLF. DF: determinante femenina, genes de expresión en pistilo; DM: determinante masculina, genes de expresión en polen. Datos tomados de (de Nettancourt, 2001; Hernández-Navarro *et al.*, 2009)

De manera general la AI se define como “la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para generar cigotos después de la autopolinización” y es controlada por un *locus* multialélico

llamado *locus S (Sterility)*, el cual impone la especificidad en el reconocimiento del polen. En este *locus* se encuentran al menos dos genes estrechamente ligados, uno expresado específicamente en el polen o Determinante Masculino (DM) y otro de expresión específica en el pistilo o Determinante Femenino (DF) (de Nettancourt, 2001). Ambas determinantes son polimórficas, se heredan como una misma unidad mendeliana y las variantes de este complejo de genes se denominan haplotipo S (Takayama y Isogai, 2005).

Clasificación de los sistemas de Autoincompatibilidad

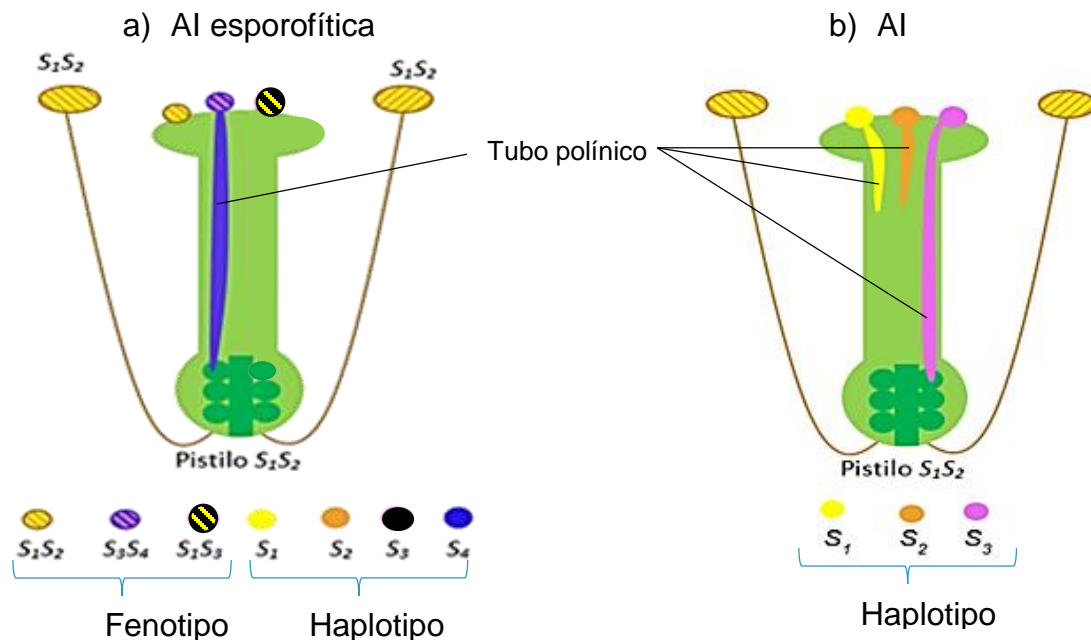


Figura 3. Sistemas de autoincompatibilidad homomórfica.

a) AI esporofítica: el fenotipo de incompatibilidad del polen es determinado por el genoma diploide de la antera donde se formó, por lo que el polen con fenotipo S_3S_4 (definido por las proteínas producidas en la antera que recubren el polen) podrá germinar y fecundar la planta de genotipo S_1S_2 . b) AI gametofítica: el fenotipo de incompatibilidad del polen es determinado por su propio genoma haploide, por lo que el tubo polínico producido por el polen de genotipo S_3 podrá crecer hasta el ovario y fecundar la planta de fenotipo S_1S_2 , mientras que se inhibe el crecimiento del polen con haplotipos S_1 y S_2 produciendo así el rechazo del polen.

En la autoincompatibilidad esporofítica (AIE), el fenotipo de incompatibilidad del polen es determinado por el genoma diploide de la antera en que se desarrolla (Figura 3a). Las proteínas

SCR (también llamadas SP11) codificadas por ambos alelos del *locus S*, se expresan específicamente en las anteras (tejido diploide) y recubren la superficie del polen, dicho recubrimiento proteico es reconocido de manera específica en la superficie del estigma por el receptor SRK y el co-receptor SLG, ambos codificados en el *locus S*. La interacción ligando-receptor define si el polen es compatible o incompatible, de ser incompatible el polen no germina y por tanto es rechazado. Este tipo de AI está presente en varias familias como Brassicaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Betulaceae, Caryophyllaceae, Sterculiaceae y Polemoniaceae (Hernández-Navarro *et al.*, 2009).

En la autoincompatibilidad gametofítica (AIG) dependiente de S-RNasa, el fenotipo de incompatibilidad del polen es determinado por su propio genoma haploide, por lo que el polen producirá a la determinante masculina SLF (producto de un solo alelo del *locus S*) la cual interacciona con la determinante femenina S-RNasa producida en el pistilo (proveniente de ambos alelos del *locus S*), dicha interacción define si el polen es compatible o incompatible (**Figura 3b**). La AIG se considera el tipo de AI más común. La determinante femenina, la ribonucleasa S-RNasa (McClure *et al.*, 1989), es una proteína altamente polimórfica que se expresa en estigma, estilo y ovario. Su nivel máximo de expresión se presenta en etapas de desarrollo cercanas a la antesis (McClure *et al.*, 1999).

La S-RNasa es una glicoproteína estilar cuya función como determinante S-específica se determinó mediante estudios de pérdida y ganancia de función en *Nicotiana glauca* y *Petunia inflata*, los cuales dieron evidencia que la S-RNasa controla el comportamiento de AI en el pistilo y por tanto es esencial para el rechazo del polen propio (Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994). Por estudios de mutagénesis del codón que codifica a una histidina de su sitio activo, fue posible abolir su actividad de ribonucleasa y con ello la capacidad de rechazar el propio polen

en plantas transgénicas de *P. inflata*, lo cual demostró que el mecanismo bioquímico de AI involucra la actividad ribonucleasa de la S-RNasa (Huang *et al.*, 1994). Mediante marcaje radioactivo del RNA de polen se demostró que éste se degrada específicamente después de una cruce incompatible, pero no así después de una cruce compatible y dado que el mRNA y rRNA son degradados se imposibilita la continuación del crecimiento del tubo polínico, por lo que es una citotoxina altamente específica (McClure *et al.*, 1990).

La determinante masculina denominada SLF se expresa específicamente en granos de polen (Sijacic *et al.*, 2004) y contiene un dominio Caja F; ya que muchas proteínas con Caja F (F box) se caracterizan por ser componentes del complejo E3 de ligasa de ubiquitina llamado SCF el cual está involucrado en el proceso de ubiquitinación y degradación específica de proteínas blanco mediante el proteasoma 26S, se ha propuesto que SLF podría formar parte del complejo SCF y producir la degradación específica de la S-RNasa (Moon *et al.*, 2004; Hua y Kao, 2006).

Además de S-RNasa y SLF se requieren otros factores para que se lleve a cabo de manera exitosa el mecanismo de AI y por consiguiente el rechazo del polen (Tabla 1) (McClure *et al.*, 2000), entre éstos se encuentran los genes: *HT-B* (McClure *et al.*, 1999), *120K* (Lind *et al.*, 1994a), *NaStEP* (Jimenez-Duran *et al.*, 2013; Busot *et al.*, 2008), *NaSIPP* (García-Valencia *et al.*, 2017) y *NaTrxh* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Torres-Rodriguez y F.C.G., no publicado). Estos factores no se encuentran ligados al *locus* S pero son esenciales para llevar a cabo el mecanismo bioquímico del rechazo del polen.

Tabla 1. Factores esenciales del sistema de AI gametofítica no ligados al locus S.

Factor	Descripción
HT-B	<p><i>HT-B</i> (High-Top Band) tiene expresión específica en estilo de la especie AI <i>N. alata</i> (O'Brien <i>et al.</i>, 2002) y su nivel máximo de expresión se presenta en etapas de desarrollo cercanas a la antesis. Este factor contribuye directamente al sistema de AI, ya que mediante estudios de pérdida de función en plantas transgénicas se encontró que su supresión incapacita a la planta para rechazar su propio polen (McClure <i>et al.</i>, 1999).</p> <p>En una cruce compatible HT-B se degrada en el tubo polínico y la S-RNasa permanece en un estado compartimentalizado. De modo opuesto, en una cruce incompatible HT-B permanece estable, lo que sugiere que su estabilidad es crucial para el mecanismo de AI (Goldraij <i>et al.</i>, 2006; Franklin-Tong, 2008).</p>
120K	<p>Es una glicoproteína que se encuentra de manera abundante en pistilo de <i>N. alata</i>, aunque también se expresa en especies AC de <i>Nicotiana</i>. Se localiza en la matriz extracelular del tracto de transmisión del estilo y está conservada en otras especies de la familia Solanaceae (Lind <i>et al.</i>, 1994b).</p> <p>En pistilos polinizados 120K cambia su localización y se concentra en la matriz extracelular adyacente al tubo polínico, en el citoplasma y la pared celular del tubo polínico (Lind <i>et al.</i>, 1994; 1996). Al analizar la interacción de la S-RNasa con proteínas estilares se encontró que 120K se une a la S-RNasa como parte de un complejo de proteínas estilares (Cruz-García <i>et al.</i>, 2003; 2005).</p> <p>Al suprimir la expresión de 120K por RNAi, la habilidad para rechazar el polen propio de manera S-específica es deficiente, pero la supresión de 120K no mostró efecto sobre una polinización compatible descartando su función en el crecimiento del tubo polínico (Hancock <i>et al.</i>, 2005).</p>

NaStEP	<p>El gen <i>NaStEP</i> codifica un inhibidor de proteasas tipo Kunitz y su transcrito se encuentra altamente expresado en pistilos maduros de <i>N. alata</i> (AI), pero es indetectable en pistilos maduros de <i>N. plumbaginifolia</i> (AC). Se localiza específicamente en estigmas de <i>Nicotiana</i> AI. Este factor se deposita en vacuolas estigmáticas que son liberadas en el exudado estigmático durante la polinización (Busot <i>et al.</i>, 2008).</p> <p>Plantas con NaStEP suprimida aceptan el crecimiento del tubo polínico hasta la base del pistilo sin importar el haplotipo S del polen y en cruza compatibles e incompatibles NaStEP cambia su localización a la superficie del estigma e ingresa al tubo polínico. También hay evidencias que indican que la estabilidad de HT-B disminuye en tubos polínicos de pistilos en ausencia de NaStEP, lo que sugiere que NaStEP es necesario para mantener la estabilidad de HT-B en el tubo polínico durante la respuesta de rechazo del polen, aunque no se ha demostrado el mecanismo específico (Jimenez-Duran <i>et al.</i> 2013; Cruz-González Zamora 2018).</p>
NaSIPP	<p>Identificada en <i>N.alata</i>, NaSIPP es una proteína mitocondrial con actividad transportadora de fosfato e interacciona físicamente con NaStEP en las mitocondrias del tubo polínico, lo cual señala que la interacción entre ambas ocasiona la relocalización de NaStEP a mitocondrias.</p> <p>El transcrito de <i>NaSIPP</i> se detecta específicamente en polen maduro de <i>Nicotiana spp</i>; sin embargo, en especies AC el gen ha acumulado mutaciones en su región codificadora interrumpiendo el marco de lectura. La supresión de <i>NaSIPP</i> por RNAi interrumpe el mecanismo de AI por lo que es esencial para el sistema (García Valencia 2013; García-Valencia <i>et al.</i> 2017; Nájera-Torres 2018).</p>
NaTrxh	<p>El gen <i>NaTrxh</i> codifica para una tiorredoxina tipo h, la cual se acumula de manera importante en el pistilo de especies AI y se secreta al espacio extracelular del tejido de transmisión. NaTrxh interacciona con la S-RNasa y la reduce provocando un aumento significativo en la actividad ribonucleasa de la S-RNasa (Juárez-Díaz <i>et al.</i> 2006; Ávila-Castañeda <i>et al.</i> 2014; Torres-Rodríguez 2018). Experimentos funcionales indican que la actividad reductora de NaTrxh sobre la S-RNasa es crucial para la respuesta del rechazo del polen (Torres-Rodriguez y F.C.G, no publicado)</p>

Se han propuesto modelos para el mecanismo de rechazo del polen dependiente de S-RNasa en la AI tipo Solanaceae. El modelo de compartimentalización de la S-RNasa (Figura 4) incorpora la observación de que el tubo polínico internaliza la S-RNasa con el mismo o diferente haplotipo S, mediante endocitosis para mantenerlas en una vacuola y que HT-B es degradada en cruza

compatibles, pero permanece estable en cruzas incompatibles. En una crusa compatible se conserva la integridad de las vacuolas del tubo polínico permitiendo que continúe su crecimiento hacia el ovario, mientras que en una crusa incompatible las vacuolas que contienen a la S-RNasa se rompen, liberando la ribonucleasa al citoplasma en donde degrada al RNA, esto conlleva a la inhibición del crecimiento del tubo polínico y por consiguiente a su muerte.

En este modelo, la interacción de la S-RNasa (propia o no propia) con SLF determina directamente la especificidad del rechazo del polen (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006), y también se incluye la participación de los genes modificadores (*HT-B*, *120K* y *NaStEP*) y explica cómo el tubo polínico restringe la gran cantidad de S-RNasa por medio de la compartimentalización vacuolar, además de suponer que la ruptura de las vacuolas que contienen la S-RNasa es una consecuencia de la interacción específica entre las determinantes S-RNasa y SLF (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006).

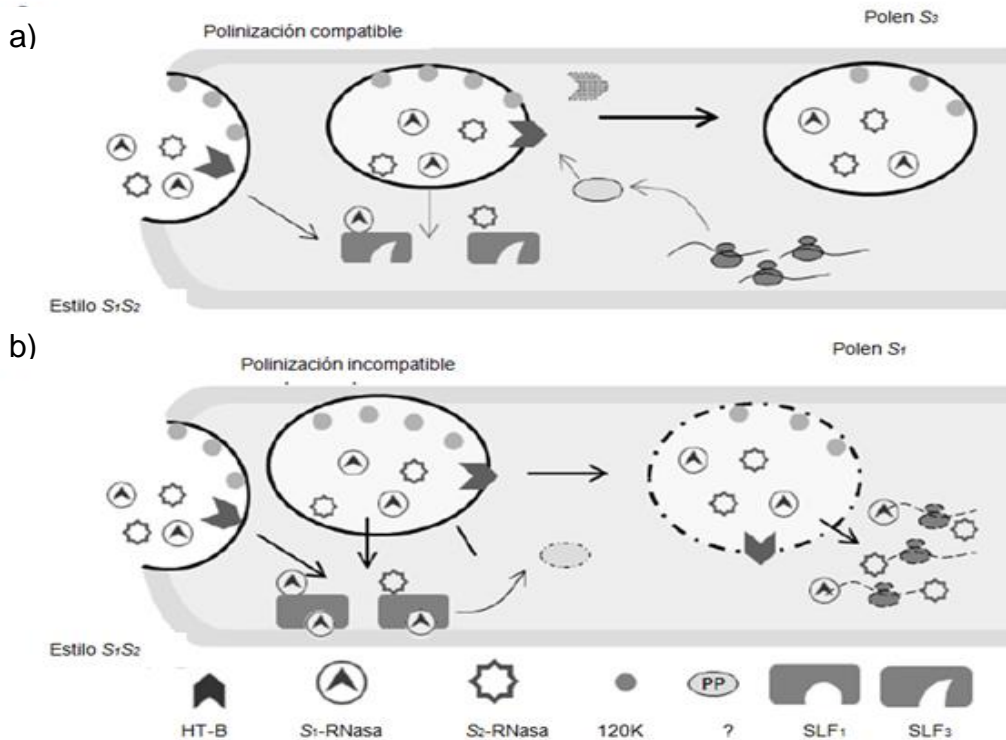


Figura 4. Modelo de compartimentalización del sistema de AI gametofítica.

a) En una cruz compatible entre una planta S_1S_2 y polen S_3 , ambas S-RNasas entran por endocitosis al tubo polínico junto con HT-B y 120K. No hay interacción específica entre S_1 -RNasa y S_2 -RNasa con SLF_3 , HT-B es degradado por una proteína estabilizadora (PP) hipotética y como consecuencia la S-RNasa se mantiene recluida en vacuolas. b) En una cruz incompatible entre una planta S_1S_2 con polen S_1 , ambas S-RNasas entran por endocitosis al tubo polínico y permanecen en vacuolas en etapas tempranas. El reconocimiento específico entre S_1 -RNasa y SLF_1 evitan la degradación de HT-B, la vacuola se rompe y libera S-RNasas al citoplasma. Modificado de Hernández-Navarro *et al.*, 2009.

El mecanismo de AI está fuertemente regulado a nivel bioquímico y además existe evidencia de que la determinante femenina *S-RNasa* y los factores no ligados al *locus S* (Tabla 1) exhiben un patrón de expresión específico en cuanto a la especie, el tejido y la etapa de desarrollo, por lo que la regulación de la expresión de estos genes también es importante para el mecanismo de rechazo del polen.

Sistema de AI durante el desarrollo de la flor

A lo largo del desarrollo de la flor, el sistema de autoincompatibilidad es más eficiente cuando abre la flor, es decir durante la antesis, esto en relación a la parte femenina del sistema, pues los pistilos en estado receptivo (etapa de madurez en que pueden ser polinizados) son completamente capaces de rechazar su propio polen. Antes de esta etapa, es decir durante el desarrollo del botón, las especies autoincompatibles pueden aceptar su propio polen en cantidades limitadas y producir semillas. Bajo este principio es posible generar individuos homocigos para el *locus S* (Nettancourt 2001).

La eficacia del rechazo del polen durante la antesis coincide además con un aumento en la acumulación de los transcritos provenientes de los genes estilares *S-RNasa*, *HT-B* (McClure *et al.*, 1999) y *NaStEP* (Busot *et al.*, 2008) (Figura 5) y aunque no se han reportado datos sobre la acumulación del transcrito, existe también evidencia de que la proteína 120K (Lind *et al.*, 1994) presenta mayor acumulación en pistilo durante la antesis (Figura 6).

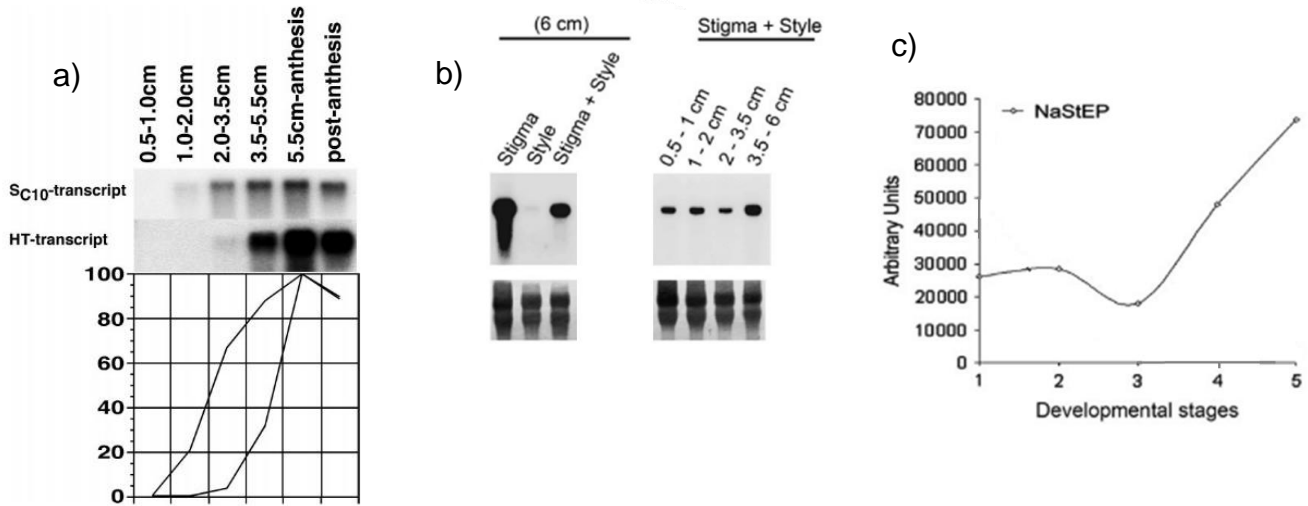


Figura 5. Acumulación del producto de los genes estilares *S-RNasa*, *HT-B* y *NaStEP*

a) Acumulación del transcrito de *HT-B* y *S-RNasa* en *N. alata* en diferentes etapas del desarrollo del pistilo (estilo y estigma). Blot de RNA: sondas marcadas con ³²P para *HT-B* y *S_{c10}-RNasa*. Imagen superior muestra autoradiografía, imagen inferior muestra cuantificación de la señal normalizada a la mayor señal. Modificado de (McClure *et al.*, 1999). b-c) Acumulación del transcrito de *NaStEP* de *N. alata* en diferentes etapas del desarrollo del pistilo (estilo y estigma). Blot de RNA: sonda marcada con ³²P para *NaStEP*. b) Autoradiografía. b) Cuantificación de la señal en unidades arbitrarias, números 1 a 5 representan la etapa de desarrollo del pistilo: 1, 0.5-1.0cm; 2, 1-2 cm; 3, 2-3.5 cm; 4, 3.5-6 cm y 5, 6 cm. Modificado de (Busot *et al.*, 2008).

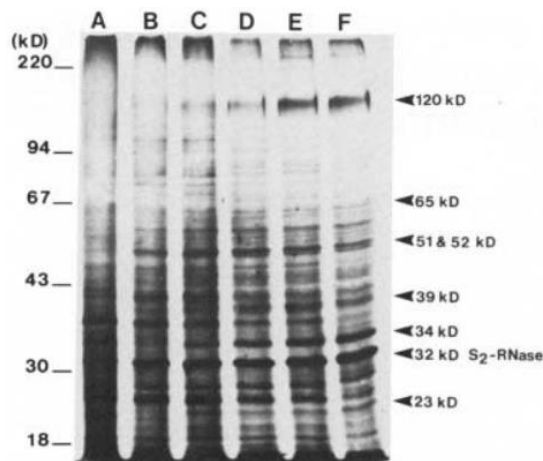


Figura 6. Extracto proteico de pistilo de *N. alata* en diferentes etapas de desarrollo

Electroforesis en gel SDS-PAGE, tinción con plata. (A) Botón verde, (B) botón corto, (C) botón elongado, (D) coloración del pétalo, (E) antesis, (F) post-antesis. Las proteínas 120K y S₂-RNase se localizan en 120 kD y 32 kD respectivamente.

Los datos antes mostrados indican que la expresión de estos genes se encuentra regulada de forma que las proteínas involucradas en el mecanismo bioquímico estén presentes en etapas cercanas a la antesis y en conjunto puedan rechazar el polen cuando el estigma es más receptivo a la polinización.

Hasta la fecha, la investigación en torno al sistema de AI se he centrado principalmente en elucidar el mecanismo bioquímico del rechazo del polen y la regulación de este sistema a nivel transcripcional es un campo poco explorado. Aquí reside la importancia de explorar también la regulación genética y epigenética del sistema de AI a nivel transcripcional pues esto podrá contribuir a esclarecer el sistema de autoincompatibilidad sexual desde un enfoque diferente.

Componentes de la Regulación Transcripcional

Regulación a nivel de secuencia del DNA

La transcripción de un gen está dirigida por la unión de proteínas específicas denominadas factores de transcripción (TFs) a una región del DNA que tiene como función regular la transcripción, ésta se localiza comúnmente en la región 5' río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS: *Transcription Start Site*) y se conoce como promotor.

Además de la regulación transcripcional dada por la unión coordinada de muchos TFs a la región promotora, también influyen regiones activadoras o represoras. La combinación específica de sitios de unión a TFs puede proveer información que sugiera un contexto de expresión particular, es decir, los factores fisiológicos o ambientales que dirigen la expresión del gen (Fickett y Hatzigeorgiou, 1997; Yamamoto *et al.*, 2007). Por tanto, la regulación de la transcripción depende de la disponibilidad y de la actividad de los TFs, así como del tipo,

número, posición y combinación de los elementos reguladores presentes en el promotor y otras regiones reguladoras.

Estructuralmente, un promotor se divide en la región distal y la proximal. La región proximal comprende desde el TSS e incluye una región llamada núcleo del promotor (Smale y Kadonaga, 2003), el cual contiene la secuencia necesaria para guiar la iniciación de la transcripción de manera correcta. Esta zona incluye el TSS y los elementos que se encuentran conservados de manera general en muchos organismos eucariontes (Butler y Kadonaga, 2002). Tal es el caso de la Caja *TATA* (en promotores de tipo TATA), el elemento *Inr* o iniciador (en promotores de tipo TATA-less), el elemento de reconocimiento *B* (BRE) y el elemento río abajo del promotor o *DPE* (*downstream promoter element*).

El complejo de preiniciación de la transcripción (PIC) reconoce al núcleo del promotor e inicia la transcripción, este complejo incluye además de la RNA polimerasa II a los factores de transcripción TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH (también llamados factores generales o basales de la transcripción), siendo algunos de estos, a su vez, complejos proteicos. Los factores de transcripción basales se llaman así ya que son los factores mínimos necesarios para llevar a cabo la transcripción desde el núcleo de promotor aislado en un sistema *in vitro*. La mayoría de los estudios realizados sobre los factores de transcripción basales, se han hecho en promotores que contienen la caja TATA como elemento esencial del núcleo del promotor (Smale y Kadonaga, 2003), es importante destacar que aunque la Caja TATA es el motivo más estudiado presente en el núcleo del promotor, se encuentra sólo en el 10-15% de los promotores eucariontes (Juven-Gershon y Kadonaga, 2010).

Expresión específica espacio temporal

Las interacciones entre elementos reguladores río arriba del TSS con factores de transcripción específicos de secuencia (SSTFs) determinan el tiempo, el lugar y el nivel de actividad de todos los genes no constitutivos dentro de una red de expresión altamente controlada. En el caso de *S-RNasa*, *HT-B* y *120K*, su expresión específica en el tejido de transmisión del estilo maduro (tejido por donde crecen los tubos polínicos), sugiere que la secuencia de sus promotores podrían tener elementos de regulación comunes que pudieran ser sitios de unión a factores de transcripción que dirijan su expresión específica en etapas del desarrollo cercanas a la antesis, además de contener elementos que se han reportado como pertenecientes al núcleo del promotor.

Mediante diversos estudios de mutación dirigida, eliminación de bases y análisis *in silico*, se han identificado secuencias conservadas en algunos promotores de genes específicos de expresión en pistilo como los que se muestran a continuación (Tabla 2), estos ejemplos incluyen al gen *S-RNasa* de *Solanum* y *Petunia*, así como a la determinante masculina *SLG* de sistema de AI en *Brassica*.

Tabla 2. Motivos reguladores reportados como importantes para dirigir la expresión específica en pistilo

Motivo	Gen	Secuencia	Referencia
motivo III <i>Solanum tuberosum</i> S1-1	<i>S₁-RNasa</i>	ACATAAT	(Kaufmann <i>et al.</i> , 1991)
motivo III <i>Solanum tuberosum</i> S1-2	<i>S₁-RNasa</i>	ATTATGT	
motivo III <i>Solanum tuberosum</i> S2-1	<i>S₂-RNasa</i>	ACATAAT	
motivo III <i>Solanum tuberosum</i> S2-2	<i>S₂-RNasa</i>	ATTATAT	
motivo III <i>Solanum chacoense</i> S11-1	<i>S₁₁-RNasa</i>	ATGTAAA	(Saba-el-Leil <i>et al.</i> , 1994)

motivo III <i>Solanum chacoense</i> S11-2	<i>S₁₁-RNasa</i>	TTTACAT	
motivo III <i>Petunia inflata</i> S1-1	<i>S₁-RNasa</i>	ACATAAA	(Coleman y Kao, 1992)
motivo III <i>Petunia inflata</i> S1-2	<i>S₁-RNasa</i>	ATTATGT	
motivo III <i>Petunia inflata</i> S3-1	<i>S₃-RNasa</i>	ACATAAA	
motivo III <i>Petunia inflata</i> S3-2	<i>S₃-RNasa</i>	ATTATGT	
motivo III-related <i>Brassica</i> SLG13	<i>SLG₁₃</i>	CCATATGTTATGTT	(Dzelzkalns et al. 1993)
motivo III-related <i>Brassica</i> SLG1	<i>SLG₁</i>	ACATATGATATGTT	
motivo III-related <i>Brassica</i> SLG2	<i>SLG₂</i>	CCATATGCTATGTT	
motivo III-related <i>Arabidopsis</i> Ats1	<i>Ats1</i>	ACATATGTTATGTT	(Dwyer et al. 1994)
motivo III-related <i>Pyrus serotina</i> PsTL1	<i>PsTL1</i>	ACATAGTATATGTT	(Sassa et al., 2002)

Aunque la secuencia del promotor es muy importante para regular la transcripción, existen otros mecanismos que no dependen directamente de la secuencia de DNA. Estos incluyen: la metilación en posición 5' de la base nitrogenada citosina (metilación de DNA) y las modificaciones post transcripcionales de las histonas, lo que permite establecer diferentes estados de condensación y accesibilidad de la cromatina.

Regulación epigenética, metilación del DNA y accesibilidad de la cromatina

Mecanismos de metilación del DNA en plantas

Desde una perspectiva integral, para que sea posible el reclutamiento de toda la maquinaria de transcripción al promotor es necesario que se lleve a cabo la descondensación del *locus*,

esto mediante la modificación de histonas y el rearrreglo de nucleosomas. Asimismo, dicha región del DNA debe encontrarse en un estado de metilación determinado, esto se conoce como regulación epigenética (Bird 2007). Las modificaciones epigenéticas consisten en alteraciones químicas del DNA e histonas que se asocian a cambios en la expresión de genes y son heredables pero no alteran la secuencia primaria del DNA (Law y Jacobsen, 2010). Este tipo de regulación incluye, tres mecanismos principales: la metilación de DNA, la modificación de histonas y el silenciamiento por RNAs pequeños (Allis y Jenuwein, 2016).

La metilación del DNA fue el primer mecanismo epigenético conocido por correlacionar con la expresión genética, consiste en la adición de un grupo metilo en la base citosina. Es una marca estable regulada dinámicamente y generalmente se asocia al silenciamiento de genes eucariontes, además de estar conservada en la evolución (He *et al.*, 2011). Las regiones centroméricas, pericentroméricas, intergénicas y regiones de elementos repetidos así como las que producen siRNAs, generalmente se encuentran hipermetiladas para mantener la integridad del genoma, entre otras funciones. En contraste, las regiones promotoras de genes que se expresan diferencialmente, se encuentran hipometiladas (en su mayoría) y estos patrones son generalmente estables; sin embargo, algunas regiones reguladoras presentan metilación variable dependiendo del tipo celular y de las condiciones celulares, denotando así el componente dinámico de la regulación epigenética (Zhang *et al.*, 2006; Weber y Schübeler 2007).

La metilación del DNA se puede clasificar de dos formas: la metilación de novo y la metilación de mantenimiento. La primera se refiere a metilación de DNA que previamente se encontraba no metilado, mientras que la metilación de mantenimiento permite conservar los patrones de metilación durante la replicación del DNA.

En plantas, la metilación del DNA se presenta en los tres contextos de citosinas, el contexto simétrico CG y CHG, además del contexto asimétrico CHH (donde H corresponde a T, A o C). Este proceso se lleva a cabo por medio de tres mecanismos: vía MET1, vía CMT2-CMT3 y vía RdDM (

Figura 7).

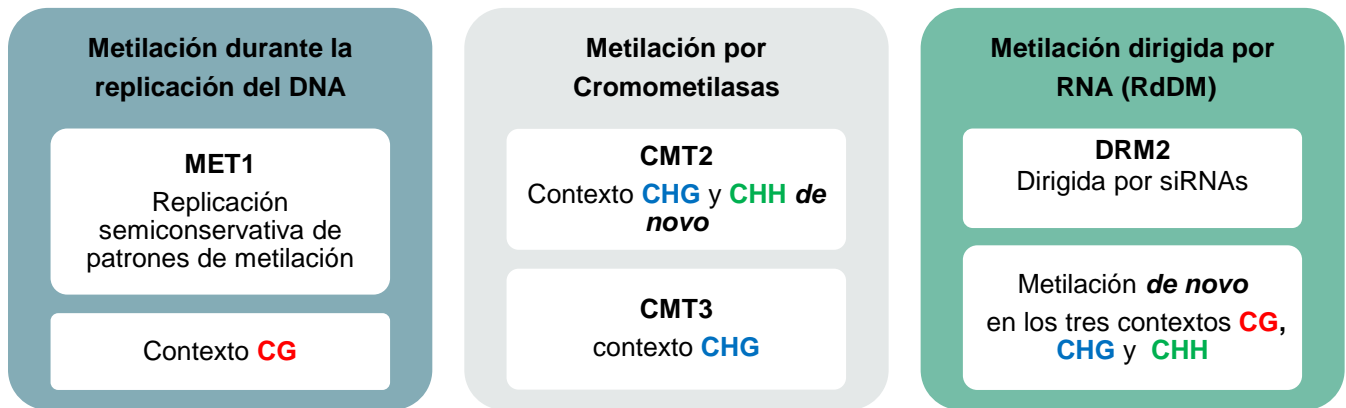


Figura 7. Resumen de los mecanismos de metilación del DNA presentes en células vegetales.

La metilación en el DNA que ocurre durante la replicación se produce únicamente en contexto CG mediante la metiltransferasa 1 (MET1). La metilación del DNA producida por las metiltransferasas llamadas cromometilasas 2 y 3 (CMT2 y CMT3), producen metilación *de novo* en los contextos no-CG, que incluyen el contexto CHG y el CHH. La metilación de DNA dirigida por RNA o RdDM (RNA directed DNA methylation), genera metilación *de novo* en los tres contextos de secuencia y depende de siRNAs.

El mantenimiento de la metilación ocurre en cadenas de DNA hemimetiladas que se forman después de la replicación o la reparación del DNA y consisten en cadenas híbridas formadas por una hebra metilada y una hebra no metilada. La metiltransferasa 1 (MET1) actúa únicamente en el contexto CG y su función principal es conservar los patrones de metilación del DNA durante la replicación. Una función importante de este proceso es asegurar el silenciamiento de transposones y pseudogenes, manteniendo así la integridad del genoma.

Los sitios CG hemimetilados generados durante la replicación del DNA son reconocidos, en *A. thaliana*, por las proteínas de la familia VIM (variante de metilación, también conocida como ORTH), que posteriormente reclutan a MET1 para generar el estado CG completamente metilado y así mantener los patrones de metilación (Ronemus *et al.*, 1996; Kraft *et al.*, 2008).

En la metilación *de novo*, están implicadas las vías de metilación por cromometilasas y la vía RdDM (Kawashima y Berger, 2014). En la vía de metilación por cromometilasas, la metilación del DNA en contexto CHG es producida por CMT3 (Cromometilasa 3) y la metilación en CHH por CMT2 (Cromometilasa 2), esta vía de metilación es capaz de reclutar a la metiltransferasa de histonas KRYPTONITE (KYP o SUVH4) que produce la dimetilación de la histona H3 en la lisina 9 o H3K9me2 (Lindroth *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2007); de este modo CMT3 o CMT2 se une a la marca H3K9me2 y metila el DNA en los sitios CHG o CHH cercanos y a su vez el DNA metilado recluta a SUVH4 creando así un ciclo de retroalimentación positiva en el cual se propagan dichas marcas a lo largo del genoma (Du *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2015).

En el mecanismo general de metilación vía RdDM o metilación de DNA dirigida por RNA están implicados dos tipos de RNAs, los siRNAs (small interfering RNAs) y los lncRNAs (long non-coding RNAs). Los siRNAs de 24 nucleótidos (24-nt) involucrados en la vía canónica se derivan de RNAs largos de doble cadena (dsRNAs) y confieren la especificidad de secuencia en la metilación del DNA, mientras que los lncRNAs coordinan el ensamblaje de la maquinaria de metilación en un locus específico actuando como un RNA andamio (scaffold RNA). La síntesis y el funcionamiento de estos RNAs para dirigir la vía RdDM requiere de algunas proteínas involucradas en la maquinaria de RNAs interferentes: DICER-LIKE (DCL), RNA Polimerasa de dependiente de RNA (RDR), y ARGONAUTA 4 (AGO4). Además requiere factores específicos de plantas, estos son: RNA polimerasa IV y RNA polimerasa V. La RNA polimerasa IV produce

los siRNAs que dirigen la metilación, mientras que la polimerasa V actúa río abajo permitiendo la metilación *de novo* en el *locus* reconocido por los siRNAs al sintetizar lncRNAs que son reconocidos por las proteínas AGO unidas a siRNAs, esta unión conduce al reclutamiento de la maquinaria de silenciamiento. El silenciamiento se lleva a cabo por factores específicos que incluyen a la metiltransferasa DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYL-TRANSFERASE 2) y al remodelador de la cromatina DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1), los cuales son necesarios para la transcripción de las polimerasas IV y V (Matzke *et al.*, 2015).

La polimerasa V requiere de otras proteínas poco descritas como RDM1 (RNA DIRECTED DNA METHYLATION 1), DMS3 (DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING3), SPT5L (SUPPRESSOR OF TY INSERTION 5-LIKE) y las proteínas MORC (microorchidia). Por otra parte, la polimerasa IV es reclutada a *loci* específicos a través de la proteína SHH1 (SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1), la cual contiene un dominio que reconoce las H3K4 no metiladas y las H3K9 metiladas. El reclutamiento de la polimerasa V hacia *loci* con metilación de DNA preexistente se lleva a cabo por las proteínas SUVH2 y SUVH9, las cuales reconocen la metilación en contexto CG (Figura 8) (Wierzbicki *et al.* 2012; Matzke y Mosher 2014).

La metilación del DNA es una marca que puede ser reversible dependiendo de la etapa de desarrollo o del ambiente, en plantas, este proceso se lleva a cabo por medio de las enzimas DNA glicosilasa DEMETER y REPRESSOR OF SILENCING1 (ROS1) (Zhu 2009).

Pol IV-RDR2

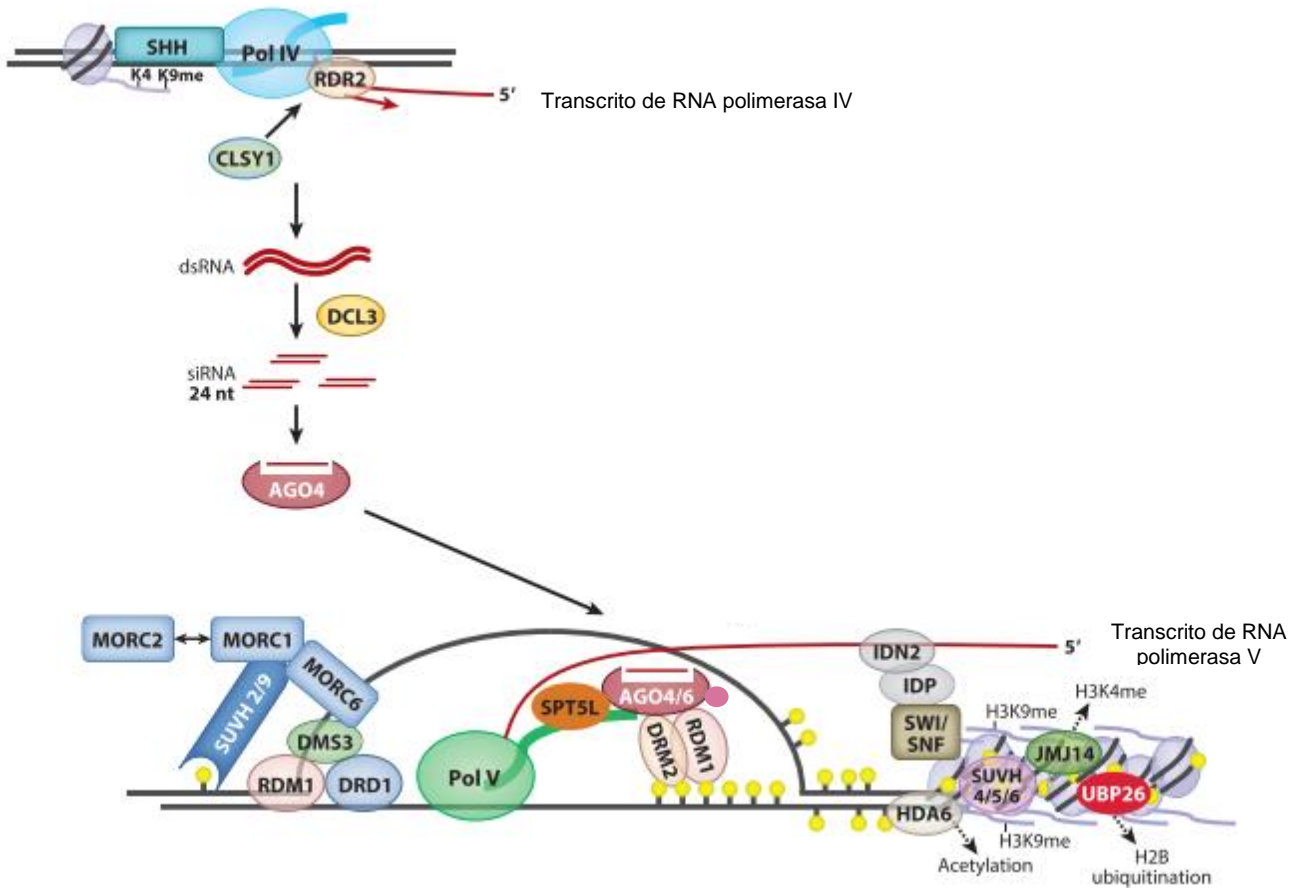


Figura 8. Vía RdDM canónica, modificado de Matzke et al., 2015.

a) *Biogénesis de siRNA's*: SHH1 se une a la H3K4 (lisina 4 en la histona 3) no metilada y a la H3K9 (lisina 9 en la histona 3) metilada y recluta a la RNA polimerasa IV que transcribe la región. RDR2 interacciona con la RNA polimerasa IV y convierte los transcritos de la polimerasa IV en dsRNAs (RNAs de doble cadena) con la participación del remodelador de la cromatina CLSY1. Los dsRNAs se procesan por medio de DCL3 en siRNAs de 24-nt y la cadena guía se incorpora a la proteína AGO4, posteriormente, este complejo entra a la vía de metilación de novo mediada por la RNA polimerasa V. b) *Formación de heterocromatina y metilación de DNA dependiente de RNA polimerasa V*: la polimerasa V es reclutada por las proteínas SUVH2 y SUVH9 a un locus específico, transcribe el locus produce un lncRNA. Por complementariedad de bases, al lncRNA se une el siRNA guía unido a AGO4. AGO4 interacciona con SPT5L, RDM1 y DRM2, donde DRM2 produce la metilación del DNA (círculos amarillos) en el sitio indicado por el siRNA. RDM1 también podría funcionar con DRD1 y DMS3 para facilitar la transcripción de la polimerasa V abriendo la doble cadena del DNA. Las proteínas MORC se asocian a SUVH2/9 e interaccionan con DMS3 para formar un complejo que genera y al mismo tiempo estabiliza la abertura de la doble cadena del DNA. c) *Los transcritos de la polimerasa V están implicados con la formación de heterocromatina*: el complejo IDN2/IDP se une al transcrito de la polimerasa V y recluta al complejo SWI/SNF para posicionar los nucleosomas para su metilación. Las marcas relacionadas con eucromatina como H3K4me3, acetilación y ubiquitinación, son eliminadas del nucleosoma por JMJ14, HDA6 y UBP26 respectivamente (flechas punteadas). SUVH4-6 cataliza la formación de la marca represiva H3K9me para reforzar el silenciamiento. *Nota: Todos los siRNAs se estabilizan por metilación producida por HEN1 (HUA ENHANCER 1) en el extremo 3' (no ilustrado).

Al analizar la metilación global en *A. thaliana*, se descubrió que regiones pericentroméricas heterocromatinizadas, secuencias repetidas y regiones que producen RNAs pequeños, se encuentran densamente metiladas (Zhang *et al.*, 2006). También se encontró que un tercio de los genes que se expresan contienen metilación en la región que se transcribe (cuerpo del gen) y estos corresponden a genes altamente expresados y activos de forma constitutiva. En cambio, sólo el 5% de los genes incluyen metilación en la región promotora, muchos de los cuales presentan un alto grado de expresión tejido- especificidad (Zhang *et al.*, 2006).

La metilación en el cuerpo del gen es una característica conservada en diferentes especies de plantas, mamíferos y otros eucariontes. Con mayor frecuencia se localiza en los exones (Feng *et al.*, 2010); si bien no se conoce la función de la metilación en el cuerpo del gen, se sugiere que suprime la transcripción de secuencias que podrían interferir con la regulación transcripcional (Tran *et al.*, 2005). Aunque el alcance de este estudio no define el contexto de metilación principal en cada una de las regiones analizadas, resalta la importancia de la metilación del DNA como mecanismo de control de la expresión genética y para mantener la estabilidad del genoma.

La metilación del DNA no es una marca constante pues depende del ambiente y del contexto genómico. Un ejemplo de esto son las regiones con metilación diferencial (DMRs: differentially methylated regions) que se han reportado en el genoma de *Zea mays* (maíz). Al analizar diferentes líneas genéticas del maíz, se encontró que estas discrepancias en los patrones de metilación están relacionadas con polimorfismos de un solo nucleótido encontrados adyacentes o dentro de la región diferencialmente metilada, además de que muchos de los DMRs están agrupados dentro de elementos transponibles (su papel en la regulación transcripcional e integridad del genoma se menciona más adelante) (Eichten *et al.*, 2013), por lo que la metilación

se ve afectada por la inserción variable e inconsistente de elementos transponibles presentes en cada línea analizada, a estos casos se les ha denominado epialelos obligados (Richards 2006).

Además de los epialelos obligados, también existen epialelos independientes de la secuencia del locus o de loci adyacentes, los cuales se construyen únicamente por mecanismos epigenéticos (como los siRNAs) por lo que se les designa con el nombre de epialelos puros (Richards, 2006). Cada tipo de epialelo presenta heredabilidad diferente, los epialelos puros no siempre son heredables además de que con mucha frecuencia pueden ser reversibles (un ejemplo es *Lcyc* que codifica para la proteína cicloidea), a comparación de los epialelos obligados (característica que explica el efecto de dominancia entre alelos de *SP11*).

A continuación se mencionan ejemplos concretos sobre la regulación de la expresión genética en plantas que sirven como modelos que permiten explicar la relación que existe entre el entorno genético y las marcas epigenéticas que están detrás de un fenotipo específico.

Casos particulares de regulación de la expresión genética en plantas mediada por marcas epigenéticas

Epimutante *Lcyc* en *Linaria vulgaris*

Un caso de control de la expresión debida a metilación del DNA es la mutante natural de *L. vulgaris*, donde la simetría de la flor cambia de bilateral a radial (**Figura 9**). *Lcyc* es un ortólogo del gen que codifica para la proteína cicloidea (*cyc*) que controla la simetría floral en *Antirrhinum* y en comparación con la planta silvestre, la mutante de simetría radial (pelórica) no tiene expresión de *Lcyc*. Al analizar la secuencia de *Lcyc* en ambos fenotipos, se encontró que existen polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's) (Restriction

Fragment Length Polymorphism) en el fenotipo pelórico, aunque a nivel de secuencia de DNA existe polimorfismo en un solo nucleótido en la región 3' del gen.

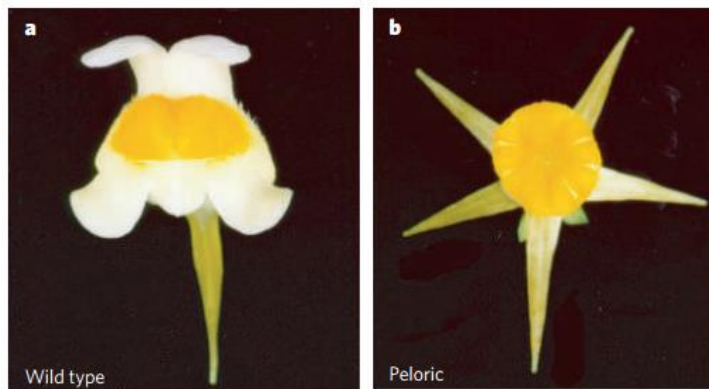


Figura 9. Morfología floral de *Linaria vulgaris* silvestre y mutante

Morfología de *L. vulgaris*: a) Fenotipo silvestre de simetría bilateral. b) Epimutante natural de simetría radial o pelórica. Modificado de Cubas *et al.*, 1999.

Debido a que los RFLP's encontrados se obtuvieron con enzimas de restricción sensibles a metilación (la escisión se puede bloquear o perjudicar cuando una base particular en el sitio de reconocimiento de la enzima se modifica), se evaluó el estado de metilación de *Lcyc* en flores que presentaban un fenotipo intermedio (entre silvestre y pelórico), con esto fue posible determinar que el estado de metilación de *Lcyc* corresponde con el fenotipo floral, en tanto que la mutante completa muestra mayor metilación que el fenotipo intermedio y el fenotipo silvestre no presenta metilación. Aunque el fenotipo epimutante es heredable no es completamente estable durante el desarrollo somático ya que ocasionalmente se presentan reversiones por desmetilación (Cubas *et al.*, 1999).

Dominancia alélica de *SP11* en *Brassica rapa*

SP11, es un gen involucrado en el mecanismo de autoincompatibilidad sexual en *Brassica rapa* y codifica para la determinante masculina por lo que tiene expresión específica en pistilo . Aunque la mayoría de los alelos de *SP11* en *B. rapa* se expresan en codominancia, es decir

que ambos alelos se expresan, también existen alelos que poseen dominancia sobre otros por lo que dependiendo del genotipo, sólo uno se expresa (Shiba *et al.*, 2002). Mediante análisis de metilación de *SP11* en diferentes genotipos, se comprobó que la región promotora de los alelos recesivos se encuentra metilada en el tejido tapetal de la antera y que el estado de metilación incrementa conforme progresa el desarrollo de la antera, dado que no se observa metilación del promotor de *SP11* en ningún otro órgano de la planta, este estado de metilación se denominó: monoalélico tejido-específico (Figura 10).

Una característica interesante de los alelos recesivos de *SP11*, es que el sitio potencial de unión a un factor de transcripción de la familia bZip se encuentra en un estado hipermetilado, lo cual influye en el silenciamiento de estos alelos (Shiba *et al.*, 2006). En un estudio posterior se demostró que la metilación en las regiones reguladoras de los alelos recesivos de *SP11* está controlada por RNAs pequeños no codificantes (sRNA) expresados de manera específica en el tapete de la antera, los cuales son procesados a sRNA de 24-nt, nombrados inductores de la metilación de *SP11* (*Smi*). Las secuencias *Smi* que inducen metilación de los alelos recesivos y por tanto suprimen su expresión, se encuentran codificadas en regiones cercanas

al alelo dominante *SP11*, de manera que el silenciamiento por metilación *de novo* del alelo recesivo se origina de la vía RdDM (Tarutani *et al.*, 2010).

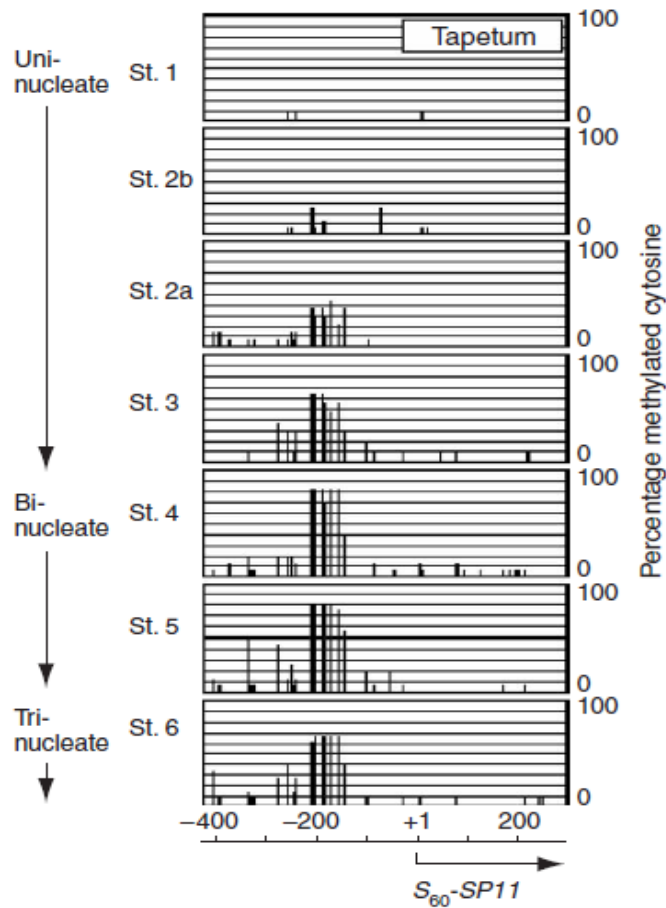


Figura 10. Patrón de metilación en el promotor del gen *SP11* de *B. rapa* durante el desarrollo de la antera.

Análisis del cambio en el estado de metilación de *SP11* durante el desarrollo de la antera. La gráfica representa el porcentaje de metilación de citosinas en la región 5' río arriba del sitio de inicio de la transcripción en diferentes etapas del desarrollo de la antera. Modificado de Shiba *et al.* 2006.

Las hipótesis planteadas y los estudios antes descritos dejan claro que los mecanismos genéticos y epigenéticos no pueden estudiarse como entidades separadas, sino como dos componentes de un mismo sistema que tiene como objetivo mantener la integridad y regular las funciones del genoma, siendo las más notables la activación y el silenciamiento de la transcripción, que derivan a su vez, en la identidad celular y la respuesta a estímulos internos y ambientales.

Entonces, puesto que la regulación de la expresión genética puede estar determinada a nivel epigenético, depender del contexto genómico, a secuencias reguladoras en el promotor y/o a factores de transcripción, por lo que resulta importante estudiar las marcas epigenéticas además de la estructura del promotor de la *S-RNasa* que es un gen esencial ligado al locus *S* como un primer acercamiento para entender su regulación durante el desarrollo del pistilo y la adquisición del mecanismo de autoincompatibilidad sexual en *N. alata* como un modelo de estudio del sistema de AI dependiente de RNAsas en la familia Solanaceae.

JUSTIFICACIÓN

El gen *S-RNasa*, que se encuentra ligado al *locus S* y es esencial en la respuesta de autoincompatibilidad en Solanaceae, se expresa de manera abundante y específica en las células del tejido de transmisión en etapas de madurez del estilo, lo cual puede ser el resultado de mecanismos de regulación altamente específicos, que aún no se han descrito, por lo que caracterizar la secuencia de la región promotora y sus patrones de metilación durante el desarrollo del pistilo, brindará información útil que contribuirá al esclarecimiento de los mecanismos que regulan la expresión de este gen.

HIPÓTESIS

La regulación de la expresión espacio-temporal del gen *S-RNasa* en pistilos maduros de *N. alata* puede atribuirse a elementos específicos del promotor y/o posiblemente a marcas epigenéticas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los componentes de regulación transcripcional del gen estilar *Sc10-RNasa*

Objetivos particulares

1. Obtener la secuencia de la región promotora del gen *Sc10-RNasa*.
2. Identificar *in silico* elementos reguladores esenciales para su expresión específica en el pistilo y/o madurez de la flor.
3. Determinar el estado de metilación del promotor durante el desarrollo del pistilo y en otros órganos de la planta.

ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES

Material biológico

El material biológico utilizado fue extraído de plantas de la especie *Nicotiana alata* línea $S_{c10}S_{c10}$ (homócigas para el locus S_{c10}), cultivadas en invernadero.

De estas plantas se recolectó tejido con las siguientes características:

- Hoja joven de longitud menor a 5 cm (Figura 11a).
- Pistilo (estilo y estigma) maduro de flores en antesis (Figura 11b). Previo a la apertura de las anteras, el botón floral fue emasculado (remoción de anteras) para evitar la contaminación del tejido con polen.
- Pistilo (estilo y estigma) de botón floral previo a la elongación (Figura 11c).

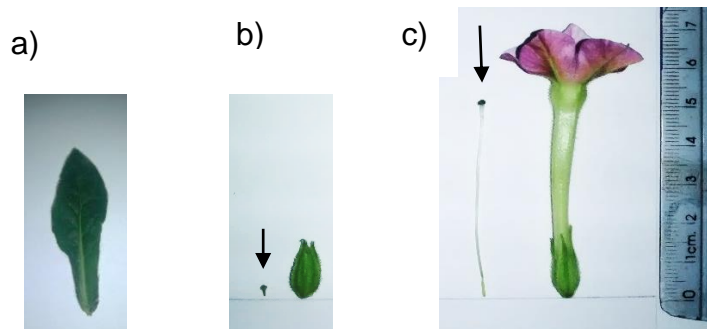


Figura 11. Tejidos de *Nicotiana alata* $S_{c10}S_{c10}$

a) Hoja joven de longitud menor a 5 cm. b) La flecha negra señala el pistilo (estilo y estigma) de botón floral, a un lado se muestra el botón floral previo a la elongación. c) La flecha negra señala el pistilo (estilo y estigma) de flor en antesis, a un lado se muestra la flor de *N. alata* en antesis.

Clonación de la secuencia promotora de *S-RNasa*

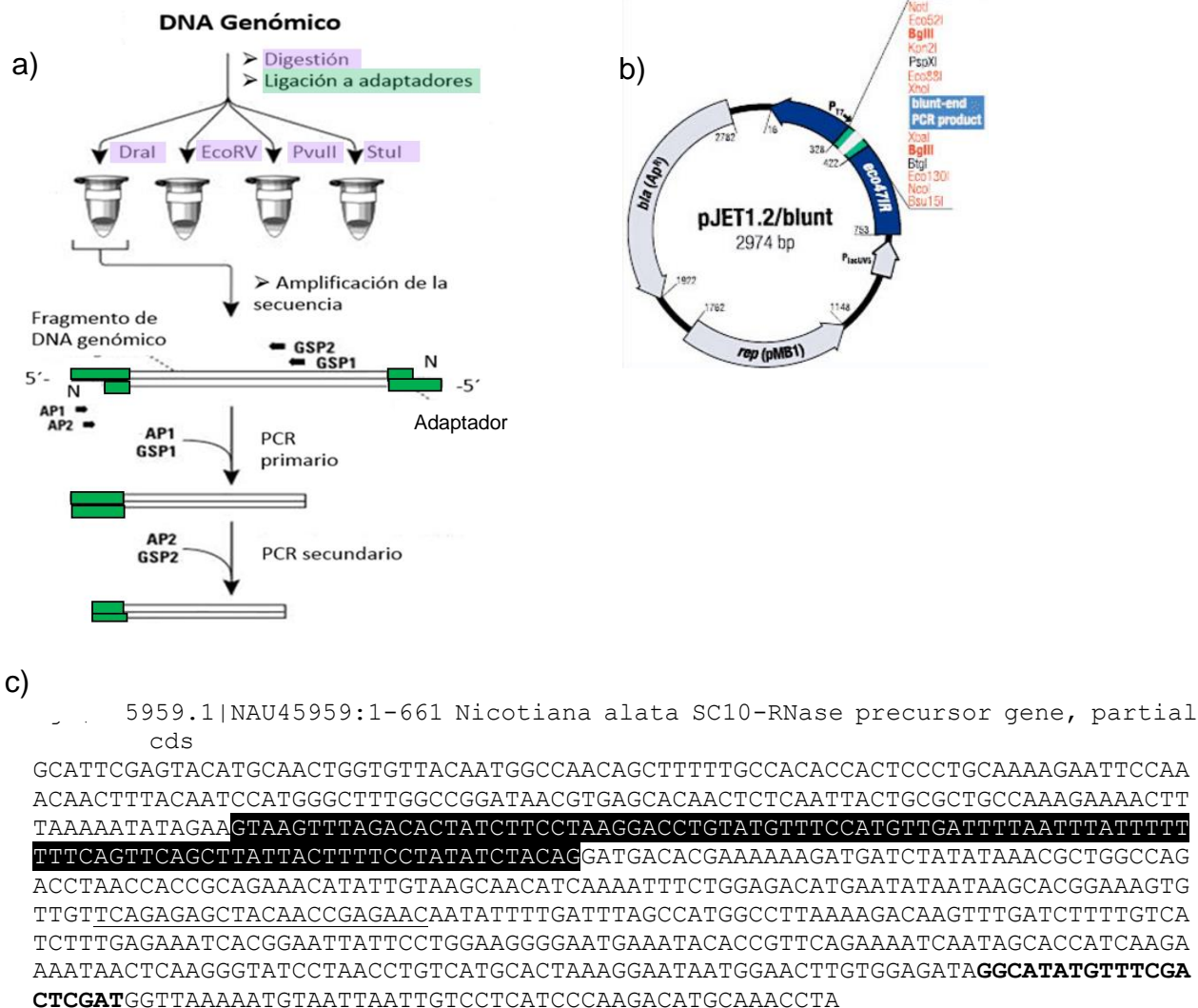


Figura 12. Diagrama del protocolo walking de DNA y mapa del plásmido pJET1.2/blunt

a) Diagrama simplificado del protocolo para walking de DNA. Donde GSP1= oligonucleótido externo específico del gen, GSP2= oligonucleótido interno específico del gen, AP1= oligonucleótido externo del adaptador, AP2= oligonucleótido interno del adaptador; b) Mapa del plásmido pJET1.2/blunt. c) Secuencia parcial del precursor del gen *Sc10-RNasa* de *Nicotiana alata*, número de acceso Genbank: U45959.1. Fondo negro: secuencia del intrón, subrayado: sitio de unión del oligonucleótido GSP2, negritas: sitio de unión del oligonucleótido GSP1.

Dado que el genoma de *N. alata* no se encuentra secuenciado, se empleó el método de *DNA walking*, el cual permite clonar secuencias desconocidas adyacentes a una región conocida del DNA (Figura 12a). Este método consiste en la construcción de cuatro “bibliotecas” que son

fragmentos de DNA genómico ligados a adaptadores. Cada biblioteca se construye con DNA genómico (gDNA) de hoja de *N. alata* Sc₁₀Sc₁₀ completamente digerido con una enzima de restricción diferente que deja extremos romos (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*), a continuación cada biblioteca se liga por separado a un adaptador.

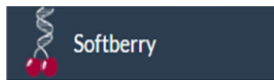
Posterior a la construcción de las bibliotecas, se realiza un PCR anidado, el cual es una variante del PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos oligonucleótidos en cada una, esto con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la reacción.

Primero se monta una reacción con el oligo externo específico del gen (GSP1: gene specific primer 1) más el oligo externo que se une al adaptado (AP1: adaptor primer 1) y después este producto se utiliza como molde de la segunda PCR la cual emplea el oligo interno específico del gen (GSP2: : gene specific primer 2) más el oligo interno del adaptador (AP2: adaptor primer 1) para obtener productos más específico (Laboratories Clontech, 2014). La secuencia conocida a partir de la cual se diseñaron los oligonucleótidos GSP1 y GSP2 corresponde a la secuencia parcial del precursor del gen *Sc10-RNasa* de *Nicotiana alata*, número de acceso Genbank: U45959.1 (Figura 12c).

Los productos obtenidos mediante este protocolo se ligan al plásmido pJET1.2/blunt (Figura 12b) (Thermo Scientific 2015); con esta construcción se transforman células competentes de *E. coli* cepa Top10 de las cuales posteriormente se purificó el plásmido y se envió a secuenciación, para verificar la inserción del fragmento de interés (consultar metodología detallada en Apéndice I: Metodología). La secuencia obtenida corresponde al promotor potencial del gen *Sc10-RNasa* (*ppSc10-RNasa*).

Análisis in silico

A partir de la secuencia *ppS_{C10}-RNasa* obtenida por el método de DNA walking, se realizaron análisis *in silico* para identificar elementos importantes pertenecientes al núcleo del promotor y elementos de regulación específicos relacionados con la expresión espacio-temporal del gen *S_{C10}-RNasa* en pistilo maduro, esto incluye predicción de secuencias conservadas como la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción/TSS (Softberry), alineamientos de secuencias conservadas reportadas (Ver Tabla 2) (The MEME Suite) y búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción/TF's en bases de datos (PlantRegMap) (Figura 13).



Sitio de inicio de la transcripción
Y tipo de promotor (TATA o TATA less)

The MEME Suite
Motif-based sequence analysis tools



Búsqueda de motivos ya reportados como importantes para la expresión específica en pistilo maduro (Ver Tabla 2)



motif III Solanum tuberosum S1-1	ACATAAT	motif III-related Brassica SLG13	CCATATGTTATGTT
motif III Solanum tuberosum S1-2	ATTATGT	motif III-related Brassica SLR1	ACATATGATATGTT
motif III Solanum tuberosum S2-1	ACATAAT	motif III-related Brassica SLG2	CCATATGCTATGTT
motif III Solanum tuberosum S2-2	ATTATAT	motif III-related Arabidopsis Ats1	ACATATGTTATGTT
motif III Solanum chacoense S11-1	ATGTAAA	motif III-related Pyrus serotina PsTL1	ACATAGTATATGTT
motif III Solanum chacoense S11-2	TTTACAT		
motif III Petunia inflata S1-1	ACATAAA		
motif III Petunia inflata S1-2	ATTATGT		
motif III Petunia inflata S3-1	ACATAAA		
motif III Petunia inflata S3-2	ATTATGT		



Sitios de unión a factores de transcripción

- Respuesta a estrés
- Respuesta a auxinas
- Expresión específica espaciotemporal

Figura 13. Análisis in silico

Determinación del patrón de metilación de los promotores en diferentes etapas del desarrollo del pistilo

El ensayo de conversión por bisulfito es el método más usado para identificar patrones de metilación específicos dentro de una secuencia de DNA. El bisulfito de sodio desamina residuos de citosina y por tanto convierte las citosinas no metiladas a uracilos, mientras que las citosinas metiladas no son sensibles a esta modificación y mediante la comparación de las secuencias obtenidas por conversión con bisulfito y la secuencia original, es posible determinar el patrón de metilación (Hayatsu, 2008).

El DNAg (DNA genómico) purificado, previo a la reacción de conversión con Bisulfito de Sodio, se digirió con una enzima de restricción que no tiene sitios de corte dentro de la secuencia de interés, en este caso se utilizó la enzima *NdeI*. La conversión de DNAg se realizó con el kit EZ DNA Methylation-Gold Zymoresearch, según las especificaciones del manual (Figura 14) (consultar metodología detallada en Apéndice I: Metodología).

Posterior a la reacción con bisulfito, el DNA convertido se utilizó para realizar PCR de dicha secuencia. El diseño de las reacciones de PCR permitió amplificar secuencias sobrelapantes de aproximadamente 300 pb empleando seis pares de oligonucleótidos; los productos de estas reacción se ligan al plásmido pJET1.2/Blunt y se envían a secuenciación.

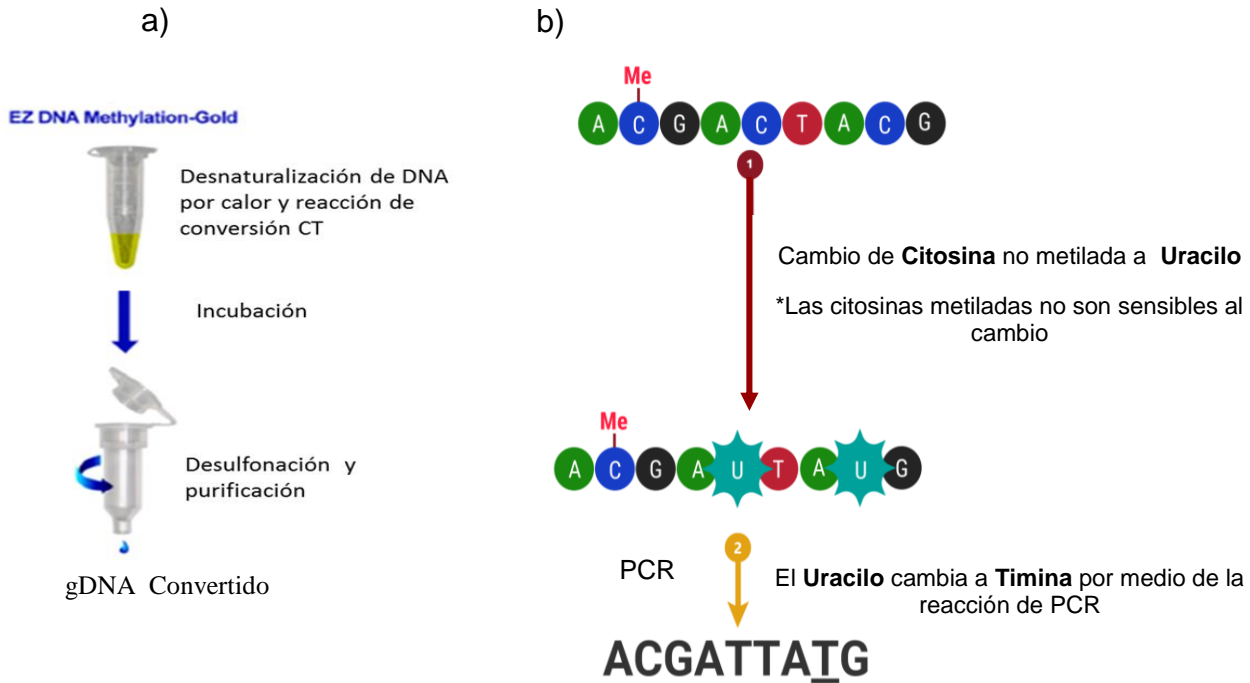


Figura 14. Conversión de gDNA con bisulfito de sodio

a) Diagrama simplificado de la conversión de DNAg con bisulfito de sodio con el kit EZ DNA Methylation-Gold. b) Diagrama del cambio de citosina no metilada a uracilo durante la conversión de DNA con bisulfito de sidio y cambio de uracilo a timina postior a la reacción de PCR.

Dado que los perfiles de metilación se reportan como porcentaje de metilación en cada citosina, se compararon las secuencias de varias clonas (seis clonas por par de oligos; treinta y seis por tejido analizado) (Haque y Nishiguchi, 2011). Posterior a esto, se realizó un tratamiento de las secuencias para poder analizarlas en el programa CyMATE (Figura 15), el cual identifica las citosinas metiladas en cada contexto y con estos datos se puede construir el mapa de metilación.

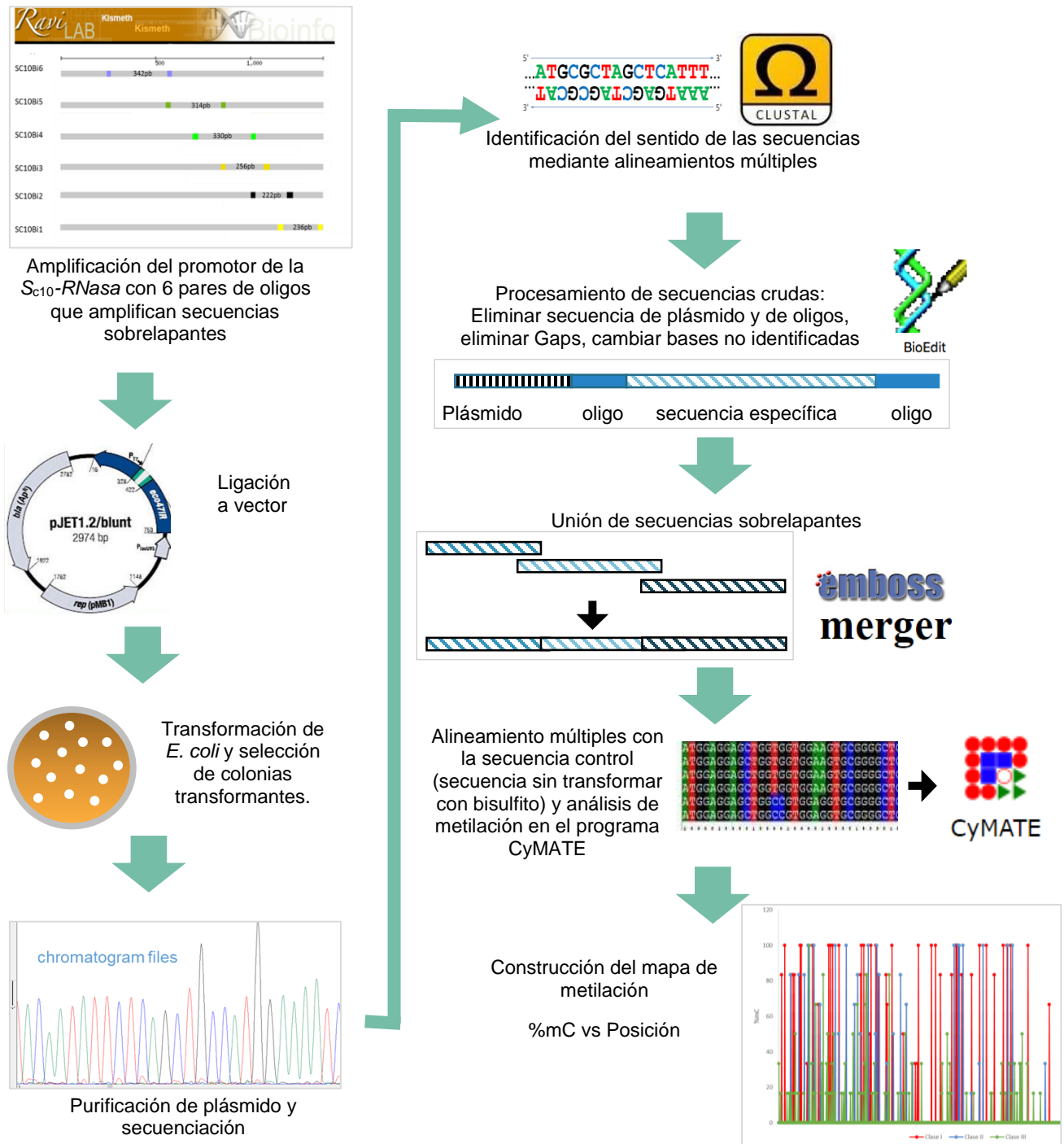


Figura 15. Construcción de un mapa de metilación

El diseño de los seis pares de oligonucleótidos degenerados se realizó con el programa kismeth, posterior a la amplificación por PCR, la ligación al plásmido pJET1.2/blunt se realizó con el protocolo del kit. Para la transformación se utilizaron células de *E. coli* quimiocompetentes Top10, se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina y se purificó el plásmido, para verificar la ligación del inserto se realizaron ensayos de restricción con la enzima BglII. A partir de cada reacción de PCR se seleccionaron 6 colonias positivas para la secuenciación. La secuenciación se realizó en el IBT UNAM, utilizando el oligonucleótido T7. Las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia control en el programa Clustal Omega para verificar el sentido de cada una,

posteriormente se eliminaron las regiones correspondientes a secuencia de plásmido y de oligonucleótidos con el programa BioEdit. Las secuencias específicas sobrelapantes se unieron con el programa Emboss Merge para formar la secuencia completa de *ppSc10-RNAsa*. Las seis secuencias completas se alinearon en Clustal Omega con la secuencia control para eliminar gaps y el alineamiento obtenido se analizó con el programa CyMATE, este programa indica el porcentaje de metilación en cada posición correspondiente a una citosina e identifica la metilación para los tres contextos de metilación del DNA en plantas, a partir de estos datos se construyeron gráficas de %mC vs posición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clonación de la región 5' del gen *S_{C10}-RNasa*

La conservación de la variabilidad genética en las poblaciones vegetales es un tema muy importante ya que el éxito que han tenido las angiospermas a lo largo de la evolución para evitar la endogamia es debido en gran medida al mecanismo de AI, el cual implica eventos bioquímicos altamente específicos y regulados. La expresión de las proteínas y demás factores involucrados en el mecanismo se encuentran bajo un control fino a diferentes niveles, incluyendo el nivel genético y epigenético que le permite a la célula contener la información necesaria para que la AI funcione en tiempos y tejidos específicos.

Como se menciona en la sección de antecedentes, el locus *S* de *Nicotiana* codifica las determinantes de especificidad S-RNasa (McClure *et al.*, 1989) y SLF (Entani *et al.*, 2003), aunque también son indispensables para el mecanismo de AI los factores modificadores HT-B (McClure *et al.*, 1999), 120K (Hancock *et al.*, 2005), NaStEP (Busot *et al.*, 2008; Jiménez-Durán *et al.*, 2013) y NaSIPP (García Valencia 2013; García-Valencia *et al.*, 2017). A la fecha se sabe que la interacción entre la S-RNasa y SLF determina directamente la especificidad del rechazo del polen (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006).

La S-RNasa es una proteína altamente polimórfica con una notable expresión diferencial, pues sólo se expresa en tejidos específicos (estigma, estilo y ovario) y su nivel máximo de expresión se presenta en etapas de desarrollo cercanas a la antesis es decir, durante la madurez de la flor. Este patrón de expresión tan específico y esencial para el sistema de AI puede ser el resultado de mecanismos de regulación altamente específicos que aún no se han descrito, pero que podrían ayudarnos a comprender el sistema desde un enfoque genético en una etapa

previa a los eventos bioquímicos. He aquí la importancia de caracterizar la secuencia de la región promotora del gen *S-RNasa* y sus patrones de metilación como un primer acercamiento a la regulación epigenética, haciendo hincapié una vez más en que la regulación a nivel de secuencia y a nivel epigenético están estrechamente relacionadas, todo esto con el fin de esclarecer los mecanismos que regulan la expresión de este gen.

Para el estudio de los promotores existen dos acercamientos complementarios, el estructural y el funcional (Porto *et al.*, 2014), en este proyecto se realizó análisis estructural mediante un acercamiento bioinformático. Para esto fue necesario obtener primero la secuencia río arriba a la región codificadora de *S_{c10}-RNasa* y debido a que el genoma de *N.alata* no está secuenciado, se optó por clonar una región río arriba del sitio de inicio de la traducción mediante el método conocido como *DNA walking*.

En primera instancia se purificó DNAG de hoja de *N. alata* *S_{c10}* *S_{c10}* (Apéndice I: Metodología, Extracción de DNA genómico con CTAB) a partir del cual se construyeron bibliotecas de DNA que se utilizaron en reacciones de PCR anidadas, de los productos del PCR secundario obtenidos a partir de la biblioteca construida con la enzima de restricción *EcoRV*, se recuperó el amplicón marcado como 2B (Figura 16) que corresponde a un producto de aproximadamente 1700 pb (Apéndice I: Metodología, Walking de DNA), este amplicón se ligó al plásmido pJET1.2/Blunt y se confirmó la clonación del inserto mediante un ensayo de digestión con la enzima *BglIII*. Los plásmidos confirmados fueron enviados a secuenciación y se obtuvo una región que comprende 1300 pb río arriba del codón de inicio de la traducción.

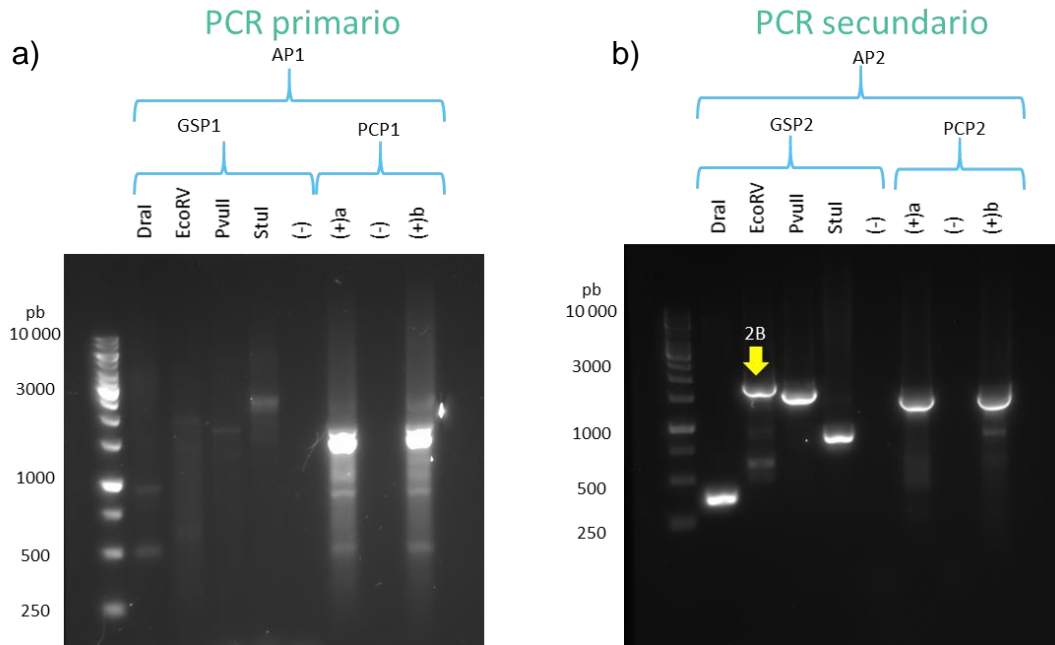


Figura 16. PCR primario y secundario del DNA walking de S_{C10} -RNasa.

a) PCR primario del DNA walking de S_{C10} -RNasa. b) PCR secundario del DNA walking de S_{C10} -RNasa. En la parte superior se indican los oligonucleótidos empleados en cada reacción; oligo PCP amplifica el control positivo que corresponde al promotor del gen plasminógeno tisular humano. (+)a: DNA Genómico humano digerido con *PvuII*; (+) b: Biblioteca control de DNA humano. (-) control negativo sin DNA. Gel de agarosa 1.5%/EtBr/TAE.

Aunque no se tiene un consenso sobre la longitud de las regiones promotoras en plantas (Wittkopp y Kalay, 2011), la mayoría de las investigaciones sugieren que alrededor de 1200 pb río arriba de la región codificante, podría ser suficiente para incluir las regiones reguladoras de un promotor, aunque este dato puede variar según cada caso particular. Con estas consideraciones, la secuencia ***ppS_{C10}-RNasa*** (promotor potencial de *S-RNasa S_{C10}*) obtenida con un total de 1300pb se tomó como la región promotora de este gen para continuar con el análisis bioinformático.

Es importante aclarar que ***ppS_{C10}-RNasa*** no se ha evaluado como una secuencia promotora y por lo tanto no se ha comprobado sea capaz de dirigir la expresión de un gen reportero de forma tejido específica. Esto debido a que, hasta la fecha, no se ha logrado generar plantas transgénicas, pero es un trabajo que sigue en proceso (ver perspectivas).

Análisis *in silico* de la secuencia *ppSc₁₀-RNasa*

A partir de la secuencia obtenida se realizaron análisis BLAST en los servidores Sol Genomics Network (Fernandez-Pozo *et al.*, 2015) y en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se identificó que la secuencia *ppSc₁₀-RNasa* está presente en los genomas de varias especies de *Nicotiana*, sin embargo, debido a que la información disponible en las bases de datos no se encuentra anotada completamente, no fue posible concluir respecto a la información obtenida.

La secuencia *ppSc₁₀-RNasa* también se analizó en el servidor Softberry con el programa TSSPlant: *Search for RNA polymerase II promoters (TSSs) in plant DNA sequences*, el cual busca promotores para RNA polimerasa II de tipo TATA o TATA-less; con este acercamiento se predijo que *ppSc₁₀-RNasa* contiene un promotor de caja TATA a una distancia de 27 pb río arriba del TSS pronosticado por el mismo programa, lo que coincide con la distancia entre estos elementos registrada en la literatura (Figura 17) (Shahmuradov *et al.*, 2017; Yamamoto *et al.*, 2007)

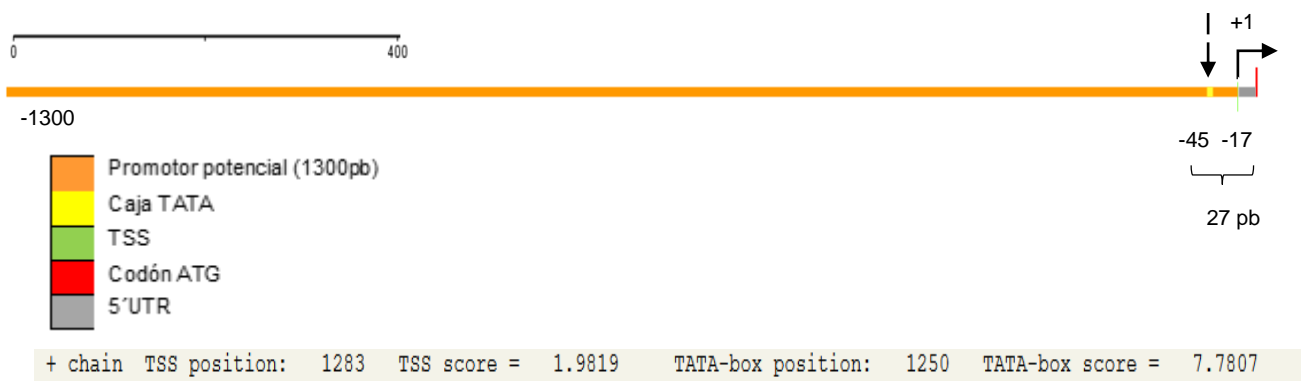


Figura 17. Predicción del sitio de inicio de la transcripción y caja TATA.

Representación gráfica de la secuencia *ppSc₁₀-RNasa* construida con el programa DNAplotter. La posición del TSS y la caja TATA fueron obtenidos por predicción del servidor Softberry con el programa TSSPlant: *Search for RNA polymerase II promoters (TSSs) in plant DNA sequences*. La flecha continua marca el TSS y la flecha punteada marca la posición de la caja TATA.

Con el mismo programa se identificó la secuencia 5'UTR con una longitud de 17 pb, aunque esta secuencia es muy corta existen reportes de regiones con hasta 12 pb en genes eucariontes, estos 5'UTR's cortos están relacionados con procesos de inicio de la traducción no canónicos, es importante mencionar que esta característica no se ha encontrado en plantas (Haimov, Sinvani, y Dikstein 2015).

Para determinar si la secuencia *ppS_{C10}-RNasa* contiene alguno de los motivos reportados como importantes para dirigir la expresión específica en pistilo (Tabla 2), se empleó la herramienta MAST (Motif Alignment and Search Tool) disponible en el servidor MEME Suite, este programa permite buscar un conjunto de motivos específicos dentro de una secuencia de interés (Bailey y Gribskov, 1998). Los resultados del análisis (Figura 18) indican que la secuencia *ppS_{C10}-RNasa* no contiene ninguno de los motivos incluidos en el ensayo (Tabla 2).

Lo anterior no implica que no existan motivos específicos que dirijan la expresión al pistilo, pues es probable que no se hayan reportado o que la búsqueda fue muy limitada, esto con base en que al analizar el promotor del gen *Chi2:1*, únicamente se identificó el *motivo III de Solanum tuberosum S1-1*. El gen *Chi2:1* codifica para una endoquitinasa *Solanum lycopersicum*, la cual se expresa de manera predominante en órganos florales, aunque presenta un alto nivel de expresión en el tejido de transmisión del estilo durante la antesis (similar al patrón de expresión de la S-RNasa) y se sabe que la región 5' río arriba de *Chi2:1* que comprende 1.4 kpb, es suficiente para dirigir altos niveles de expresión de un gen reportero en el estilo (Harikrishna et al., 1996; Bailey y Gribskov 1998).

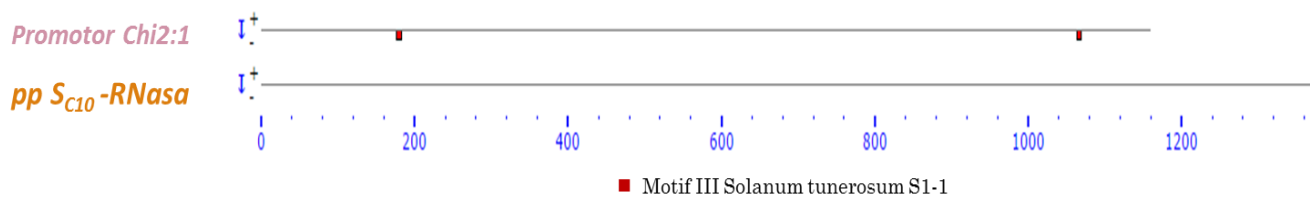


Figura 18. Búsqueda de motivos reguladores con MAST del servidor MEME Suit.

También se realizó la predicción de sitios de unión a factores de transcripción en el servidor PlantTFDB (Plant Transcription Factor Database), con la herramienta PlantRegMap (Plant Transcriptional Regulatory Map), la cual compara la secuencia de interés con la base de datos del servidor e identifica secuencias de unión a factores de transcripción anotados (Jin *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2017). Con este análisis se encontraron 270 sitios de unión a 152 TF's de 28 familias diferentes (Figura 19). Aunque la mayoría de los TF's encontrados están relacionados con la respuesta a estrés ambiental y fitohormonas, también se encontraron 7 sitios de unión a factores de transcripción relacionados con el desarrollo de los órganos florales que incluyen ovario, carpelo, pétalo, antera, polen, estilo y estambres (Figura 20).

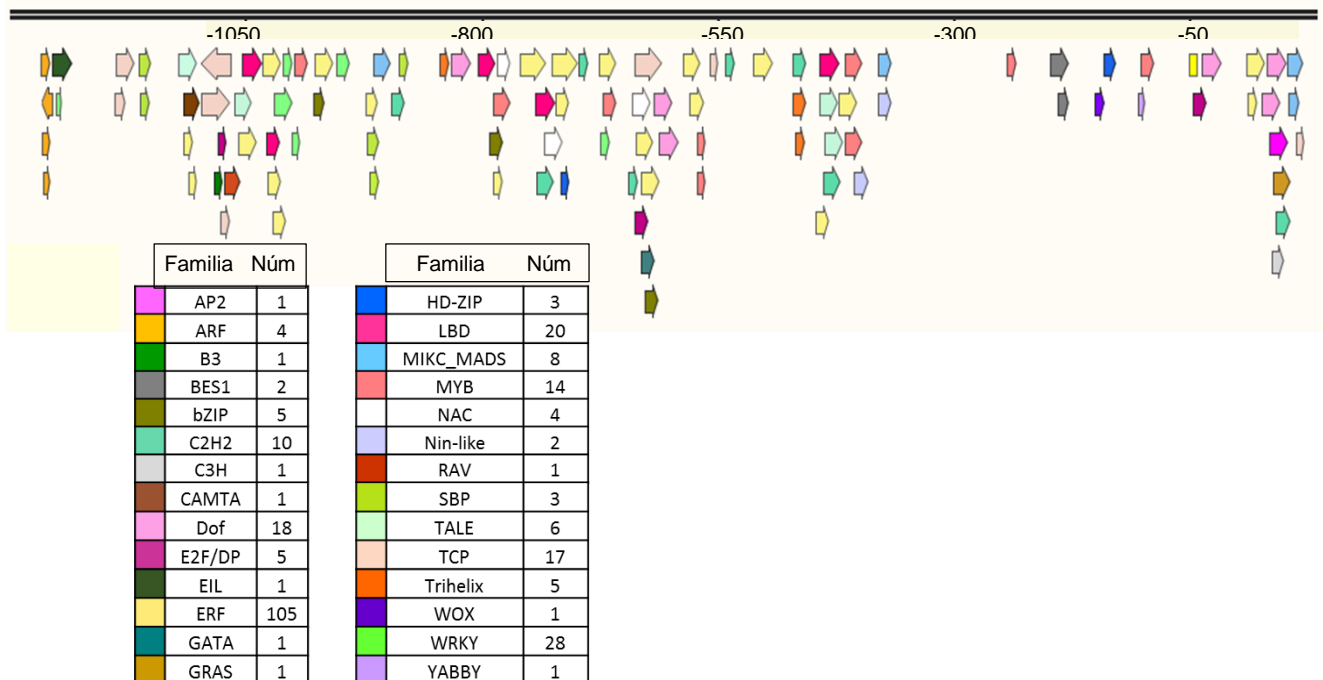
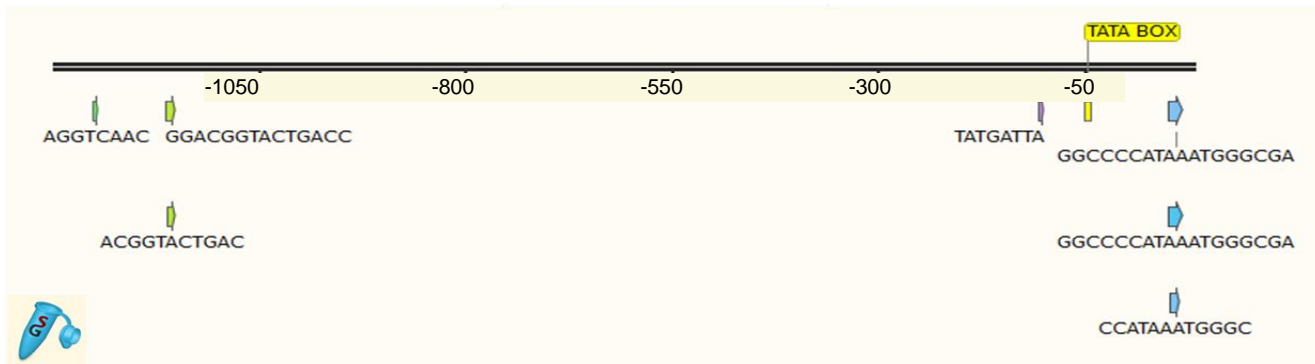


Figura 19. Predicción de sitios de unión a factores de transcripción.

La barra negra representa la secuencia *ppSc10-RNAsa*, los números indican la posición respecto al TSS. Las flechas representan el sitio de unión a TFs, el color de cada flecha corresponde a la familia de TFs que se unen a ese sitio y la dirección de la flecha indica si el sitio de unión se predice en la cadena positiva (flecha hacia la derecha) o en la cadena negativa (flecha hacia la izquierda). En las tablas se indica código de colores para cada familia de TFs, el nombre de cada familia y el número de sitios de unión encontrados. Imagen creada con el Software SnapGen a partir de la información obtenida con la herramienta PlantRegMap.

Cabe señalar que aunque estos resultados son de carácter indicativo (pues son una predicción y es necesario analizar más a fondo los resultados por medio de estudios de interacción entre los factores de transcripción y los motivos encontrados), el valor E de los sitios de unión predichos se encuentra entre 2.3×10^{-7} y 9.86×10^{-5} . Los resultados completos se encuentran en la sección [Apéndice V](#).



	Familia	Factor de transcripción	Descripción	Motivo de unión
	MIKC_MADS	Nicotiana sylvestris MADS-box protein MADS3 (NsMADS3)	Especificación de la identidad de los órganos florales, desarrollo del ovario	CCATAAATGGGCG
	MIKC_MADS	Petunia x hybrida MADS-box transcription factor FBP23	Desarrollo de sépalo, pétalo, carpelo y estambres	GGCCCCATAAATGGGCGA
	MIKC_MADS	Nicotiana tabacum MADS-box protein MADS4 (NtMADS4)	Desarrollo de sépalo, pétalo, carpelo y estambres	GGCCCCATAAATGGGCGA
	SBP	Nicotiana tabacum squamosa promoter-binding-like protein 16 isoform	Desarrollo de la antera	ACGGTACTGAC
	SBP	Solanum lycopersicum, squamosa promoter-binding-like protein 9	Desarrollo de la antera , transición de estado vegetativo a reproductivo del meristemo	GGACGGTACTGACC
	WRKY	Nicotiana benthamiana NbWRKY11	Desarrollo del polen	AGGTCAAC
	YABBY	Nicotiana tabacum isolate 2 CRABS CLAW	Desarrollo del estilo , determinación del meristema floral	TATGATTA

Figura 20. Predicción de sitio de unión a factores de transcripción relacionados con el desarrollo de órganos florales.

La barra negra representa la secuencia *ppSC10-RNAsa*, los números indican la posición respecto al TSS. Las flechas representan el sitio de unión a TFs, el color de cada flecha corresponde a la familia de TFs que se unen a ese sitio y la dirección de la flecha indica si el sitio de unión se predice en la cadena positiva (flecha hacia la derecha) o en la cadena negativa (flecha hacia la izquierda). En la tabla se indica el código de colores para cada familia de TFs, el nombre de cada familia, la especie de planta en la que se reporta el factor de transcripción, la descripción de los mecanismos en los que está involucrado cada factor y la secuencia del motivo de unión. Imagen creada con el Software SnapGen a partir de la información obtenida con la herramienta PlantRegMap.

Análisis de metilación del DNA de la secuencia *ppSC₁₀-RNasa*

Para evaluar si la expresión específica espacio-temporal de *SC₁₀-RNasa* está dirigida a nivel epigenético, como un primer acercamiento, se realizó un análisis de metilación del DNA en el promotor potencial del gen (secuencia *ppSC₁₀-RNasa*).

Para obtener el patrón de metilación del DNA de la secuencia *ppSC₁₀-RNasa* en hoja joven (H), pistilo maduro (PM) y pistilos de botón (B), se extrajo DNAg de cada tejido y cada uno se trató con Bisulfito de Sodio para obtener DNAg convertido (

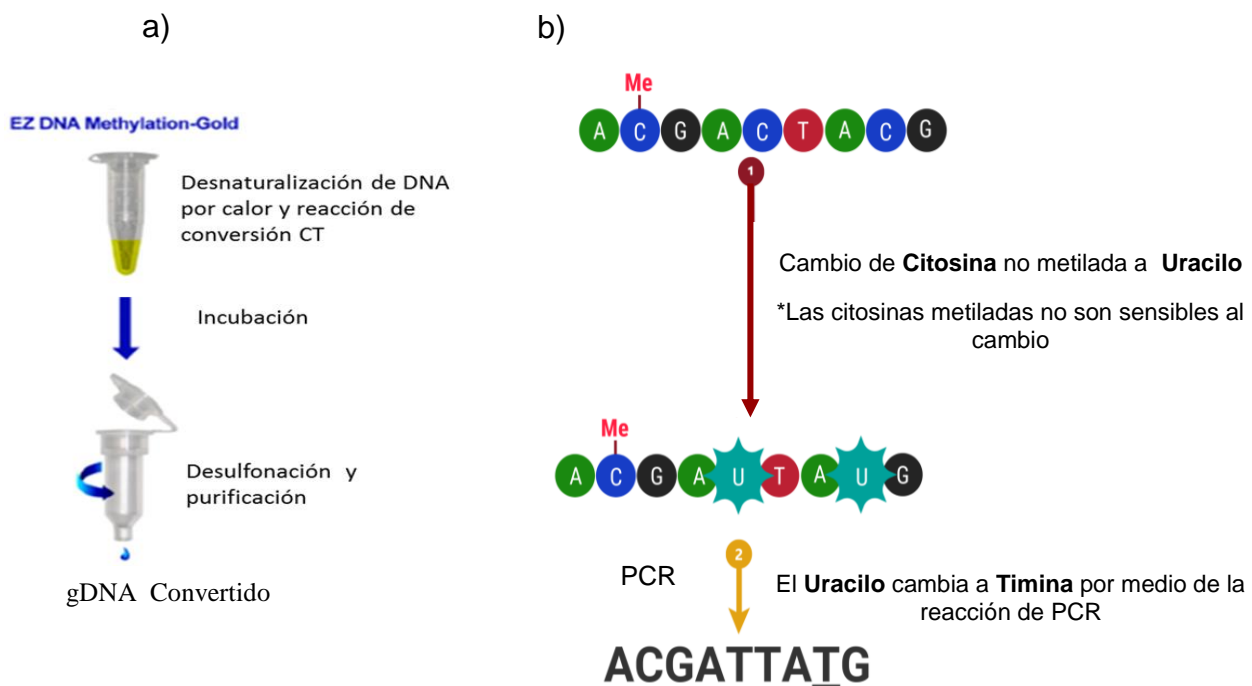


Figura 14). A partir del DNAg convertido se amplificó la secuencia *ppSC₁₀-RNasa* utilizando seis pares de oligonucleótidos degenerados diseñados con el software Kismeth (ver Apéndice IV) (Gruntman *et al.*, 2008), estos son degenerados ya que debido al tratamiento con bisulfito de sodio, la secuencia del DNA molde va a cambiar y los oligonucleótidos degenerados permiten mayor eficiencia de la reacción de PCR. Los pares de oligonucleótidos utilizados amplifican

secuencias con longitud menor a 300 pb de regiones sobrelapantes (fracciones de la secuencia *ppSC10-RNasa*), las amplificaciones son menores a 300 pb ya que en secuencias cortas la secuenciación de DNA es más eficiente. Los productos de estas amplificaciones se clonaron en el plásmido pJET1.2/blunt, las clonas en las que se confirmó el inserto de interés (ensayos de restricción con *BglII* o PCR con oligonucleótidos de pJET1.2/blunt) se enviaron a secuenciación. Para este ensayo se seleccionaron seis clonas positivas y dado que se realizaron seis reacciones de PCR por cada tejido, en total se obtuvieron treinta y seis clonas por tejido. Una vez terminado el tratamiento de las secuencias (Figura 15), por tejido, se obtuvieron seis secuencias completas de *ppSC10-RNasa* convertidas por bisulfito de sodio. Para evaluar la cantidad de citosinas convertidas (no metiladas), respecto a la secuencia de referencia, se realizó el análisis de las secuencias con el software CyMATE (Hetzl *et al.*, 2007). Dado que el software CyMATE indica el porcentaje de citosinas (Apéndice VIII: Resultados del perfil de metilación) metiladas en la secuencia para cada contexto (CG, CHG y CHH), los mapas de metilación son la representación gráfica del porcentaje de citosinas metiladas en cada posición a lo largo del promotor, %mC vs Posición. De esta forma se obtuvieron tres mapas de metilación para la secuencia *ppSC10-RNasa* y cada uno corresponde a cada tejido analizado: hoja (tejido vegetativo en el que no se expresa el gen), pistilo maduro (tejido donde se observa la mayor

expresión y acumulación del transcrito) y pistilo de botón (tejido inmaduro donde la expresión es muy baja).

Con el programa CyMATE se identificó que la metilación en hoja corresponde al 15.2% a la metilación tipo CG, el 9.1% a metilación CHG y el 11.1% a metilación CHH. El mismo análisis realizado a partir de pistilo maduro (abreviado como PM) indica que la secuencia *ppS_{C10}-RNasa* se encuentra metilada en un 19.56% en contexto CG, en 12.51% en CHG y un 56.96% corresponde a metilación CHH y, de manera interesante en los datos obtenidos a partir de pistilos

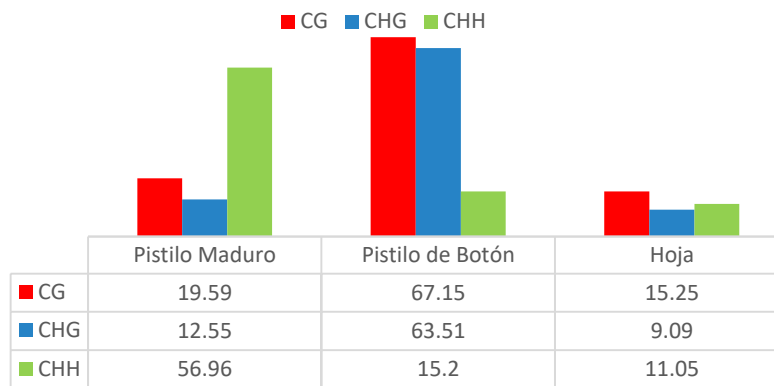


Figura 21. Porcentaje de metilación global de la secuencia *ppS_{C10}-RNasa*.

Los datos corresponden a un % de metilación del 100% de posiciones posibles en cada contexto (CG, CHG y CHH) para los tres tejidos: pistilo maduro, pistilo de botón y hoja joven. El 100% de metilaciones posibles se calcula a partir de la secuencia control no tratada con bisulfito de sodio.

de botón (abreviado B) se encontró que el 67.15% de la metilación corresponde al contexto CG, 63.5% metilación CHG y 15.2% a metilación CHH (Figura 21).

Los mapas de metilación del DNA obtenidos a partir de este análisis (Figura 22) se construyeron como gráficos de dispersión en los que cada punto representa un nucleótido de citosina localizado a lo largo de la secuencia *ppS_{C10}-RNasa* mientras que la posición de cada punto corresponde al porcentaje de metilación encontrado en cada citosina (0-100%). El patrón de metilación en contexto CG es muy similar para los tejidos de Hoja y Pistilo de Botón, pues en las citosinas metiladas, el porcentaje es mayor al 70% desde aproximadamente 100 pb río

arriba al TSS y continúa así alrededor de 500 pb río arriba, pasando este punto, el porcentaje de metilación varía mucho. El patrón de metilación en contexto CHG también es muy similar en los tejidos de Hoja y Pistilo de Botón, en estos tejidos, la metilación empieza a aumentar aproximadamente 100 pb río arriba al TSS mientras que cerca del TSS no hay metilación de DNA. Por otra parte, los patrones de metilación del contexto CHH en Hoja y Pistilo de Botón no son similares, pues en tejido de Hoja se observa claramente el aumento gradual del porcentaje de metilación alrededor de 300 pb río arriba al TSS, en tanto que en Pistilo de Botón la metilación en CHH aumenta repentinamente cerca de la posición -300 y continúa aumentando hacia el 5'. De manera interesante, los patrones de metilación en los contextos CG, CHG y CHH para el tejido de Pistilo Maduro son muy similares entre sí, puesto que en los tres casos se observa metilación alta cerca del TSS la cual empieza a variar (pero conservando niveles altos de metilación) cerca de 600 pb río arriba.

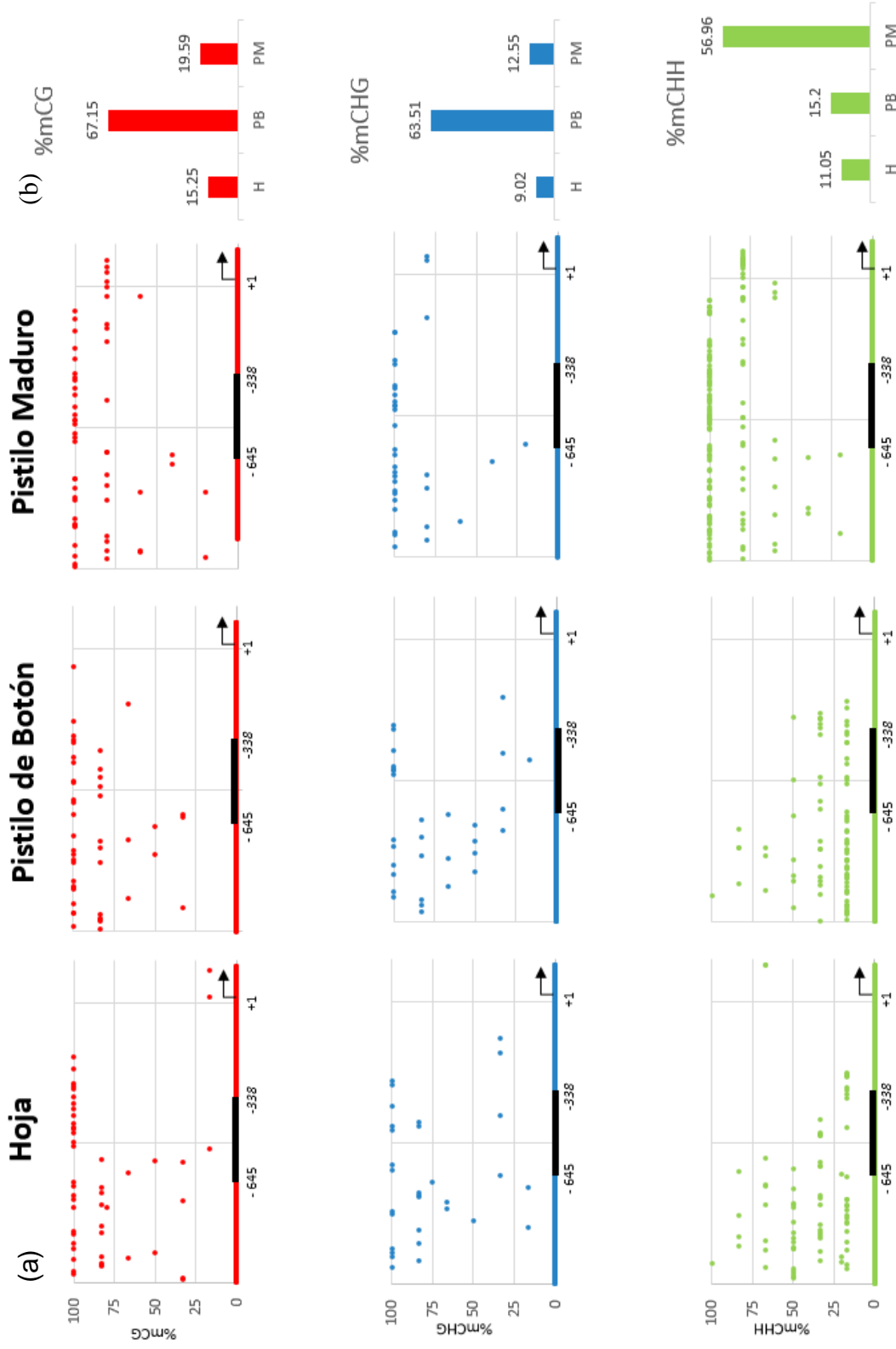


Figura 22. Mapas de metilación del DNA de la secuencia *ppSc10-RNasa*

a) Para los tejidos Hoja (H), Pistilo de Botón (B) y Pistilo Maduro (PM), cada punto del gráfico de dispersión representa nucleótidos de citosina localizados a lo largo de la secuencia del promotor (eje X) mientras que la posición de cada punto respecto al eje Y corresponde al porcentaje de metilación encontrado en cada citosina (0-100%). Cada contexto de metilación está graficado en diferente color: CG (rojo), CHG (azul) y CHH (verde). La flecha marca el TSS y el nucleótido en posición +1. La barra negra representa la posición de la secuencia *Gypsy-ppSC10* desde -338 hasta -645 respecto al TSS b) Gráfica de barras del porcentaje de metilación en cada contexto respecto al 100% de citosinas metiladas posibles calculadas por predicción en el programa Cymate.

De manera general, con este análisis se esperaba encontrar mayor nivel de citosinas metiladas (contexto CG y CHG) en el tejido donde no se expresa el transcrito (hoja) y una menor metilación en el tejido donde el gen presenta un estado transcripcionalmente activo (pistilo maduro).

Los resultados obtenidos ([Figura 21](#))

Con el programa CyMATE se identificó que la metilación en hoja corresponde al 15.2% a la metilación tipo CG, el 9.1% a metilación CHG y el 11.1% a metilación CHH. El mismo análisis realizado a partir de pistilo maduro (abreviado como PM) indica que la secuencia *ppS_{C10}-RNasa* se encuentra metilada en un 19.56% en contexto CG, en 12.51% en CHG y un 56.96% corresponde a metilación CHH y, de manera interesante en los datos obtenidos a partir de pistilos de botón (abreviado B) se encontró que el 67.15% de la metilación corresponde al contexto CG, 63.5% metilación CHG y 15.2% a metilación CHH ([Figura 21](#)).

Los mapas de metilación del DNA obtenidos a partir de este análisis ([Figura 22](#)) se construyeron como gráficos de dispersión en los que cada punto representa un nucleótido de citosina localizado a lo largo de la secuencia *ppS_{C10}-RNasa* mientras que la posición de cada punto corresponde al porcentaje de metilación encontrado en cada citosina (0-100%). El patrón de metilación en contexto CG es muy similar para los tejidos de Hoja y Pistilo de Botón, pues en las citosinas metiladas, el porcentaje es mayor al 70% desde aproximadamente 100 pb río arriba al TSS y continúa así alrededor de 500 pb río arriba, pasando este punto, el porcentaje de metilación varía mucho. El patrón de metilación en contexto CHG también es muy similar en los tejidos de Hoja y Pistilo de Botón, en estos tejidos, la metilación empieza a aumentar aproximadamente 100 pb río arriba al TSS mientras que cerca del TSS no hay metilación de DNA. Por otra parte, los patrones de metilación del contexto CHH en Hoja y Pistilo de Botón

no son similares, pues en tejido de Hoja se observa claramente el aumento gradual del porcentaje de metilación alrededor de 300 pb río arriba al TSS, en tanto que en Pistilo de Botón la metilación en CHH aumenta repentinamente cerca de la posición -300 y continúa aumentando hacia el 5'. De manera interesante, [y Figura 22](#)) difieren mucho de lo que se esperaba cuando se planteó la hipótesis antes descrita, pues en pistilo maduro hay un aumento muy marcado en la cantidad de citosinas metiladas y este aumento se presenta únicamente en el contexto CHH y, aunque también hubo aumento de la metilación en los otros contextos, este no fue tan prominente. Por otro lado, el patrón de metilación en pistilos de botón (tejido muy joven en el que el gen se transcribe muy poco) presenta un aumento significativo en la metilación de los contextos CG y CHG, mientras que la metilación en contexto CHH es muy baja.

Otro aspecto de estos resultados que llama la atención es que en hojas la metilación en la región *ppSC10-RNasa* es realmente baja, en comparación con los dos tejidos antes descritos y casi igual en todos los contextos, esto sugiere que podrían existir dos mecanismos que regulan la expresión del transcrito del gen *SC10-RNasa*, uno que pudiera evitar su transcripción en tejidos que no sean el pistilo, el cual no incluye metilación del DNA y otro mecanismo que sí involucra metilación de DNA, el cual funcionaría para regular la expresión temporal del transcrito limitándola a etapas de madurez durante la antesis.

Ya que la metilación del contexto CHH está presente de manera importante en pistilo maduro, al consultar la literatura se encontró un fenómeno similar reportado en el genoma de *Zea mays*. Este fenómeno se describió a partir de un análisis del estado de metilación del DNA a nivel del genoma de maíz, en el cual se encontró que existe metilación en contexto CHH que coincide con la acumulación de siRNAs de 24nt, esto localizado en los extremos de genes que tienen un nivel de expresión alto y medio-alto. El incremento de siRNAs de 24-nt se presenta

aproximadamente 1kb río arriba del TSS y 1kb río abajo del término de la transcripción, de manera notable el mismo patrón se observó para la marca de metilación en contexto CHH (Gent *et al.*, 2013). Esta marca de metilación está dirigida principalmente por la vía RdDM (Li *et al.*, 2014) y en conjunto, ambas marcas se relacionan con regiones cercanas a elementos transponibles (TE's) silenciados (Gent *et al.*, 2013).

Los reportes más recientes respecto a lo antes descrito, revelan que estas características coinciden también con la disminución en la marca de heterocromatina H3K9me2 y el aumento en la marca H3K4me3 relacionada con cromatina accesible (Lunardon *et al.*, 2016), lo anterior indica las marcas de mCHH son importantes para el silenciamiento de transposones ya que podrían actuar previniendo la propagación de eucromatina (de los genes expresados) hacia los transposones (secuencias blanco del silenciamiento) o viceversa, esto por medio de la actividad RdDM (Li *et al.*, 2015). También se reporta que dichas marcas se presentan de manera tejido-específica en genes de expresión diferencial, esto al comparar entre tejido vegetativo y reproductivo, pues se encontró que el aumento en la metilación CHH tiene una correlación positiva con la expresión de genes, la mayoría de los cuales están involucrados con la respuesta a estímulos, reproducción y respuesta a auxinas (Hsu *et al.*, 2017).

Búsqueda de elementos transponibles en la secuencia *ppSC10-RNasa*

El siguiente paso fue buscar otra característica en la secuencia *ppSC10-RNasa* que pudiera relacionarse con las islas mCHH, por lo que se propuso como un primer acercamiento identificar elementos transponibles (transposable elements o TEs), ya que en plantas la regulación de la transcripción a nivel epigenético está estrechamente relacionada con la presencia de estas secuencias.

Los TEs son secuencias de DNA que pueden moverse de un sitio a otro del genoma (Pray, 2008), ya sea directamente mediante mecanismos de corte-inserción (transposones) o de forma indirecta utilizando un intermediario de RNA (retrotransposones). Los TEs constituyen una fracción importante del genoma de plantas (además de muchos otros organismos), por lo que no es de sorprenderse que también sean muy importantes en la evolución de los genomas, además, son precisamente mecanismos epigenéticos los encargados de suprimir la proliferación de TEs y así mantener un equilibrio en la expansión del genoma (Fedoroff, 2012).

Si bien los TEs están relacionados con la expansión de los genomas, lo anterior no es totalmente favorable ya que podría derivar en consecuencias catastróficas al comprometer la integridad del genoma, puesto que su inserción puede alterar la transcripción y el procesamiento del transcrito (Fedoroff, 2000), con esto se sabe que la regulación de TEs, así como sus efectos en el diseño del genoma y la regulación de genes depende de la posición en el cromosoma donde se encuentren (Sigman y Slotkin, 2016). Aquí reside una función importante del control epigenético, pues permite crear un balance en el genoma al silenciar TEs en ciertos contextos genómicos (Kawashima y Berger, 2014).

Los TEs se clasifican en dos grupos según el mecanismo de transposición que presentan. Los de clase I son elementos que se transponen por transcripción reversa de un RNA intermediario, por lo que pasan de DNA a RNA y a DNA nuevamente. La clase II de TEs, comúnmente llamados transposones de DNA, se transponen directamente de DNA a DNA (Piégu *et al.*, 2015).

La abundancia de elementos transponibles contenidos en el genoma de las plantas varía de manera importante, por ejemplo, alrededor del 10% del genoma de *A. thaliana* son TEs (The

Arabidopsis Genome 2000), 35% del genoma de arroz (International Rice Genome Sequencing 2005) y 85% del genoma de maíz (Haberer *et al.*, 2009).

En las especies *N. obtusifolia*, *N. tomentosiformis*, *N. sylvestris* y *N. attenuata* del género *Nicotiana*, se ha reportado que aproximadamente el 60% del genoma está conformado por TEs de los cuales el 80% corresponden a TEs de la familia Gypsy (Xu *et al.*, 2017). La familia Gypsy de TEs está conformada por elementos transponible que se clasifican como Retrotransposones LTR, ya que en sus extremos contienen elementos LTR (repetidos largos terminales) y su secuencia codifica un antígeno específico (Gag), una proteína de la envoltura del retrovirus (Env), una transcriptasa reversa (RT), una endonucleasaapurínica/apirimidínica (AP) y una RNasa H (RH) (Revisado en Piégu *et al.*, 2015).

Para identificar TEs, la secuencia *ppSC10-RNasa* se analizó *in silico* en el servidor Dfam (Hubley *et al.*, 2016). Este servidor permite realizar alineamientos de secuencias de elementos de DNA repetitivos y secuencias consenso modelo. Es importante mencionar que si bien esta base de datos no es específica de plantas, muchos elementos transponibles están muy conservados entre diferentes especies de plantas y mamíferos. Con esta herramienta se identificó una región de 305 pb dentro de la secuencia *ppSC10-RNasa* correspondiente a un retrotransposón LTR de la familia Gypsy del genoma de *Danio rerio* (pez cebra), lo cual es consistente con la abundancia de TEs de la familia Gypsy en el género *Nicotiana*. Los resultados obtenidos se presentan a continuación (Figura 23).

Tabla 9. Predicción de sitios de unión a factores de transcripción, resultados del PlanRegMap

Código	Familia	Inicio	Termino	Cadena	Score	E-value	q-value	Secuencia
LOC107776848	ERF	274	288	+	18.8594	2.83E-07	0.000629	GGCTATGTCGGTGAC
LOC107790861	Nin-like	919	933	+	15.9531	3.01E-07	0.000782	TAATGCCCTTTCGGG
LOC107803997	ERF	276	288	+	17.25	3.95E-07	0.000919	CTATGTCGGTGAC
LOC107779745	ERF	279	293	-	18.0156	5.05E-07	0.00111	CCTTAGTCACCGACA
LOC107777214	ERF	279	293	-	18.0156	5.05E-07	0.00112	CCTTAGTCACCGACA
LOC107811321	ERF	276	289	-	16.6094	7.19E-07	0.0017	AGTCACCGACATAG
LOC107768279	TALE	179	198	-	17.32	7.67E-07	0.00123	TGTGCGGTGCGCGGCTCGCC
LOC107797149	ERF	276	292	+	17.9844	7.70E-07	0.00172	CTATGTCGGTGACTAAG
LOC107777976	C2H2	861	879	-	16.5294	8.55E-07	0.00216	TTTTCTCCTGGTCCTCCTC
LOC107808010	ERF	276	290	-	17.125	9.69E-07	0.00228	TAGTCACCGACATAG
LOC107775685	ERF	277	288	-	16.4688	1.07E-06	0.00255	GTCACCGACATA
LOC107762099	ERF	276	290	+	15.7812	3.35E-06	0.00774	CTATGTCGGTGACTA
LOC107790562	WRKY	299	308	-	15.094	3.51E-06	0.00851	CCGTTGACGG
LOC107828216	LBD	857	877	-	13.2812	4.01E-06	0.00851	TTCTCCTGGTCCTCCTCGGCC
LOC107780621	LBD	857	877	-	13.2812	4.01E-06	0.00859	TTCTCCTGGTCCTCCTCGGCC
LOC107771704	LBD	857	877	-	13.2812	4.01E-06	0.00851	TTCTCCTGGTCCTCCTCGGCC
LOC107809033	Dof	133 1	135 1	-	14.1406	4.36E-06	0.00684	AAGAACAAAAGCAATACGAA
LOC107768279	TALE	857	876	-	14.4667	4.83E-06	0.00272	TCTCCTGGTCCTCCTCGGCC
LOC107809033	Dof	468	488	-	14.0156	5.05E-06	0.00684	AATGGGAAAAGCAGATAAAT
LOC107768279	TALE	858	877	-	14.3733	5.10E-06	0.00272	TTCTCCTGGTCCTCCTCGGC
LOC107797149	ERF	720	736	-	14.6406	6.18E-06	0.0069	TTAGGTCGGTGAAATCC
LOC107765238	Dof	688	708	-	13.6875	6.93E-06	0.0145	CCACTTCCCATTTTTCTTTTT
LOC107819325	ERF	726	735	+	13.4526	6.99E-06	0.0164	CACCGACCTA
LOC107797718	MYB_relat ed	729	737	-	14.2059	7.41E-06	0.0193	TTTAGGTCG
LOC107807704	C2H2	828	842	+	13.7969	7.97E-06	0.0194	GCCTACTCCGGTTAC
LOC107768279	TALE	238	257	-	13.56	8.07E-06	0.00322	CACTCGCCCCCTCAGCTGT
LOC107829848	WRKY	290	300	+	14.5625	8.15E-06	0.0219	AAGGTCAACCC
LOC107822582	ERF	280	299	-	13.4531	8.19E-06	0.0153	GGTTGACCTTAGTCACCGAC
LOC107784356	ERF	280	299	-	13.4531	8.19E-06	0.0153	GGTTGACCTTAGTCACCGAC
LOC107773801	ERF	578	592	+	12.2188	8.41E-06	0.0188	TCAACGCCGAATCA
LOC107788682	WRKY	290	299	+	12.3474	8.84E-06	0.0241	AAGGTCAACC
LOC107828891	ERF	575	602	+	10.2656	9.24E-06	0.00963	AATTCACGCCGCAATCAATGAAGCGG C
LOC107800804	ERF	853	867	-	12.4219	9.34E-06	0.0204	CCTCCTCGGCCATCA
LOC107776521	Dof	126 2	128 2	+	13.5781	9.53E-06	0.0258	AAAATGAAGGAAAAGCAAACG
LOC107769453	GATA	669	683	-	13.5588	9.70E-06	0.0256	ATGACGACGTTGGCG

LOC107763082	TCP	111	123	-	11.5205	9.85E-06	0.0212	GAAGGGACCGCTC
LOC107828891	ERF	541	568	+	9.96875	1.00E-05	0.00963	CTATTACATCCGCCAGTGCACAGATG A
LOC107813905	ERF	280	299	+	13.3281	1.01E-05	0.0196	GTCGGTGACTAAGGTCAACC
LOC107788512	ERF	578	598	-	11.9531	1.02E-05	0.0226	CTTCATTGATTGCGGCGTTGA
LOC107803997	ERF	724	736	-	14.3906	1.03E-05	0.012	TTAGGTCGGTGAA
LOC107765238	Dof	132 5	134 5	+	13.2812	1.07E-05	0.0145	GTCCTCTTCGTATTGCTTTTT
LOC107829180	RAV	228	244	-	13.5781	1.11E-05	0.0298	CAGCTGTTTTTTGTGGG
LOC107811321	ERF	723	736	+	14.25	1.11E-05	0.0131	TTTCACCGACCTAA
LOC107777976	C2H2	858	876	-	11.9328	1.26E-05	0.0159	TCTCCTGGTCCTCCTCGGC
LOC107816356	ERF	853	867	-	11.625	1.28E-05	0.0257	CCTCCTCGGCCATCA
LOC107791186	TCP	113	120	-	10.375	1.28E-05	0.0275	GGGACCGC
LOC107820624	ERF	579	593	-	12.7656	1.31E-05	0.0292	TTGATTGCGGCGTTG
LOC107826452	TCP	224	233	+	11.6752	1.34E-05	0.0257	TGCGCCACA
LOC107789289	WRKY	290	301	-	13.7344	1.40E-05	0.0377	CGGGTTGACCTT
LOC107822582	ERF	713	732	+	12.1719	1.41E-05	0.0153	TGTGCGTGGATTTACCCGAC
LOC107784356	ERF	713	732	+	12.1719	1.41E-05	0.0153	TGTGCGTGGATTTACCCGAC
LOC107768279	TALE	863	882	-	12.4133	1.48E-05	0.00473	TCGTTTTCTCCTGGTCTCC
LOC107826136	ERF	276	290	+	13.6094	1.52E-05	0.0357	CTATGTCGGTGACTA
LOC107762262	ERF	276	290	+	13.6094	1.52E-05	0.0354	CTATGTCGGTGACTA
LOC107809033	Dof	126 5	128 5	+	12.9844	1.53E-05	0.0138	ATGAAGGAAAAGCAAACGAGT
LOC107798466	ERF	279	293	-	12.0781	1.58E-05	0.0364	CCTTAGTCACCGACA
LOC107818849	WRKY	288	301	-	13.2031	1.58E-05	0.0432	CGGGTTGACCTTAG
LOC107782559	WRKY	281	299	-	13.4559	1.61E-05	0.0431	GGTTGACCTTAGTCACCGA
LOC107816670	ERF	268	288	+	10.3235	1.75E-05	0.0267	GCAATCGGCTATGTCGGTGAC
LOC107829243	TCP	225	232	+	10.3173	1.82E-05	0.0323	GCGCCAC
LOC107767662	WOX	114 9	115 8	-	12.903	1.90E-05	0.052	TGTCATCAC
LOC107770058	Dof	126 0	128 0	-	12.875	1.91E-05	0.0339	TTTGCTTTTCCTTCATTTTGC
LOC107770569	TCP	204	233	-	7.70886	1.97E-05	0.0171	TGTGGGCGCAATCTTGAGCTATTTTGT AGC
LOC107761268	MIKC_MA DS	135 4	136 5	-	12.5378	1.98E-05	0.0541	CCATAAATGGGC
LOC107831331	LBD	496	514	-	12.5	2.01E-05	0.0298	TGTCTCGCGGGATTCTGC
LOC107808560	LBD	496	514	-	12.5	2.01E-05	0.0295	TGTCTCGCGGGATTCTGC
LOC107777976	C2H2	558	576	-	11.0588	2.01E-05	0.017	TTTCCTTCTCATCTGTCCG
LOC107793050	WRKY	289	301	+	12.875	2.04E-05	0.0558	TAAGGTCAACCCG
LOC107770569	TCP	662	691	+	7.58228	2.05E-05	0.0171	AGTGGGTGCCAACGTCGTCATGGTCA AAA
LOC107825706	MYB	629	643	-	13.3125	2.07E-05	0.0565	TGATGGAGCCGTTGG
LOC107830873	ERF	788	808	-	9.98438	2.09E-05	0.0365	CGTGTCTGCAGTGGCGTCCGA
LOC107778042	ERF	788	808	-	9.98438	2.09E-05	0.0363	CGTGTCTGCAGTGGCGTCCGA
LOC107828216	LBD	247	267	-	9.92188	2.09E-05	0.0222	TATGCCTCTGCACTCGCCCC
LOC107780621	LBD	247	267	-	9.92188	2.09E-05	0.0225	TATGCCTCTGCACTCGCCCC

LOC107771704	LBD	247	267	-	9.92188	2.09E-05	0.0222	TATGCCTCTGCACTCGCCCCC
LOC107775685	ERF	724	735	+	13.3906	2.10E-05	0.025	TTCACCGACCTA
LOC107790562	WRKY	291	300	-	12.5726	2.12E-05	0.0257	GGGTTGACCT
LOC107804504	ERF	545	559	-	9.34375	2.13E-05	0.0482	GCACTGGCGGATGTA
LOC107776521	Dof	471	491	-	12.7344	2.14E-05	0.0288	CTGAATGGGAAAAGCAGATA
LOC107814796	ERF	582	589	+	13.3723	2.15E-05	0.0392	CGCCGCAA
LOC107804466	C2H2	603	613	+	11.6406	2.19E-05	0.0598	CAGTGAAGAAG
LOC107827621	Dof	469	483	+	12.8281	2.20E-05	0.06	TTTATCTGCTTTTTTC
LOC107808010	ERF	722	736	+	12.7969	2.22E-05	0.0262	ATTTACCGACCTAA
LOC107770412	ARF	278	285	-	14.3023	2.24E-05	0.0517	ACCGACAT
LOC107769080	ERF	722	735	-	12.5312	2.27E-05	0.0278	TAGGTCGGTGAAAT
LOC107776848	ERF	724	738	-	11.4688	2.32E-05	0.0257	GTTTAGGTCGGTGAA
LOC107775004	bZIP	322	333	+	12.8298	2.33E-05	0.0495	CCCCGACGTCGT
LOC107811137	CAMTA	184	201	-	12.375	2.38E-05	0.0577	TCCTGTGCGGTGCGCGGC
LOC107824973	LBD	859	879	-	10.2812	2.42E-05	0.0468	TTTTCTCCTGGTCCTCCTCGG
LOC107802176	LBD	859	879	-	10.2812	2.42E-05	0.0467	TTTTCTCCTGGTCCTCCTCGG
LOC107820490	WRKY	289	301	-	11.8906	2.42E-05	0.0657	CGGGTTGACCTTA
LOC107762610	WRKY	289	301	-	11.8906	2.42E-05	0.0657	CGGGTTGACCTTA
LOC107807098	MIKC_MA DS	919	933	+	12.1406	2.43E-05	0.0662	TAATGCCCTTTCGGG
LOC107825059	ERF	853	872	-	11.0781	2.44E-05	0.0191	CTGGTCCTCCTCGGCCATCA
LOC107822582	ERF	506	525	+	10.6562	2.50E-05	0.0181	CGCGAGACATCGCCACCCAC
LOC107784356	ERF	506	525	+	10.6562	2.50E-05	0.018	CGCGAGACATCGCCACCCAC
LOC107770058	Dof	133 6	135 6	+	12.5156	2.50E-05	0.0339	ATTGCTTTTTGTTCTTTTCGCC
LOC107813905	ERF	713	732	-	11.5312	2.50E-05	0.0243	GTCGGTGAAATCCACGCACA
LOC107771611	WRKY	289	301	+	12.6562	2.53E-05	0.0674	TAAGGTCAACCCG
LOC107810623	HD-ZIP	584	593	+	11.4	2.60E-05	0.0713	CCGCAATCAA
LOC107779745	ERF	719	733	+	11.5781	2.61E-05	0.0287	TGGATTTACCGACC
LOC107777214	ERF	719	733	+	11.5781	2.61E-05	0.029	TGGATTTACCGACC
LOC107831331	LBD	861	879	-	12.0625	2.65E-05	0.0298	TTTTCTCCTGGTCCTCCTC
LOC107808560	LBD	861	879	-	12.0625	2.65E-05	0.0295	TTTTCTCCTGGTCCTCCTC
LOC107818082	WRKY	288	301	-	10.5625	2.74E-05	0.0746	CGGGTTGACCTTAG
LOC107780905	WRKY	347	361	-	12.8438	2.75E-05	0.0743	GTCCTTGACTGTCGC
LOC107807574	ERF	852	868	+	8.10938	2.78E-05	0.0505	ATGATGGCCGAGGAGGA
LOC107828746	WRKY	289	299	+	12.5469	2.80E-05	0.0759	TAAGGTCAACC
LOC107762948	WRKY	289	301	-	12.875	2.80E-05	0.0752	CGGGTTGACCTTA
LOC107798916	WRKY	289	299	+	12.25	2.82E-05	0.077	TAAGGTCAACC
LOC107769080	ERF	377	390	+	12.1094	2.82E-05	0.0278	TTGGACGGTACTGA
LOC107825059	ERF	669	688	+	10.75	2.92E-05	0.0191	CGCCAACGTCGTCATGGTCA
LOC10777523	WRKY	292	299	+	12.734	2.96E-05	0.0766	GGTCAACC
LOC107816670	ERF	546	566	-	9.13235	2.97E-05	0.0267	ATCTGTGCACTGGCGGATGT

LOC107825132	Trihelix	829	843	+	11.4219	3.11E-05	0.0676	CCTACTCCGGTTACA
LOC107783127	Trihelix	829	843	+	11.4219	3.11E-05	0.0676	CCTACTCCGGTTACA
LOC107817958	ERF	581	588	+	12.2692	3.14E-05	0.0591	ACGCCGCA
LOC107791029	MYB	119 7	121 1	+	12.5938	3.15E-05	0.0859	GATTAAATTAGGCAA
LOC107776521	Dof	133 4	135 4	-	12.2812	3.19E-05	0.0288	CGAAAGAACAAAAGCAATAC
LOC107790861	Nin-like	894	908	-	12.4375	3.22E-05	0.0418	ATACGTCCCTTGGTG
LOC107810059	WRKY	289	301	+	11.9844	3.23E-05	0.0883	TAAGGTCAACCCG
LOC107807320	WRKY	289	301	+	11.9844	3.23E-05	0.0883	TAAGGTCAACCCG
LOC107774101	WRKY	289	301	+	11.9844	3.23E-05	0.0883	TAAGGTCAACCCG
LOC107786459	BES1	110 1	112 0	-	9.64062	3.26E-05	0.0723	CCCCTCGTGTCCAGCGAACC
LOC107823205	Dof	133 4	135 2	-	12.2344	3.28E-05	0.0889	AAAGAACAAAAGCAATAC
LOC107828273	ERF	544	564	+	7.85294	3.32E-05	0.0508	TTACATCCGCCAGTGCACAG
LOC107801353	ERF	185	194	-	12.1744	3.38E-05	0.0572	CGGTGCGCGG
LOC107775566	MYB	884	902	-	12	3.41E-05	0.0595	CCCTTGGTGGGTGATGAAA
LOC107816670	ERF	667	687	-	8.79412	3.43E-05	0.0267	GACCATGACGACGTTGGCGAC
LOC107769908	WRKY	289	299	+	12.5312	3.44E-05	0.0939	TAAGGTCAACC
LOC107808466	ERF	579	597	-	9.875	3.44E-05	0.0703	TTCATTGATTGCGGCGTTG
LOC107781702	E2F/DP	662	676	+	8.7766	3.48E-05	0.0666	AGTGGGTGCGCAACG
LOC107766447	E2F/DP	662	676	+	8.7766	3.48E-05	0.0665	AGTGGGTGCGCAACG
LOC107817374	MYB	513	531	+	11.9844	3.51E-05	0.0753	CATCGCCACCCACAAGCTG
LOC107825059	ERF	246	265	-	10.2969	3.71E-05	0.0191	TGCCTCTGCACTCGCCCCCT
LOC107808166	ERF	787	807	+	8.82812	3.74E-05	0.0653	ATCGACGCCACTGCAGGACAC
LOC107769080	ERF	277	290	+	11.4375	3.92E-05	0.0278	TATGTGCGGTGACTA
LOC107803829	WRKY	289	299	+	12.2656	3.94E-05	0.107	TAAGGTCAACC
LOC107830371	ERF	577	595	-	9.28125	3.96E-05	0.0406	CATTGATTGCGGCGTTGAA
LOC107769986	MYB	119 8	121 2	+	10.6719	3.98E-05	0.109	ATTAAATTAGGCAAAA
LOC107819325	ERF	516	525	+	11.6842	4.06E-05	0.0386	CGCCACCCAC
LOC107820060	MYB	630	644	-	12.0469	4.08E-05	0.111	CTGATGGAGCCGTTG
LOC107828891	ERF	782	809	+	4.89062	4.27E-05	0.0273	AACTGATCGACGCCACTGCAGGACAC GA
LOC107830873	ERF	578	598	-	8.28125	4.41E-05	0.0365	CTTCATTGATTGCGGCGTTGA
LOC107778042	ERF	578	598	-	8.28125	4.41E-05	0.0363	CTTCATTGATTGCGGCGTTGA
LOC107775566	MYB	513	531	-	11.5312	4.41E-05	0.0595	CAGCTTGTGGGTGGCGATG
LOC107824973	LBD	249	269	-	8.9375	4.48E-05	0.0468	GCTATGCCTCTGCACTCGCCC
LOC107802176	LBD	249	269	-	8.9375	4.48E-05	0.0467	GCTATGCCTCTGCACTCGCCC
LOC107830371	ERF	273	291	+	8.98438	4.49E-05	0.0406	CGGCTATGTGCGGTGACTAA
LOC107807574	ERF	540	556	-	6.59375	4.54E-05	0.0505	CTGGCGGATGTAATAGG
LOC107783484	WRKY	289	301	-	12.0781	4.56E-05	0.123	CGGGTTGACCTTA
LOC107809033	Dof	682	702	+	11.7969	4.57E-05	0.031	ATGGTCAAAAAGAAAATGGG
LOC107787814	TCP	224	232	+	11.2979	4.60E-05	0.0521	TGCGCCAC
LOC107825059	ERF	856	875	-	9.85938	4.66E-05	0.0191	CTCCTGGTCTCCTCGGCCA

LOC107773468	MIKC_MA DS	135 3	136 5	-	11.6912	4.70E-05	0.127	CCATAAATGGGCG
LOC107764357	MIKC_MA DS	135 3	136 5	-	11.6912	4.70E-05	0.127	CCATAAATGGGCG
LOC107816356	ERF	629	643	+	8.46875	4.71E-05	0.0473	CCAACGGCTCCATCA
LOC107780563	ERF	789	796	+	9.79808	4.72E-05	0.0662	CGACGCCA
LOC107774538	ERF	789	796	+	9.79808	4.72E-05	0.0664	CGACGCCA
LOC107808040	Trihelix	831	841	-	10.6875	4.76E-05	0.107	TAACCGGAGTA
LOC107777976	C2H2	855	873	-	9.36975	4.80E-05	0.0304	CCTGGTCCTCCTCGGCCAT
LOC107819325	ERF	277	286	-	11.4737	4.94E-05	0.0386	CACCGACATA
LOC107794330	TCP	113	132	-	-4.31395	4.98E-05	0.105	TAGAAGCTTGAAGGGACCGC
LOC107828273	ERF	578	598	+	6.77941	4.98E-05	0.0508	TCAACGCCGCAATCAATGAAG
LOC107781702	E2F/DP	125 2	126 6	+	7.64894	4.99E-05	0.0666	ATATAGGCGCAAAAT
LOC107766447	E2F/DP	125 2	126 6	+	7.64894	4.99E-05	0.0665	ATATAGGCGCAAAAT
LOC107825059	ERF	279	298	-	9.71875	5.02E-05	0.0191	GTTGACCTTAGTCACCGACA
LOC107793223	NAC	516	530	-	11.2188	5.02E-05	0.137	AGCTTGTGGGTGGCG
LOC107788580	ERF	182	189	+	10.5745	5.21E-05	0.0497	GAGCCGCG
LOC107777199	GRAS	133 7	135 6	-	11.2571	5.30E-05	0.133	GGCGAAAGAACAAAAAGCAA
LOC107768279	TALE	860	879	-	9.66667	5.31E-05	0.0141	TTTTCTCCTGGTCCTCCTCG
LOC107775004	bZIP	324	335	-	11.6277	5.34E-05	0.0568	CCACGACGTCGG
LOC107765920	HD-ZIP	584	596	-	11.3906	5.35E-05	0.085	TCATTGATTGCGG
LOC107760506	Trihelix	456	465	+	10.7021	5.37E-05	0.0877	CTAACCATGC
LOC107787814	TCP	136 2	137 0	-	10.9787	5.38E-05	0.0521	AGGCCCCAT
LOC107788580	ERF	581	588	+	10.4894	5.47E-05	0.0497	ACGCCGCA
LOC107788876	LBD	272	286	+	11.1719	5.48E-05	0.132	TCGGCTATGTCGGTG
LOC107825059	ERF	624	643	+	9.53125	5.53E-05	0.0191	ACTGGCCAACGGCTCCATCA
LOC107778263	bZIP	673	687	-	9.46875	5.54E-05	0.147	GACCATGACGACGTT
LOC107762209	MYB	888	902	+	11.625	5.57E-05	0.15	ATCACCCACCAAGGG
LOC107817374	MYB	884	902	+	11.125	5.59E-05	0.0753	TTTCATCACCCACCAAGGG
LOC107785742	MYB	518	530	-	2.25316	5.61E-05	0.0998	AGCTTGTGGGTGG
LOC107765562	NAC	567	586	-	10.0625	5.69E-05	0.0948	CGGCGTTGAATTTCTTCTC
LOC107829243	TCP	113	120	-	9.33654	5.94E-05	0.0428	GGGACCGC
LOC107819058	MIKC_MA DS	135 2	136 9	-	11.4051	5.98E-05	0.163	GGCCCCATAAATGGGCGA
LOC107762217	MIKC_MA DS	135 2	136 9	-	11.4051	5.98E-05	0.163	GGCCCCATAAATGGGCGA
LOC107808166	ERF	546	566	+	7.5625	6.17E-05	0.0653	ACATCCGCCAGTGGCAGAGAT
LOC107765920	HD-ZIP	115 8	117 0	-	11.1094	6.22E-05	0.085	TCATTTATTGAGT
LOC107789709	C2H2	758	768	+	11.2308	6.23E-05	0.103	CATTCCCACTA
LOC107777680	TCP	223	232	+	10.2021	6.27E-05	0.0688	TTGCGCCCAC
LOC107760309	B3	459	467	-	11.2991	6.33E-05	0.137	CTGCATGGT
LOC107825059	ERF	243	262	-	9.26562	6.33E-05	0.0191	CTCTGCACTCGCCCCCTTCA
LOC107817492	WRKY	291	298	+	11.7021	6.42E-05	0.161	AGGTCAAC

LOC107825059	ERF	663	682	+	9.21875	6.48E-05	0.0191	GTGGGTGCCAACGTCGTCA
LOC107788512	ERF	544	564	-	7.28125	6.49E-05	0.0615	CTGTGCGACTGGCGGATGTAA
LOC107788682	WRKY	298	307	+	10.7474	6.54E-05	0.0892	CCCGTCAACG
LOC107830873	ERF	668	688	-	7.28125	6.70E-05	0.0365	TGACCATGACGACGTTGGCGA
LOC107778042	ERF	668	688	-	7.28125	6.70E-05	0.0363	TGACCATGACGACGTTGGCGA
LOC107777680	TCP	113	122	-	10.0957	6.73E-05	0.0688	AAGGGACCGC
LOC107807704	C2H2	404	418	+	10.8125	6.74E-05	0.0822	GCCTACATCGGGCAC
LOC107830873	ERF	547	567	-	7.26562	6.74E-05	0.0365	CATCTGTGCGACTGGCGGATG
LOC107778042	ERF	547	567	-	7.26562	6.74E-05	0.0363	CATCTGTGCGACTGGCGGATG
LOC107828273	ERF	788	808	+	5.91176	6.83E-05	0.0508	TCGACGCCACTGCAGGACACG
LOC107760506	Trihelix	833	842	-	10.4255	6.88E-05	0.0877	GTAACCGGAG
LOC107830371	ERF	546	564	-	7.90625	6.97E-05	0.0406	CTGTGCGACTGGCGGATGT
LOC107802463	Dof	133 7	134 6	-	10.3419	7.07E-05	0.135	CAAAAAGCAA
LOC107787968	ARF	276	285	-	11.4062	7.14E-05	0.184	ACCGACATAG
LOC107829243	TCP	136 2	136 9	-	9.03846	7.23E-05	0.0428	GGCCCCAT
LOC107763599	YABBY	119 4	120 1	+	11.7344	7.35E-05	0.201	TATGATTA
LOC107790562	WRKY	626	635	-	10.7863	7.36E-05	0.0595	CCGTTGGCCA
LOC107776843	bZIP	508	522	-	8.23438	7.36E-05	0.105	GGTGGCGATGTCTCG
LOC107830371	ERF	787	805	-	7.73438	7.46E-05	0.0406	GTCCTGCAGTGGCGTGCAT
LOC107789709	C2H2	655	665	+	10.9385	7.55E-05	0.103	TACTCCCAGTG
LOC107769170	LBD	861	875	+	10.3594	7.59E-05	0.0997	GAGGAGGACCAGGAG
LOC107830873	ERF	273	293	+	6.96875	7.61E-05	0.0365	CGGTATGTGCGGTGACTAAGG
LOC107778042	ERF	273	293	+	6.96875	7.61E-05	0.0363	CGGTATGTGCGGTGACTAAGG
LOC107768912	SBP	381	391	+	11.2031	7.61E-05	0.208	ACGGTACTGAC
LOC107812294	Dof	126 2	128 2	+	11.0938	7.73E-05	0.11	AAAATGAAGGAAAAGCAAACG
LOC107780563	ERF	582	589	+	9.21154	7.79E-05	0.0662	CGCCGCAA
LOC107774538	ERF	582	589	+	9.21154	7.79E-05	0.0664	CGCCGCAA
LOC107798905	C3H	133 6	134 9	-	11.0938	7.80E-05	0.212	GAACAAAAGCAAT
LOC107830213	TCP	223	232	+	10.0526	7.93E-05	0.156	TTGCGCCCAC
LOC107819325	ERF	131 1	132 0	+	10.9053	7.96E-05	0.0395	CACCGCTCAC
LOC107828216	LBD	557	577	-	6.92188	7.99E-05	0.0566	ATTCCTTCTCATCTGTCGCA
LOC107780621	LBD	557	577	-	6.92188	7.99E-05	0.0571	ATTCCTTCTCATCTGTCGCA
LOC107771704	LBD	557	577	-	6.92188	7.99E-05	0.0566	ATTCCTTCTCATCTGTCGCA
LOC107812294	Dof	133 4	135 4	-	11.0156	8.17E-05	0.11	CGAAAGAACAAAAGCAATAC
LOC107816670	ERF	130 9	132 9	-	6.69118	8.17E-05	0.0476	AGGACTGATGTGAGCGGTGAG
LOC107827621	Dof	687	701	-	11.2656	8.18E-05	0.112	CCATTTTTCTTTTTG
LOC107776843	bZIP	320	334	+	7.92188	8.19E-05	0.105	GACCCCGACGTCGTG
LOC107811159	NAC	516	530	+	10.7344	8.22E-05	0.224	CGCCACCCACAAGCT
LOC107804908	ERF	575	589	-	7.45312	8.26E-05	0.188	TTGCGGCGTTGAATT

LOC107779232	MYB	105 5	106 5	-	9.8375	8.27E-05	0.18	AACTCAGCCTG
LOC107788512	ERF	785	805	-	6.5625	8.34E-05	0.0615	GTCCTGCAGTGGCGTCGATCA
LOC107819325	ERF	190	199	+	10.8526	8.43E-05	0.0395	CACCGCACAG
LOC107785538	SBP	413	422	+	11	8.44E-05	0.204	GGGCACGGCC
LOC107777142	AP2	133 3	135 2	-	10.2785	8.48E-05	0.228	AAAGAACAAAAAGCAATACG
LOC107787383	ERF	852	866	-	6.51562	8.49E-05	0.105	CTCCTCGGCCATCAT
LOC107780905	WRKY	287	301	-	11.1406	8.53E-05	0.115	CGGGTTGACCTTAGT
LOC107823216	SBP	379	392	+	8.70588	8.60E-05	0.224	GGACGGTACTGACC
LOC107825706	MYB	302	316	-	10.8438	8.70E-05	0.119	AATGGCGTCCGTTGA
LOC107767159	MIKC_M ADS	921	935	+	9.625	8.76E-05	0.239	ATGCCCTTTCGGGCT
LOC107823513	BES1	111 0	112 0	+	2.42188	8.79E-05	0.202	GACACGAGGGG
LOC107787383	ERF	542	556	+	6.39062	8.86E-05	0.105	TATTACATCCGCCAG
LOC107816762	E2F/DP	221	230	-	11.1383	8.88E-05	0.167	GGGCGCAATC
LOC107765562	NAC	660	679	-	9.0625	8.91E-05	0.0948	CGACGTTGGCGACCCACTGG
LOC107798348	ARF	277	286	-	11.1719	8.93E-05	0.206	CACCGACATA
LOC107816356	ERF	575	589	+	6.73438	8.94E-05	0.0599	AATTCAACGCCGCAA
LOC107769170	LBD	496	510	+	10.0625	9.00E-05	0.0997	GCAGGAATCCCGCGA
LOC107766306	ERF	791	801	+	6.51562	9.07E-05	0.107	ACGCCACTGCA
LOC107807574	ERF	628	644	-	4.25	9.11E-05	0.0675	CTGATGGAGCCGTTGGC
LOC107808166	ERF	323	343	+	6.53125	9.11E-05	0.0653	CCCGACGTCGTGGAAGCCTGT
LOC107787782	ARF	277	285	+	10.6146	9.13E-05	0.24	TATGTGGT
LOC107801353	ERF	244	253	-	10.4419	9.16E-05	0.0774	CGCCCCCTTC
LOC107766306	ERF	512	522	+	6.4375	9.20E-05	0.107	ACATCGCCACC
LOC107797072	MIKC_M ADS	386	404	-	8.78125	9.29E-05	0.253	CTTCTTTGTAAAGGTCAGT
LOC107830873	ERF	544	564	-	6.46875	9.31E-05	0.0372	CTGTCGCACTGGCGGATGTAA
LOC107778042	ERF	544	564	-	6.46875	9.31E-05	0.037	CTGTCGCACTGGCGGATGTAA
LOC107787814	TCP	663	671	-	9.92553	9.40E-05	0.0607	GCGACCCAC
LOC107827249	WRKY	287	299	-	9.89062	9.50E-05	0.259	GGTTGACCTTAGT
LOC107785742	MYB	889	901	-	0.088607 6	9.52E-05	0.0998	CCTTGGTGGGTGA
LOC107820060	MYB	303	317	-	10.0625	9.62E-05	0.131	TAATGGCGTCCGTTG
LOC107822582	ERF	877	896	+	5.96875	9.74E-05	0.053	AAACGACTTTCATCACCCAC
LOC107784356	ERF	877	896	+	5.96875	9.74E-05	0.0527	AAACGACTTTCATCACCCAC
LOC107828273	ERF	321	341	+	4.89706	9.75E-05	0.0544	ACCCGACGTCGTGGAAGCCT
LOC107826816	C2H2	134 0	135 6	-	7.75	9.76E-05	0.264	GGCGAAAGAACAAAAAG
LOC107788361	EIL	46	66	-	9.08861	9.77E-05	0.265	GTTTCTGGTTTCATCACATAG
LOC107811551	TCP	742	751	+	10.3053	9.79E-05	0.116	GCGTGCCCAA
LOC107811551	TCP	742	751	-	10.3053	9.79E-05	0.116	TTGGGCACGC
LOC107802463	Dof	474	483	-	10.094	9.87E-05	0.135	GAAAAAGCAG

Apéndice VI: Identificación de elementos transponibles con el servidor DPTEdb.

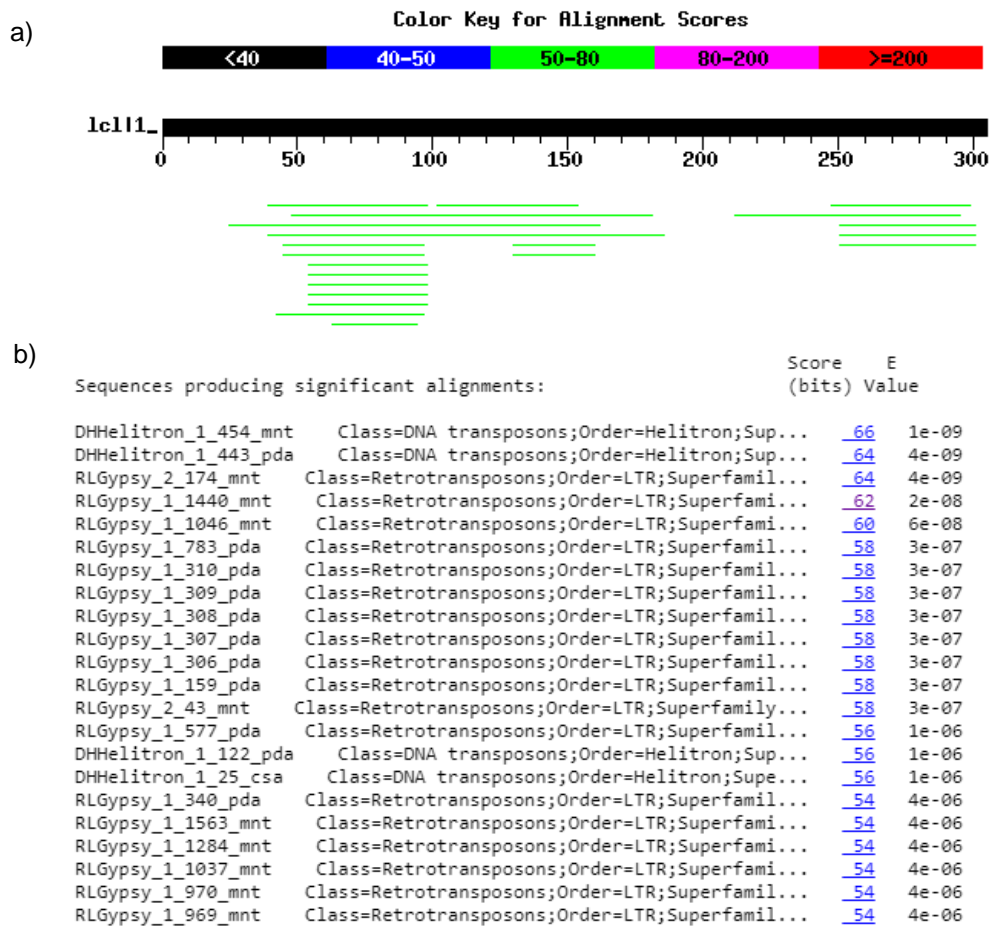


Figura 24. Identificación de TEs con el servidor DPTEdb

a) Mapa del alineamiento de 23 secuencias encontradas que tiene un alineamiento significativo con la secuencia *Gypsy-ppSC10*. La barra superior indica el código de colores que corresponden a cada intervalo de Scores, negro: Score<40, azul: 40-50, verde: 50-80, magenta: 80-200, rojo: >200. La barra negra representa la secuencia *Gypsy-ppSC10* con una longitud de 305 pb. Las líneas verdes representan la localización de los alineamientos encontrados y el color verde indica que tienen un Score de entre 50 y 80.

b) Resumen de los alineamientos encontrados, nombre de la secuencia, tipo de TE, Score y Valor E. Las secuencias encontradas están en las especies *Morus notabilis* (mnt), *Phoenix dactylifera* (pda) y *Cannabis sativa* (csa).

Aunque la base de datos de DPTEdb se especializa en secuencias de plantas dióicas, consideramos adecuada esta base de datos, ya que los TEs se encuentran muy conservados, especialmente entre especies de plantas (Niklas, 1997; Fedoroff, 2000; Todorovska, 2007; Fedoroff, 2012; Jin *et al.*, 2015). Con este análisis se encontraron secuencias correspondientes a TEs de las familias Gypsy y Helitron de las especies *Morus notabilis* (mnt), *Phoenix dactylifera*

(pda) y *Cannabis sativa* (csa). Aunque en este análisis se encontraron secuencias de la familia de transposones Helitron, con *Score* y *Valor E* aceptables, las secuencias de la familia Gypsy se hallan claramente sobre representadas además de que los análisis subsecuentes descartan que pertenezca a la familia Helitron.

El siguiente análisis *in silico* fue de tipo BLASTX en el servidor Gypsy Data Base 2.0 con la base de datos Cores (Llorens *et al.*, 2011), esta base de datos permite identificar secuencias relacionadas con las proteínas codificadas en los retrotransposones de la familia Gypsy. Con este análisis se identificaron más de dos mil secuencias de retrotransposones, y se encontró que 95% de estas tienen similitud con la transcriptasa reversa (RT), pero únicamente 9 presentan un *Score* mayor a 80 y un *valor E* menor a $3e^{-21}$, por lo que se consederan resultados aceptables. En la siguiente figura se presenta un resumen con los resultados más significativos

```
Database: cores
          2636 sequences; 629,570 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:      Score (bits)      E value
RT_Tat4-1                                     107                2e-31
RT_Tft2                                       105                6e-31
RT_Cinful-1                                   100                6e-29
RT_RIRE2                                      94                 1e-26
RT_RetroSor1                                  87                 1e-23
RT_Ogre                                       86                 3e-23
RT_GypsySL_monotypic|Chr08_2s54              85                 5e-23
RT_GypsySL_12                                83                 4e-22
RT_GypsySL_06                                80                 3e-21
```

Figura 25). La lista completa de alineamientos se incluye más adelante ([Apéndice VII: BLAST en Gypsy Data Base 2.0](#)).

```

Database: cores
      2636 sequences; 629,570 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:      Score (bits)      E value
RT_Tat4-1                                     107              2e-31
RT_Tft2                                       105              6e-31
RT_Cinful-1                                  100              6e-29
RT_RIRE2                                       94              1e-26
RT_RetroSor1                                  87              1e-23
RT_Ogre                                       86              3e-23
RT_GypsySL_monotypic|Chr08_2s54              85              5e-23
RT_GypsySL_12                                83              4e-22
RT_GypsySL_06                                80              3e-21

```

Figura 25. BLASTX de secuencia *Gypsy-ppSC10* en el servidor Gypsy Data Base 2.0

Secuencias encontradas en la base de datos Cores con Score mayor a 80. Las columnas indican el nombre de las secuencias, Score y Valor E. Fragmento de resultados totales. RT: transcriptasa reversa.

Entraron

muchas secuencias con una identidad de secuencia mayor al 80% y valores E menores a $9e^{-21}$, pero únicamente dos de las secuencias están anotadas, ambas como polimerasas de DNA dependientes de RNA pertenecientes a *Nicotiana tabacum* (Figura 26). Es importante señalar que

Download [GenPept](#) [Graphics](#)

PREDICTED: RNA-directed DNA polymerase homolog [*Nicotiana tabacum*]
 Sequence ID: [XP_016502432.1](#) Length: 205 Number of Matches: 1

Range 1: 57 to 102 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
101 bits(252)	1e-25	Composition-based stats.	45/46(98%)	46/46(100%)	0/46(0%)	+1

Query 4 QWVANVVMVKKKNGKWRMCVDFIDLNKACPKDSFPLPHIDLIDAT 141
 QWVANVVMVKKKNGKWRMCVDFIDLNKACPKDSFPLP+IDLIDAT
 Sbjct 57 QWVANVVMVKKKNGKWRMCVDFIDLNKACPKDSFPLPYIDLIDAT 102

Download [GenPept](#) [Graphics](#)

PREDICTED: RNA-directed DNA polymerase homolog [*Nicotiana tabacum*]
 Sequence ID: [XP_016454893.1](#) Length: 238 Number of Matches: 1

Range 1: 44 to 89 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
101 bits(252)	3e-25	Composition-based stats.	44/46(96%)	45/46(97%)	0/46(0%)	+1

Query 4 QWVANVVMVKKKNGKWRMCVDFIDLNKACPKDSFPLPHIDLIDAT 141
 QWVANVVMV+KKN KWRMCVDFIDLNKACPKDSFPLPHIDLIDAT
 Sbjct 44 QWVANVVMVQKKNRKWRMCVDFIDLNKACPKDSFPLPHIDLIDAT 89

Alineamientos con mejor Valor E, Score e Identidad correspondientes a secuencias anotadas. Fragmento de resultados totales.

Figura 26. BLASTX de secuencia *Gypsy-ppSc10* en el servidor NCBI.

estos alineamientos presentan una cobertura muy baja (32%), respecto a la longitud del gen, por lo que podría considerarse una secuencia trunca.

Además de que los resultados obtenidos con estas dos bases de datos son muy similares, al analizar los dominios conservados a nivel de aminoácidos en la base de datos del NCBI, se encontró que la secuencia *Gypsy-ppSC10* incluye tres elementos altamente conservados correspondientes al dominio de unión al DNA de la proteína transcriptasa reversa (Resultados no incuídos).

Un aspecto crucial relativo a los TEs es su diversidad en tamaño, pues comúnmente se presentan con longitudes que van de 1.5 a 6 kb, la secuencia *Gypsy-ppSC10* contiene alrededor de 300 nt que podrían ser la secuencia trunca de una transcriptasa reversa, por lo que esta información no concuerda con lo reportado para las islas de metilación CHH (Gent *et al.*, 2013).

Estudios realizados en diversas especies de plantas indican que los TE's no autónomos con longitudes de entre 300 y 1200 pb denominados mTEs (Miniature Transposable Elements), los cuales presentan alto número de copias, están ampliamente distribuidos en el genoma de plantas y se sabe que evolucionaron a partir de TEs autónomos que perdieron los genes necesarios para la transposición, pero que conservan parte de las regiones repetidas terminales. De acuerdo con el tipo de elemento transponible del cual se derivan los mTE's, se clasifican como MITEs (miniature inverted-repeat transposable elements) y TRIMs (terminal repeat retrotrans-posons in miniature). Las secuencias MITE se originaron a partir de transposones de DNA y conservan las secuencias terminales repetidas invertidas (TIR) y la región de duplicación sitio específico (TSD). En cambio las secuencias TRIM previenen de

retrotransposones LTR y conservan las secuencias terminales repetidas largas (LTR), la región TSD, el motivo de unión al tRNA-metionina (PBS) y el motivo de polipurina (PPT) (Sun *et al.*, 2008; Vukich *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2012; Wang y Kole, 2015; Shen *et al.*, 2017).

De acuerdo con las características que definen cada categoría, no es posible clasificar la secuencia *Gypsy-ppSC10* como un elemento TRIM, pues aunque proviene de un retrotransposón al incluir la secuencia trunca de una transcriptasa reversa de la familia Gypsy, no se identificaron secuencias LTR, PBS o PPT.

Habiendo descartado la presencia de un elemento transponible, el siguiente paso fue explorar otro aspecto de la regulación transcripcional que también está estrechamente relacionado con la regulación epigenética: la producción de transcritos de RNA no codificantes (ncRNAs), esto bajo la hipótesis de que un ncRNA codificado en la región 5' del gen *S-RNasa* podría estar involucrado en el patrón transcripcional que se observa durante el desarrollo del pistilo o en el tejido vegetativo.

Para obtener más información se analizó la secuencia *ppSC10-RNasa* (1381 pb) en la base de datos RNA central (Molecular *et al.*, 2017), con lo que se obtuvieron algunos alineamientos con valores E muy aceptables, pero nuevamente la cobertura de los alineamientos respecto a las secuencias anotadas es muy baja, contiene huecos y se restringe a la región correspondiente de *Gypsy-ppSC10*. Cabe mencionar que ninguna de las secuencias encontradas pertenece a la familia de RNA funcional no codificante, lo que sugiere que las secuencias del RNA no forman estructuras secundarias similares a las secuencias consenso almacenadas en la base de datos Rfam (Kalvari *et al.*, 2018). Un resumen de los cuatro mejores alineamientos se presenta en la [Figura 27](#).

La hipótesis antes descrita proviene de la relación que se ha observado entre los ncRNA, las secuencias *enhancer* (secuencias reguladoras que funcionan como potenciadores de la transcripción) y el silenciamiento de promotores, que en conjunto representan niveles de regulación transcripcional muy complejos (W. Li, Notani, y Rosenfeld 2016; Allis y Jenuwein 2016; Forestan *et al.*, 2017).

Arabidopsis thaliana other URS0000D1E597				
E-value	Identity	Query coverage	Target coverage	Gaps
1.60e-53	55.1% (507/920)	60.8% (901/1482)	10.5% (863/8247)	8.3% (76/920)

Arabidopsis thaliana other URS0000D47880				
E-value	Identity	Query coverage	Target coverage	Gaps
1.20e-40	55.0% (514/934)	62.0% (919/1482)	5.9% (868/14695)	8.7% (81/934)

Hevea brasiliensis misc RNA URS0000B6F570				
E-value	Identity	Query coverage	Target coverage	Gaps
4.30e-28	60.6% (246/406)	27.3% (404/1482)	8.4% (398/4747)	2.5% (10/406)

Hevea brasiliensis misc RNA URS0000BA1B74				
E-value	Identity	Query coverage	Target coverage	Gaps
4.70e-26	58.3% (305/523)	34.8% (516/1482)	16.9% (517/3063)	2.5% (13/523)

Figura 27. Identificación de ncRNA en RNACentral

La figura incluye los mejores alineamientos obtenidos de la identificación de ncRNAs en la base de datos RNACentral.

Con estos resultados no se descarta por completo la predicción de que se produzca un ncRNA a partir de esa región del gen y tenga funciones en *cis*, razón por la cual incluimos a continuación un resultado no mencionado anteriormente concernientes a la región 5' río arriba de la región codificante, con el objetivo de mostrar otra región reguladora que pudiera dirigir la expresión de un ncRNA.

Este resultado corresponde a datos obtenidos con el servidor Softberry en el programa TSSPlant, en el que se identificó un TSS y una caja TATA en el extremo 5' de promotor, situado específicamente en las posiciones -1077 y -1043 respectivamente (Figura 28). Esta predicción presenta un Score menor que el TSS y una Caja TATA que se cree dirigen la expresión del gen *SC10-RNasa* (Figura 17). Además de esto, es importante mencionar que no se observa un enriquecimiento significativo de sitios de unión a factores de transcripción en esa zona (Figura 19) (análisis en PlanRegMap: TF Enrichment, resultados no mostrados) y el patrón de metilación tampoco cambia a partir de esa región.

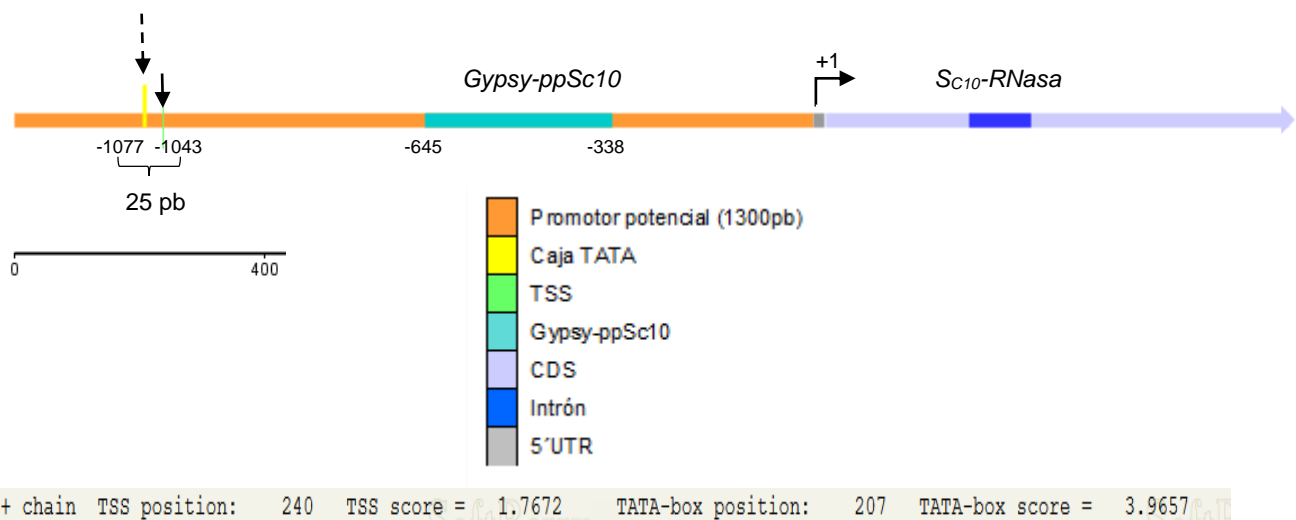


Figura 28. TSS y caja TATA en la región 5' de ppSc10-RNasa

Representación gráfica de las secuencias *ppSC10-RNasa* y *SC10-RNasa* construida con el programa DNAPlotter. La posición del TSS y la caja TATA fueron obtenidos por predicción del servidor Softberry con el programa TSSPlant: *Search for RNA polymerase II promoters (TSSs) in plant DNA sequences*. La flecha continua marca el TSS y la flecha punteada marca la posición de la caja TATA. CDS corresponde a la región codificante del gen *SC10-RNasa*.

Dado que en la región *Gypsy-ppSC10* tampoco se identificó un enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción, con los análisis *in silico* realizados no es posible discernir claramente la función de esta región o relacionar esta secuencia con el patrón de metilación en contexto CHH que se presenta en maíz como “límite heterocromatina-eucromatina”, e incluso no es posible descartar la existencia de un elemento transponible río arriba a las 1300 pb

obtenidas mediante el método Walking de DNA, pues permanecerá sin explorar debido a la limitante de no contar con la secuencia del locus *S* de *N. alata*, además de que los genomas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* (especies autocompatibles) no se encuentran anotados a detalle .

Los análisis *in silico* representan una guía indicativa que permiten descartar hipótesis o generar más interrogantes. En el caso de este estudio, fue posible identificar un fragmento retrotransposón de la familia Gypsy altamente conservado (*Gypsy-ppSc10*), identificar esta secuencia como el homólogo de una transcriptasa reversa trunca y descartar que la secuencia es un elemento transponible en miniatura, pues carece de las secuencias repetidas invertidas que definen este tipo de elementos. Por otra parte, permanece la interrogante sobre la función de esta secuencia, más aún, desconocemos si de hecho participa en la regulación transcripcional del gen y de ser así, el mecanismo por el cual actúa permanece en incógnita, pues bien podría influir en la composición del patrón de metilación en alguna etapa del desarrollo, promover cambios en la cromatina, ser el blanco de complejos transcripcionales importantes o producir ncRNA con función en *cis*.

CONCLUSIONES

Se clonó una secuencia de 1300 pb río arriba de la región codificadora del gen SC_{10} -RNasa, dentro de la cual se identificó (*in silico*) un elemento Caja TATA en la posición esperada, respecto al sitio de inicio de la transcripción, además de diversos motivos de unión a factores de transcripción, algunos relacionados con el desarrollo de órganos florales.

También se identificó una secuencia de 305 pb en la posición -338 río arriba del sitio de inicio de la transcripción con similitud a la transcriptasa reversa trunca de un retrotransposón LTR de la familia Gypsy, el cual no es un elemento transponible en miniatura.

Por último se determinó el patrón de metilación del promotor potencial de SC_{10} -RNasa a partir de DNA de hoja, pistilo de botón y pistilo maduro, en este último se encontró un nivel elevado de metilación en contexto CHH.

PERSPECTIVAS

Evaluar si la secuencia obtenida puede dirigir la expresión de forma específica en pistilo maduro de genes reporteros (β -Glucuronidasa y GFP), mediante expresión estable en *N. tabacum* y *N. benthamiana*.

Obtener el patrón de metilación del gen *ppS_{C10}-RNasa* en la etapa de intermedia de desarrollo del pistilo y en polen para compararlo con los resultados obtenidos en hoja, pistilo de botón y pistilo maduro.

Definir si la secuencia *pp-Gypsy* es parte del mecanismo de regulación transcripcional del gen *ppS_{C10}-RNasa*.

Evaluar las marcas de la cromatina y la accesibilidad de nucleosomas en el gen *ppS_{C10}-RNasa*.

Definir el mecanismo que evita la expresión de la S-RNasa en tejido vegetativo.

APÉNDICE I: METODOLOGÍA

Extracción de DNA genómico con CTAB

La extracción de DNA genómico se realizó por el método de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) amortiguador al 3% ([Apéndice II: Materiales y equipos](#)).

Procedimiento

1. Triturar 1 g de tejido (hoja) congelado y transferir a un tubo de 2 mL
2. Adicionar 700 μ L de amortiguador CTAB con 1% β -mercapto etanol y mezclar con vortex. Preparar esta mezcla al momento
3. Incubar a 65°C por 60 minutos, invertir el tubo cada 15 minutos
4. En campana de extracción adicionar 400 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (AI) (24:1) y mezclar con vortex
5. Centrifugar por 7 minutos 3500rpm
6. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo
7. Adicionar 1 μ L de RNasa A (20 mg / mL). Incubar 30 minutos a 37°C
8. En campana de extracción adicionar 400 μ L de cloroformo:AI (24:1) y mezclar con vortex
9. Centrifugar por 7 minutos a 3500rpm
10. Transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo
11. Adicionar 500 μ L de isopropanol y 1 μ L de glucógeno para precipitar el DNA e incubar toda la noche a -20°C
12. Centrifugar por 10 minutos a 11000rpm
13. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet con 500 μ L de agua grado PCR
14. Adicionar 500 μ L de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (PCI) a la muestra de DNA y mezclar bien con vortex suave
15. Centrifugar por 3 minutos a 8000rpm
16. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo de 1.5 mL
17. Adicionar 50 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.5 frío y 1 mL de etanol 100% frío, Incubar 1 hora a -20°C
18. Centrifugar por 10 minutos a 11000xg

19. Remover el sobrenadante y lavar con 400 μ L de etanol 70%
20. Centrifugar por 5 minutos a 11000xg
21. Remover el etanol y secar al aire por 10 minutos
22. Resuspender el DNA en 200 μ L de agua grado PCR
23. Cuantificar el DNA utilizando NANODROP y almacenar a -20°C

*Protocolo modificado de (Doyle y Doyle, 1990)

Walking de DNA

Construcción de Bibliotecas

1. Calidad de DNA genómico

Cargar el DNA genómico purificado de hoja en un gel de agarosa al 0.6%/ EtBr/TAE junto con un marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder)

- Evaluar la pureza del DNA genómico mediante digestión con enzimas de restricción *DraI*, *EcoRI*, *PvuII* y *StuI*.
 - a) En un tubo de 0.5 mL combinar lo siguiente e incubar a 37°C toda la noche/ON (16-18h).

5 μ L	DNA genómico
1.6 μ L	Enzima (10U/ μ L)
2 μ L	Amortiguador de restricción 10X
11.4 μ L	Agua desionizada
20 μ L	Volumen total

- b) Correr una electroforesis con 5 μ L de cada reacción en un gel de agarosa al 0.6%/ EtBr/TAE.

2. Digestión de DNA genómico

Para construir la biblioteca se deben montar cinco reacciones: cuatro correspondientes al DNA genómico de *N. alata* y una de DNA genómico humano como control positivo (incluido en el kit).

- a) Marcar cinco tubos de 1.5 mL como se muestra a continuación

DL-1	DNA genómico de <i>N. alata</i> digerido con <i>DraI</i>
DL-2	DNA genómico de <i>N. alata</i> digerido con <i>EcoRV</i>
DL-3	DNA genómico de <i>N. alata</i> digerido con <i>PvuII</i>
DL-4	DNA genómico de <i>N. alata</i> digerido con <i>StuI</i>

Control positivo DNA genómico humano digerido con *PvuII*

b) En cada tubo por separado combinar lo siguiente

25 µL	DNA genómico (0.1 µg/ µL)
8 µL	Enzima de restricción (10U/ µL)
10 µL	Amortiguador de restricción 10X
57 µL	Agua desionizada
<hr/>	
100 µL	Volumen total

c) Mezclar suavemente por inversión e incubar 2 horas a 37°C

d) Mezclar la reacción por vortex a baja velocidad por 10 segundos e incubar O/N a 37°C

e) Realizar una electroforesis con 5 µL de cada reacción en un gel de agarosa al 0.6%/ EtBr/TAE para verificar que la digestión se completó

3. Purificación de DNA genómico

➤ La purificación de las bibliotecas se realizó mediante el “kit Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up” como se indica en el siguiente protocolo:

a) Ajustar las condiciones de unión del DNA

Mezclar los 95 µL restantes de cada reacción de digestión con 200 µL de Amortiguador NT1

b) Unión de DNA

- Colocar una columna “Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up” en un tubo colector (2 mL) y cargar la muestra obtenida del paso anterior
- Centrifugar por 30 segundos a 11000xg, descartar el líquido y colocar la columna de nuevo en el tubo colector

c) Lavar la membrana de sílice

Adicionar 700 µL de Amortiguador NT3 a la columna. Centrifugar por 30 segundos a 11000xg. Descartar el líquido y colocar la columna de nuevo en el tubo colector

d) Secar la membrana de sílice

Centrifugar por 1 minuto a 11000xg para remover completamente el Amortiguador NT3. Asegurarse de que la columna no entre en contacto con el líquido al quitarla del tubo colector

e) Eluir el DNA

Colocar la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL y adicionar 20 µL de Amortiguador NE (precalentado a 70°C), incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar durante 1 minuto a 11000xg.

f) Estimar el rendimiento de DNA

De cada tubo de reacción tomar 1 µL y correr en un gel de agarosa 6%/EtBr/TAE

4. Ligación de DNA genómico a adaptadores GenomeWalker

➤ Las bibliotecas y el control positivo se ligaron a los adaptadores proporcionados en el kit según el siguiente protocolo:

a) De cada tubo (DL-1, DL-2, DL-3, DL-4 y control positivo), transferir 4.8 µL de DNA digerido y purificado a tubos nuevos de 0.5 mL, a cada uno adicionar:

1.9 µL Adaptador GenomeWalker (25µM)

0.8 µL Amortiguador de ligación 10X

0.5 µL T4 DNA ligasa (6U/ µL)

b) Incubar a 16°C en termociclador O/N

c) Incubar a 70°C por 5 minutos para detener la reacción

d) A cada tubo adicionar 32 µL de TE 10/1 pH 7.5 para un volumen final de 40 µL

e) Mezclar por vortex a baja velocidad de 10-15 segundos

DNA walking

1. Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos según las recomendaciones del protocolo; cada par se diseñó específicamente para cada uno de los dos walking de DNA realizados como se muestra en la Tabla 3.

Diseño de oligonucleótidos para PCR anidado

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para DNA walking

	Código	Secuencia	Longitud	TM	% GC
DNA walking 1	GSP1 / SC10P2	CATCGAGTCGAAACATATGCC	21	53	47
	GSP2	CATTCCCCTTCCAGGAATAATTCCG	25	57	48

2. PCR primario

a) Marcar ocho tubos para PCR de 0.5 mL para emplearlos como se muestra en el siguiente plan:

Tabla 4. Plan de etiquetado de tubos para el PCR primario, DNA walking

Tubo	DNA molde	Forward	Reverse
1A	DL-1 (<i>DraI</i>)	AP1	GSP1
2A	DL-2 (<i>EcoRV</i>)	AP1	GSP1
3A	DL-3 (<i>PvuII</i>)	AP1	GSP1
4A	DL-4 (<i>StuI</i>)	AP1	GSP1
5A	-	AP1	GSP1
6A	Control positivo para la construcción de bibliotecas*	AP1	PCP1
7A	-	AP1	PCP1
8A	Control positivo de PCR**	AP1	PCP1

* DNA Genómico humano digerido con *PvuII*

** Biblioteca control de DNA humano

- b) Preparar PCR mix para las ocho reacciones más un tubo adicional. Mezclar por vortex y centrifugar brevemente

9 reacciones	
175.5 µL	H ₂ O desionizada
22.5 µL	10X Advantage 2 PCR amortiguador
4.5 µL	dNTP (10 mM)
4.5 µL	AP1 (10 µM)
4.5 µL	Advantage 2 polymerase mix (50X)
<hr/>	
211.5 µL	Volumen total

- c) Adicionar 23.5 µL del PCR mix a cada tubo marcado
- d) Para cada reacción 1A a 5A adicionar 0.5 µL de GSP a cada tubo. Para las reacciones 6A a 8A adicionar 0.5 µL de PCP1
- e) Adicionar 1 µL de cada biblioteca al tubo correspondiente
- f) Adicionar agua los tubos 5A y 7A
- g) centrifugar brevemente los tubos
- h) Realizar el ciclo termal de PCR como se indica:

Tabla 5. Condiciones de ciclo termal de PCR primario para DNA walking

DNA walking	
• 7 ciclos:	94°C 25s 72°C 3min
• 32 ciclos:	94°C 25s 67°C 3min

- 1 ciclo:

67°C 7min

- i) Analizar 5 μ L de cada producto de PCR primario en una electroforesis con gel de agarosa 1.5%/EtBr
3. PCR secundario
- a) Marcar ocho tubos para PCR de 0.5 mL para emplearlos como se muestra en el siguiente plan:

Tabla 6. Plan de etiquetado de tubos para el PCR secundario

Tubo	DNA molde (tomado del PCR primario)	Forward	Reverse
1B	1A	AP2	GSP2
2B	2A	AP2	GSP2
3B	3A	AP2	GSP2
4B	4A	AP2	GSP2
5B	5A	AP2	GSP2
6B	6A*	AP2	PCP2
7B	7A	AP2	PCP2
8B	8A**	AP2	PCP2

* DNA Genómico humano digerido con *PvuII*

** Biblioteca control de DNA humano

- b) Empleando un tubo nuevo para cada muestra, diluir cada PCR primario en agua desionizada, para un volumen final de 50 μ L, dilución 1:50.
- c) Preparar PCR mix para las ocho reacciones más un tubo adicional. Mezclar por vortex y centrifugar brevemente

9 reacciones

175.5 μ L	H ₂ O desionizada	
22.5 μ L	10X Advantage 2 PCR amortiguador	
4.5 μ L	dNTP (10 mM)	
4.5 μ L	AP2 (10 μ M)	
4.5 μ L	Advantage 2 polymerase mix (50X)	
211.5 μ L	Volumen total	

- d) Adicionar 23.5 μ L del PCR mix a cada tubo marcado
- e) Para cada reacción 1B a 5B adicionar 0.5 μ L de GSP a cada tubo. Para las reacciones 6B a 8B adicionar 0.5 μ L de PCP2

- f) Adicionar 1 μL de cada PCR primario diluido al tubo correspondiente
- g) Centrifugar brevemente los tubos
- h) Realizar el ciclo termal de PCR como se indica:

Tabla 7. Condiciones de ciclo termal de PCR secundario para DNA walking

DNA walking		
• 5 ciclos:	94°C	25s
	72°C	3min
• 20 ciclos:	94°C	25s
	67°C	3min
• 1 ciclo:	67°C	7min

- i) Analizar 5 μL de cada producto de PCR secundario en una electroforesis con gel de agarosa 1.5%/EtBr

Clonación de las secuencias obtenidas por el método de DNA walking

Purificación del amplicón

- En cada walking de DNA se seleccionó una biblioteca que contuviera una banda de alto peso molecular, definida y abundante.

DNA walking 1
Biblioteca <i>EcoRV</i>
Banda 2B de ~1700 pb

1. Extracción de banda seleccionada de gel de agarosa
 - a) Cargar los 20 μL restantes de la biblioteca seleccionada en un gel de agarosa 1%/EtBr y correr electroforesis
 - b) Extraer del gel la banda seleccionada y colocar en un tubo de 1.5 mL previamente pesado
2. Purificar la banda según el siguiente protocolo incluido en el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up
3. Cuantificación por NANODROP
4. Ligación a vector de clonación pJET1.2/blunt

5. Transformación de células competentes de *E. coli* top 10 quimiocompetentes
6. Selección de colonias positivas en placas de LB/ampicilina
7. Purificación del plásmido por kit a partir de cultivo celular
8. Envío a unidad de secuenciación al IBT Cuernavaca, Morelos.

Extracción de DNA de geles de agarosa

- Protocolo incluido en el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up
 1. Solubilizar el fragmento de gel. Por cada 100 mg de gel de agarosa adicionar 200 µL de Amortiguador NT1. Incubar la muestra 5 minutos a 50°C, mezclar por vortex brevemente cada 2 min hasta que el gel esté completamente disuelto
 2. Unir DNA. Colocar una columna NucleoSpin en un tubo colector y adicionar hasta 700 µL de muestra. Centrifugar 30s a 11000xg, descartar el flujo y colocar la columna en el tubo colector
 3. Lavar la membrana de silica. Adicionar 700 µL de Amortiguador NT3 a la columna. Centrifugar por 30s a 11000xg, descartar el flujo y colocar la columna en el tubo colector
 4. Secar la membrana de silica. Centrifugar por 1min a 11000xg para remover el Amortiguador NT3 completamente
 5. Eluir el DNA. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Adicionar 15 µL de Amortiguador NE e incubar a temperatura ambiente por 1min. Centrifugar 1min a 11000xg.

Ligación a plásmido pJET1.2/blunt

- Protocolo incluido en el pJET1.2/blunt Cloning Vector

Sticky-End cloning protocol (para clonar fragmentos de PCR con extremos 3'-dA).

 1. Preparar la reacción de "blunting" o creación de extremos romos en hielo y agitar con vortex:

Componente	Volumen
Buffer de reacción 2X	10 µL
Productos de PCR purificados	0.15 pmol de extremos (Ver Tabla 8)
Agua libre de nucleasas	cbp 17 µL
DNA Blunting Enzyme	1 µL
Volumen total	18 µL

Tabla 8. Cantidad recomendada de productos de PCR para ligación a pJET1.2/blunt

Largo del producto de PCR (pb)	Cantidad (ng) optima de producto de PCR para la ligación (0.15pmol de extremos)
100	5
300	15
500	25
1000	50
2000	100
3000	150
4000	200
5000	250

2. Incubar a 70° por 5 minutos y dejar enfriar en hielo
3. Preparar la reacción de ligación en hielo. Adicionar los siguientes reactivos a la reacción anterior. Agitar con vortex y centrifugar brevemente.

Componente	Volumen
pJET1.2/blunt	1 µL
T4 DNA ligasa	1 µL
Volumen total	20 µL

4. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos
5. Utilizar la reacción de ligación directamente para transformar o almacenar a -20°C

** Selección de colonias transformantes en placas de LB/ampicilina concentración final de 100 µg/mL

Transformación de células competentes de *E. coli* top 10 quimiocompetentes

Procedimiento:

1. Colocar la alícuota de células en hielo
2. Adicionar 100ng de plásmido
3. Incubar 30min en hielo
4. Tratar con shock térmico a 42°C por 1 minuto 30 segundos
5. Incubar en hielo 1 minuto
6. Adicionar 4 volúmenes de medio SOC (400 µL)
7. Incubar en agitación a 37°C por 2 h
8. Centrifugar y descartar el sobrenadante
9. Resuspender en 100 µL de medio LB
10. Inocular Caja Petri con medio sólido LB/antibiótico (según el protocolo del vector)
11. Incubar a 37°C O/N

Protocolo mini-preparación de plásmido

1. Centrifugar 2 mL de cultivo a 10 000rpm 30s y eliminar el sobrenadante
2. Añadir 200 µL de solución de resuspensión y agitar con vortex
3. Adicionar 200 µL de solución de lisis y agitar por inversión 5 veces
4. Adicionar 200 µL de solución de neutralización y agitar por inversión 5 veces
5. Centrifugar a máxima velocidad 5min
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
7. Adicionar 800 µL de EtOH 100% y mezclar bien
8. Incubar a -20° por 30 min
9. Centrifugar 4 min a máxima velocidad y desechar el sobrenadante
10. Lavar el botón con 1mL de EtOH 70% agitando con vortex y centrifugar 4 min a máxima velocidad
11. Desechar el sobrenadante
12. Dejar secar hasta que el botón sea transparente a 36°C o temperatura ambiente
13. Resuspender en 30-60 µL de agua dependiendo del tamaño del botón, incubar a 65°C para facilitar la resuspención.

Conversión de DNA con Bisulfito de Sodio

Protocolo modificado de (Haque y Nishiguchi 2011).

1. Extracción de gDNA (elución en agua)
2. Reacción de digestión con *NdeI* a partir de 10mg de gDNA (enzima de restricción que no reconozca sitios de corte en la secuencia de interés)
 - Reacción de digestión, volumen final de 50 µL. en un tubo de 1.5 mL

gDNA (10 µg)	5 µL
Amortiguador de restricción 10X Smart Cut	5 µL
Enzima <i>NdeI</i> (20U/ µL)	1.3 µL
Agua cbp 50 µL	38.7 µL
Volumen final	50 µL

- Incubación ON a 37°C
- 3. Llevar la reacción a un volumen de 400 µL con agua
- 4. Adicionar 400 µL de PCI y agitar por vortex
- 5. Centrifugar a 15000g por 10 min
- 6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 50 µL de acetato de sodio 3M
- 7. Adicionar 1 mL de EtOH 100% y mezclar por inversión
- 8. Incubar ON a 20° C
- 9. Centrifugar a máxima velocidad por 15 min a 4°C
- 10. Lavar el pellet 2 veces con 500 µL de EtOH al 70%
- 11. Dejar secar el pellet
- 12. Resuspender en 100 µL de agua
- 13. Transferir 20 µL a tubos para PCR (5 tubos)
- 14. Conversión por bisulfito de sodio. EZ Gold Kit, Zymo Research
 - 1) Preparación del reactivo CT Conversion Reagent, según el protocolo del kit. (Preparar y usar de inmediato).
 - 2) Adicionar el reactivo CT según el protocolo del kit
 - 3) Incubar las muestras en termociclador

98° C	10 min	
53°C	30 min	
53°C	6 min	8 Ciclos
37° C	30 min	
4°C	-	
 - 4) Realizar Desulfonación y purificación según el protocolo del kit.
 - 5) Almacenar la mitad de la reacción a -70°C

APÉNDICE II: MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos

- Acetato de sodio, J. T. Baker
- Ácido acético glacial, J. T. Baker
- Agar, Sigma-Aldrich
- Alcohol isoamílico (AI) , J. T. Baker
- Ampicilina, Sigma-Aldrich
- Bromuro de etidio, GibcoBRL
- Cloroformo, J. T. Baker
- CTAB, Research Organics
- *EcoRI* 10X amortiguador de restricción New England's BioLab
- *EcoRI* New England's BioLab
- EDTA sódico, J. T. Baker
- Etanol, J. T. Baker
- Extracto de levadura, Difco Laboratories
- Bromuro de etidio
- Fenol-cloroformo-Alcohol isoamílico (PCI), Sigma-Aldrich
- Glicerol, AMRESCO
- Glucógeno, Sigma-Aldrich
- Glucosa, Sigma-Aldrich
- Isopropanol, J. T. Baker
- KCl, J. T. Baker
- Marcador de peso molecular de 100 pb, Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder
- Marcador de peso molecular de 1kb, Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder
- $MgCl_2$, J. T. Baker
- NaCl, J. T. Baker

- NaOH ojuelas, Meyer
- *NdeI*, New Englands BioLab
- Amortiguador de restricción 10X Smart Cut, New Englands BioLab
- N-N dimetilformamida, Sigma-Aldrich
- Peptona, BD Becton, Dickenson & Company
- RNasa A, Invitrogen
- Tris, Sigma-Aldrich
- Tris-HCl, Sigma-Aldrich
- X-Gal, US Biological
- β -mercapto etanol, Sigma-Aldrich
- PCI, Sigma-Aldrich

Soluciones

- Amortiguador CTAB 3% (400 mL)

Mezclar 12 g de CTAB, 112 mL de NaCl 5M, 400 mL de Tris-HCl 1M pH 8, 16 mL de EDTA 0.5 M pH 8 y 230 mL de agua. Guardar a temperatura ambiente.

- TE 10/1 pH 7.5

Mezclar 3 mL de Tris 100 mM y 3 mL de EDTA 10 mM, llevar a un volumen de 25 mL con agua y ajustar el pH a 7.5. Adicionar agua hasta un volumen final de 30 mL

- Amortiguador TAE 50X (1L)

Disolver 242 g de Tris base, 57 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0.5 M (pH 8) en 800 mL de agua. Adicionar agua hasta un volumen final de 1L.

Medios de cultivo

- Medio LB (200 mL)

Disolver 2 g de peptona, 1 g de extracto de levadura y 1 g de NaCl, Adicionar agua hasta un volumen final de 200 mL y esterilizar.

- Medio SOC (100 mL)

Disolver 2 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura y 0.05 g de NaCl en 95 mL de agua, adicionar 1 mL de KCl 250mM, ajustar a pH 7 y esterilizar. En condiciones de esterilidad adicionar 1 mL de MgCl₂ 1 M (estéril) y 1 mL de glucosa 2 M (esterilizar por filtración).

- Solución de resuspensión (preparar al momento)

Para 1 mL: 500 µL Tris 0.1 M pH 8.0, 20 µL EDTA 0.5 M pH 8.0, 5 µL RNasa A 20mg/mL, 475 µL agua.

- Solución de lisis

NaOH 200 mM, SDS 1%

- Solución de neutralización

Acetato de potasio 3M pH 5.5

Equipos

- Campana de flujo laminar, HeraguardEco Thermo Scientific
- ChemiDoc MP Imaging System, BIO-RAD
- Espectrofotómetro, NanoDrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific
- Fuente de poder, Amersham Pharmacia Biotech. Electrophoresis power supply EPS 301
- Heat block Teche Dry-Block DB1
- Incubadora con agitación, IKA KS 4000
- Incubadora, LAB LINE Incubator
- Microcentrífuga, Eppendorf Centrifuge 5418
- Potenciómetro, Thermo Scientific OrionStar A211
- Termociclador, BIO-RAD T100 Thermal Cycler

Componentes incluidos en el Kit Universal GenomeWalker 2.0 Clontech Laboratories

- Lista de componentes

<i>DraI</i> (10unidades/ μ L)	10X Amortiguador de ligación
10X <i>DraI</i> Amortiguador de restricción	Adaptador GenomeWalker (25 μ M)
<i>EcoRV</i> (10unidades/ μ L)	Adaptor Primer 1 (AP1; 10 μ M)
10X <i>EcoRV</i> Amortiguador de restricción	Nested Adaptor Primer 2 (AP2; 10 μ M)
<i>PvuII</i> (10unidades/ μ L)	GenomeWalker Human Positive Control Library
10X <i>PvuII</i> Amortiguador de restricción	Positive Control tPA Primer (PCP1; 10 μ M)
<i>StuI</i> (10unidades/ μ L)	Positive Control tPA Nested Primer (PCP2; 10 μ M)
10X <i>StuI</i> Amortiguador de restricción	10X Advantage 2 PCR Amortiguador
Control Human Genomic DNA (0.1 μ g/ μ L)	Advantage 2 Polymerase Mix (50X)
T4 DNA Ligasa (6unidades/ μ L)	dNTP (10 mM)

- Secuencia del adaptador y los oligonucleótidos PCP

PCP1	AGAAACCCGACCTACCACGGCTTGCTCCTT
PCP2	CCCTTTCCTCGCAGAGGTTTTCTCTCCAGC
Adaptador	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGT

APÉNDICE III: PROGRAMAS, PLATAFORMAS Y BASES DE DATOS

- Ampliflix
- BioEdit
- Chromas lite
- Clustal Omega
- CyMATE
- Dfam
- DNAplotter
- DPTedb
- GiriRepbase
- Gypsy Database
- Kismeth
- MAST de MEME suit
- NCBI Blast
- PlantRegMap
- RFam
- RNACentral
- Serial Cloner
- SerialCloner
- SnapGen
- SolGenomics
- TSSPlant de Softberry

APÉNDICE IV: SECUENCIAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS EN FORMATO FASTA

Secuencias reportadas en NCBI relacionadas con la Sc_{10} -RNASA

- Secuencia de la región codificante de Sc_{10} -RNasa de *N. alata* registrada en la base de datos del NCBI

```
>gb|U45959.1|NAU45959:1-661 Nicotiana alata SC10-RNase precursor gene, partial cds
GCATTCGAGTACATGCAACTGGTGTACAATGGCCAACAGCTTTTTGCCACACCACTCCCTGCAAAGAATTCCAAACAACCTT
ACAATCCATGGGCTTTGGCCGGATAACGTGAGCACAACCTCTCAATTACTGCGCTGCCAAAGAAAACCTTTAAAAATATAGAAGT
AAGTTTAGACACTATCTTCCTAAGGACCTGTATGTTTCCATGTTGATTTTAATTTATTTTTTTTTTTCAGTTCAGCTTATTACTTT
TCCTATATCTACAGGATGACACGAAAAAAGATGATCTATATAAACGCTGGCCAGACCTAACCACCGCAGAAACATATTGTAAG
CAACATCAAAATTTCTGGAGACATGAATATAATAAGCACGGAAAGTGTGTTGTTTCAGAGAGCTACAACCGAGAACAATATTTTGA
TTTAGCCATGGCCTTAAAAGACAAGTTTGATCTTTTGTTCATCTTTGAGAAATCACGGAATTATTCCTGGAAGGGGAATGAAAT
ACACCGTTTCAGAAAATCAATAGCACCATCAAGAAAATAACTCAAGGGTATCCTAACCTGTCATGCACTAAAGGAATAATGGAA
CTTGTGGAGATAGGCATATGTTTCGACTCGATGGTTAAAAATGTAATTAATTGTCCTCATCCCAAGACATGCAAACCTA
```

Oligonucleótidos y Secuencias relacionadas con el protocolo walking de DNA

- Oligonucleótidos utilizados en el protocolo “walking de DNA” y secuencia del adaptador.

```
>GSP1/ SC10 P2
catcgagtcgaaacatatgcc

> GSP2 SC10
CATTCCCCTTCCAGGAATAATTCCG

>PCP1
AGAAACCCGACCTACCACGGCTTGCTCCTT

>PCP2
CCCTTTCCTCGCAGAGGTTTTCTCTCCAGC

>Adaptador_GW
GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT
```

- Secuencia del promotor putativo de la Sc_{10} -RNasa de *N. alata* obtenida con el protocolo “Walking de DNA”

```
>pp SRNasa SC10 (1 381pb)
ATCATCGCCCGTTTTAGCAGGAGGTACGCTGGAAACAACCTTTCTATGTGATGAACCAGGAAACAGCGTACAACGCCATCA
TAGGACGCCCTTGGATACATGCCATGCGAGCGGTCCCTTCAAGCTTCTACCAAGTGATCAAATTTCTACCCCATGGGGAGTA
TTTAGCATTTCGAGGCGAGCCGCGCACAGGAATGCTACAAAATAGCTCAAGATTGCGCCACAAAAACAGCTGAAGGG
```

GGCGAGTGCAGAGGCATAGCAATCGGCTATGTCGGTACTAAGGTCAACCCGTCAACGGACGCCATTAGAGACCCCGACGTCG
TGGAAGCCTGTAAAGCGACAGTCAAGGACCTCGACCCAGTCCAATTGGACGGTACTGACCTTACAAAGAAAGCCTACATCGGG
CACGGCCTCGACAACCCAGGTAAGTACCGTGAATTCTTAACCTAACCATGCAGATTTATCTGCTTTTTCCATTTCAGATATGCA
GGAATCCCGCGAGACATCGCCACCCACAAGCTGAACGTGCACCTATTACATCCGCCAGTGCAGACAGATGAGAAGGAAATTCAA
CGCCGCAATCAATGAAGCGGCCAGTGAAGAAGTGGACAAGCTACTGGCCAACGGCTCCATCAGAGAATCAAAGTACTCCAGT
GGGTGCGCAACGTCGTCATGGTCAAAAAGAAAAATGGGAAGTGGAGAATGTGCGTGGATTTACCCGACCTAAACAAGGCGTGC
CCAAAGGATTCATTCCCCTACTACCCACATCGACCAACTGATCGACGCCACTGCAGGACACGAAGTGTGAGCTCTTAGATGCC
TACTCCGGTTACAATCAAATTATGATGGCCGAGGAGGACCAGGAGAAAACGACTTTCATCACCCACCAAGGGACGTATTGCTA
CAAGGTAATGCCCTTTTCGGGCTCAAGAACGCAGGGGCTACGTACCAGAGACCAGTATCTTTAAAACCACAATACAAGTTAAT
TGTTACTCGGATGTTAGTGTAAACACAAAGGCTATCTATTATATCTACGTCTTTGATTTCAGGCTGAGTTTCGTTTTAGTTTGA
GTTTTATGGAGTTTATGTTTTTGGTTTCGCTGGACACGAGGGGTAATATGACGATCCAAATTACCCACGGGGTATTGACACTCA
ATAAATGAGGAATCGAAACCACAATTATCCCTATGATTAATAGGCAAAAAAATTTATATCGCGACCAATGGGTAAAAGAC
TATTATATATAGGCGAAAATGAAGGAAAAGCAAACGAGTTTTTTGAGTTACAAAATGCTTAACTCACCGCTCACATCAGTCC
TCTTCGTATTGCTTTTTGTTCTTTTCGCCATTTATGGGGCTTCGAGTATATGCAACTCGTTTTACAATGGCCAACAGCTTTT
TGCCACACCACTCCCTGCAAAAGAATTCCAACAACCTTTACAATCCATGGGCTTTGGCCGATAACGTGAG

Secuencia de retrotransposón identificada con el servidor Dfam

>Gypsy-ppSC10

TCCAGTGGGTCGCCAACGTCGTCATGGTCAAAAAGAAAAATGGGAAGTGGAGAATGTGCGTGGATTTACCCGACCTAAA
CAAGGCGTGCACAAAGGATTCATTCCCCTACTACCCACATCGACCAACTGATCGACGCCACTGCAGGACACGAAGTGTG
GCTCTTAGATGCCTACTCCGGTTACAATCAAATTATGATGGCCGAGGAGGACCAGGAGAAAACGACTTTCATCACCCACC
AAGGGACGTATTGCTACAAGGTAATGCCCTTTTCGGGCTCAAGAACGCAGGGGCTACGTACCAGAG

Oligonucleótidos y secuencias relacionadas con el protocolo de Clonación a un gen reportero

- Oligonucleótido para clonación en pENTR/D-TOPO

>SC10R

ACATAGGTTTGCATGTCTtgggat

>ppSC10R

TTGGCCATTGTAACACCAGTTGCATA

>ppSC10Fcacc

CACCTCATCGCCCGTTTTAGCAG

- Secuencia del vector pENTR/D-TOPO

>pENTR/D-TOPO

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGC
CGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGC
CTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAG
TGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCTAGCCAGGAAGAGTTTGTAGAAACGAAAAAGGCCATCCG
TCAGGATGGCCTTCTGCTTAGTTTGTATGCCTGGCAGTTTTATGGCGGGCGTCTGCCCCGCCACCCTCCGGG
CCGTTGCTTACAACGTTCAAATCCGCTCCCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTACCCGACAAA
CAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCT

ACTCTCGCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAGC
TCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTGTTGCAACAAATTGATGAGCAATG
CTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTACCAAGGGTGGGCGC
GCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAAC
AGGTCACTATCAGTCAAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGATATCCCCTATAGTGAGTCGTATTA
CATGGTCATAGCTGTTTTCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGAT
AAAAATATATCATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCC
ATATTC AACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATG
GGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAG
TTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGC
TGACGGAATTTATGCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCAC
CACTGCGATCCCCGGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTGAGGTGAAAAATTTGTT
GATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTGATTCTGTTTGTAAATGTCCTTTTAAACAGCGATC
GCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTTGATGA
CGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACC GGAT
TCAGTCGTCATCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTA
TTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGA
GTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTG
CAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCA
TTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTACGCGTCGTTCCA
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC
TGCTTGCAAAACAAAAAACACCAGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTT
TTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGG
CCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCT
GCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACC GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC GGATAAGGCGCAGCGGT
CGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
ACAGCGTGAGCATTGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGC
AGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCG
GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAA
CGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT

Oligonucleótidos y secuencias relacionadas con la contrucción del mapa de metilación del promotor de la S_{C10}-RNASA

- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de gDNA convertido con bisulfito de sodio

```
>BiNa1F
GGGGTGATTGAYAYTYAATAAATGAGGAAT

>BiNa1R
CATATACTCRAARRCCCCATAAAT
>BiNa2F
GGATGTTAGTGTAAYAYAAAGG

>BiNa2R
CRATATAATTTTTTTTTTRCCTAATTTAATCAT

>BiNa3F
AAATTATGATGGYYGAGGAGGA

>BiNa3R
CCAAAAACATAAACTCCATAAACTCAAATAA
```

>BiNa4F
ATGGGAAGTGGAGAATGTGYGTGGATTT

>BiNa4R
CCTTTRTRTTTACACTAACATCC

>BiNa5F
AGTGYGAYAGATGAGAAGGAAATT

>BiNa5R
TCCTCCTCRRCCATCATAATTT

>BiNa6F
TGAAGGGGGYGAGTGYAGAGG

>BiNa6R
RCRTTRAATTTCTTCTCATCT

- Fragmento de la secuencia del promotor putativo de la S_{C10} -RNasa de *N. alata* que se amplifica con cada par de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de gDNA convertido con bisulfito de sodio, las secuencias incluyen el sitio de unión de los oligonucleótidos.

>BiNa1
GGGGTGATTGACACTCAATAAATGAGGAATCGAAACCACAATTATCCCTATGATTAAATTAGGCACAAAAAATTATATCGCG
ACCAATGGGTAAAAGACTATTATATATAGGCGCAAAATGAAGGAAAAGCAAACGAGTTTTTTGAGTTACAAAATGCTTAACTC
ACCGCTCACATCAGTCCTCTTCGTATTGCTTTTTGTTCTTTTCGCCATTTATGGGGCCTTCGAGTATATG

>BiNa2
GGATGTTAGTGTAACACAAAGGCTATCTATTATATCTACGTCTTTGATTTCAGGCTGAGTTTCGTTTTAGTTTGGATTTATGG
AGTTTATGTTTTTGGTTTCGCTGGACACGAGGGGTAATATGACGATCCAAATTACCCACGGGGTGATTGACACTCAATAAATGA
GGAATCGAAACCACAATTATCCCTATGATTAAATTAGGCACAAAAAATTATATCG

>BiNa3
AAATTATGATGGCCGAGGAGGACCAGGAGAAAACGACTTTCATCACCCACCAAGGGACGTATTGCTACAAGGTAATGCCCTTT
CGGGCTCAAGAACGCAGGGGCTACGTACCAGAGACCAGTATCTTTAAAACCACAATACAAGTTTAAATTGTTACTCGGATGTTA
GTGTAACACAAAGGCTATCTATTATATCTACGTCTTTGATTTCAGGCTGAGTTTCGTTTTAGTTTGGATTTATGGAGTTTATG
TTTTTGG

>BiNa4
ATGGGAAGTGGAGAATGTGCGTGGATTTACCGACCTAAACAAGGCGTGCCCAAAGGATTCATTCCCACTACCCACATCGAC
CAACTGATCGACGCCACTGCAGGACACGAAGTGTGAGCTCTTAGATGCCTACTCCGTTACAATCAAATTATGATGGCCGAG
GAGGACCAGGAGAAAACGACTTTCATCACCCACCAAGGGACGTATTGCTACAAGGTAATGCCCTTTGGGCTCAAGAACGCAG
GGGCTACGTACCAGAGACCAGTATCTTTAAAACCACAATACAAGTTTAAATTGTTACTCGGATGTTAGTGTAACACAAAGG

>BiNa5
AGTGCACAGATGAGAAGGAAATTCACGCCGCAATCAATGAAGCGGCCAGTGAAGAAGTGGACAAGCTACTGGCCAACGGCT
CCATCAGAGAATCAAAGTACTCCAGTGGGTGCGCAACGTCGTCATGGTCAAAAAGAAAAATGGGAAGTGGAGAATGTGCGTG
GATTTACCCGACCTAAACAAGGCGTGCCCAAAGGATTCATTCCCACTACCCACATCGACCAACTGATCGACGCCACTGCAGG
ACACGAACTGTTGAGCTCTTAGATGCCTACTCCGGTTACAATCAAATTATGATGGCCGAGGAGGA

>BiNa6

TGAAGGGGGCGAGTGCAGAGGCATAGCAATCGGCTATGTTCGGTACTAAGGTCAACCCGTCAACGGACGCCATTAGAGACCCC
GACGTCGTGGAAGCCTGTAAAGCGACAGTCAAGGACCTCGACCCAGTCCAATTGGACGGTACTGACCTTACAAAGAAAGCCTA
CATCGGGCACGGCCTCGACAACCCAGGTAAGTACCGTGAATTCTTAACCTAACCATGCAGATTTATCTGCTTTTTCCATTAG
ATATGCAGGAATCCCAGGACATCGCCACCCACAAGCTGAACGTTCGACCTATTACATCCGCCAGTGCAGATGAGAAGGA
AATTCAACGC

- Fragmento de la secuencia del promotor putativo de la S_{C10} -RNasa de *N. alata* que se amplifica con cada par de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de gDNA convertido con bisulfito de sodio, las secuencias no incluyen el sitio de unión de los oligonucleótidos (secuencia sin oligonucleótidos= so).

>BiNa1_so

CGAAACCACAATTATCCCTATGATTAAATTAGGCCAAAAAATTATATCGCGACCAATGGGTAAAAGACTATTATATATAGG
CGCAAAATGAAGGAAAAGCAAACGAGTTTTTTGAGTTACAAAATGCTTAACTCACCGCTCACATCAGTCCTCTTCGTATTGCT
TTTTGTTCTTTGCCCC

> BiNa2_so

CTATCTATTATATCTACGTCTTTGATTGAGGCTGAGTTTTGTTTTAGTTTTGAGTTTTATGGAGTTTTATGTTTTTGGTTGCTGG
ACACGAGGGTAATATGACGATCCAAATTACCCACGGGTGATTGACACTCAATAAATGAGGAATCGAAACCACAATTATCCC
T

> BiNa3_so

CCAGGAGAAAACGACTTTCATCACCCACCAAGGGACGTATTGCTACAAGGTAATGCCCTTTTCGGGCTCAAGAACGCAGGGGCT
ACGTACCAGAGACCAGTATCTTTAAACCACAATACAAGTTAATTGTTACTCGGATGTTAGTGTAACACAAAGGCTATCTA
TTATATCTACGTCTTTGATTGAGGCTGAGTTTCGTT

> BiNa4_so

CACCGACCTAAACAAGGCGTGCCCAAAGGATTCATTCCCCTACCCACATCGACCAACTGATCGACGCCACTGCAGGACACG
AACTGTTGAGCTCTTAGATGCCTACTCCGGTTACAATCAAATTATGATGGCCGAGGAGGACCAGGAGAAAACGACTTTCATCA
CCCACCAAGGACGTATTGCTACAAGGTAATGCCCTTTTCGGGCTCAAGAACGCAGGGGCTACGTACCAGAGACCAGTATCTTT
AAAACCACAATACAAGTTAATTGTTACTC

> BiNa5_so

CAACGCCGCAATCAATGAAGCGGCCAGTGAAGAAGTGGACAAGCTACTGGCCAACGGCTCCATCAGAGAATCAAAGTACTCCC
AGTGGGTCGCCAACGTCGTATGGTCAAAAAGAAAAATGGGAAGTGGAGAATGTGCGTGGATTTACCGACCTAAACAAGGCG
TGCCCAAAGGATTCATTCCCCTACCCACATCGACCAACTGATCGACGCCACTGCAGGACACGAAGTGTGAGCTCTTAGAT
GCCTACTCCGGTTACAATC

> BiNa6_so

CATAGCAATCGGCTATGTTCGGTACTAAGGTCAACCCGTCAACGGACGCCATTAGAGACCCCGACGTCGTGGAAGCCTGTAAA
GCGACAGTCAAGGACCTCGACCCAGTCCAATTGGACGGTACTGACCTTACAAAGAAAGCCTACATCGGGCACGGCCTCGACAA
CCCAGGTAAGTACCGTGAATTCTTAACCTAACCATGCAGATTTATCTGCTTTTTCCATTAGATATGCAGGAATCCCAGGAGA
CATCGCCACCCACAAGCTGAACGTTCGACCTATTACATCCGCCAGTGCAG

- Secuencia control para el análisis de metilación con el programa CyMATE. Fragmento de la secuencia del promotor putativo de la S_{C10} -RNasa de *N. alata* (1094 pb).

>ppSC10 control

CATAGCAATCGGCTATGTTCGGTACTAAGGTCAACCCGTCAACGGACGCCATTAGAGACCCCGACGTCGTGGAAGCCTGTAAA
GCGACAGTCAAGGACCTCGACCCAGTCCAATTGGACGGTACTGACCTTACAAAGAAAGCCTACATCGGGCACGGCCTCGACAA
CCCAGGTAAGTACCGTGAATTCTTAACCTAACCATGCAGATTTATCTGCTTTTTCCATTAGATATGCAGGAATCCCAGGAGA

CATCGCCACCCACAAGCTGAACGTCGACCTATTACATCCGCCAGTGGCAGACAGATGAGAAGGAAATTC AACGCCGCAATCAATG
AAGCGCCAGTGAAGAAGTGGACAAGCTACTGGCCAACGGCTCCATCAGAGAATCAAAGTACTCCCAGTGGGTGCGCAACGTC
GTCATGGTCAAAAAGAAAAATGGGAAGTGGAGAATGTGCGTGGATTTACCCGACCTAAACAAGGCGTGCCCAAAGGATTCATT
CCCCTACCCACATCGACCAACTGATCGACGCCACTGCAGGACACGAACTGTTGAGCTCTTAGATGCCTACTCCGGTTACAA
TCAAATTATGATGGCCGAGGAGGACCAGGAGAAAACGACTTTCATCACCCACCAAGGGACGTATTGCTACAAGGTAATGCCCT
TTCCGGCTCAAGAACGCAGGGGCTACGTACCAGAGACCAGTATCTTTAAACCACAATACAAGTTTAAATTTACTCGGATGT
TAGTGTAACACAAAGGCTATCTATTATATCTACGTCTTTGATTACGGCTGAGTTTCGTTTTAGTTTTGAGTTTTATGGAGTTA
TGTTTTTGGTTCGCTGGACACGAGGGGTAATATGACGATCCAAATTACCCACGGGGTGATTGACACTCAATAAATGAGGAATC
GAAACCACAATTATCCCTATGATTAAATTAGGCAAAAAAATTTATATCGCGACCAATGGGTAAAAGACTATTATATATAGGC
GCAAAATGAAGGAAAAGCAACGAGTTTTTTGAGTTACAAAATGCTTAACTCACCGCTCACATCAGTCCTCTTCGTATTGCTT
TTTTTTCTTTTCGCC

- **Secuencia del vector pJET1.2/blunt**

>pJET1.2

gcccctgcagccgaattatattatTTTTgccaataatTTTTaaciaaaagctctgaagtcttcttcatTTaaattcttag
atgatacttcatctggaattgtcccaattagtagcatcacgctgtgagtaagttctaaaccattTTTTtattgttga
ttatctctaacttactactcgatgagtttccggtattatctctatTTTTaacttggagcaggttccattcattgtTTTT
ttcatcatagtgaataaaatcaactgctttaaacttgtgctgaacaccatatccatccggcgtaatacagactcactat
agggagagcggccgagatcttccggatggctcgagTTTTcagcaagatatcttctagaagatctcctacaatattc
tcagctgccatggaaaatcgatgttcttcttttattctctcaagatttccaggctgtatattaaaacttatattaagaac
tatgctaaccacctcatcaggaaccgtttaggtggcgtgggtTTTTcttggcaatcgactctcatgaaaactacgagcta
aatattcaatatgttctcttgaccaactttattctgcattTTTTgaacgaggttagagcaagcttcaggaaactga
gacaggaattttattaaaaatttaaatttgaagaaagttcagggtaataagcatccattTTTTgcttggcaagttcctc
agcatttcttaacaaaagacgtctcttttgacatgtttaaagtttaaaccctctgtgtgaaattattatccgctcataatt
ccacacattatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgctaatgagtgaactcaacttaattgctgt
gctgctcactgccaattgcttccagtcgggaaacctgtcgtgcccagctgcattaatgaatcggccaacgcgaggggagag
gctgtttgctgattgggctcttccgcttctcctcgtcactgactcgtgctcggctcgttcggctgagggagagggta
tcagctcactcaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggcca
gcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggcgtTTTTccataggctccgccccctgacgagcatcaca
atcgcgctcaagtgcagaggtggcgaacccgcaggaactataaagataccaggcgttccccctggaagctccctcgtg
cgctctcctgttccgaccctgcccgttaccggatacctgtccgcctttctccttcgggaagcgtggcgttctc
ctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttccgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccg
accgctgctccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccact
ggtaacaggatttagcagagcagggatgttagggcgtgctacagagttcttgaagtgggcttaactacggctacactag
aaggacagtatTTGGTatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggc
aaaccaccgctggtagcgggtggTTTTTTTTgTTTTgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcct
ttgatTTTTctacgggctgacgctcagtggaacgaaaactcacggttaaggatTTTTggctcatgagattatcaaaaag
gatcttcacctagatcTTTTaaattaaaaatgaagTTTTaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggctgaca
gttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatTTcgttccatccatagttgcctgactccccgctc
gtgtagataaactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggc
tccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatcc
agtctattaattgTTGCCGGAAGctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgTTgTTGCCattgctaca
ggcatcgtgggtgctcacgctcgtcgtTTGGTatggcttcaattcagctccggTTCCCAACgatcaaggcgagttacatgatc
ccccatgTTGTGcaaaaaagcggTTtagctccttcggctcctccgatcgttgtcagaagtaagtTGGCCGcagtgTTatcac
tcatggTTatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgctTTTTctgtgactgggtgagtaactca
accaagtcatctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcctgccccggcgtcaatacgggataataccgcgccaca
tagcagaactTTAAAAGTgctcatattggaaaacgTTcttccggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgTTgagat
ccagttcgatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgttctggggtgagcaaaa
acaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgTTgaatactcatactcttcttTTTcaata
ttattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaaciaaatagggg
tccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaatagg
cgtatcacgaggcc

- Secuencia de oligonucleótidos pJET1.2/blunt > pJET_forward

```
CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC  
> pJET_reverse  
AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
```

APÉNDICE V: PREDICCIÓN DE SITIOS DE UNIÓN A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CON EL SERVIDOR PLANTREG MAP

- Tabla de resultados de la predicción de sitios de unión a factores de transcripción

Tabla 9. Predicción de sitios de unión a factores de transcripción, resultados del PlanRegMap

Código	Familia	Inicio	Termino	Cadena	Score	E-value	q-value	Secuencia
LOC107776848	ERF	274	288	+	18.8594	2.83E-07	0.000629	GGCTATGTCGGTGAC
LOC107790861	Nin-like	919	933	+	15.9531	3.01E-07	0.000782	TAATGCCCTTTCGGG
LOC107803997	ERF	276	288	+	17.25	3.95E-07	0.000919	CTATGTCGGTGAC
LOC107779745	ERF	279	293	-	18.0156	5.05E-07	0.00111	CCTTAGTCACCGACA
LOC107777214	ERF	279	293	-	18.0156	5.05E-07	0.00112	CCTTAGTCACCGACA
LOC107811321	ERF	276	289	-	16.6094	7.19E-07	0.0017	AGTCACCGACATAG
LOC107768279	TALE	179	198	-	17.32	7.67E-07	0.00123	TGTGCGGTGCGCGGCTCGCC
LOC107797149	ERF	276	292	+	17.9844	7.70E-07	0.00172	CTATGTCGGTGACTAAG
LOC107777976	C2H2	861	879	-	16.5294	8.55E-07	0.00216	TTTTCTCCTGGTCCTCCTC
LOC107808010	ERF	276	290	-	17.125	9.69E-07	0.00228	TAGTCACCGACATAG
LOC107775685	ERF	277	288	-	16.4688	1.07E-06	0.00255	GTCACCGACATA
LOC107762099	ERF	276	290	+	15.7812	3.35E-06	0.00774	CTATGTCGGTGACTA
LOC107790562	WRKY	299	308	-	15.094	3.51E-06	0.00851	CCGTTGACGG
LOC107828216	LBD	857	877	-	13.2812	4.01E-06	0.00851	TTCTCCTGGTCCTCCTCGGCC
LOC107780621	LBD	857	877	-	13.2812	4.01E-06	0.00859	TTCTCCTGGTCCTCCTCGGCC
LOC107771704	LBD	857	877	-	13.2812	4.01E-06	0.00851	TTCTCCTGGTCCTCCTCGGCC
LOC107809033	Dof	133 1	135 1	-	14.1406	4.36E-06	0.00684	AAGAACAAAAGCAATACGAA
LOC107768279	TALE	857	876	-	14.4667	4.83E-06	0.00272	TCTCCTGGTCCTCCTCGGCC
LOC107809033	Dof	468	488	-	14.0156	5.05E-06	0.00684	AATGGGAAAAGCAGATAAAT
LOC107768279	TALE	858	877	-	14.3733	5.10E-06	0.00272	TTCTCCTGGTCCTCCTCGGCC
LOC107797149	ERF	720	736	-	14.6406	6.18E-06	0.0069	TTAGGTCGGTGAAATCC
LOC107765238	Dof	688	708	-	13.6875	6.93E-06	0.0145	CCACTTCCCATTITTTCTTTTT
LOC107819325	ERF	726	735	+	13.4526	6.99E-06	0.0164	CACCGACCTA
LOC107797718	MYB_relat ed	729	737	-	14.2059	7.41E-06	0.0193	TTTAGGTCG
LOC107807704	C2H2	828	842	+	13.7969	7.97E-06	0.0194	GCCTACTCCGGTTAC
LOC107768279	TALE	238	257	-	13.56	8.07E-06	0.00322	CACTCGCCCCCTTACAGCTGT
LOC107829848	WRKY	290	300	+	14.5625	8.15E-06	0.0219	AAGGTCAACCC
LOC107822582	ERF	280	299	-	13.4531	8.19E-06	0.0153	GGTTGACCTTAGTCACCGAC

LOC107784356	ERF	280	299	-	13.4531	8.19E-06	0.0153	GGTTGACCTTAGTCACCGAC
LOC107773801	ERF	578	592	+	12.2188	8.41E-06	0.0188	TCAACGCCGCAATCA
LOC107788682	WRKY	290	299	+	12.3474	8.84E-06	0.0241	AAGGTCAACC
LOC107828891	ERF	575	602	+	10.2656	9.24E-06	0.00963	AATTCAACGCCGCAATCAATGAAGCGG C
LOC107800804	ERF	853	867	-	12.4219	9.34E-06	0.0204	CCTCCTCGGCCATCA
LOC107776521	Dof	126 2	128 2	+	13.5781	9.53E-06	0.0258	AAAATGAAGGAAAAGCAAACG
LOC107769453	GATA	669	683	-	13.5588	9.70E-06	0.0256	ATGACGACGTTGGCG
LOC107763082	TCP	111	123	-	11.5205	9.85E-06	0.0212	GAAGGGACCGCTC
LOC107828891	ERF	541	568	+	9.96875	1.00E-05	0.00963	CTATTACATCCGCCAGTGCACAGATG A
LOC107813905	ERF	280	299	+	13.3281	1.01E-05	0.0196	GTCGGTGACTAAGGTCAACC
LOC107788512	ERF	578	598	-	11.9531	1.02E-05	0.0226	CTTCATTGATTGCGGCGTTGA
LOC107803997	ERF	724	736	-	14.3906	1.03E-05	0.012	TTAGGTCGGTGAA
LOC107765238	Dof	132 5	134 5	+	13.2812	1.07E-05	0.0145	GTCCTCTTCGTATTGCTTTTT
LOC107829180	RAV	228	244	-	13.5781	1.11E-05	0.0298	CAGCTGTTTTTTGTGGG
LOC107811321	ERF	723	736	+	14.25	1.11E-05	0.0131	TTTCACCGACCTAA
LOC107777976	C2H2	858	876	-	11.9328	1.26E-05	0.0159	TCTCCTGGTCCTCCTCGGC
LOC107816356	ERF	853	867	-	11.625	1.28E-05	0.0257	CCTCCTCGGCCATCA
LOC107791186	TCP	113	120	-	10.375	1.28E-05	0.0275	GGGACCGC
LOC107820624	ERF	579	593	-	12.7656	1.31E-05	0.0292	TTGATTGCGGCGTTG
LOC107826452	TCP	224	233	+	11.6752	1.34E-05	0.0257	TGCGCCACA
LOC107789289	WRKY	290	301	-	13.7344	1.40E-05	0.0377	CGGGTTGACCTT
LOC107822582	ERF	713	732	+	12.1719	1.41E-05	0.0153	TGTGCGTGATTTACCGAC
LOC107784356	ERF	713	732	+	12.1719	1.41E-05	0.0153	TGTGCGTGATTTACCGAC
LOC107768279	TALE	863	882	-	12.4133	1.48E-05	0.00473	TCGTTTTCTCTGGTCCTCC
LOC107826136	ERF	276	290	+	13.6094	1.52E-05	0.0357	CTATGTCGGTGACTA
LOC107762262	ERF	276	290	+	13.6094	1.52E-05	0.0354	CTATGTCGGTGACTA
LOC107809033	Dof	126 5	128 5	+	12.9844	1.53E-05	0.0138	ATGAAGGAAAAGCAAACGAGT
LOC107798466	ERF	279	293	-	12.0781	1.58E-05	0.0364	CCTTAGTCACCGACA
LOC107818849	WRKY	288	301	-	13.2031	1.58E-05	0.0432	CGGGTTGACCTTAG
LOC107782559	WRKY	281	299	-	13.4559	1.61E-05	0.0431	GGTTGACCTTAGTCACCGA
LOC107816670	ERF	268	288	+	10.3235	1.75E-05	0.0267	GCAATCGGCTATGTCGGTGAC
LOC107829243	TCP	225	232	+	10.3173	1.82E-05	0.0323	GCGCCAC
LOC107767662	WOX	114 9	115 8	-	12.903	1.90E-05	0.052	TGTCAATCAC
LOC107770058	Dof	126 0	128 0	-	12.875	1.91E-05	0.0339	TTTGCTTTTCCTTCATTTTGC
LOC107770569	TCP	204	233	-	7.70886	1.97E-05	0.0171	TGTGGGCGCAATCTTGAGCTATTTTGT AGC
LOC107761268	MIKC_MA DS	135 4	136 5	-	12.5378	1.98E-05	0.0541	CCATAAATGGGC
LOC107831331	LBD	496	514	-	12.5	2.01E-05	0.0298	TGTCTCGGGGATTCTCTGC
LOC107808560	LBD	496	514	-	12.5	2.01E-05	0.0295	TGTCTCGGGGATTCTCTGC
LOC107777976	C2H2	558	576	-	11.0588	2.01E-05	0.017	TTTCCTTCTCATCTGTCTGC

LOC107793050	WRKY	289	301	+	12.875	2.04E-05	0.0558	TAAGGTCAACCCG
LOC107770569	TCP	662	691	+	7.58228	2.05E-05	0.0171	AGTGGGTCGCCAACGTCGTCATGGTCA AAA
LOC107825706	MYB	629	643	-	13.3125	2.07E-05	0.0565	TGATGGAGCCGTTGG
LOC107830873	ERF	788	808	-	9.98438	2.09E-05	0.0365	CGTGTCTGCAGTGGCGTCGA
LOC107778042	ERF	788	808	-	9.98438	2.09E-05	0.0363	CGTGTCTGCAGTGGCGTCGA
LOC107828216	LBD	247	267	-	9.92188	2.09E-05	0.0222	TATGCCTCTGCACTCGCCCC
LOC107780621	LBD	247	267	-	9.92188	2.09E-05	0.0225	TATGCCTCTGCACTCGCCCC
LOC107771704	LBD	247	267	-	9.92188	2.09E-05	0.0222	TATGCCTCTGCACTCGCCCC
LOC107775685	ERF	724	735	+	13.3906	2.10E-05	0.025	TTCACCGACCTA
LOC107790562	WRKY	291	300	-	12.5726	2.12E-05	0.0257	GGGTTGACCT
LOC107804504	ERF	545	559	-	9.34375	2.13E-05	0.0482	GCACTGGCGGATGTA
LOC107776521	Dof	471	491	-	12.7344	2.14E-05	0.0288	CTGAATGGGAAAAAGCAGATA
LOC107814796	ERF	582	589	+	13.3723	2.15E-05	0.0392	CGCCGCAA
LOC107804466	C2H2	603	613	+	11.6406	2.19E-05	0.0598	CAGTGAAGAAG
LOC107827621	Dof	469	483	+	12.8281	2.20E-05	0.06	TTTATCTGCTTTTTTC
LOC107808010	ERF	722	736	+	12.7969	2.22E-05	0.0262	ATTTACCGACCTAA
LOC107770412	ARF	278	285	-	14.3023	2.24E-05	0.0517	ACCGACAT
LOC107769080	ERF	722	735	-	12.5312	2.27E-05	0.0278	TAGGTCGGTGAAAT
LOC107776848	ERF	724	738	-	11.4688	2.32E-05	0.0257	GTTTAGGTCGGTGAA
LOC107775004	bZIP	322	333	+	12.8298	2.33E-05	0.0495	CCCCGACGTCGT
LOC107811137	CAMTA	184	201	-	12.375	2.38E-05	0.0577	TCCTGTGCGGTGCGCGGC
LOC107824973	LBD	859	879	-	10.2812	2.42E-05	0.0468	TTTTCTCCTGGTCCTCCTCGG
LOC107802176	LBD	859	879	-	10.2812	2.42E-05	0.0467	TTTTCTCCTGGTCCTCCTCGG
LOC107820490	WRKY	289	301	-	11.8906	2.42E-05	0.0657	CGGGTTGACCTTA
LOC107762610	WRKY	289	301	-	11.8906	2.42E-05	0.0657	CGGGTTGACCTTA
LOC107807098	MIKC_M ADS	919	933	+	12.1406	2.43E-05	0.0662	TAATGCCCTTTCGGG
LOC107825059	ERF	853	872	-	11.0781	2.44E-05	0.0191	CTGGTCCTCCTCGGCCATCA
LOC107822582	ERF	506	525	+	10.6562	2.50E-05	0.0181	CGCGAGACATCGCCACCCAC
LOC107784356	ERF	506	525	+	10.6562	2.50E-05	0.018	CGCGAGACATCGCCACCCAC
LOC107770058	Dof	133 6	135 6	+	12.5156	2.50E-05	0.0339	ATTGCTTTTTGTTCTTTCGCC
LOC107813905	ERF	713	732	-	11.5312	2.50E-05	0.0243	GTCGGTGAAATCCACGCACA
LOC107771611	WRKY	289	301	+	12.6562	2.53E-05	0.0674	TAAGGTCAACCCG
LOC107810623	HD-ZIP	584	593	+	11.4	2.60E-05	0.0713	CCGCAATCAA
LOC107779745	ERF	719	733	+	11.5781	2.61E-05	0.0287	TGGATTTACCGACC
LOC107777214	ERF	719	733	+	11.5781	2.61E-05	0.029	TGGATTTACCGACC
LOC107831331	LBD	861	879	-	12.0625	2.65E-05	0.0298	TTTTCTCCTGGTCCTCCTC
LOC107808560	LBD	861	879	-	12.0625	2.65E-05	0.0295	TTTTCTCCTGGTCCTCCTC
LOC107818082	WRKY	288	301	-	10.5625	2.74E-05	0.0746	CGGGTTGACCTTAG
LOC107780905	WRKY	347	361	-	12.8438	2.75E-05	0.0743	GTCCTTGACTGTCGC
LOC107807574	ERF	852	868	+	8.10938	2.78E-05	0.0505	ATGATGGCCGAGGAGGA

LOC107828746	WRKY	289	299	+	12.5469	2.80E-05	0.0759	TAAGGTCAACC
LOC107762948	WRKY	289	301	-	12.875	2.80E-05	0.0752	CGGGTTGACCTTA
LOC107798916	WRKY	289	299	+	12.25	2.82E-05	0.077	TAAGGTCAACC
LOC107769080	ERF	377	390	+	12.1094	2.82E-05	0.0278	TTGGACGGTACTGA
LOC107825059	ERF	669	688	+	10.75	2.92E-05	0.0191	CGCCAACGTCGTCATGGTCA
LOC107777523	WRKY	292	299	+	12.734	2.96E-05	0.0766	GGTCAACC
LOC107816670	ERF	546	566	-	9.13235	2.97E-05	0.0267	ATCTGTGCGACTGGCGGATGT
LOC107825132	Trihelix	829	843	+	11.4219	3.11E-05	0.0676	CCTACTCCGGTTACA
LOC107783127	Trihelix	829	843	+	11.4219	3.11E-05	0.0676	CCTACTCCGGTTACA
LOC107817958	ERF	581	588	+	12.2692	3.14E-05	0.0591	ACGCCGCA
LOC107791029	MYB	119 7	121 1	+	12.5938	3.15E-05	0.0859	GATTAAATTAGGCAA
LOC107776521	Dof	133 4	135 4	-	12.2812	3.19E-05	0.0288	CGAAAGAACAAAAAGCAATAC
LOC107790861	Nin-like	894	908	-	12.4375	3.22E-05	0.0418	ATACGTCCCTTGGTG
LOC107810059	WRKY	289	301	+	11.9844	3.23E-05	0.0883	TAAGGTCAACCCG
LOC107807320	WRKY	289	301	+	11.9844	3.23E-05	0.0883	TAAGGTCAACCCG
LOC107774101	WRKY	289	301	+	11.9844	3.23E-05	0.0883	TAAGGTCAACCCG
LOC107786459	BES1	110 1	112 0	-	9.64062	3.26E-05	0.0723	CCCCTCGTGTCCAGCGAACC
LOC107823205	Dof	133 4	135 2	-	12.2344	3.28E-05	0.0889	AAAGAACAAAAAGCAATAC
LOC107828273	ERF	544	564	+	7.85294	3.32E-05	0.0508	TTACATCCGCCAGTGCACAG
LOC107801353	ERF	185	194	-	12.1744	3.38E-05	0.0572	CGGTGCGCGG
LOC107775566	MYB	884	902	-	12	3.41E-05	0.0595	CCCTTGGTGGGTGATGAAA
LOC107816670	ERF	667	687	-	8.79412	3.43E-05	0.0267	GACCATGACGACGTTGGCGAC
LOC107769908	WRKY	289	299	+	12.5312	3.44E-05	0.0939	TAAGGTCAACC
LOC107808466	ERF	579	597	-	9.875	3.44E-05	0.0703	TTCATTGATTGCGGCGTTG
LOC107781702	E2F/DP	662	676	+	8.7766	3.48E-05	0.0666	AGTGGGTGCGCAACG
LOC107766447	E2F/DP	662	676	+	8.7766	3.48E-05	0.0665	AGTGGGTGCGCAACG
LOC107817374	MYB	513	531	+	11.9844	3.51E-05	0.0753	CATCGCCACCCACAAGCTG
LOC107825059	ERF	246	265	-	10.2969	3.71E-05	0.0191	TGCCTCTGCACTGCCCCCT
LOC107808166	ERF	787	807	+	8.82812	3.74E-05	0.0653	ATCGACGCCACTGCAGGACAC
LOC107769080	ERF	277	290	+	11.4375	3.92E-05	0.0278	TATGTGCGGTGACTA
LOC107803829	WRKY	289	299	+	12.2656	3.94E-05	0.107	TAAGGTCAACC
LOC107830371	ERF	577	595	-	9.28125	3.96E-05	0.0406	CATTGATTGCGGCGTTGAA
LOC107769986	MYB	119 8	121 2	+	10.6719	3.98E-05	0.109	ATTAAATTAGGCAAA
LOC107819325	ERF	516	525	+	11.6842	4.06E-05	0.0386	CGCCACCCAC
LOC107820060	MYB	630	644	-	12.0469	4.08E-05	0.111	CTGATGGAGCCGTTG
LOC107828891	ERF	782	809	+	4.89062	4.27E-05	0.0273	AACTGATCGACGCCACTGCAGGACAC GA
LOC107830873	ERF	578	598	-	8.28125	4.41E-05	0.0365	CTTCATTGATTGCGGCGTTGA
LOC107778042	ERF	578	598	-	8.28125	4.41E-05	0.0363	CTTCATTGATTGCGGCGTTGA
LOC107775566	MYB	513	531	-	11.5312	4.41E-05	0.0595	CAGCTTGTGGGTGGCGATG
LOC107824973	LBD	249	269	-	8.9375	4.48E-05	0.0468	GCTATGCCTCTGCACTGCCCC

LOC107802176	LBD	249	269	-	8.9375	4.48E-05	0.0467	GCTATGCCTCTGCACTCGCCC
LOC107830371	ERF	273	291	+	8.98438	4.49E-05	0.0406	CGGCTATGTCGGTACTAA
LOC107807574	ERF	540	556	-	6.59375	4.54E-05	0.0505	CTGGCGGATGTAATAGG
LOC107783484	WRKY	289	301	-	12.0781	4.56E-05	0.123	CGGGTTGACCTTA
LOC107809033	Dof	682	702	+	11.7969	4.57E-05	0.031	ATGGTCAAAAAGAAAATGGG
LOC107787814	TCP	224	232	+	11.2979	4.60E-05	0.0521	TGCGCCAC
LOC107825059	ERF	856	875	-	9.85938	4.66E-05	0.0191	CTCCTGGTCTCCTCGGCCA
LOC107773468	MIKC_MA DS	135 3	136 5	-	11.6912	4.70E-05	0.127	CCATAAATGGGCG
LOC107764357	MIKC_MA DS	135 3	136 5	-	11.6912	4.70E-05	0.127	CCATAAATGGGCG
LOC107816356	ERF	629	643	+	8.46875	4.71E-05	0.0473	CCAACGGCTCCATCA
LOC107780563	ERF	789	796	+	9.79808	4.72E-05	0.0662	CGACGCCA
LOC107774538	ERF	789	796	+	9.79808	4.72E-05	0.0664	CGACGCCA
LOC107808040	Trihelix	831	841	-	10.6875	4.76E-05	0.107	TAACCGGAGTA
LOC107777976	C2H2	855	873	-	9.36975	4.80E-05	0.0304	CCTGGTCTCCTCGGCCAT
LOC107819325	ERF	277	286	-	11.4737	4.94E-05	0.0386	CACCGACATA
LOC107794330	TCP	113	132	-	-4.31395	4.98E-05	0.105	TAGAAGCTTGAAGGGACCGC
LOC107828273	ERF	578	598	+	6.77941	4.98E-05	0.0508	TCAACGCCGAATCAATGAAG
LOC107781702	E2F/DP	125 2	126 6	+	7.64894	4.99E-05	0.0666	ATATAGGCGCAAAAT
LOC107766447	E2F/DP	125 2	126 6	+	7.64894	4.99E-05	0.0665	ATATAGGCGCAAAAT
LOC107825059	ERF	279	298	-	9.71875	5.02E-05	0.0191	GTTGACCTTAGTCACCGACA
LOC107793223	NAC	516	530	-	11.2188	5.02E-05	0.137	AGCTTGTGGGTGGCG
LOC107788580	ERF	182	189	+	10.5745	5.21E-05	0.0497	GAGCCGCG
LOC107777199	GRAS	133 7	135 6	-	11.2571	5.30E-05	0.133	GGCGAAAGAACAAAAAGCAA
LOC107768279	TALE	860	879	-	9.66667	5.31E-05	0.0141	TTTTCTCCTGGTCTCCTCG
LOC107775004	bZIP	324	335	-	11.6277	5.34E-05	0.0568	CCACGACGTCGG
LOC107765920	HD-ZIP	584	596	-	11.3906	5.35E-05	0.085	TCATTGATTGCGG
LOC107760506	Trihelix	456	465	+	10.7021	5.37E-05	0.0877	CTAACCATGC
LOC107787814	TCP	136 2	137 0	-	10.9787	5.38E-05	0.0521	AGGCCCAT
LOC107788580	ERF	581	588	+	10.4894	5.47E-05	0.0497	ACGCCGA
LOC107788876	LBD	272	286	+	11.1719	5.48E-05	0.132	TCGGCTATGTCGGTG
LOC107825059	ERF	624	643	+	9.53125	5.53E-05	0.0191	ACTGGCCAACGGCTCCATCA
LOC107778263	bZIP	673	687	-	9.46875	5.54E-05	0.147	GACCATGACGACGTT
LOC107762209	MYB	888	902	+	11.625	5.57E-05	0.15	ATCACCCACCAAGGG
LOC107817374	MYB	884	902	+	11.125	5.59E-05	0.0753	TTTCATCACCCACCAAGGG
LOC107785742	MYB	518	530	-	2.25316	5.61E-05	0.0998	AGCTTGTGGGTGG
LOC107765562	NAC	567	586	-	10.0625	5.69E-05	0.0948	CGGCGTTGAATTTCTTCTC
LOC107829243	TCP	113	120	-	9.33654	5.94E-05	0.0428	GGGACCGC
LOC107819058	MIKC_MA DS	135 2	136 9	-	11.4051	5.98E-05	0.163	GGCCCCATAAATGGGCGA
LOC107762217	MIKC_MA DS	135 2	136 9	-	11.4051	5.98E-05	0.163	GGCCCCATAAATGGGCGA

LOC107808166	ERF	546	566	+	7.5625	6.17E-05	0.0653	ACATCCGCCAGTGGACAGAT
LOC107765920	HD-ZIP	115 8	117 0	-	11.1094	6.22E-05	0.085	TCATTTATTGAGT
LOC107789709	C2H2	758	768	+	11.2308	6.23E-05	0.103	CATTCCCACTA
LOC107777680	TCP	223	232	+	10.2021	6.27E-05	0.0688	TTGCGCCCAC
LOC107760309	B3	459	467	-	11.2991	6.33E-05	0.137	CTGCATGGT
LOC107825059	ERF	243	262	-	9.26562	6.33E-05	0.0191	CTCTGCACTCGCCCCCTTCA
LOC107817492	WRKY	291	298	+	11.7021	6.42E-05	0.161	AGGTCAAC
LOC107825059	ERF	663	682	+	9.21875	6.48E-05	0.0191	GTGGGTGCCAACGTCGTCA
LOC107788512	ERF	544	564	-	7.28125	6.49E-05	0.0615	CTGTGCACTGGCGGATGTAA
LOC107788682	WRKY	298	307	+	10.7474	6.54E-05	0.0892	CCCGTCAACG
LOC107830873	ERF	668	688	-	7.28125	6.70E-05	0.0365	TGACCATGACGACGTTGGCGA
LOC107778042	ERF	668	688	-	7.28125	6.70E-05	0.0363	TGACCATGACGACGTTGGCGA
LOC107777680	TCP	113	122	-	10.0957	6.73E-05	0.0688	AAGGGACCGC
LOC107807704	C2H2	404	418	+	10.8125	6.74E-05	0.0822	GCCTACATCGGGCAC
LOC107830873	ERF	547	567	-	7.26562	6.74E-05	0.0365	CATCTGTGCACTGGCGGATG
LOC107778042	ERF	547	567	-	7.26562	6.74E-05	0.0363	CATCTGTGCACTGGCGGATG
LOC107828273	ERF	788	808	+	5.91176	6.83E-05	0.0508	TCGACGCCACTGCAGGACACG
LOC107760506	Trihelix	833	842	-	10.4255	6.88E-05	0.0877	GTAACCGGAG
LOC107830371	ERF	546	564	-	7.90625	6.97E-05	0.0406	CTGTGCACTGGCGGATGT
LOC107802463	Dof	133 7	134 6	-	10.3419	7.07E-05	0.135	CAAAAAGCAA
LOC107787968	ARF	276	285	-	11.4062	7.14E-05	0.184	ACCGACATAG
LOC107829243	TCP	136 2	136 9	-	9.03846	7.23E-05	0.0428	GGCCCCAT
LOC107763599	YABBY	119 4	120 1	+	11.7344	7.35E-05	0.201	TATGATTA
LOC107790562	WRKY	626	635	-	10.7863	7.36E-05	0.0595	CCGTTGGCCA
LOC107776843	bZIP	508	522	-	8.23438	7.36E-05	0.105	GGTGCGATGTCTCG
LOC107830371	ERF	787	805	-	7.73438	7.46E-05	0.0406	GTCCTGCAGTGGCGTGCAT
LOC107789709	C2H2	655	665	+	10.9385	7.55E-05	0.103	TACTCCAGTG
LOC107769170	LBD	861	875	+	10.3594	7.59E-05	0.0997	GAGGAGGACCAGGAG
LOC107830873	ERF	273	293	+	6.96875	7.61E-05	0.0365	CGGCTATGTCGGTACTAAGG
LOC107778042	ERF	273	293	+	6.96875	7.61E-05	0.0363	CGGCTATGTCGGTACTAAGG
LOC107768912	SBP	381	391	+	11.2031	7.61E-05	0.208	ACGGTACTGAC
LOC107812294	Dof	126 2	128 2	+	11.0938	7.73E-05	0.11	AAAATGAAGGAAAAGCAAACG
LOC107780563	ERF	582	589	+	9.21154	7.79E-05	0.0662	CGCCGCAA
LOC107774538	ERF	582	589	+	9.21154	7.79E-05	0.0664	CGCCGCAA
LOC107798905	C3H	133 6	134 9	-	11.0938	7.80E-05	0.212	GAACAAAAGCAAT
LOC107830213	TCP	223	232	+	10.0526	7.93E-05	0.156	TTGCGCCCAC
LOC107819325	ERF	131 1	132 0	+	10.9053	7.96E-05	0.0395	CACCGCTCAC
LOC107828216	LBD	557	577	-	6.92188	7.99E-05	0.0566	ATTCCTTCTCATCTGTCGCA
LOC107780621	LBD	557	577	-	6.92188	7.99E-05	0.0571	ATTCCTTCTCATCTGTCGCA

LOC107771704	LBD	557	577	-	6.92188	7.99E-05	0.0566	ATTCCTTCTCATCTGTCGCA
LOC107812294	Dof	133 4	135 4	-	11.0156	8.17E-05	0.11	CGAAAGAACAAAAAGCAATAC
LOC107816670	ERF	130 9	132 9	-	6.69118	8.17E-05	0.0476	AGGACTGATGTGAGCGGTGAG
LOC107827621	Dof	687	701	-	11.2656	8.18E-05	0.112	CCATTTTTCTTTTTG
LOC107776843	bZIP	320	334	+	7.92188	8.19E-05	0.105	GACCCCGACGTCGTG
LOC107811159	NAC	516	530	+	10.7344	8.22E-05	0.224	CGCCACCCACAAGCT
LOC107804908	ERF	575	589	-	7.45312	8.26E-05	0.188	TTGCGGCGTTGAATT
LOC107779232	MYB	105 5	106 5	-	9.8375	8.27E-05	0.18	AACTCAGCCTG
LOC107788512	ERF	785	805	-	6.5625	8.34E-05	0.0615	GTCCTGCAGTGGCGTCGATCA
LOC107819325	ERF	190	199	+	10.8526	8.43E-05	0.0395	CACCGCACAG
LOC107785538	SBP	413	422	+	11	8.44E-05	0.204	GGGCACGGCC
LOC107777142	AP2	133 3	135 2	-	10.2785	8.48E-05	0.228	AAAGAACAAAAAGCAATACG
LOC107787383	ERF	852	866	-	6.51562	8.49E-05	0.105	CTCCTCGGCCATCAT
LOC107780905	WRKY	287	301	-	11.1406	8.53E-05	0.115	CGGGTTGACCTTAGT
LOC107823216	SBP	379	392	+	8.70588	8.60E-05	0.224	GGACGGTACTGACC
LOC107825706	MYB	302	316	-	10.8438	8.70E-05	0.119	AATGGCGTCCGTTGA
LOC107767159	MIKC_MADS	921	935	+	9.625	8.76E-05	0.239	ATGCCCTTTCGGGCT
LOC107823513	BES1	111 0	112 0	+	2.42188	8.79E-05	0.202	GACACGAGGGG
LOC107787383	ERF	542	556	+	6.39062	8.86E-05	0.105	TATTACATCCGCCAG
LOC107816762	E2F/DP	221	230	-	11.1383	8.88E-05	0.167	GGGCGCAATC
LOC107765562	NAC	660	679	-	9.0625	8.91E-05	0.0948	CGACGTTGGCGACCCACTGG
LOC107798348	ARF	277	286	-	11.1719	8.93E-05	0.206	CACCGACATA
LOC107816356	ERF	575	589	+	6.73438	8.94E-05	0.0599	AATTC AACGCCGCAA
LOC107769170	LBD	496	510	+	10.0625	9.00E-05	0.0997	GCAGGAATCCCGCGA
LOC107766306	ERF	791	801	+	6.51562	9.07E-05	0.107	ACGCCACTGCA
LOC107807574	ERF	628	644	-	4.25	9.11E-05	0.0675	CTGATGGAGCCGTTGGC
LOC107808166	ERF	323	343	+	6.53125	9.11E-05	0.0653	CCCGACGTCGTGGAAGCCTGT
LOC107787782	ARF	277	285	+	10.6146	9.13E-05	0.24	TATGTCGGT
LOC107801353	ERF	244	253	-	10.4419	9.16E-05	0.0774	CGCCCCCTTC
LOC107766306	ERF	512	522	+	6.4375	9.20E-05	0.107	ACATCGCCACC
LOC107797072	MIKC_MADS	386	404	-	8.78125	9.29E-05	0.253	CTTCTTTGTAAGGTCAGT
LOC107830873	ERF	544	564	-	6.46875	9.31E-05	0.0372	CTGTGCACTGGCGGATGTAA
LOC107778042	ERF	544	564	-	6.46875	9.31E-05	0.037	CTGTGCACTGGCGGATGTAA
LOC107787814	TCP	663	671	-	9.92553	9.40E-05	0.0607	GCGACCCAC
LOC107827249	WRKY	287	299	-	9.89062	9.50E-05	0.259	GGTTGACCTTAGT
LOC107785742	MYB	889	901	-	0.088607 6	9.52E-05	0.0998	CCTTGGTGGGTGA
LOC107820060	MYB	303	317	-	10.0625	9.62E-05	0.131	TAATGGCGTCCGTTG
LOC107822582	ERF	877	896	+	5.96875	9.74E-05	0.053	AAACGACTTTCATCACCCAC
LOC107784356	ERF	877	896	+	5.96875	9.74E-05	0.0527	AAACGACTTTCATCACCCAC

LOC107828273	ERF	321	341	+	4.89706	9.75E-05	0.0544	ACCCCGACGTCGTGGAAGCCT
LOC107826816	C2H2	134 0	135 6	-	7.75	9.76E-05	0.264	GGCGAAAGAACAAAAAG
LOC107788361	EIL	46	66	-	9.08861	9.77E-05	0.265	GTTTCCTGGTTCATCACATAG
LOC107811551	TCP	742	751	+	10.3053	9.79E-05	0.116	GCGTGCCCAA
LOC107811551	TCP	742	751	-	10.3053	9.79E-05	0.116	TTGGGCACGC
LOC107802463	Dof	474	483	-	10.094	9.87E-05	0.135	GAAAAAGCAG

APÉNDICE VI: IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS TRANSPONIBLES CON EL SERVIDOR DPTEDB

- El análisis se realizó con la región denominada >Gypsy-ppSC10 correspondiente a 305 pb dentro de la secuencia *ppSC10-RNasa*.

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value	Score	E
DHHelitron_1_454_mnt Class=DNA transposons;Order=Helitron;Sup...	66	1e-09		
DHHelitron_1_443_pda Class=DNA transposons;Order=Helitron;Sup...	64	4e-09		
RLGypsy_2_174_mnt Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	64	4e-09		
RLGypsy_1_1440_mnt Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfami...	62	2e-08		
RLGypsy_1_1046_mnt Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfami...	60	6e-08		
RLGypsy_1_783_pda Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	58	3e-07		
RLGypsy_1_310_pda Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	58	3e-07		
RLGypsy_1_309_pda Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	58	3e-07		
RLGypsy_1_308_pda Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	58	3e-07		
RLGypsy_1_307_pda Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	58	3e-07		
RLGypsy_1_306_pda Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	58	3e-07		
RLGypsy_1_159_pda Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	58	3e-07		
RLGypsy_2_43_mnt Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily...	58	3e-07		
RLGypsy_1_577_pda Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	56	1e-06		
DHHelitron_1_122_pda Class=DNA transposons;Order=Helitron;Sup...	56	1e-06		
DHHelitron_1_25_csa Class=DNA transposons;Order=Helitron;Supe...	56	1e-06		
RLGypsy_1_340_pda Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	54	4e-06		
RLGypsy_1_1563_mnt Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfami...	54	4e-06		
RLGypsy_1_1284_mnt Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfami...	54	4e-06		
RLGypsy_1_1037_mnt Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfami...	54	4e-06		
RLGypsy_1_970_mnt Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	54	4e-06		
RLGypsy_1_969_mnt Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamil...	54	4e-06		
 >DHHelitron_1_454_mnt Class=DNA				
transposons;Order=Helitron;Superfamily=Helitron;LEN=12765				
;locate=scaffold305:460581:473345:-;				
Length = 12765				
Score = 65.9 bits (33), Expect = 1e-09				
Identities = 48/53 (90%)				
Strand = Plus / Plus				
 Query: 103 ttcccactaccccacatcgaccaactgatcgacgccactgcaggacacgaact 155				
Sbjct: 5681 ttcccactaccccacaaatcgaccagctggctcgacgccacggtaggacacgaact 5733				
 >DHHelitron_1_443_pda Class=DNA				
transposons;Order=Helitron;Superfamily=Helitron;LEN=10469				
;locate=KE332665.1:168724:179192:-;				
Length = 10469				
Score = 63.9 bits (32), Expect = 4e-09				
Identities = 53/60 (88%)				
Strand = Plus / Plus				
 Query: 40 aatgggaagtggagaatgtgctggatttcaccgacctaaacaaggcgtgcccaaaggat 99				
Sbjct: 5802 aatgggaaatggcgtatgtgctggactacaccgacctgaacaaggcctgcccaaaggat 5861				

>RLGypsy_2_174_mnt
 Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=11480;locate=scaffold3186:2206:13685:-;
 Length = 11480
 Score = 63.9 bits (32), Expect = 4e-09
 Identities = 48/52 (92%), Gaps = 1/52 (1%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 249 tattgctacaaggtaatgccctttcgggctcaagaacgcaggggctacgtac 300
 |||
 Sbjct: 4058 tattgctacaaggtaatgcccttt-ggcctgaagaacgcaggggcaacgtac 4108

>RLGypsy_1_1440_mnt
 Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=12828;locate=scaffold2224:57158:69985:+;
 Length = 12828
 Score = 61.9 bits (31), Expect = 2e-08
 Identities = 110/135 (81%), Gaps = 1/135 (0%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 49 tggagaatgtgctggatccacggacctaacaaggcgtgcccaaggattcattccca 108
 |||
 Sbjct: 3766 tggagaacatgctgcgatttcagcgacctcaacaaggcgtgcccaaggatgggtttcca 3825

Query: 109 ctacccccacatcgaccaactgatcgacgccactgcaggacacgaactggtgagctct-ta 167
 |||
 Sbjct: 3826 ctccttcagatagaccaaattggtcgacgccacagcaggacatgaaatggtgagttttatg 3885

Query: 168 gatgcctactccggt 182
 |||
 Sbjct: 3886 gatgcctactccggt 3900
 Score = 60.0 bits (30), Expect = 6e-08
 Identities = 109/134 (81%), Gaps = 1/134 (0%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 49 tggagaatgtgctggatccacggacctaacaaggcgtgcccaaggattcattccca 108
 |||
 Sbjct: 5327 tggagaacatgctgcgatttcagcgacctcaacaaggcgtgcccaaggatgggtttcca 5386

Query: 109 ctacccccacatcgaccaactgatcgacgccactgcaggacacgaactggtgagctct-ta 167
 |||
 Sbjct: 5387 ctccttcagatagaccaaattggtcgacgccacagcaggacatgaaatggtgagttttatg 5446

Query: 168 gatgcctactccgg 181
 |||
 Sbjct: 5447 gatgcctactccgg 5460

>RLGypsy_1_1046_mnt
 Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=10910;locate=scaffold101:63412:74321:-;
 Length = 10910
 Score = 60.0 bits (30), Expect = 6e-08
 Identities = 111/138 (80%)
 Strand = Plus / Minus

Query: 26 tgggtcaaaaagaaaaatgggaagtggagaatgtgctggatttcaccgacctaacaagg 85
||||| ||||| ||| ||| ||||| ||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||
Sbjct: 7407 tgggtgaaaaagccaaacggggagtggtgaacgtgctgacttcagtgacctcaacaaag 7348

Query: 86 cgtgccccaaaggattcattcccactaccccacatcgaccaactgatcgacgccactgcag 145
| || | ||||| ||||| ||||| ||||| || || ||||| ||||| ||
Sbjct: 7347 catgtccaaggatagcttcccactaccccgaatcgaccagctagtcgacgccactgcgg 7288

Query: 146 gacacgaactgttgagct 163
| ||||| |||||
Sbjct: 7287 ggcacgaactgctgagct 7270

>RLGypsy_1_783_pda
Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=11
866;locate=KE334358.1:5027:16892:-;
Length = 11866

Score = 58.0 bits (29), Expect = 3e-07
Identities = 47/53 (88%)
Strand = Plus / Plus

Query: 46 aagtggagaatgtgctggatttcaccgacctaacaaggcgtgccccaaagga 98
||||| | ||||| ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 3624 aagtggcgcgatgtgctggactacaccgacctgaacaaggcctgccccaaagga 3676

>RLGypsy_1_310_pda
Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=10
814;locate=KE332816.1:19752:30565:-;
Length = 10814

Score = 58.0 bits (29), Expect = 3e-07
Identities = 41/45 (91%)
Strand = Plus / Minus

Query: 55 atgtgctggatttcaccgacctaacaaggcgtgccccaaaggat 99
||||||| ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 7550 atgtgctggactacaccgacctgaacaaggcctgccccaaaggat 7506

>RLGypsy_1_309_pda
Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=11
151;locate=KE332816.1:19619:30769:-;
Length = 11151

Score = 58.0 bits (29), Expect = 3e-07
Identities = 41/45 (91%)
Strand = Plus / Minus

Query: 55 atgtgctggatttcaccgacctaacaaggcgtgccccaaaggat 99
||||||| ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 7754 atgtgctggactacaccgacctgaacaaggcctgccccaaaggat 7710

>RLGypsy_1_308_pda
Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=11
109;locate=KE332816.1:19596:30704:-;
Length = 11109

Score = 58.0 bits (29), Expect = 3e-07
Identities = 41/45 (91%)
Strand = Plus / Minus

Query: 100 tcattcccactacccccatcgaccaactgatcgacgccactgcaggacacgaactgttg 159
|| ||||| || || || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||
Sbjct: 3736 ggctttccactccctcagatagaccaaattggtcgacgccacggcgggacacgagatgtg 3795

Query: 160 agctct-tagatgcctactccggttacaa 187
|||| | | ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 3796 agctttatggatgcctactccggatataa 3824

>RLGypsy_1_577_pda
Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=2
048;locate=KE333503.1:70443:72490:++;
Length = 2048

Score = 56.0 bits (28), Expect = 1e-06
Identities = 71/84 (84%), Gaps = 1/84 (1%)
Strand = Plus / Plus

Query: 213 caggagaaaacgactttcatcaccaccaaggacgtattgctacaaggtaatgcccttt 272
||||||| ||||| || | || || ||||| ||||| || | ||
Sbjct: 173 caggagaaaacggctttcatcaccgacaaggcacttattgttacaaggatg-catt 231

Query: 273 cgggctcaagaacgcaggggctac 296
||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 232 cgggctgaagaatgcaggagctac 255

>DHHelitron_1_122_pda Class=DNA
transposons;Order=Helitron;Superfamily=Helitron;LEN=12741;
locate=KE332697.1:504492:517232:++;
Length = 12741

Score = 56.0 bits (28), Expect = 1e-06
Identities = 49/56 (87%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43 ggggaagtggagaatgtgctgggatttcaccgacctaaacaaggcgtgcccaaagga 98
||||||| | ||||| ||||| | ||||| ||||| || || ||||| |||||
Sbjct: 10279 ggggaagtggcgcgatgtgctgggactacaccgacctgaacaaagcgtgcccaaagga 10334

>DHHelitron_1_25_csa Class=DNA
transposons;Order=Helitron;Superfamily=Helitron;LEN=16931;
locate=JH226400.1:84094:101024:++;
Length = 16931

Score = 56.0 bits (28), Expect = 1e-06
Identities = 31/32 (96%)
Strand = Plus / Minus

Query: 64 gatttcaccgacctaaacaaggcgtgcccaaa 95
||||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 14591 gatttcaccgacctcaacaaggcgtgcccaaa 14560

>RLGypsy_1_340_pda
Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=11
661;locate=KE332846.1:196523:208183:++;
Length = 11661

Score = 54.0 bits (27), Expect = 4e-06

Sbjct: 2701 tcgacgccactgccggacacgaactggtgag 2671

>RLGypsy_1_969_mnt

Class=Retrotransposons;Order=LTR;Superfamily=Gypsy;LEN=64
26;locate=scaffold6:69019:75444:+;
Length = 6426

Score = 54.0 bits (27), Expect = 4e-06
Identities = 30/31 (96%)
Strand = Plus / Plus

Query: 131 tcgacgccactgcaggacacgaactggtgag 161
|||||
Sbjct: 3853 tcgacgccactgccggacacgaactggtgag 3883

APÉNDICE VII: BLAST EN GYPSY DATA BASE 2.0

- El análisis se realizó con la región denominada >Gypsy-ppSC10 correspondiente a 305pb

```

Database: cores
        2636 sequences; 629,570 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:          Score (bits)          E value
RT_Tat4-1                      107                    2e-31
RT_Tft2                          105                    6e-31
RT_Cinful-1                      100                    5e-29
RT_RIRE2                          94                     1e-26
RT_RetroSor1                     87                     1e-23
RT_Ogre                           86                     2e-23
RT_GypsySL_monotypic|Chr08_2s54   85                     5e-23
RT_GypsySL_12                     83                     4e-22
RT_GypsySL_06                     80                     3e-21
RT_Peabody                        57                     5e-16
RT_GypsySL_monotypic|Chr03_1s10   62                     3e-14
RT_Legolas                        58                     3e-14
RT_Cer3                           56                     3e-14
RT_Retrosat-2                    51                     3e-13
RT_GypsySL_10                    44                     1e-12
RT_Gimli                          57                     2e-12
RT_GypsySL_05                    57                     3e-12
RT_rGmr1                          57                     3e-12
RT_Reina                          57                     3e-12
RT_Tse3                           57                     3e-12
RT_GypsySL_monotypic|Chr03_1s33   55                     3e-12
RT_Mdg3                           56                     4e-12
RT_Gloin                          56                     5e-12
RT_Cer2                            56                     5e-12
RT_GypsySL_monotypic|Chr12_1s55   56                     5e-12
RT_Osvaldo                       56                     6e-12
RT_Cyclops-2                      48                     8e-12
RT_Galadriel                      40                     1e-11
RT_Ty3-1                          55                     1e-11
RT_Ifg7                           54                     2e-11
RT_B1147A04.5                    52                     4e-11
RT_GypsySL_monotypic|Chr04_2s29   41                     5e-11
RT_Gmr1                           53                     5e-11
RT_SURL                          45                     7e-11
RT_Monkey                        40                     9e-11
RT_GypsySL_09                    47                     9e-11
RT_Tma                            52                     1e-10
RT_Cer1                           52                     1e-10

```

RT_Athila4-1	52	2e-10
RT_GypsySL_03	52	2e-10
RT_Diaspora	52	2e-10
RT_412	42	3e-10
RT_GypsySL_01	50	5e-10
RT_Grasshopper	50	5e-10
RT_GypsySL_11	38	9e-10
RT_Zam	50	1e-09
RT_Calypso5-1	50	1e-09
RT_GypsySL_02	49	1e-09
RT_Grandel-4	49	3e-09
RT_Cgret	48	4e-09
RT_REM1	48	4e-09
RT_Mag	40	5e-09
RT_GypsySL_monotypic Chr02_1s41	45	1e-08
RT_CSVMV	35	2e-08
RT_Bagy-2	46	3e-08
RT_Beetle1	45	3e-08
RT_CRM	45	3e-08
RT_SPM	45	4e-08
RT_GypsySL_04	45	4e-08
RT_G-Rhodo	45	6e-08
RT_Tor4a	36	7e-08
RT_Amn-san	44	1e-07
RT_Micropia	44	2e-07
RT_Idefix	44	2e-07
RT_Blastopia	40	2e-07
RT_CsRN1	43	2e-07
RT_Cft-1	36	3e-07
RT_GypsySL_07	42	4e-07
RT_Del	42	4e-07
RT_Amn-ichi	42	6e-07
RT_Hydra2-1	42	6e-07
RT_Bagy-1	42	8e-07
RT_Maggy	41	1e-06
RT_Mdg1	41	1e-06
RT_Springer	41	1e-06
RT_Pyret	41	2e-06
RT_Cer4	41	2e-06
RT_FIV	41	2e-06
RT_Cigr-1	33	2e-06
RT_LLDAV	32	3e-06
RT_CaMV	40	3e-06
RT_Ted	40	4e-06
RT_DRM	40	4e-06
RT_Tor1	39	5e-06
RT_Gypsyvir	39	6e-06
RT_Gypsy	39	6e-06
RT_CFG1	32	7e-06
RT_MGLR3	39	7e-06
RT_Tv1	39	7e-06
RT_Woot	34	1e-05
RT_Tom	39	1e-05

RT_TF1	38	1e-05
RT_TF2	38	1e-05
RT_Gulliver	38	1e-05
RT_Tntom1	38	1e-05
RT_CAEV	38	2e-05
RT_SA-OMVV	38	2e-05
RT_VMV	38	2e-05
RT_MiMV	38	2e-05
RT_Real	37	5e-05
RT_Nomad	37	5e-05
RT_297	37	5e-05
RT_Cereba	37	5e-05
RT_HMS-Beagle	37	5e-05
RT_GypsySL_08	36	7e-05
RT_CERV	36	7e-05
RT_Cer5	36	9e-05
RT_Skippy	36	9e-05
RT_GypsySL_monotypic Chr07_1s69	35	1e-04
RT_Skipper	35	1e-04
RT_Cer6	35	2e-04
RT_Tor2	35	2e-04
RT_Burdock	35	2e-04
RT_PVCV	31	3e-04
RT_Kabuki	34	3e-04
RT_17.6	34	3e-04
RT_FMV	34	3e-04
RT_CSSV	34	4e-04
RT_Boudicca	34	4e-04
RT_Dane-1	34	4e-04
RT_Sushi-ichi	34	4e-04
RT_Ulysses	33	6e-04
RT_marY1	33	6e-04
RT_BsCVBV	33	7e-04
RT_EVCV	33	9e-04
RT_SVBV	33	9e-04
RT_DrMV	33	9e-04
RT_DBV	33	9e-04
RT_Amn-ni	33	0.001
RT_BFV	30	0.001
RT_BIV	32	0.002
RT_CmYLCV	32	0.002
RT_KTSV	32	0.002
RT_ScBIMV	28	0.003
RT_Yoyo	32	0.003
RT_K-HERV	32	0.003
RT_JSRV	32	0.003
RT-TaBV	32	0.003
RT_FFV	30	0.003
RT_SFV-1	31	0.004
RT_TVCV	31	0.004
RT_MMTV	31	0.005
RT_SRV-1	30	0.007
RT_MPMV	30	0.007

RT_SMRV-H	30	0.007
RT_SERV	30	0.007
RT_RTBV	28	0.009
RT_HFV	30	0.010
RT_BSGFV	30	0.011
RT_MuERV-L	30	0.013
RT_HIV-2	30	0.013
RT_RuFDV	30	0.015
RT_ComYMV	29	0.020
RT_EIAV	29	0.025
RT_DrFV-1	25	0.025
RT_CYMV	29	0.026
RT_CLNV	29	0.027
RT_EFV	28	0.034
RT_SIVMAC	28	0.034
RT_BSMYV	28	0.049
RT_HIV-1	28	0.063
RT_BSVAV	28	0.067
RT_HERV-K10	27	0.086
RT_SIVAGM	27	0.086
RT_BSOLV	27	0.093
RT_PyERV	27	0.12
RT_SnRV	27	0.16
RT_SIVMND	26	0.30
RT_HTLV-2	25	0.55
RT_StcLV2PP1664	25	0.55
RT_Pygy	24	1.0
RT_PCSV	23	2.0
RT_ZFERV	23	3.5
BEL1_EFV	23	3.6
RT_SbCMV	23	3.7
AP_Orycol-2	22	4.2
ENV_Gypsyvir	22	5.2
GAG_Retrosat-2	22	5.3
RT_HTLV-1	22	6.5
AP_AtASP38	22	7.2
TAX_BLV	22	9.2

RT_Tat4-1

Length = 226

Score = 107 bits (266), Expect = 2e-31
 Identities = 53/100 (53%), Positives = 69/100 (69%)
 Frame = +2

Query: 8 QWVANVMVKKKNGKWRMCVDFDNLKACPKDSFPLPHIDQLIDATAGHELLSS*MPTPV 187
+W+AN V+VKKKNGK R+C+DFTDLNKACPKDSFPLPHID++++AT G+ELLS
Sbjct: 13 EWLANPVVVKKNGKLRVCIDFDTDLNKACPKDSFPLPHIDRMEATGNELLSFMDAFSG 72

Query: 188 TIKL*WPRRTRRKRLSSPTKGRIATR*CPFGLKNAGATYQ 307
++ + + K +G + PFGLKNAGA YQ
Sbjct: 73 YNQIPMHKDDQEKTSFITDRGTYCYKVMPPFGLKNAGARYQ 112

RT Tft2 Length = 226

Score = 105 bits (262), Expect = 6e-31
Identities = 54/99 (54%), Positives = 67/99 (67%)
Frame = +2

Query: 11 WVANVMVKKKNGKWRMCVDFDNLKACPKDSFPLPHIDQLIDATAGHELLSS*MPTPVT 190
W+AN V+VKKKNGK +C+DFTDLNKACPKDSFPLPHID L+++TAG+ELLS
Sbjct: 14 WLANTVVVKKKNGKRIVCIDFDTDLNKACPKDSFPLPHIDNLVESTAGNELLSFMDALSGY 73

Query: 191 IKL*WPRRTRRKRLSSPTKGRIATR*CPFGLKNAGATYQ 307
++ + K +G + PFGLKNAGATYQ
Sbjct: 74 NQIMNPEDQEKTSFITDRGIYCYKVMPPFGLKNAGATYQ 112

RT Cinful-1 Length = 226

Score = 100 bits (249), Expect = 5e-29
Identities = 53/100 (53%), Positives = 63/100 (63%), Gaps = 1/100 (1%)
Frame = +2

Query: 8 QWVANVMVKKKNGKWRMCVDFDNLKACPKDSFPLPHIDQLIDATAGHELLSS*MPTPV 187
+W+AN VMVKK NGKWRMC+DFTDLNKACPKD FPLP ID L+DATA EL+S +
Sbjct: 13 EWLANTVMVKKKANGKWRMCIDFDTDLNKACPKDEFPLPRIDSLVDATASSELMSL-LDCYS 71

Query: 188 TIKL*WPRRTRRKRLSSPT-KGRIATR*CPFGLKNAGATY 304
W+R + S T G P GLKNAG ++
Sbjct: 72 GYHQIWMKREDEPKTSFITPSGTYCYLRMPEGLKNAGGSF 111

RT RIRE2 Length = 226

Score = 94.4 bits (233), Expect = 1e-26
Identities = 51/99 (51%), Positives = 62/99 (62%)
Frame = +2

Query: 11 WVANVMVKKKNGKWRMCVDFDNLKACPKDSFPLPHIDQLIDATAGHELLSS*MPTPVT 190
W+AN V+V+KK G+WRCVD+TDLNK+CPKD F LP IDQ++D+TAG ELLS
Sbjct: 14 WLANPVLVRKKTGQWRMCVDYTDLNKSCPKDPFGLPRIDQVVDSTAGCELLSFLDCYSGY 73

Query: 191 IKL*WPRRTRRKRLSSPTKGRIATR*CPFGLKNAGATYQ 307
++ K G PFGLKNAGATYQ
Sbjct: 74 HQIRLKESDCLKTSFITPFGAYCYVTMPFGLKNAGATYQ 112

RT RetroSor1 Length = 226

Score = 86.7 bits (213), Expect = 1e-23
Identities = 49/100 (49%), Positives = 60/100 (60%), Gaps = 1/100 (1%)
Frame = +2

Query: 8 QWVANVMVKKKNGKWRMCVDFDNLKACPKDSFPLPHIDQLIDATAGHELLSS*MPTPV 187
+W+ANVV+V KKNK RMC+DFTDLNKAC KDSFPLP ID +D AG + S +
Sbjct: 13 EWLANVVLVPKKNKMRMCIDFDTDLNKACVKDSFPLPRIDTSVDKAAGCQRFSL-LDCFS 71

Query: 188 TIKL*WPRRTRRKRLSSPTK-GRIATR*CPFGLKNAGATY 304

W ++ + S T G P GLKNAGAT+
Sbjct: 72 GYHQIWLKKEDEGKASFTTFFGTGYCYTRMPEGLKNAGATF 111

RT OGRE Length = 226

Score = 85.9 bits (211), Expect = 2e-23
Identities = 47/99 (47%), Positives = 57/99 (57%)
Frame = +2

Query: 11 WVANVVMVKKKNGKWRMCVDFDNLKACPKDSFPLPHIDQLIDATAGHELLSS*MPTPVT 190
W+AN+V V KK+GK RMCVD+ DLN+A PKD FPLPHID L+D TA + S

Sbjct: 14 WMANIVPVPKKDGKVRMCVDYRDLNRASPKDDFPLPHIDVLVDNTAQSSVFSFMDGFSGY 73

Query: 191 IKL*WPRRTRRKRLSSPTKGRIATR*CPFGLKNAGATYQ 307
++ K G + PFGLKNAGATYQ

Sbjct: 74 NQIKMAPEDMEKTTFFITPFWGTFCYKVMFPFGLKNAGATYQ 112

RT GypsySL monotypic|Chr08 2s54 Length = 225

Score = 85.1 bits (209), Expect = 5e-23
Identities = 47/98 (47%), Positives = 60/98 (61%)
Frame = +2

Query: 11 WVANVVMVKKKNGKWRMCVDFDNLKACPKDSFPLPHIDQLIDATAGHELLSS*MPTPVT 190
W+ANVV V KK+GK R+CVDF DLNKA PKD+FPLP+I L+D A HE+ S

Sbjct: 13 WLANVVPVKKKDGKIRVCVDYRDLNKASPKDNFPLPNIHILVDNCAKHEIQSFVDCYAGY 72

Query: 191 IKL*WPRRTRRKRLSSPTKGRIATR*CPFGLKNAGATY 304
++ + +K + G R PFGLKNAGATY

Sbjct: 73 HQILMDEKDAKKTAFITPFWGTFCYRVMPFGLKNAGATY 110

RT GypsySL 12 Length = 223

Score = 82.8 bits (203), Expect = 4e-22
Identities = 45/99 (45%), Positives = 59/99 (59%)
Frame = +2

Query: 11 WVANVVMVKKKNGKWRMCVDFDNLKACPKDSFPLPHIDQLIDATAGHELLSS*MPTPVT 190
W++++V V+KKN+ R+CVDF DLN ACPKD FPLP + +IDAT G +L +

Sbjct: 13 WISSIVPVRKKNQIRVCVDFRDLNACPKDEFPLPIPELMIDATTGKAILFMDGSSGYN 72

Query: 191 IKL*WPRRTRRKRLSSPTKGRIATR*CPFGLKNAGATYQ 307
P+ +P KG + PFGLKN GATYQ

Sbjct: 73 QIRMSPKDEELTAFRTP-KGIYCYKVMFPFGLKNDGATYQ 110

RT GypsySL 06 Length = 225

Score = 80.5 bits (197), Expect = 3e-21
Identities = 48/98 (48%), Positives = 57/98 (58%)
Frame = +2

Query: 11 WVANVVMVKKKNGKWRMCVDFDNLKACPKDSFPLPHIDQLIDATAGHELLSS*MPTPVT 190
W+ANVV V KK+GK R+CVDF DLNKA PKD+FPLP+I LID A HE+ S

Sbjct: 13 WLANVVPVAKKDGKIRICVDYRDLNKASPKDNFPLPNIHILIDNCAKHEMQSFVDCYAGY 72

Query: 191 IKL*WPRRTRRKRLSSPTKGRIATR*CPFGLKNAGATY 304
++ K G R PFGLKNAGATY

Sbjct: 73 HQILMDGEDAEKTAFITPFWGVYHYRVMPFGLKNAGATY 110

APÉNDICE VIII: RESULTADOS DEL PERFIL DE METILACIÓN

Resultados obtenidos a partir de hoja

```
tarting CyMATE module: ss
Analysis results of ss-module:
****
OVERVIEW OF THE MASTER SEQUENCE: 'pp':
  Sum of all bisulfite patterns: 266 of 1141 positions (23.31%).
>> Class I (CGN):
  Pattern found at position(s):
  [10, 31, 40, 58, 64, 68, 83, 86, 89, 106, 122, 140, 170, 176, 182,
  201, 265, 267, 275, 293, 296, 310, 318, 341, 344, 358, 392, 428, 434,
  437, 476, 488, 502, 536, 548, 551, 566, 596, 620, 640, 664, 689, 701,
  712, 763, 804, 827, 865, 874, 889, 905, 936, 985, 987, 1019, 1041,
  1074, 1093, 1113, 1132]
  Pattern frequency: 60 of 266 (22.56%).

>> Class II (CHG):
  Pattern found at position(s):
  [16, 57, 82, 98, 109, 127, 145, 190, 200, 223, 232, 247, 256, 264,
  288, 309, 313, 321, 343, 362, 384, 401, 420, 487, 543, 556, 559, 570,
  595, 619, 630, 703, 717, 724, 815, 819, 867, 1073, 1083]
  Pattern frequency: 39 of 266 (14.66%).

>> Class III (CHH):
  Pattern found at position(s):
  [22, 27, 34, 46, 53, 56, 61, 70, 71, 80, 81, 97, 113, 119, 120, 125,
  126, 131, 132, 149, 150, 154, 163, 164, 167, 174, 179, 180, 185, 188,
  189, 209, 214, 218, 219, 235, 241, 242, 243, 263, 272, 277, 278, 280,
  281, 282, 284, 299, 300, 306, 312, 338, 346, 350, 361, 377, 381, 388,
  389, 395, 397, 398, 409, 416, 418, 419, 430, 431, 440, 446, 485, 491,
  492, 497, 506, 507, 508, 517, 521, 522, 523, 525, 528, 529, 530, 531,
  533, 539, 540, 553, 554, 564, 578, 581, 589, 590, 593, 602, 606, 629,
  643, 647, 650, 652, 653, 654, 656, 657, 671, 674, 684, 686, 693, 695,
  709, 716, 723, 730, 738, 739, 741, 746, 761, 780, 782, 788, 792, 801,
  807, 872, 893, 894, 901, 902, 903, 917, 919, 921, 941, 942, 944, 951,
  952, 953, 969, 990, 991, 1005, 1021, 1037, 1057, 1064, 1069, 1071,
  1076, 1078, 1080, 1087, 1088, 1090, 1100, 1109, 1115, 1116, 1117,
  1128, 1129]
  Pattern frequency: 167 of 266 (62.78%).

****
POSITION-ANALYSE RESULT:
Of 1574 analysed positions 557 (35.39%) are methylated, 1017 are not methylated (64.61%) and 0 are erroneous (0.00%).
>> Class I (CGN):
  Pos | M | NM | OK
  10 | 2 ( 33.33%) | 4 ( 66.67%) | 6 (100.00%)
  31 | 6 (100.00%) | 0 ( 0.00%) | 6 (100.00%)
  40 | 6 (100.00%) | 0 ( 0.00%) | 6 (100.00%)
  58 | 5 ( 83.33%) | 1 ( 16.67%) | 6 (100.00%)
  64 | 5 ( 83.33%) | 1 ( 16.67%) | 6 (100.00%)
  68 | 5 ( 83.33%) | 1 ( 16.67%) | 6 (100.00%)
  83 | 6 (100.00%) | 0 ( 0.00%) | 6 (100.00%)
  86 | 4 ( 66.67%) | 2 ( 33.33%) | 6 (100.00%)
  89 | 5 ( 83.33%) | 1 ( 16.67%) | 6 (100.00%)
  106 | 3 ( 50.00%) | 3 ( 50.00%) | 6 (100.00%)
  122 | 5 (100.00%) | 0 ( 0.00%) | 5 (100.00%)
  140 | 6 (100.00%) | 0 ( 0.00%) | 6 (100.00%)
  170 | 4 (100.00%) | 0 ( 0.00%) | 4 (100.00%)
  176 | 5 ( 83.33%) | 1 ( 16.67%) | 6 (100.00%)
  182 | 6 (100.00%) | 0 ( 0.00%) | 6 (100.00%)
  201 | 5 ( 83.33%) | 1 ( 16.67%) | 6 (100.00%)
  265 | 6 (100.00%) | 0 ( 0.00%) | 6 (100.00%)
```

267		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
275		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
293		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
296		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
310		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
318		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
341		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
344		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
358		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
392		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
428		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
434		3 (50.00%)		3 (50.00%)		6 (100.00%)
437		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
476		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
488		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
502		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
536		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
548		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
551		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
566		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
596		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
620		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
640		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
664		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
689		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
701		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
712		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
763		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
804		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
827		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
865		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
874		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
889		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
905		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
936		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
985		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
987		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1019		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
1041		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1074		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1093		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1113		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
1132		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
SUM(AVG)		240 (67.42%)		116 (32.58%)		356 (100.00%)

>> Class II (CHG):

Pos	M	NM	OK
16	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
57	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
82	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
98	5 (100.00%)	0 (0.00%)	5 (100.00%)
109	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
127	5 (100.00%)	0 (0.00%)	5 (100.00%)
145	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
190	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
200	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
223	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
232	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
247	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
256	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
264	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
288	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
309	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
313	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
321	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
343	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
362	3 (75.00%)	1 (25.00%)	4 (100.00%)
384	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
401	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
420	4 (100.00%)	0 (0.00%)	4 (100.00%)

487		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
543		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
556		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
559		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
570		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
595		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
619		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
630		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
703		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
717		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
724		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
815		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
819		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
867		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
1073		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1083		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
SUM(AVG)		143 (62.72%)		85 (37.28%)		228 (100.00%)

>> Class III (CHH):

Pos	M	NM	OK
22	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
27	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
34	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
46	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
53	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
56	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
61	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
70	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
71	5 (100.00%)	0 (0.00%)	5 (100.00%)
80	1 (20.00%)	4 (80.00%)	5 (100.00%)
81	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
97	1 (20.00%)	4 (80.00%)	5 (100.00%)
113	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
119	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
120	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
125	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
126	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
131	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
132	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
149	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
150	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
154	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
163	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
164	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
167	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
174	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
179	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
180	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
185	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
188	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
189	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
209	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
214	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
218	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
219	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
235	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
241	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
242	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
243	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
263	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
272	2 (50.00%)	2 (50.00%)	4 (100.00%)
277	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
278	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
280	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
281	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
282	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
284	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
299	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
300	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
306	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)

312		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
338		3 (50.00%)		3 (50.00%)		6 (100.00%)
346		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
350		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
361		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
377		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
381		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
388		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
389		1 (20.00%)		4 (80.00%)		5 (100.00%)
395		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
397		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
398		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
409		3 (50.00%)		3 (50.00%)		6 (100.00%)
416		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
418		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
419		1 (33.33%)		2 (66.67%)		3 (100.00%)
430		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
431		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
440		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
446		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
485		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
491		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
492		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
497		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
506		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
507		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
508		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
517		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
521		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
522		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
523		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
525		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
528		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
529		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
530		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
531		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
533		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
539		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
540		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
553		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
554		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
564		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
578		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
581		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
589		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
590		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
593		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
602		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
606		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
629		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
643		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
647		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
650		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
652		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
653		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
654		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
656		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
657		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
671		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
674		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
684		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
686		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
693		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
695		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
709		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
716		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
723		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
730		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
738		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
739		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)

741		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
746		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
761		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
780		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
782		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
788		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
792		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
801		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
807		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
872		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
893		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
894		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
901		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
902		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
903		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
917		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
919		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
921		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
941		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
942		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
944		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
951		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
952		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
953		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
969		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
990		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
991		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1005		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1021		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1037		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1057		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1064		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1069		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1071		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1076		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1078		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1080		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1087		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1088		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1090		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1100		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1109		0 (0.00%)		5 (100.00%)		5 (100.00%)
1115		0 (0.00%)		5 (100.00%)		5 (100.00%)
1116		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1117		0 (0.00%)		5 (100.00%)		5 (100.00%)
1128		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
1129		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
SUM (AVG)		174 (17.58%)		816 (82.42%)		990 (100.00%)

SEQUENCE-ANALYSE RESULT:

Name	C	M	NM	OK
1-7-31-37-43-49	I	43 (72.88%)	16 (27.12%)	59 (100.00%)
	II	23 (62.16%)	14 (37.84%)	37 (100.00%)
	III	57 (34.76%)	107 (65.24%)	164 (100.00%)
	AVG	123 (47.31%)	137 (52.69%)	260 (100.00%)
2-8-32-38-44-50	I	38 (64.41%)	21 (35.59%)	59 (100.00%)
	II	21 (53.85%)	18 (46.15%)	39 (100.00%)
	III	19 (11.38%)	148 (88.62%)	167 (100.00%)
	AVG	78 (29.43%)	187 (70.57%)	265 (100.00%)
3-9-33-39-45-51	I	40 (68.97%)	18 (31.03%)	58 (100.00%)
	II	27 (71.05%)	11 (28.95%)	38 (100.00%)
	III	28 (16.97%)	137 (83.03%)	165 (100.00%)
	AVG	95 (36.40%)	166 (63.60%)	261 (100.00%)
4-10-34-40-46-52	I	38 (63.33%)	22 (36.67%)	60 (100.00%)
	II	27 (69.23%)	12 (30.77%)	39 (100.00%)
	III	29 (17.47%)	137 (82.53%)	166 (100.00%)

```

| AVG | 94 ( 35.47%) | 171 ( 64.53%) | 265 (100.00%)
5-11-35-41-47-53 | I | 37 ( 61.67%) | 23 ( 38.33%) | 60 (100.00%)
| II | 21 ( 56.76%) | 16 ( 43.24%) | 37 (100.00%)
| III | 9 ( 5.49%) | 155 ( 94.51%) | 164 (100.00%)
| AVG | 67 ( 25.67%) | 194 ( 74.33%) | 261 (100.00%)
6-12-36-42-45-54 | I | 44 ( 73.33%) | 16 ( 26.67%) | 60 (100.00%)
| II | 24 ( 63.16%) | 14 ( 36.84%) | 38 (100.00%)
| III | 32 ( 19.51%) | 132 ( 80.49%) | 164 (100.00%)
| AVG | 100 ( 38.17%) | 162 ( 61.83%) | 262 (100.00%)
Name | Class I | Class II | Class III
1-7-31-37-43-49 | 43 ( 34.96%) | 23 ( 18.70%) | 57 ( 46.34%)
2-8-32-38-44-50 | 38 ( 48.72%) | 21 ( 26.92%) | 19 ( 24.36%)
3-9-33-39-45-51 | 40 ( 42.11%) | 27 ( 28.42%) | 28 ( 29.47%)
4-10-34-40-46-52 | 38 ( 40.43%) | 27 ( 28.72%) | 29 ( 30.85%)
5-11-35-41-47-53 | 37 ( 55.22%) | 21 ( 31.34%) | 9 ( 13.43%)
6-12-36-42-45-54 | 44 ( 44.00%) | 24 ( 24.00%) | 32 ( 32.00%)
****
End of analysis.

```

Resultados obtenidos a partir de pistilo maduro

```

Starting CyMATE module: ss
Analysis results of ss-module:
****
OVERVIEW OF THE MASTER SEQUENCE: 'ppSRNasaSC10':
Sum of all bisulfite patterns: 260 of 1095 positions (23.74%).
>> Class I (CGN):
Pattern found at position(s):
[10, 19, 37, 43, 47, 62, 65, 68, 85, 101, 119, 149, 155, 161, 180,
243, 245, 253, 271, 274, 288, 296, 319, 322, 336, 370, 406, 412, 415,
454, 466, 480, 514, 526, 529, 544, 574, 598, 618, 642, 668, 680, 691,
742, 782, 805, 843, 852, 867, 883, 914, 963, 965, 997, 1019, 1052,
1071, 1091]
Pattern frequency: 58 of 260 (22.31%).
>> Class II (CHG):
Pattern found at position(s):
[36, 61, 77, 88, 106, 124, 169, 179, 202, 211, 226, 234, 242, 266,
287, 291, 299, 321, 340, 362, 379, 398, 465, 521, 534, 537, 548, 573,
597, 608, 682, 696, 703, 793, 797, 845, 1051, 1061]
Pattern frequency: 38 of 260 (14.62%).
>> Class III (CHH):
Pattern found at position(s):
[1, 6, 13, 25, 32, 35, 40, 49, 50, 59, 60, 76, 92, 98, 99, 104, 105,
110, 111, 128, 129, 133, 142, 143, 146, 153, 158, 159, 164, 167, 168,
188, 193, 197, 198, 214, 220, 221, 222, 241, 250, 255, 256, 258, 259,
260, 262, 277, 278, 284, 290, 316, 324, 328, 339, 355, 359, 366, 367,
373, 375, 376, 387, 394, 396, 397, 408, 409, 418, 424, 463, 469, 470,
475, 484, 485, 486, 495, 499, 500, 501, 503, 506, 507, 508, 509, 511,
517, 518, 531, 532, 542, 556, 559, 567, 568, 571, 580, 584, 607, 621,
625, 628, 630, 631, 632, 634, 635, 649, 652, 662, 663, 664, 672, 674,
688, 695, 702, 709, 717, 718, 720, 725, 740, 758, 760, 766, 770, 779,
785, 850, 871, 872, 879, 880, 881, 895, 897, 899, 919, 920, 922, 929,
930, 931, 947, 968, 969, 983, 999, 1015, 1035, 1042, 1047, 1049, 1054,
1056, 1058, 1065, 1066, 1068, 1078, 1087, 1093]
Pattern frequency: 164 of 260 (63.08%).
****
POSITION-ANALYSE RESULT:
Of 1271 analysed positions 1132 (89.06%) are methylated, 139 are not methylated (10.94%) and 0 are erroneous (0.00%).
>> Class I (CGN):
Pos | M | NM | OK
10 | 5 (100.00%) | 0 ( 0.00%) | 5 (100.00%)

```


19		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
37		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
43		1(25.00%)		3(75.00%)		4(100.00%)
47		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
62		3(60.00%)		2(40.00%)		5(100.00%)
65		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
68		3(60.00%)		2(40.00%)		5(100.00%)
85		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
101		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
119		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
149		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
155		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
161		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
180		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
243		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
245		4(100.00%)		0(0.00%)		4(100.00%)
253		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
271		1(20.00%)		4(80.00%)		5(100.00%)
274		3(60.00%)		2(40.00%)		5(100.00%)
288		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
296		4(100.00%)		0(0.00%)		4(100.00%)
319		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
322		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
336		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
370		2(40.00%)		3(60.00%)		5(100.00%)
406		2(40.00%)		3(60.00%)		5(100.00%)
412		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
415		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
454		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
466		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
480		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
514		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
526		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
529		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
544		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
574		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
598		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
618		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
642		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
668		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
680		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
691		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
742		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
782		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
805		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
843		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
852		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
867		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
883		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
914		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
963		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
965		3(60.00%)		2(40.00%)		5(100.00%)
997		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1019		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1052		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1071		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1091		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
SUM(AVG)		249(86.76%)		38(13.24%)		287(100.00%)

>> Class II (CHG):

Pos	M	NM	OK			
36		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
61		4(100.00%)		0(0.00%)		4(100.00%)
77		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
88		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
106		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
124		3(100.00%)		0(0.00%)		3(100.00%)
169		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
179		0(0.00%)		5(100.00%)		5(100.00%)
202		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)

211		0 (0.00%)		5 (100.00%)		5 (100.00%)
226		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
234		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
242		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
266		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
287		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
291		4 (100.00%)		0 (0.00%)		4 (100.00%)
299		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
321		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
340		2 (100.00%)		0 (0.00%)		2 (100.00%)
362		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
379		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
398		1 (100.00%)		0 (0.00%)		1 (100.00%)
465		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
521		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
534		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
537		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
548		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
573		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
597		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
608		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
682		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
696		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
703		0 (0.00%)		5 (100.00%)		5 (100.00%)
793		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
797		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
845		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
1051		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
1061		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
SUM(AVG)		159 (88.83%)		20 (11.17%)		179 (100.00%)

>> Class III (CHH):

Pos		M		NM		OK
1		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
6		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
13		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
25		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
32		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
35		3 (60.00%)		2 (40.00%)		5 (100.00%)
40		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
49		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
50		4 (100.00%)		0 (0.00%)		4 (100.00%)
59		3 (60.00%)		2 (40.00%)		5 (100.00%)
60		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
76		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
92		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
98		1 (20.00%)		4 (80.00%)		5 (100.00%)
99		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
104		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
105		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
110		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
111		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
128		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
129		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
133		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
142		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
143		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
146		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
153		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
158		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
159		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
164		3 (75.00%)		1 (25.00%)		4 (100.00%)
167		2 (40.00%)		3 (60.00%)		5 (100.00%)
168		4 (80.00%)		1 (20.00%)		5 (100.00%)
188		2 (40.00%)		3 (60.00%)		5 (100.00%)
193		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
197		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
198		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
214		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)
220		5 (100.00%)		0 (0.00%)		5 (100.00%)

221		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
222		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
241		0(0.00%)		5(100.00%)		5(100.00%)
250		4(100.00%)		0(0.00%)		4(100.00%)
255		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
256		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
258		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
259		3(60.00%)		2(40.00%)		5(100.00%)
260		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
262		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
277		0(0.00%)		5(100.00%)		5(100.00%)
278		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
284		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
290		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
316		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
324		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
328		4(100.00%)		0(0.00%)		4(100.00%)
339		0(0.00%)		5(100.00%)		5(100.00%)
355		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
359		3(60.00%)		2(40.00%)		5(100.00%)
366		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
367		2(100.00%)		0(0.00%)		2(100.00%)
373		1(20.00%)		4(80.00%)		5(100.00%)
375		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
376		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
387		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
394		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
396		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
397		0(0.00%)		0(0.00%)		0(0.00%)
408		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
409		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
418		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
424		3(60.00%)		2(40.00%)		5(100.00%)
463		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
469		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
470		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
475		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
484		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
485		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
486		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
495		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
499		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
500		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
501		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
503		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
506		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
507		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
508		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
509		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
511		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
517		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
518		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
531		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
532		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
542		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
556		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
559		4(100.00%)		0(0.00%)		4(100.00%)
567		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
568		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
571		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
580		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
584		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
607		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
621		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
625		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
628		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
630		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
631		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
632		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
634		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)

635		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
649		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
652		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
662		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
663		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
664		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
672		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
674		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
688		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
695		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
702		4(100.00%)		0(0.00%)		4(100.00%)
709		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
717		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
718		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
720		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
725		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
740		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
758		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
760		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
766		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
770		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
779		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
785		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
850		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
871		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
872		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
879		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
880		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
881		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
895		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
897		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
899		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
919		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
920		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
922		5(100.00%)		0(0.00%)		5(100.00%)
929		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
930		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
931		3(75.00%)		1(25.00%)		4(100.00%)
947		3(60.00%)		2(40.00%)		5(100.00%)
968		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
969		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
983		3(60.00%)		2(40.00%)		5(100.00%)
999		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1015		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1035		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1042		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1047		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1049		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1054		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1056		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1058		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1065		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1066		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1068		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1078		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1087		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
1093		4(80.00%)		1(20.00%)		5(100.00%)
SUM(AVG)		724(89.94%)		81(10.06%)		805(100.00%)

SEQUENCE-ANALYSE RESULT:

Name	C	M	NM	OK
BiNa_PM_11	I 52(89.66%)	6(10.34%)	58(100.00%)	
	II 33(91.67%)	3(8.33%)	36(100.00%)	
	III 149(92.55%)	12(7.45%)	161(100.00%)	
	AVG 234(91.76%)	21(8.24%)	255(100.00%)	
BiNa_PM_12-	I 52(91.23%)	5(8.77%)		
57(100.00%)				
	II 31(91.18%)	3(8.82%)	34(100.00%)	
	III 151(94.38%)	9(5.62%)	160(100.00%)	

```

      | AVG |234( 93.23%)| 17(  6.77%)|251(100.00%)
BiNa_PM_13-| I | 48( 82.76%)| 10( 17.24%)| 58(100.00%)
      | II | 32( 91.43%)|  3(  8.57%)| 35(100.00%)
      | III|149( 93.12%)| 11(  6.88%)|160(100.00%)
      | AVG |229( 90.51%)| 24(  9.49%)|253(100.00%)
BiNa_PM_61 | I | 53( 92.98%)|  4(  7.02%)|
57(100.00%)
      | II | 33( 89.19%)|  4( 10.81%)| 37(100.00%)
      | III|150( 92.02%)| 13(  7.98%)|163(100.00%)
      | AVG |236( 91.83%)| 21(  8.17%)|257(100.00%)
BiNa_PM_15 | I | 44( 77.19%)| 13( 22.81%)| 57(100.00%)
      | II | 30( 81.08%)|  7( 18.92%)| 37(100.00%)
      | III|125( 77.64%)| 36( 22.36%)|161(100.00%)
      | AVG |199( 78.04%)| 56( 21.96%)|255(100.00%)

```

```

      Name          | Class I | Class II | Class III
BiNa_PM_11-T7_A08.ab1 | 52( 22.22%)| 33( 14.10%)|149( 63.68%)
BiNa_PM_12-T7_B08.ab1 | 52( 22.22%)| 31( 13.25%)|151( 64.53%)
BiNa_PM_13-T7_C08.ab1 | 48( 20.96%)| 32( 13.97%)|149( 65.07%)
BiNa_PM_61-T7_R_C09.a | 53( 22.46%)| 33( 13.98%)|150( 63.56%)
BiNa_PM_15-T7_E08.ab1 | 44( 22.11%)| 30( 15.08%)|125( 62.81%)

```

End of analysis.

Resultados obtenidos a partir de pistilo de botón

Starting CyMATE module: ss

Analysis results of ss-module:

OVERVIEW OF THE MASTER SEQUENCE: 'promotor':

Sum of all bisulfite patterns: 261 of 1095 positions (23.84%).

>> Class I (CGN):

Pattern found at position(s):

[10, 19, 37, 43, 47, 62, 65, 68, 85, 101, 119, 149, 155, 161, 180, 244, 246, 254, 272, 275, 289, 297, 320, 323, 337, 371, 407, 413, 416, 455, 467, 481, 515, 527, 530, 545, 574, 598, 618, 642, 668, 680, 691, 742, 782, 805, 843, 852, 867, 883, 914, 963, 965, 997, 1019, 1052, 1071, 1091]

Pattern frequency: 58 of 261 (22.22%).

>> Class II (CHG):

Pattern found at position(s):

[36, 61, 77, 88, 106, 124, 169, 179, 202, 211, 226, 235, 243, 267, 288, 292, 300, 322, 341, 363, 380, 399, 466, 522, 535, 538, 549, 573, 597, 608, 682, 696, 703, 793, 797, 845, 1051, 1061]

Pattern frequency: 38 of 261 (14.56%).

>> Class III (CHH):

Pattern found at position(s):

[1, 6, 13, 25, 32, 35, 40, 49, 50, 59, 60, 76, 92, 98, 99, 104, 105, 110, 111, 128, 129, 133, 142, 143, 146, 153, 158, 159, 164, 167, 168, 188, 193, 197, 198, 214, 220, 221, 222, 234, 242, 251, 256, 257, 259, 260, 261, 263, 278, 279, 285, 291, 317, 325, 329, 340, 356, 360, 367, 368, 374, 376, 377, 388, 395, 397, 398, 409, 410, 419, 425, 464, 470, 471, 476, 485, 486, 487, 496, 500, 501, 502, 504, 507, 508, 509, 510, 512, 518, 519, 532, 533, 543, 557, 559, 567, 568, 571, 580, 584, 607, 621, 625, 628, 630, 631, 632, 634, 635, 649, 652, 662, 663, 664, 672, 674, 688, 695, 702, 709, 717, 718, 720, 725, 740, 758, 760, 766, 770, 779, 785, 850, 871, 872, 879, 880, 881, 895, 897, 899, 919, 920, 922, 929, 930, 931, 947, 968, 969, 983, 999, 1015, 1035, 1042, 1047, 1049, 1054, 1056, 1058, 1065, 1066, 1068, 1078, 1087, 1093]

Pattern frequency: 165 of 261 (63.22%).

POSITION-ANALYSE RESULT:

Of 1543 analysed positions 522 (33.83%) are methylated, 1021 are not methylated (66.17%) and 0 are erroneous (0.00%).

>> Class I (CGN):

Pos	M	NM	OK
10	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
19	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
37	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
43	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
47	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
62	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
65	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
68	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
85	2 (40.00%)	3 (60.00%)	5 (100.00%)
101	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
119	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
149	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
155	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
161	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
180	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
244	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
246	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
254	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
272	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
275	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
289	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
297	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
320	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
323	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
337	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
371	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
407	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
413	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
416	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
455	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
467	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
481	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
515	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
527	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
530	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
545	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
574	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
598	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
618	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
642	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
668	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
680	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
691	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
742	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
782	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
805	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
843	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
852	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
867	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
883	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
914	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
963	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
965	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
997	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
1019	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
1052	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
1071	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
1091	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
SUM(AVG)	233 (67.15%)	114 (32.85%)	347 (100.00%)

>> Class II (CHG):

Pos	M	NM	OK
36	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
61	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
77	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
88	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
106	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
124	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
169	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)

179		3 (50.00%)		3 (50.00%)		6 (100.00%)
202		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
211		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
226		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
235		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
243		3 (50.00%)		3 (50.00%)		6 (100.00%)
267		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
288		3 (50.00%)		3 (50.00%)		6 (100.00%)
292		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
300		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
322		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
341		3 (100.00%)		0 (0.00%)		3 (100.00%)
363		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
380		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
399		2 (66.67%)		1 (33.33%)		3 (100.00%)
466		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
522		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
535		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
538		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
549		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
573		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
597		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
608		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
682		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
696		6 (100.00%)		0 (0.00%)		6 (100.00%)
703		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
793		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
797		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
845		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1051		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
1061		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
SUM(AVG)		141 (63.51%)		81 (36.49%)		222 (100.00%)

>> Class III (CHH):

Pos	M	NM	OK
1	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
6	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
13	0 (0.00%)	5 (100.00%)	5 (100.00%)
25	1 (20.00%)	4 (80.00%)	5 (100.00%)
32	1 (20.00%)	4 (80.00%)	5 (100.00%)
35	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
40	1 (20.00%)	4 (80.00%)	5 (100.00%)
49	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
50	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
59	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
60	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
76	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
92	6 (100.00%)	0 (0.00%)	6 (100.00%)
98	0 (0.00%)	6 (100.00%)	6 (100.00%)
99	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
104	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
105	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
110	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
111	4 (66.67%)	2 (33.33%)	6 (100.00%)
128	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
129	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
133	5 (83.33%)	1 (16.67%)	6 (100.00%)
142	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
143	2 (40.00%)	3 (60.00%)	5 (100.00%)
146	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
153	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
158	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
159	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)
164	3 (50.00%)	3 (50.00%)	6 (100.00%)
167	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
168	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
188	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
193	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
197	1 (16.67%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)
198	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)

214		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
220		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
221		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
222		3 (50.00%)		3 (50.00%)		6 (100.00%)
234		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
242		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
251		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
256		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
257		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
259		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
260		4 (66.67%)		2 (33.33%)		6 (100.00%)
261		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
263		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
278		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
279		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
285		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
291		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
317		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
325		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
329		5 (83.33%)		1 (16.67%)		6 (100.00%)
340		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
356		1 (20.00%)		4 (80.00%)		5 (100.00%)
360		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
367		0 (0.00%)		5 (100.00%)		5 (100.00%)
368		1 (33.33%)		2 (66.67%)		3 (100.00%)
374		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
376		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
377		3 (50.00%)		3 (50.00%)		6 (100.00%)
388		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
395		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
397		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
398		0 (0.00%)		3 (100.00%)		3 (100.00%)
409		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
410		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
419		0 (0.00%)		5 (100.00%)		5 (100.00%)
425		2 (40.00%)		3 (60.00%)		5 (100.00%)
464		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
470		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
471		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
476		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
485		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
486		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
487		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
496		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
500		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
501		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
502		3 (50.00%)		3 (50.00%)		6 (100.00%)
504		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
507		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
508		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
509		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
510		2 (33.33%)		4 (66.67%)		6 (100.00%)
512		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
518		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
519		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
532		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
533		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
543		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
557		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
559		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
567		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
568		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
571		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
580		1 (16.67%)		5 (83.33%)		6 (100.00%)
584		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
607		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
621		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
625		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
628		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)
630		0 (0.00%)		6 (100.00%)		6 (100.00%)

631		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
632		1	(16.67%)		5	(83.33%)		6	(100.00%)
634		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
635		1	(16.67%)		5	(83.33%)		6	(100.00%)
649		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
652		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
662		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
663		1	(16.67%)		5	(83.33%)		6	(100.00%)
664		2	(33.33%)		4	(66.67%)		6	(100.00%)
672		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
674		1	(16.67%)		5	(83.33%)		6	(100.00%)
688		2	(33.33%)		4	(66.67%)		6	(100.00%)
695		1	(16.67%)		5	(83.33%)		6	(100.00%)
702		2	(33.33%)		4	(66.67%)		6	(100.00%)
709		1	(16.67%)		5	(83.33%)		6	(100.00%)
717		2	(33.33%)		4	(66.67%)		6	(100.00%)
718		2	(33.33%)		4	(66.67%)		6	(100.00%)
720		2	(33.33%)		4	(66.67%)		6	(100.00%)
725		3	(50.00%)		3	(50.00%)		6	(100.00%)
740		2	(33.33%)		4	(66.67%)		6	(100.00%)
758		1	(16.67%)		5	(83.33%)		6	(100.00%)
760		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
766		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
770		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
779		1	(16.67%)		5	(83.33%)		6	(100.00%)
785		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
850		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
871		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
872		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
879		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
880		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
881		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
895		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
897		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
899		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
919		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
920		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
922		0	(0.00%)		5	(100.00%)		5	(100.00%)
929		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
930		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
931		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
947		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
968		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
969		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
983		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
999		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1015		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1035		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1042		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1047		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1049		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1054		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1056		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1058		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1065		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1066		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1068		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1078		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1087		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
1093		0	(0.00%)		6	(100.00%)		6	(100.00%)
SUM(AVG)		148	(15.20%)		826	(84.80%)		974	(100.00%)

SEQUENCE-ANALYSE RESULT:

Name		C		M		NM		OK
B1		I		40	(68.97%)		18	(31.03%) 58(100.00%)
		II		28	(73.68%)		10	(26.32%) 38(100.00%)
		III		64	(39.51%)		98	(60.49%) 162(100.00%)
		AVG		132	(51.16%)		126	(48.84%) 258(100.00%)
B6		I		33	(56.90%)		25	(43.10%) 58(100.00%)

	II	23 (63.89%)	13 (36.11%)	36 (100.00%)
	III	19 (11.73%)	143 (88.27%)	162 (100.00%)
	AVG	75 (29.30%)	181 (70.70%)	256 (100.00%)
B2	I	42 (72.41%)	16 (27.59%)	58 (100.00%)
	II	22 (61.11%)	14 (38.89%)	36 (100.00%)
	III	18 (11.25%)	142 (88.75%)	160 (100.00%)
	AVG	82 (32.28%)	172 (67.72%)	254 (100.00%)
B3	I	42 (72.41%)	16 (27.59%)	58 (100.00%)
	II	23 (63.89%)	13 (36.11%)	36 (100.00%)
	III	21 (12.88%)	142 (87.12%)	163 (100.00%)
	AVG	86 (33.46%)	171 (66.54%)	257 (100.00%)
B4	I	39 (67.24%)	19 (32.76%)	58 (100.00%)
	II	23 (60.53%)	15 (39.47%)	38 (100.00%)
	III	11 (6.67%)	154 (93.33%)	165 (100.00%)
	AVG	73 (27.97%)	188 (72.03%)	261 (100.00%)
B5	I	37 (64.91%)	20 (35.09%)	57 (100.00%)
	II	22 (57.89%)	16 (42.11%)	38 (100.00%)
	III	15 (9.26%)	147 (90.74%)	162 (100.00%)
	AVG	74 (28.79%)	183 (71.21%)	257 (100.00%)

Name	Class I	Class II	Class III
B1	40 (30.30%)	28 (21.21%)	64 (48.48%)
B6	33 (44.00%)	23 (30.67%)	19 (25.33%)
B2	42 (51.22%)	22 (26.83%)	18 (21.95%)
B3	42 (48.84%)	23 (26.74%)	21 (24.42%)
B4	39 (53.42%)	23 (31.51%)	11 (15.07%)
B5	37 (50.00%)	22 (29.73%)	15 (20.27%)

End of analysis.

REFERENCIAS

- Allis, C. David, y Thomas Jenuwein. 2016. "The molecular hallmarks of epigenetic control". *Nature Reviews Genetics* 17 (8). Nature Publishing Group: 487–500.
- Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389–3402.
- Ávila-Castañeda, Alejandra, Javier A. Juárez-Díaz, Rogelio Rodríguez-Sotres, Carlos E. Bravo-Alberto, Claudia P. Ibarra-Sánchez, Alejandra Zavala-Castillo, Yuridia Cruz-Zamora, León P. Martínez-Castilla, Judith Márquez-Guzmán, y Felipe Cruz-García. 2014. "A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase in vitro". *BMC Plant Biology* 14 (1): 1–16. doi:10.1186/1471-2229-14-147.
- Bailey, T. L., y M. Gribskov. 1998. "Combining Evidence Using P-Values: Application to Sequence Homology Searches". *Bioinformatics* 14 (1). England: 48–54.
- Bird, Adrian. 2007. "Perceptions of epigenetics". *Nature* 447 (7143): 396–98.
- Brien, M O, C Kapfer, G Major, M Laurin, C Bertrand, K Kondo, Y Koyama, y D P Matton. 2002. "Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*", 985–96.
- Busot, Grethel, Bruce McClure, Claudia Patricia Ibarra-Sánchez, Karina Jiménez-Durán, Sonia Vázquez-Santana, y Felipe Cruz-García. 2008. "Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue". *Journal of Experimental Botany* 59 (11): 3187–3201.
- Busot, Grethel Yanet, Bruce McClure, Claudia Patricia Ibarra-Sánchez, Karina Jiménez-Durán, Sonia Vázquez-Santana, y Felipe Cruz-García. 2008. "Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue." *Journal of experimental botany* 59 (11): 3187–3201.
- Coleman, C E, y T Kao. 1992. "The Flanking Regions of Two *Petunia inflata* S Alleles Are Heterogeneous and Contain Repetitive Sequences." *Plant Molecular Biology* 18 (4). Netherlands: 725–37.
- Cruz-García, Felipe, C Hancock, y Bruce McClure. 2003. "S-RNase complexes and pollen rejection". *Journal of Experimental Botany* 54 (380): 123–30.
- Cruz-García, Felipe, C Nathan Hancock, Donggiun Kim, y Bruce McClure. 2005. "Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro." *The Plant journal: for cell and molecular biology* 42 (3): 295–304.
- Cruz-González Zamora, Yuridia. 2018. "Pendiente de Publicación".
- Cubas, Pilar, Coral Vincent, y Enrico Coen. 1999. "An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry". *Nature* 401 (6749): 157–61.
- Dellaporta, S L, y A Calderon-Urrea. 1993. "Sex Determination in Flowering Plants." *The Plant Cell* 5 (10). UNITED STATES: 1241–51.
- Doyle, J J, y J L Doyle. 1990. "Isolation of plant DNA from fresh tissue." *FOCUS* 12: 13–15.
- Du, Jiamu, Lianna Johnson, Steve E. Jacobsen, y Dinshaw Patel. 2015. "DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (9): 519–32.
- Du, Jiamu, Xuehua Zhong, Yana V Bernatavichute, Hume Stroud, Suhua Feng, James A Wohlschlegel, Sriharsa Pradhan, Dinshaw J Patel, E Steven, y England Biolabs. 2013. "Dual Binding of Chromomethylase Domains to H3K9me2-containing Nucleosomes Directs DNA Methylation in Plants". *Cell* 151 (1): 167–80.
- Dwyer, K G, M K Kandasamy, D I Mahosky, J Acciai, B I Kudish, J E Miller, M E Nasrallah, y J B Nasrallah. 1994. "A Superfamily of S Locus-Related Sequences in *Arabidopsis*: Diverse Structures and Expression Patterns." *The Plant Cell* 6 (12). United States: 1829–43.
- Dzelzkalns, V A, M K Thorsness, K G Dwyer, J S Baxter, M A Balent, M E Nasrallah, y J B Nasrallah. 1993. "Distinct Cis-Acting Elements Direct Pistil-Specific and Pollen-Specific Activity of the Brassica S Locus Glycoprotein Gene Promoter." *The Plant Cell* 5 (8). United States: 855–63.

- Eichten, Steven R, Roman Briskine, Jawon Song, Qing Li, Ruth Swanson-wagner, Peter J Hermanson, Amanda J Waters, et al. 2013. "Epigenetic and Genetic Influences on DNA Methylation Variation in Maize Populations". *The Plant Cell* 25 (August): 2783–97.
- Entani, Tetsuyuki, Megumi Iwano, Hiroshi Shiba, Fang-sik Che, Akira Isogai, y Seiji Takayama. 2003. "Comparative analysis of the self-incompatibility (S -) locus region of Prunus mume : identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity", 203–13.
- Fedoroff, Nina V. 2000. "Transposons and genome evolution in plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (13): 7002–7.
- . 2012. "Transposable Elements and Genome Evolution". *Science* 338 (November): 95–99.
- Feng, S., S. J. Cokus, X. Zhang, P.-Y. Chen, M. Bostick, M. G. Goll, J. Hetzel, et al. 2010. "Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (19): 8689–94.
- Fernandez-Pozo, N, N Menda, JD Edwards, S Saha, IY Teclé, SR Strickler, Bombarely A, et al. 2015. "The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding." *Nucleic Acids Research* 43 (Database issue).
- Forestan, Cristian, Silvia Farinati, Riccardo Aiese Cigliano, Alice Lunardon, Walter Sanseverino, y Serena Varotto. 2017. "Maize RNA PolIV affects the expression of genes with nearby TE insertions and has a genome-wide repressive impact on transcription". *BMC Plant Biology* 17 (1). BMC Plant Biology: 1–27.
- Franklin-Tong, Noni V E, y F Chris H Franklin. 2003. "Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms." *Trends in plant science* 8 (12): 598–605.
- Franklin-Tong, V. 2008. *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Berlin: Springer.
- Gao, Dongying, Jinfeng Chen, Mingsheng Chen, Blake C. Meyers, y Scott Jackson. 2012. "A highly conserved, small LTR retrotransposon that preferentially targets genes in grass genomes". *PLoS ONE* 7 (2). doi:10.1371/journal.pone.0032010.
- García-Valencia, Liliana Elizabeth, Carlos Bravo-Alberto, Hen-Ming Wu, Rogelio RodríguezSotres, Alice Cheung, y Felipe Cruz-garcía. 2017. "NaSIPP mediates self-incompatibility in". *Plant Physiology* 01 (55).
- García Valencia, Liliana Elizabeth. 2013. "Interactores protéicos de NaSTEP en el polen/tubo polínico de Nicotiana glauca". Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Gent, Jonathan I., Nathanael A. Ellis, Lin Guo, Alex E. Harkess, Yingyin Yao, Xiaoyu Zhang, y R. Kelly Dawe. 2013. "CHH islands: De novo DNA methylation in near-gene chromatin regulation in maize". *Genome Research* 23 (4): 628–37.
- Goldraij, Ariel, Katsuhiko Kondo, Christopher B. Lee, C. Nathan Hancock, Mayandi Sivaguru, Sonia Vazquez-Santana, Sunran Kim, Thomas E. Phillips, Felipe Cruz-García, y Bruce McClure. 2006. "Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible Nicotiana". *Nature* 439 (7078): 805–10.
- Gruntman, Eyal, Yijun Qi, R. Keith Slotkin, Ted Roeder, Robert A. Martienssen, y Ravi Sachidanandam. 2008. "Kismeth: Analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing". *BMC Bioinformatics* 9 (1): 371.
- Haberer, George, Sara Young, Kirti Bhatotia, Heidrun Gundlach, Christina Raymond, y Fuks Galina. 2009. "Teachers' perceptions of strategy based reading instruction for reading comprehension". *Strategies* 139 (December): 1–42.
- Haimov, Ora, Hadar Sinvani, y Rivka Dikstein. 2015. "Cap-Dependent, Scanning-Free Translation Initiation Mechanisms." *Biochimica et Biophysica Acta* 1849 (11). Netherlands: 1313–18.
- Hancock, C, L Kent, y B McClure. 2005. "The stylar 120kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in Nicotiana". *Plant Journal* 43: 716–23.
- Haque, Nazmul, y Masamichi Nishiguchi. 2011. "Bisulfite Sequencing for Cytosine-Methylation Analysis in Plants". En *RNAi and Plant Gene Function Analysis Methods in Molecular Biology*, 744:187–97.
- Hayatsu, Hikoya. 2008. "Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis — A personal account". *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and biological sciences* 84 (8): 321.330.
- He, Xin-Jian, Taiping Chen, y Jian-Kang Zhu. 2011. "Regulation and function of DNA methylation in plants and animals". *Cell Research* 21 (3). Nature Publishing Group: 442–65.
- Hetzl, Jennifer, Andrea M. Foerster, Günther Raidl, y Ortrun Mittelsten Scheid. 2007. "CyMATE: A new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing". *Plant Journal* 51 (3): 526–36.
- Hiscock, S J, y S M Mcinnis. 2003. "The Diversity of Self-Incompatibility Systems in Flowering Plants". *Plant Biology* 5 (1): 23–32.

- Hiscock, Simon, y U Kües. 1999. "Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plant and fungi". *International Review of Cytology* 193: 165–295.
- Hua, Zhihua, y Teh-hui Kao. 2006. "Identification and Characterization of Components of a Putative Petunia S-Locus F-Box-Containing E3 Ligase Complex Involved in S-RNase-Based Self-Incompatibility". *The Plant Cell* 18 (10): 2531–53.
- Huang, Shihshieh, Hyun-sook Lee, Balasulojini Karunanandaa, y Teh-hui Kao. 1994. "Ribonuclease Activity of Petunia inflata S Proteins s Essential for Rejection of Self-Pollen". *The Plant cell* 6 (July): 1021–28.
- Hubley, Robert, Robert D. Finn, Jody Clements, Sean R. Eddy, Thomas A. Jones, Weidong Bao, Arian F.A. Smit, y Travis J. Wheeler. 2016. "The Dfam database of repetitive DNA families". *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D81–89.
- International Rice Genome Sequencing. 2005. "The map-based sequence of the rice genome". *Nature* 436 (agosto). Nature Publishing Group: 793.
- Jimenez-Duran, K., B. McClure, F. Garcia-Campusano, R. Rodriguez-Sotres, J. Cisneros, G. Busot, y F. Cruz-Garcia. 2013. "NaStEP: A Proteinase Inhibitor Essential to Self-Incompatibility and a Positive Regulator of HT-B Stability in Nicotiana glauca Pollen Tubes". *Plant Physiology* 161 (1): 97–107.
- Jin, Jinpu, Kun He, Xing Tang, Zhe Li, Le Lv, Yi Zhao, Jingchu Luo, y Ge Gao. 2015. "An Arabidopsis Transcriptional Regulatory Map Reveals Distinct Functional and Evolutionary Features of Novel Transcription Factors." *Molecular Biology and Evolution* 32 (7). United States: 1767–73.
- Jin, Jinpu, Feng Tian, De-Chang Yang, Yu-Qi Meng, Lei Kong, Jingchu Luo, y Ge Gao. 2017. "PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants". *Nucleic Acids Research* 45 (Database issue). Oxford University Press: D1040–45.
- Johnson, Lianna M, Magnolia Bostick, Xiaoyu Zhang, Edward Kraft, Ian Henderson, Judy Callis, y Steven E Jacobsen. 2007. "The SRA Methyl-Cytosine-Binding Domain Links DNA and Histone Methylation". *Current Biology*, 379–84.
- Juárez-Díaz, Javier Andrés, Bruce McClure, Sonia Vázquez-Santana, Arturo Guevara-García, Patricia León-Mejía, Judith Márquez-Guzmán, y Felipe Cruz-García. 2006. "A novel thioredoxin h is secreted in Nicotiana glauca and reduces S-RNase in vitro". *Journal of Biological Chemistry* 281 (6): 3418–24. doi:10.1074/jbc.M511687200.
- Juven-Gershon, Tamar, y James Kadonaga. 2010. "Regulation of Gene Expression via the Core Promoter and the Basal Transcriptional Machinery". *Developmental Biology* 15 (2): 225–29.
- Kalvari, Ioanna, Joanna Argasinska, Natalia Quinones-Olvera, Eric P Nawrocki, Elena Rivas, Sean R Eddy, Alex Bateman, Robert D Finn, y Anton I Petrov. 2018. "Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families". *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D335–42. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx1038>.
- Kaufmann, H, F Salamini, y R D Thompson. 1991. "Sequence Variability and Gene Structure at the Self-Incompatibility Locus of Solanum tuberosum." *Molecular & General Genetics : MGG* 226 (3). Germany: 457–66.
- Kawashima, Tomokazu, y Frédéric Berger. 2014. "Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction". *Nature Reviews Genetics* 15 (9). Nature Publishing Group: 613–24.
- Kraft, Edward, Magnolia Bostick, Steven E. Jacobsen, y Judy Callis. 2008. "ORTH/VIM proteins that regulate DNA methylation are functional ubiquitin E3 ligases". *Plant Journal* 45 (6): 788–802.
- Laboratories Clontech. 2014. "Universal GenomeWalker™ 2.0".
- Law, Julie A., y Steven E. Jacobsen. 2010. "Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals". *Nature Reviews Genetics* 11 (3). Nature Publishing Group: 204–20.
- Lee, H, Shihshieh Huang, y Teh-hui Kao. 1994. "S proteins control rejection of incompatible pollen in Petunia inflata". *Nature* 367: 560–63.
- Li, Wenbo, Dimple Notani, y Michael G. Rosenfeld. 2016. "Enhancers as non-coding RNA transcription units: Recent insights and future perspectives". *Nature Reviews Genetics* 17 (4). Nature Publishing Group: 207–23.
- Lind, J, A Bacic, A Clarke, y M Anderson. 1994a. "A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins". *The Plant Journal* 6 (4): 491.
- Lind, J, A Bacic, A Clarke, y Marilyn A Anderson. 1994b. "A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins". *the Plant Cell Online* 6 (4): 491–502.
- Lind, J, I Böning, A Clarke, y M Anderson. 1996. "A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of Nicotiana glauca in vivo , Sex . A

style-specific 120-kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo". *Sexual Plant Reproduction* 9: 75–86.

- Lindroth, A M, X Cao, J P Jackson, D Zilberman, C M McCallum, S Henikoff, y S E Jacobsen. 2001. "Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for Maintenance of CpXpG Methylation." *Science (New York, N.Y.)* 292 (5524). United States: 2077–80.
- Llorens, C., R. Futami, L. Covelli, L. Dominguez-Escriba, J.M. Viu, D. Tamarit, M. Aguilar-Rodriguez, J. Vicente-Ripolles, et al. 2011. "The Gypsy Database (GyDB) of Mobile Genetic Elements: Release 2.0". *Nucleic Acids Research* 39.
- Matzke, Marjori A., Tatsuo Kanno, y Antonius J.M. Matzke. 2015. "RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants". *Annual Review of Plant Biology* 66 (1): 243–67. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114633.
- Matzke, Marjori A., y Rebecca A. Mosher. 2014. "RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity". *Nature Reviews Genetics* 15 (6): 394–408.
- McClure, B, F Cruz-García, B Beecher, y W Sulaman. 2000. "Factors affecting inter and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*". *Annals of Botany* 85 (S1): 113–23.
- McClure, B, J Gray, Ma Anderson, y A Clarke. 1990. "Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA". *Nature* 347: 757–60.
- McClure, B, V Haring, P Ebert, M Anderson, R Simpson, F Sakiyama, y A Clarke. 1989. "Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases". *Nature* 342 (6252): 955–57.
- McClure, Bruce A., y Veronica Franklin-Tong. 2006. "Gametophytic self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in 'self' pollen tube inhibition". *Planta* 224 (2): 233–45.
- McClure, Bruce, Beiwan Mou, Stefano Canevascini, y Robert Bernatzky. 1999. "A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23): 13548–53.
- Molecular, European, Wellcome Trust Genome, Oxford Road, Wellcome Trust, Genome Campus, San Antonio, Sandia National Laboratories, et al. 2017. "RNACentral: a comprehensive database of non-coding RNA sequences". *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D128–34. doi:10.1093/nar/gkw1008.
- Moon, Jennifer, Geraint Parry, y Mark Estelle. 2004. "The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Plant Development" 16 (December): 3181–95.
- Murfett, J, T Atherton, B Mou, C Gassert, y B McClure. 1994. "S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection". *Nature* 367: 563–66.
- Nájera-Torres, Edgar. 2018. "Pendiente de Publicación".
- Nettancourt, De. 2001. *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Second Edi. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Niklas, K. J. 1997. *The evolutionary biology of plants*. Illinois: University of Chicago.
- Piégu, Benoît, Solenne Bire, Peter Arensburger, y Yves Bigot. 2015. "A survey of transposable element classification systems - A call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity". *Molecular Phylogenetics and Evolution* 86: 90–109.
- Porto, Milena Silva, Morganna Pollyne Nóbrega Pinheiro, Vandré Guevara Lyra Batista, y Liziane Maria De Lima. 2014. "Plant promoters: An approach of structure and function". *Molecular Biotechnology* 56 (1): 38–49.
- Pray, Leslie. 2008. "Transposons, or Jumping Genes: Not Junk DNA?" *Nature Education* 1 (1): 32.
- Richards, Eric J. 2006. "Inherited epigenetic variation - Revisiting soft inheritance". *Nature Reviews Genetics* 7 (5): 395–401.
- Ronemus, M J, M Galbiati, C Ticknor, J Chen, y S L Dellaporta. 1996. "Demethylation-Induced Developmental Pleiotropy in *Arabidopsis*." *Science (New York, N.Y.)* 273 (5275). United States: 654–57.
- Saba-el-Leil, M K, S Rivard, D Morse, y M Cappadocia. 1994. "The S11 and S13 Self Incompatibility Alleles in *Solanum chacoense* Bitt. Are Remarkably Similar." *Plant Molecular Biology* 24 (4). Netherlands: 571–83.
- Sassa, Hidenori, Koichiro Ushijima, y Hisashi Hirano. 2002. "A pistil-specific thaumatin / PR5-like protein gene of Japanese pear (*Pyrus serotina*) : sequence and promoter activity of the 5' region in transgenic tobacco". *Plant Molecular Biology*, núm. 1999: 371–77.
- Shahmuradov, Ilham A, Ramzan Kh. Umarov, y Victor V Solovyev. 2017. "TSSPlant: a new tool for prediction of plant Pol II promoters". *Nucleic Acids Research* 45 (8): e65–e65.
- Shen, Jianqiang, Juhong Liu, Kabin Xie, Feng Xing, Fang Xiong, Jinghua Xiao, Xianghua Li, y Lizhong Xiong. 2017. "Translational repression

- by a miniature inverted-repeat transposable element in the 3' untranslated region". *Nature Communications* 8. Nature Publishing Group: 1–10.
- Shiba, Hiroshi, Megumi Iwano, Tetsuyuki Entani, Kyoko Ishimoto, Hiroko Shimosato, Fang-Sik Che, Yoko Satta, et al. 2002. "The Dominance of Alleles Controlling Self-Incompatibility in Brassica Pollen Is Regulated at the RNA Level". *The Plant Cell* 14 (2). American Society of Plant Biologists: 491–504.
- Shiba, Hiroshi, Tomohiro Kakizaki, Megumi Iwano, Yoshiaki Tarutani, Masao Watanabe, Akira Isogai, y Seiji Takayama. 2006. "Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation". *Nature Genetics* 38 (3): 297–99.
- Sigman, Meredith J., y R. Keith Slotkin. 2016. "The First Rule of Plant Transposable Element Silencing: Location, Location, Location". *The Plant Cell* 28 (2): 304–13.
- Sijacic, Paja, Xi Wang, Andrea L Skirpan, Yan Wang, Peter E Dowd, Andrew G McCubbin, Shihshieh Huang, y Teh-hui Kao. 2004. "Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility". *Nature* 429 (6989): 302–5.
- Smale, Stephen T, y James T Kadonaga. 2003. "The RNA polymerase II core promoter." *Annual review of biochemistry* 72: 449–79.
- Sun, Hai Yue, Hong Yan Dai, Gui Ling Zhao, Yue Ma, Chun Qing Ou, He Li, Lin Guang Li, y Zhi Hong Zhang. 2008. "Genome-wide characterization of long terminal repeat-retrotransposons in apple reveals the differences in heterogeneity and copy number between Ty1-copia and Ty3-gypsy retrotransposons". *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (9): 1130–39.
- Takayama, Seiji, y Akira Isogai. 2005. "Self-Incompatibility in Plants". *Annual Review of Plant Biology* 56 (1): 467–89.
- Tarutani, Yoshiaki, Hiroshi Shiba, Megumi Iwano, Tomohiro Kakizaki, Go Suzuki, Masao Watanabe, Akira Isogai, y Seiji Takayama. 2010. "Trans-acting small RNA determines dominance relationships in Brassica self-incompatibility". *Nature* 466 (7309). Nature Publishing Group: 983–86.
- The Arabidopsis Genome. 2000. "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*". *Nature* 408 (diciembre). Macmillan Magazines Ltd.: 796. <https://doi.org/10.1038/35048692>.
- Thermo Scientific. 2015. "ThermoScientific: CloneJET PCR Cloning Kit". *Manual*.
- Torres-Rodríguez, María Daniela. 2018. "Pendiente de Publicación".
- Tran, Robert K., Jorja Henikoff, Daniel Zilberman, Renata Ditt, Steve E. Jacobsen, y Steven Henikoff. 2005. "DNA Methylation Profiling Identifies CG Methylation Clusters in Arabidopsis Genes". *Current Biology* 15: 154–59.
- Vukich, Marco, Tommaso Giordani, Lucia Natali, y Andrea Cavallini. 2009. "Copia and Gypsy retrotransposons activity in sunflower (*Helianthus annuus* L.)". *BMC Plant Biology* 9: 1–12.
- Wang, Xiaowu, y Chittaranjan Kole. 2015. *The Brassica rapa Genome*. Springer.
- Weber, Michael, y Dirk Schübeler. 2007. "Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark". *Current Opinion in Cell Biology* 19 (3): 273–80.
- Wierzbicki, Andrzej T, Ross Cocklin, Anoop Mayampurath, Ryan Lister, M Jordan Rowley, Brian D Gregory, Joseph R Ecker, Haixu Tang, y Craig S Pikaard. 2012. "Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci , Pol IV-dependent siRNAs , and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome", 1825–36.
- Wittkopp, Patricia J., y Gizem Kalay. 2011. "Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence". *Nature Reviews Genetics* 13 (January): 59–70.
- Xu, Shuqing, Thomas Brockmüller, Aura Navarro-Quezada, Heiner Kuhl, Klaus Gase, Zhihao Ling, Wenwu Zhou, et al. 2017. "Wild tobacco genomes reveal the evolution of nicotine biosynthesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (23): 6133–38.
- Yamamoto, Yoshiharu Y, Hiroyuki Ichida, Minami Matsui, Junichi Obokata, Tetsuya Sakurai, Masakazu Satou, Motoaki Seki, Kazuo Shinozaki, y Tomoko Abe. 2007. "Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences." *BMC genomics* 8: 67.
- Zhang, Xiaoyu, Junshi Yazaki, Ambika Sundaresan, Shawn Cokus, Simon W.L. Chan, Huaming Chen, Ian R. Henderson, et al. 2006. "Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis". *Cell* 126 (6): 1189–1201.
- Zhu, J.-K. 2009. "Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases". *Annual review of genetics* 43: 143–66.