



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión de la SC10-RNasa en plantas
transgénicas de *Nicotiana tabacum***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MATÍAS MEDINA TANCO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FELIPE CRUZ GARCÍA

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Llegar al final de mi carrera y realizar esta tesis no ha sido resultado de un simple trabajo individual, si no de un enorme esfuerzo colaborativo.

Agradezco profundamente a mi familia: a mi mamá, a mi papá y a mi hermano por el apoyo incondicional y la compañía constante que me han dado a lo largo de los años.

También agradezco profundamente a mi *alma mater*, la UNAM; y a su Facultad de Ciencias por las grandes oportunidades que me dieron.

Agradezco a todos los maestros a lo largo de mi carrera que me inspiraron y guiaron a lo largo de mi desarrollo personal y académico. Gracias a ellos pude volverme la persona que soy hoy.

Agradezco a todo el equipo del laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García, a quién agradezco por la oportunidad de trabajar en el laboratorio y por su guía y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Agradezco profundamente a la Dra. Yuridia Cruz González Zamora por toda la paciencia y la ayuda que me proporcionó como asesora técnica.

También agradezco toda la ayuda que recibí de mis compañeros de laboratorio Renata Salcedo Sánchez, Édgar Nájera Torres y Liliana Benítez.

Adicionalmente, agradezco enormemente al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, bajo la responsabilidad de la M. en C. Teresa Jesús Olivera Flores, y a la Unidad de Biología

Molecular en el Instituto de Fisiología Celular, bajo la responsabilidad de la Dra. Laura Ongay-Larios.

Sin la ayuda de estas personas no me habría sido posible realizar este trabajo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. SISTEMAS DE AUTOINCOMPATIBILIDAD	10
1.2. EL LOCUS <i>S</i> , LAS <i>S</i> -RNAs Y SLF	12
1.3. LOS GENES MODIFICADORES	14
1.4. LOS PRINCIPALES MODELOS PROPUESTOS PARA EL SISTEMA DE AUTOINCOMPATIBILIDAD BASADO EN <i>S</i> -RNAs	16
1.5. INCOMPATIBILIDAD INTERESPECÍFICA Y LA REGLA DE UNILATERALIDAD	17
1.6. MECANISMOS DE RECHAZO DEL POLEN PROPUESTOS	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. OBJETIVOS PARTICULARES	21
5. METODOLOGÍA	22
5.1. PLÁSMIDOS UTILIZADOS	22
5.2. DISEÑO Y SÍNTESIS DE CONSTRUCCIONES	23
5.3. TRANSFORMACIÓN DE CONSTRUCCIONES EN PUC57 A CÉLULAS COMPETENTES XL-10 GOLD	24
5.4. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	24
5.5. ENSAYO DE RESTRICCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES EN PUC57	24
5.6. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AGREGAR SITIOS DE RESTRICCIÓN	25
5.7. GENERACIÓN POR PCR DE LAS CONSTRUCCIONES CON LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN <i>SacI</i> Y <i>XmaI</i>	25
5.8. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA AMPLIFICACIÓN EN pJET1.2/BLUNT	26
5.9. CLONACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES AL VECTOR PK2GW7	26
5.10. TRANSFORMACIÓN DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
5.11. SECUENCIACIÓN	27
5.12. ANÁLISIS DE SECUENCIAS	28

5.14. TRANSFORMACIÓN DE HOJAS DE <i>NICOTIANA TABACUM</i>	29
5.15. CULTIVO DE TEJIDOS	30
6. RESULTADOS.....	31
6.1. CONSTRUCCIONES DISEÑADAS	31
6.2. PRESENCIA DE LAS CONSTRUCCIONES EN PUC57	31
6.3. PRESENCIA DE LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN DE <i>SACI</i> Y <i>XMAI</i>	32
6.4. CLONACIÓN AL VECTOR PK2GW7	33
6.5. PRESENCIA DE LAS CONSTRUCCIONES EN <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	35
6.6. TRANSFORMACIÓN DE HOJAS DE <i>NICOTIANA TABACUM</i> Y CULTIVO DE TEJIDOS.....	37
7. DISCUSIÓN.....	39
8. CONCLUSIÓN	42
9. PERSPECTIVAS.....	42
10. REFERENCIAS	43
11. ANEXOS.....	55
ANEXO 1. SECUENCIA DE <i>CHIP</i>	55
ANEXO 2. SECUENCIA DE <i>MPLUM</i>	55
ANEXO 3. SECUENCIA DEL PÉPTIDO SEÑAL DE LA <i>Sc10</i> - <i>RNASa</i>	56
ANEXO 4. SECUENCIA DE LA <i>Sc10</i> - <i>RNASa</i>	56
ANEXO 5. SECUENCIA DE <i>CHIP_MPLUM_Sc10</i>	56
ANEXO 6. SECUENCIA DE <i>CHIP_Sc10</i>	58
ANEXO 7. ALINEAMIENTO DE <i>CHIP</i> Y <i>CHIP_MPLUM_Sc10</i> EN PK2GW7 UTILIZANDO EL OLIGONUCLEÓTIDO PK2 F.....	60
ANEXO 8. ALINEAMIENTO DE <i>Sc10</i> Y <i>CHIP_MPLUM_Sc10</i> EN PK2GW7 UTILIZANDO EL OLIGONUCLEÓTIDO PK2 R	62
ANEXO 9. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE <i>MPLUM</i> Y <i>CHIP_MPLUM_Sc10</i> EN PK2GW7 UTILIZANDO EL OLIGONUCLEÓTIDO SC10 F	64
ANEXO 10. ALINEAMIENTO DE <i>Sc10</i> Y <i>CHIP_MPLUM_Sc10</i> EN PK2GW7 UTILIZANDO EL OLIGONUCLEÓTIDO SC10 F.....	66
ANEXO 11. ALINEAMIENTO DE <i>CHIP</i> Y <i>CHIP_Sc10</i> EN PK2GW7 UTILIZANDO EL OLIGONUCLEÓTIDO PK2 F.....	68
ANEXO 12. ALINEAMIENTO DE <i>Sc10</i> Y <i>CHIP_Sc10</i> EN PK2GW7 UTILIZANDO EL OLIGONUCLEÓTIDO PK2 R.....	70
ANEXO 13. ALINEAMIENTO DE <i>Sc10</i> Y <i>CHIP_Sc10</i> EN PK2GW7 UTILIZANDO EL OLIGONUCLEÓTIDO SC10 F.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una polinización compatible y de polinizaciones incompatibles en un sistema gametofítico y uno esporofítico	11
Figura 2. Esquema simplificado del modelo colaborativo y del modelo de compartimentalización	17
Figura 3. Mapa del vector pJet1.2/blunt.....	22
Figura 4. Mapa del vector pK2GW7	23
Figura 5. Diagrama a escala de las construcciones diseñadas	31
Figura 6. Análisis de restricción con <i>EcoRI</i> y <i>NheI</i> para confirmar la presencia de las construcciones	32
Figura 7. Electroforesis de los productos de la PCR de las construcciones en pUC57 con pK2 F y pK2 R.....	33
Figura 8. Restricción con <i>SacI</i> y <i>XmaI</i> de ChiP_ <i>Sc10</i> y del vector pK2GW7 para su posterior ligación	34
Figura 9. Diagrama de la secuenciación de las construcciones con los puntos de unión de los oligonucleótidos pK2 F, pK2 R y SC10 F	35
Figura 10. PCR de colonia con pK2 F y pK2 R para confirmar la presencia de ChiP_ <i>Sc10</i> en pK2GW7 en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
Figura 11. PCR de colonia con pK2 F y pK2 R para confirmar la presencia de ChiP_ <i>mPlum_Sc10</i> en pK2GW7 en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
Figura 12. Explantes de hoja de <i>Nicotiana tabacum</i> transformadas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
Figura 13. Explantes de <i>Nicotiana tabacum</i> en cultivo de tejidos	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones empleadas para la PCR de las construcciones con los oligonucleótidos pK2 F y pK2 R para agregar los sitios de restricción de <i>SacI</i> y <i>XmaI</i>	26
Tabla 2. Condiciones empleadas para la PCR de las colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas con las construcciones.....	29

RESUMEN

Muchas especies de angiospermas han desarrollado diversos sistemas de autoincompatibilidad que sirven como mecanismos para prevenir cruzas genéticamente cercanas, aumentando la variabilidad genética en la población.

En muchos casos, incluyendo el de la familia Solanaceae, la autoincompatibilidad es controlada por el locus polimórfico *S*. Este locus codifica una determinante femenina (la *S*-RNasa, una ribonucleasa con expresión en el estigma y estilo) y una determinante masculina (SLF, una proteína de caja F con expresión en el polen). En la polinización, la *S*-RNasa se incorpora al tubo polínico. Mientras que en las cruzas compatibles la *S*-RNasa es reconocida y neutralizada (existen distintos modelos para explicar cómo ocurre esto), en el caso de las cruzas incompatibles la *S*-RNasa escapa el reconocimiento y degrada el RNA del citoplasma del tubo polínico. Aparte de esto, en especies como *Nicotiana glauca* se han identificado genes modificadores que no están ligados al locus *S* pero que son necesarios para la autoincompatibilidad, como *HT-B*, *120K*, *NaStEP*, *NaTrxh* y *NaSIPP*. Adicionalmente, se ha descubierto que las *S*-RNasas, SLF y los genes modificadores también pueden participar en el rechazo interespecífico del polen, recalando la complejidad del proceso.

Los estudios del rechazo intra e interespecífico del polen sugieren que existen al menos 3 vías: una dependiente de *S*-RNasa, SLF y de los genes modificadores; otra dependiente únicamente de los genes modificadores; y una tercera vía en la cual la expresión únicamente de la *S*-RNasa es suficiente para provocar el rechazo del polen. Las primeras dos vías se están estudiando activamente, pero la tercera, que se ha observado en *Nicotiana glauca* aún no.

Uno de los objetivos del laboratorio es aclarar las bases celulares y moleculares de esta vía del rechazo del polen dependiente únicamente de *S*-RNasa. En este trabajo se generaron líneas transgénicas de *N. glauca* que expresen a la *S*_{C10}-RNasa para que sirvan como material para estudios futuros sobre esta vía. Para esto se diseñaron dos construcciones: una con la *S*_{C10}-RNasa y otra con la *S*_{C10}-RNasa fusionada a la proteína reportera fluorescente mPlum. Las construcciones se clonaron en un vector binario y se transformaron a explantes de *N. glauca* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Los explantes se cultivaron en medio selectivo y se

obtuvieron callos resistentes con el propósito de generar plantas de *N. tabacum* que expresen a la S_{C10}-RNasa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemas de autoincompatibilidad

Aproximadamente, el 40% de las angiospermas presentan sistemas de autoincompatibilidad (Zhao *et al.*, 2022). La autoincompatibilidad se define como la incapacidad de plantas hermafroditas fértiles de producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 2001) y sirve como un mecanismo que previene cruzas genéticamente cercanas y promueve cruzas más distantes (Cornish *et al.*, 1988; Matton *et al.*, 1994; Silva y Goring, 2001; Kao y Tsukamoto, 2004).

La autoincompatibilidad se ha perdido y ganado múltiples veces a lo largo de la evolución de las angiospermas (Zhao *et al.*, 2022) y se ha propuesto que fue el sistema reproductivo ancestral en las angiospermas, con la evolución posterior de distintos sistemas en diferentes linajes de angiospermas (Allen y Hiscock, 2008). Las barreras reproductivas en las interacciones entre el polen y el pistilo pueden ser sistemas activos de rechazo del polen o por una incompatibilidad en factores esenciales masculinos y femeninos, y las distintas barreras reproductivas a la polinización pueden actuar en distintos puntos a lo largo del pistilo: desde el estigma en el momento en el que se deposita el polen, en el tejido de transmisión del estilo y hasta los óvulos (Broz y Bedinger, 2021).

La primera manera en la que se pueden clasificar estos sistemas es: a) la autoincompatibilidad heteromórfica, en la cual una planta presenta de dos a tres morfologías distintas de flor y las cruzas entre flores de la misma morfología son incompatibles; y b) la autoincompatibilidad homomórfica, en la cual solo se presenta una morfología de flor (Stevens y Murray, 1982; Kao y McCubbin, 1996; Kao y Tsukamoto 2004; Matsui y Yasui, 2020).

El sistema homomórfico se puede subdividir adicionalmente en autoincompatibilidad gametofítica y esporofítica (Cornish *et al.*, 1988; Kao y McCubbin, 1996; Dodds *et al.*, 1996).

En la autoincompatibilidad esporofítica (Figura 1) el fenotipo de incompatibilidad del polen está controlado por el genotipo diploide de su antera parental (Silva y Goring, 2001; Hiscock y Tabah, 2003). El sistema en Brassicaceae es el principal sistema esporofítico que se ha

estudiado extensivamente al nivel molecular (Kao y McCubbin, 1996; Kao y Tsukamoto, 2004; Takayama y Isogai, 2005; Sehgal y Singh, 2018). Los sistemas de autoincompatibilidad heteromórficos también están bajo un control genético de este tipo (Hiscock y Tabah, 2003; Narayanapur *et al.*, 2018).

En la autoincompatibilidad gametofítica (Figura 1) el fenotipo de autoincompatibilidad del polen está determinado por su propio genoma haploide (Silva y Goring, 2001; Hiscock y Tabah, 2003). Este es el sistema de autoincompatibilidad más ampliamente distribuido, presentándose en Solanaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Fabaceae, Papaveraceae y Poaceae, entre otros (Franklin-Tong y Franklin, 2003). Las especies del género *Nicotiana* presentan sistemas de autoincompatibilidad de tipo gametofítico (de Nettancourt, 1997).

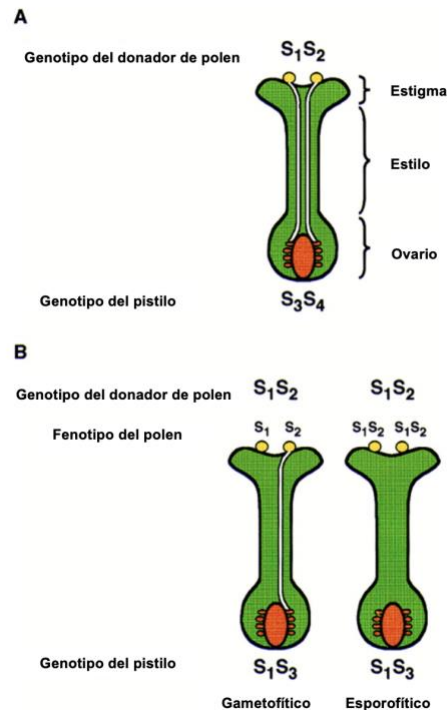


Figura 1. Esquema de una polinización compatible (A) y de polinizaciones incompatibles en un sistema gametofítico y uno esporofítico (B). Modificada de Dodds *et al.* (1996)

1.2. El locus S, las S-RNAsas y SLF

En muchas especies la autoincompatibilidad está controlada por un solo locus polimórfico conocido como el locus S (Anderson *et al.*, 1986; Takayama y Isogai, 2005). Este locus contiene dos genes fuertemente ligados que controlan la especificidad de la autoincompatibilidad: uno codifica la determinante femenina con expresión en el pistilo y el otro la determinante masculina con expresión en el polen (de Nettancourt, 2001; McClure, 2004). En los sistemas de autoincompatibilidad gametofítica, el rechazo ocurre cuando el polen haploide tiene un alelo S idéntico a al menos uno de los alelos S del tejido diploide del estilo (Murfett *et al.*, 1992). Se han identificado dos mecanismos distintos de autoincompatibilidad gametofítica: uno en Papaveraceae, en el cual la determinante femenina induce una cascada de señalización dependiente de Ca^{2+} que resulta en la muerte celular programada del polen incompatible (Franklin-Tong *et al.*, 1993; Franklin-Tong *et al.*, 1995; Thomas y Franklin-Tong, 2004; McClure y Franklin-Tong, 2006); y el otro, es el sistema del tipo de Solanaceae basado en ribonucleasas y proteínas SLF (Silva y Goring, 2001; Kao y Tsukamoto, 2004; Takayama y Isogai, 2005). Este último sistema es el más ampliamente distribuido en las angiospermas (Zhao *et al.*, 2022) y se ha reportado en Solanaceae (Meng *et al.*, 2011; McClure *et al.*, 2011), Rosaceae (Sassa *et al.*, 2010), Plantaginaceae (Hua *et al.*, 2008) y Rutaceae (Liang *et al.*, 2020).

En el caso de la determinante femenina S en el sistema de Solanaceae, los alelos del locus S codifican distintas ribonucleasas conocidas como S-RNAsas, las cuales se expresan y secretan hacia la matriz extracelular del estilo (McCubbin y Kao, 1996; McCubbin y Kao, 1999; Murfett *et al.*, 1996). La concentración de éstas en el estigma aumenta durante el desarrollo de la flor (Bredemejer y Blaas, 1981) y también varía considerablemente dependiendo del alelo S involucrado (Jahnen *et al.*, 1989). Las S-RNAsas son glicoproteínas de naturaleza muy básica (Jahnen *et al.*, 1989) que poseen una estructura con cinco regiones altamente conservadas y dos regiones hipervariables (Ioerger *et al.*, 1991). Estas regiones hipervariables controlan la especificidad alélica (Matton *et al.*, 1997). Al analizar las estructuras primarias de las S-RNAsas se ha visto que pertenecen a una familia que incluye otras RNAsas de plantas, hongos (como la RNasa T2 de *Aspergillus oryzae*) y bacterias (como la RNasal de *E. coli*) (Taylor y Greene, 1991; Beecher *et al.*, 1997). Se ha sugerido un origen evolutivo único para los sistemas de

autoincompatibilidad gametofítica basados en S-RNasa de hace unos 120 millones de años (Vieira *et al.*, 2008).

Como otras especies *Nicotiana glauca* también presenta autoincompatibilidad gametofítica controlada por un locus *S* multialélico (Matton *et al.*, 1995; de Nettancourt, 1997) y estos alelos presentan regiones conservadas e hipervariables bien definidas (Anderson *et al.*, 1989). Se ha demostrado en esta especie que las glicoproteínas producidas por el gen *S* son ribonucleasas y representan la mayor parte de la actividad de ribonucleasas en el estilo, una actividad que es 100 a 1000 veces mayor que la que se presenta en especies autocompatibles relacionadas como *N. tabacum* (McClure *et al.*, 1989). La expresión de la S-RNasa en *N. glauca* se ha correlacionado bien con la expresión de la incompatibilidad en el estigma y tejido secretor del pistilo (Cornish *et al.*, 1987).

Se ha considerado que las S-RNasas y su actividad de ribonucleasa son esenciales para el rechazo de polen alelo *S* específico (Huang *et al.*, 1994; Royo *et al.*, 1994); aunque se ha demostrado que la actividad de ribonucleasas por sí sola no es suficiente para provocar el rechazo del polen y que, por lo tanto, las S-RNasas deben presentar otras adaptaciones especiales para interactuar con el sistema de reconocimiento y rechazo del polen (Beecher *et al.*, 1997).

Las S-RNasas entran al citoplasma de tubos polínicos *in vitro* e inhiben la biosíntesis de proteínas (Gray *et al.*, 1991) y se ha observado que después de una polinización incompatible el RNA de los tubos polínicos se degrada (McClure *et al.*, 1990). Esto ha llevado a la propuesta de que las S-RNasas actúan como citotoxinas alelo *S* específicas que atacan el aparato de síntesis de proteínas en los tubos polínicos (McClure *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994; Kao y McCubbin, 1996). También se ha demostrado *in vivo* que en los sistemas de autoincompatibilidad gametofíticos, las S-RNasas pasan del estilo al citoplasma del tubo polínico, sea compatible o no (Luu *et al.*, 2000) y que la S-RNasa es incorporada a un compartimento vacuolar en los tubos polínicos (Goldraij *et al.*, 2006).

En cuanto a la determinante masculina, el locus *S* contiene al gen *SLF* (*S*-locus *F*-box) que se expresa de manera específica en el polen y que presenta diversidad específica al haplotipo *S* (Lai *et al.*, 2002; Entani *et al.*, 2003, Ushijima *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2004). La caja *F* (*F*-box) es

una región que funciona como sitio para interacciones entre proteínas y fue identificada por primera vez en componentes que se unen a sustratos para realizar la proteólisis mediada por ubiquitina, aunque también puede llevar a cabo otras funciones (Kipreos y Pagano, 2000).

La demostración de que los genes *SLF* codifican para la determinante de autoincompatibilidad del polen se realizó por primera vez en *Petunia inflata* (Sijacic *et al.*, 2004). En el mecanismo de esta especie está involucrado un solo gen de S-RNasa con una alta diversidad alélica y múltiples genes *SLF*, cada uno con una baja diversidad alélica (Wang y Kao, 2012). Otras especies de plantas autoincompatibles en Plantaginaceae (Zhou *et al.*, 2003), Rosaceae (Entani *et al.*, 2003; Hassa *et al.*, 2007; Minamikawa *et al.*, 2010) y Solanaceae (Wheeler y Newbigin, 2007; Williams *et al.*, 2014a; Bombarely *et al.*, 2016) también presentan un solo gen para S-RNasa expresada en el estilo y múltiples genes *SLF* en el locus *S* expresadas en el polen. En el caso de *Nicotiana glauca* esta presenta 10 genes relacionados a *SLF* ligados al locus *S* (Wheeler y Newbigin, 2007).

En estos sistemas los genes *SLF* detoxifican S-RNasas compatibles pero son incapaces de detoxificar S-RNasas incompatibles (Zhao *et al.*, 2022). Se ha observado que las proteínas SLF en *P. inflata* tienen una interacción más fuerte con las S-RNasas no propias que con las propias (Hua *et al.*, 2007) y se ha observado que en los grupos de genes *SLF* involucrados en la especificidad del polen el producto de cada gen solo interactúa con un subconjunto de S-RNasas no propias (Kubo *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2014b). Adicionalmente, se ha reportado que la duplicación de distintos alelos de *SLF* en el polen llevan a la pérdida de autoincompatibilidad, un fenómeno conocido como interacción competitiva (Entani *et al.*, 1999; Qiao *et al.*, 2004a; Tsukamoto *et al.*, 2005). La observación de que en *Antirrhinum* las S-RNasas compatibles sufren niveles elevados de ubiquitinación comparado con las incompatibles también ha llevado a modelos que proponen que en el rechazo del polen hay un mecanismo mediado por SLF que lleva a la ubiquitinación y degradación de las S-RNasas, neutralizando su citotoxicidad (Qiao *et al.*, 2004b; Hua y Kao, 2006).

1.3. Los genes modificadores

Aparte de las S-RNasas y SLF existen otros factores codificados por los genes modificadores que son esenciales para la autoincompatibilidad. Ejemplos de genes modificadores hasta ahora identificados son: *HT-B* (McClure *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2002; Goldraij *et al.*, 2006) y *120K* (Cruz García *et al.*, 2005; Hancock *et al.*, 2005). En Solanaceae se han identificado tres mecanismos distintos de rechazo del polen dependientes de S-RNasas que utilizan distintos genes modificadores (Bedinger *et al.*, 2017).

HT-B es una proteína pequeña de 8.6 kDa rica en asparaginas expresada en el pistilo de *N. alata* y su expresión coincide con el inicio del rechazo de polen S específico (Kondo y McClure, 2008). Se ha demostrado que HT-B es necesario para el rechazo S-específico en *Nicotiana* (McClure *et al.*, 1999). También se ha demostrado que un homólogo de HT-B de *Nicotiana* se expresa y es necesario para la autoincompatibilidad en *Solanum chacoense* (O'Brien *et al.*, 2002).

Mientras tanto, la proteína de 120 kDa (120K) es una glicoproteína rica en hidroxiprolina purificada por primera vez a partir de *N. alata* que se expresa de manera abundante en la matriz extracelular del estilo y que se conserva en varias otras especies de solanáceas (Lind *et al.*, 1994). Se ha demostrado que la proteína 120K es introducida al tubo polínico de *N. alata in vivo* (Lind *et al.*, 1996). Su expresión es necesaria para la autoincompatibilidad alelo S específica en híbridos de *N. alata* y *N. plumbaginifolia*, pero su supresión no afecta el rechazo interespecífico de polen de *N. plumbaginifolia*, (Hancock *et al.*, 2005). En contraste, la expresión de HT-B sí es necesaria para el rechazo interespecífico del polen de *N. plumbaginifolia*, indicando que este rechazo ocurre por mecanismos distintos (Hancock *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado previamente durante una cruce la S-RNasa es incorporada al tubo polínico y transportada a compartimentos vacuolares (Goldraij *et al.*, 2006). Se ha observado que la proteína 120 kDa también se asocia a estas vacuolas (Goldraij *et al.*, 2006). En tubos polínicos compatibles HT-B es degradada y la S-RNasa se mantiene en los compartimentos vacuolares; si se suprime la expresión de HT-B o de otro factor conocido como factor 4936 la S-RNasa se mantiene en estos compartimentos y no se lleva a cabo el rechazo del polen (Goldraij *et al.*, 2006).

Otro gen modificador es una tiorredoxina descrita en *N. alata* (*NaTrxh*) que interactúa de manera específica con la S-RNasa y la reduce *in vitro* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). En particular se ha visto que reduce un enlace disulfuro en la S_{C10}-RNasa, aumentando significativamente su actividad de ribonucleasa, y que la expresión de una variante inactiva de la NaTrxh suprime el rechazo del polen alelo S específico y el rechazo de polen de *N. plumbaginifolia* en *N. alata* (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

NaStEP es una proteína homóloga a inhibidores de proteasas tipo Kunitz que es detectable en los estigmas de especies autoincompatibles de *Nicotiana*, pero no en especies autocompatibles (Busot *et al.*, 2008). Se ha demostrado que durante la polinización NaStEP se incorpora a los tubos polínicos, que la supresión de su expresión en híbridos transgénicos interfiere con el rechazo del polen S específico y que su presencia es necesaria para la estabilidad de HT-B durante el rechazo del polen (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Sin embargo, todavía no se sabe sobre cuál molécula actúa esta proteína (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

Como último ejemplo, NaSIPP es una proteína mitocondrial con actividad de transportador de fosfatos expresada en el polen maduro de especies de *Nicotiana* (García-Valencia *et al.*, 2017). Se ha observado que NaSIPP interactúa con NaStEP y se la ha implicado en el transporte de NaStEP del citoplasma a las mitocondrias del tubo polínico (García-Valencia *et al.*, 2017). Esto combinado con el descubrimiento de que la supresión de NaSIPP interfiere con la autoincompatibilidad ha llevado a que se proponga un modelo en el cual la interacción entre NaSIPP y NaStEP en tubos polínicos incompatibles puede desestabilizar a las mitocondrias y contribuir a que se detenga el crecimiento del tubo polínico (García-Valencia *et al.*, 2017).

1.4. Los principales modelos propuestos para el sistema de autoincompatibilidad basado en S-RNasa

Los estudios sobre la autoincompatibilidad controlada por el locus S ha llevado a la propuesta de dos modelos principales: el modelo colaborativo y el de compartimentalización.

El modelo colaborativo de reconocimiento de polen no propio (Figura 2) propone que el conjunto de proteínas SLF codificadas por un haplotipo *S* reconoce y detoxifica (por medio de su ubiquitinación y degradación) a todas las S-RNAsas no propias; y que la autoincompatibilidad ocurre porque la S-RNasa codificada por ese haplotipo *S* no es reconocida y evade la degradación (Kubo *et al.*, 2010).

El modelo de compartimentalización (Figura 2) propone que para resistir a las S-RNAsas el polen las secuestra en compartimentos vacuolares y degrada a HT-B, es decir, el rechazo del polen ocurre cuando HT-B se mantiene estable, los compartimentos se degradan y las S-RNAsas se liberan al citoplasma del polen, donde pueden ejercer su efecto citotóxico (Goldraij *et al.*, 2006).

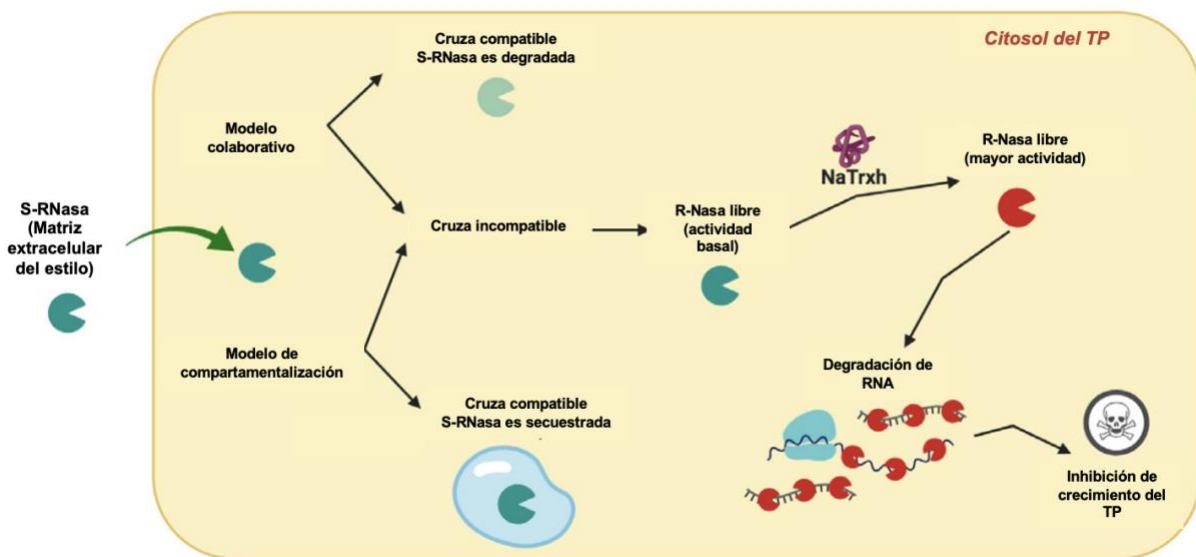


Figura 2. Esquema simplificado del modelo colaborativo y del modelo de compartimentalización. Imagen modificada de Torres Rodríguez *et al.*, 2020.

1.5. Incompatibilidad interespecífica y la regla de unilateralidad

El rechazo del polen se complica aún más cuando se incluye la incompatibilidad interespecífica, la cual puede ser muy compleja con la acción de múltiples mecanismos y una

superposición parcial en los productos involucrados y la especificidad presentada (Murfett *et al.*, 1996; McCubbin y Kao, 1999).

Las S-RNasas también pueden participar en el rechazo del polen interespecífico (McClure *et al.*, 2000; Beecher *et al.*, 2001) y este tipo de rechazo a menudo es menos específico, con una sola S-RNasa capaz de rechazar múltiples tipos de polen de otras especies (Beecher *et al.*, 1997). Esto puede ser adicionalmente afectado por otros factores como la especie en la que ocurre el rechazo interespecífico. Por ejemplo, la S_{C10} -RNasa y la S_{9811} -RNasa de *N. alata* presentan eficiencias similares en el rechazo de polen en *N. tabacum* pero presentan eficiencias muy distintas en *N. plumbaginifolia* (Beecher *et al.*, 2001). Factores como el nivel de expresión de las S-RNasas también son especialmente importantes para su funcionamiento en este tipo de rechazo (Beecher *et al.*, 2001). También se ha visto que al menos una S-RNasa quimérica que es incapaz de participar en el rechazo de polen alelo *S* específico (Con5-RNasa) (Zurek *et al.*, 1997) aún es capaz de provocar rechazo parcial del polen en *N. tabacum* (Beecher *et al.*, 2001), recalcando la complejidad de este proceso.

El rechazo interespecífico frecuentemente sigue la regla de la unilateralidad, la cual indica que en las cruzas entre especies una especie autoincompatible va a rechazar el polen de una especie autocompatible, pero en la crusa recíproca el polen será aceptado (Murfett *et al.*, 1996; Cruz-García *et al.*, 2003; Li y Chetelat, 2010; Baek *et al.*, 2015). La incompatibilidad interespecífica unilateral se ha reportado en especies de Solanaceae (Baek *et al.*, 2015), Liliaceae (Ascher y Peloquin, 1968; Harder *et al.*, 1993), Brassicaceae (Hiscock y Dickinson, 1993), Poaceae (Duvall y Biesboer, 1988) y Orchidaceae (Pinheiro *et al.*, 2015), y existen ejemplos de sistemas con unilateralidad tanto dependiente como independiente de S-RNasas (Bedinger *et al.*, 2017).

En Solanaceae se ha observado que factores controladores de la incompatibilidad interespecífica unilateral con una alta similitud a factores de autoincompatibilidad de *Petunia* interactúan con un gen en o cercano al locus *S* en especies de *Solanum*, indicando que la autoincompatibilidad y la incompatibilidad interespecífica poseen mecanismos bioquímicos similares (Li y Chetelat, 2010).

En el caso de *Nicotiana* la S-RNasa también puede provocar incompatibilidad interespecífica unilateral entre la especie autoincompatible *N. alata* y las especies autocompatibles *N. plumbaginifolia* y *N. tabacum* (Murfett *et al.*, 1996). En el caso de *N. plumbaginifolia*, para que rechace su propio polen se requiere la participación de la S-RNasa, de SLF y de los genes modificadores *NaStEP*, *HT-B*, *120K* y *NaTrxh*, como ocurre de manera natural con *N. alata* (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005; Jiménez-Durán *et al.*, 2013; Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). En contraste en *N. tabacum*, la expresión de S_{A2} -RNasa o S_{C10} -RNasa sin otros factores de *N. alata* es suficiente para provocar el rechazo de su propio polen y del polen de *N. glutinosa* (Murfett *et al.*, 1996). La expresión de S_{9811} -RNasa sin otros factores en *N. tabacum* también es suficiente para que esta rechace su propio polen (Beecher *et al.*, 2001). Todo esto indica una vía en el rechazo interespecífico del polen que no ha sido lo suficientemente explorada.

1.6. Mecanismos de rechazo del polen propuestos

En concordancia con lo anterior, es posible proponer que el rechazo del polen intra e interespecífico ocurre por tres vías:

- a) La vía dependiente de SLF, de las S-RNasas y de genes modificadores,
- b) la vía dependiente únicamente de genes modificadores, y
- c) la vía dependiente únicamente de la S-RNasa, como se ha observado en *Nicotiana tabacum*.

Las dos primeras vías ya se están estudiando en *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum*, pero este no es el caso con la vía de rechazo del polen que solo depende de la S-RNasa. Todavía no se sabe cuáles son los cambios bioquímicos y celulares que conducen a la muerte del tubo polínico en este tipo de sistemas. A la fecha no hay respuesta, pero una posibilidad es que ocurra por muerte celular programada, como sucede en *Papaver rhoeas* durante el rechazo del polen. En *P. rhoeas* la autoincompatibilidad también es gametofítica, pero el rechazo del polen depende de la interacción específica entre la determinante femenina PrsS, que es una proteína expresada en el

estigma, y la determinante masculina PrpS, una proteína membranal expresada en el polen (Thomas y Franklin-Tong, 2004; Wang *et al.*, 2019).

Este trabajo busca generar líneas de plantas transgénicas de *N. tabacum* que expresen específicamente en los estilos a la S_{C10}-RNasa y líneas donde la S_{C10}-RNasa se encuentre fusionada a la proteína reportera fluorescente mPlum para servir como material biológico para estudios futuros que tendrán como objetivo aclarar las bases moleculares y celulares del rechazo del polen dependiente únicamente de S-RNasas en esta especie.

2. JUSTIFICACIÓN

La vía de rechazo del polen dependiente únicamente de S-RNasa no ha sido investigada a fondo. Para realizar estudios futuros que aclaren los mecanismos celulares y moleculares de esta vía es necesario generar líneas de *N. tabacum* (especie que presenta la vía dependiente únicamente de S-RNasa) que expresen en sus estilos a la S_{C10}-RNasa, preferiblemente fusionada a un marcador fluorescente que facilite la observación de su movimiento y actividad en el pistilo maduro a lo largo de la polinización.

3. OBJETIVO GENERAL

Transformar *N. tabacum* con una construcción que porte a la S_{C10}-RNasa y otra donde la S_{C10}-RNasa se encuentre fusionada a la proteína reportera fluorescente mPlum.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar las dos construcciones moleculares (con y sin fusión a mPlum)
- Clonar las construcciones en un vector binario
- Transformar *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones diseñadas
- Transformar hojas de *N. tabacum* con ambas construcciones

5. METODOLOGÍA

5.1. Plásmidos utilizados

Se utilizó el vector pJET1.2/blunt (Figura 3) de la compañía Thermo Fisher Scientific como vector de clonación. Es un vector de 2974 pb en el que se puede introducir cualquier fragmento de DNA con extremos romo a través de una reacción de ligado. Además, contiene el gen letal *eco47IR*, el cual es neutralizado al introducirse el fragmento de interés, permitiendo una selección positiva de los plásmidos recombinantes. Adicionalmente, confiere resistencia a ampicilina.

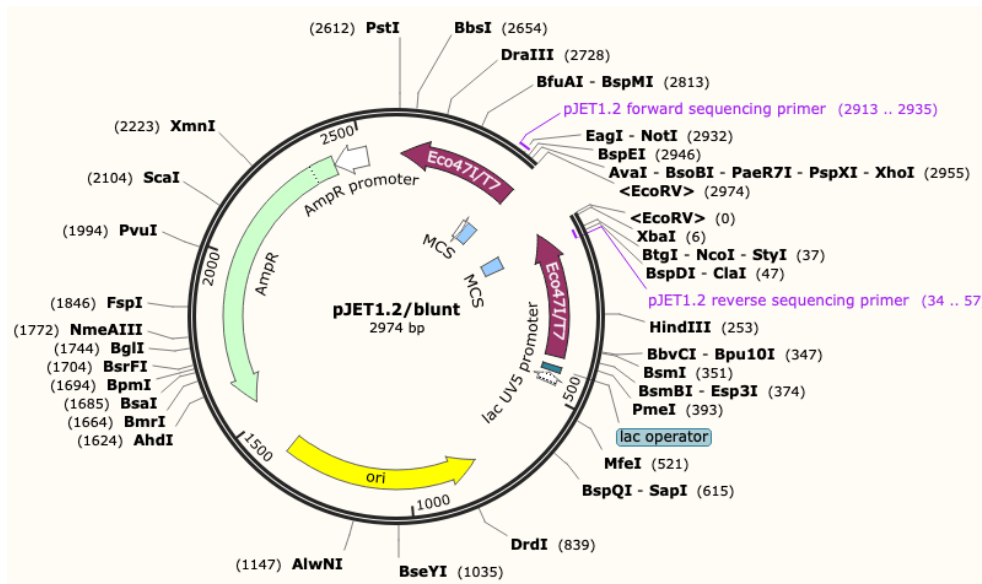


Figura 3. Mapa del vector pJET1.2/blunt

Para transformar a *N. tabacum* se utilizó el vector binario pK2GW7 (Figura 4). Este es un vector de 11,168 pb que contiene al promotor CaMV 35S, al gen tóxico *ccdB* y otorga resistencia a espectinomicina en bacterias y a kanamicina en plantas.

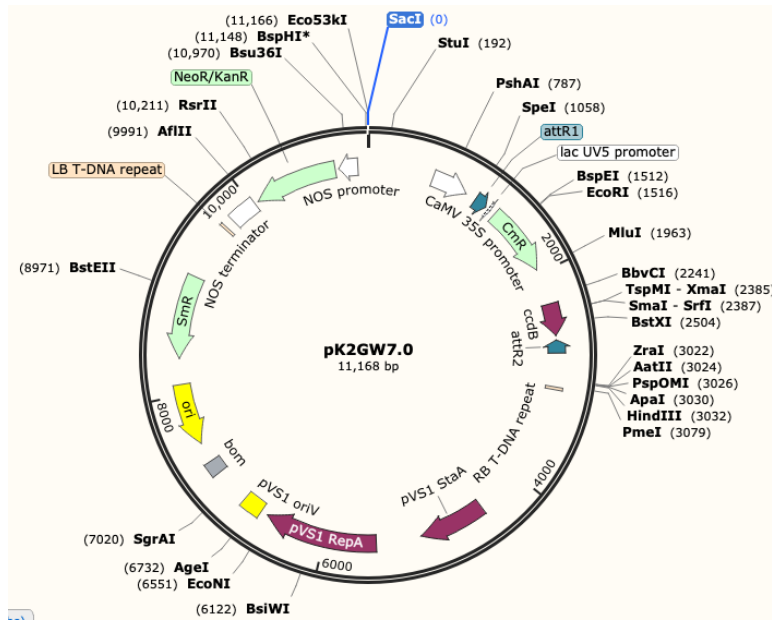


Figura 4. Mapa del vector pK2GW7

5.2. Diseño y síntesis de construcciones

Se utilizó la base de datos GenBank (Clark *et al.*, 2016) y se obtuvieron las secuencias para la proteína fluorescente roja mPlum (Kriz *et al.*, 2010) con número de acceso de GenBank HQ398619 y la secuencia de la S_{C10} -RNasa de *N. alata* con número de acceso de GenBank U45959.1. También se utilizó la secuencia para el promotor *ChiP* de quitinasa de jitomate (Murfett *et al.*, 1994). Estas secuencias se pueden observar en los Anexos 1 – 4.

Utilizando estas secuencias se diseñaron dos construcciones:

- 1) Una con el promotor *ChiP*, seguido por el péptido señal de la S_{C10} -RNasa, la secuencia de mPlum y finalmente por la S_{C10} -RNasa (ChiP_mPlum_ S_{C10}) (Anexo 5).
- 2) Una segunda construcción idéntica a la primera, con la excepción de que no presentaba la secuencia de mPlum (ChiP_ S_{C10}) (Anexo 6).

Estas construcciones fueron sintetizadas por la empresa GenScript y se entregaron en el vector pUC57, un plásmido de 2710 pb que otorga resistencia a ampicilina.

5.3. Transformación de las células competentes XL-10 Gold con las construcciones en pUC57

Los vectores pUC57 con las construcciones se utilizaron para transformar células ultracompetentes XL-10 Gold (Agilent #200315) con el siguiente protocolo:

1. Se agregó el vector con la construcción al medio con las células competentes, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 30 min.
2. Las células se incubaron a 42 °C por 45 s e inmediatamente se pasaron a hielo dejándolas 2 min.
3. Se agregaron 400 µL de medio SOC [medio Luria-Bertani (LB) con glucosa 20 mM] y se incubaron las células en agitación constante a 220 rpm por 1 h a 37 °C.
4. Finalmente, las células se centrifugaron a 7200 g por 2 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en medio LB líquido (1% de peptona, 0.5% de extracto de levadura, 0.5% de cloruro de sodio) y se plaquearon en cajas con medio LB sólido (LB con 1.5% de agar) y ampicilina (100 µg/mL).

5.4. Purificación de plásmidos

A partir de las células transformantes se purificaron los plásmidos con las construcciones usando el kit NZYMiniprep (Nzytech #MB01001), siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.5. Ensayo de restricción de las construcciones en pUC57

Se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *EcoRI-HF* (New England Biolabs #R3101S) y *NheI-HF* (New England Biolabs #R3131S) para confirmar la presencia de las construcciones en pUC57.

La reacción de restricción se preparó de la siguiente manera y se incubó a 37 °C por 1 h.

1. 1 µL rCutSmart Buffer 10X (New England Biolabs #B6004)
2. 0.5 µL *EcoRI-HF*
3. 0.5 µL *NheI-HF*

4. 200 ng vector con construcción
5. Ajustar el volumen a 10 μ L con H₂O

5.6. Diseño de oligonucleótidos para agregar sitios de restricción

Se diseñaron oligonucleótidos para agregar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los sitios de restricción de las enzimas *SacI* (GAGCTC) y *XmaI* (CCCGGG) a las construcciones, en los extremos 5' y 3', respectivamente, para su posterior clonación en el vector pK2GW7.

Oligonucleótido sentido con sitio de restricción *SacI*:

pK2 F: 5'-GAGCTCAGATCTCTTTTGTACTTTTCCC-3'

Oligonucleótido antisentido con sitio de restricción *XmaI*:

pK2 R: 5'-CCCGGGCTAGATATAGTACA-3'

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa T4 Oligo.

Nota: Los oligonucleótidos se diseñaron de manera que pudieran eliminar al promotor CaMV 35S de pK2GW7 durante la clonación.

5.7. Generación por PCR de las construcciones con los sitios de restricción *SacI* y *XmaI*

La mezcla de reacción para la amplificación por PCR se realizó de la siguiente manera:

- 0.5 μ L oligonucleótido pK2 F (10 μ M)
- 0.5 μ L oligonucleótido pK2 R (10 μ M)
- 5 μ L PCR BIO VeriFi Mix (PCR BIOSYSTEMS #PB10.43-01) compuesto de polimerasa PCR BIO VeriFi, 6mM MgCl₂, 2mM dNTPs, enhancers y estabilizadores.
- 100 ng vector con construcción
- Volumen total: 10 μ L

Para la amplificación por PCR se emplearon las condiciones indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones empleadas para la amplificación de las construcciones con los oligonucleótidos pK2 F y pK2 R para agregar los sitios de restricción de *SacI* y *XmaI*. **Nota:** Se utilizaron las temperaturas de desnaturalización y elongación recomendadas en el manual de PCR BIO VeriFi Mix. La temperatura de alineamiento se eligió basado en la secuencia de los oligonucleótidos pK2 F y pK2 R.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	-
Desnaturalización	95	45 s	30
Alineamiento	60	45 s	
Elongación	72	1 min 30 s	
Elongación final	72	5 min	-

5.8. Clonación de los productos de la amplificación en pJET1.2/blunt

Para clonar las construcciones en pJET1.2/blunt se utilizó el kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific #K1231) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Posteriormente, con los vectores resultantes se transformaron células competentes como se describió previamente (sección 5.3). Eventualmente, se purificó este plásmido como se describe en la sección 5.4.

5.9. Clonación de las construcciones en el vector pK2GW7

Para clonar las construcciones en el vector pK2GW7 se hizo una reacción de restricción para extraerlas de pJET1.2/blunt y ligarlas a pK2GW7 previamente digerido con las mismas enzimas. La reacción se realizó en condiciones iguales a las descritas en la sección 5.5. con la excepción de que se usaron las enzimas *SacI*-HF (New England BioLabs #R3156S) y *XmaI* (New England BioLabs #R0180S).

Tanto los insertos como el plásmido pK2GW7 digeridos se purificaron a partir de gel de agarosa 1% después de haber realizado una electroforesis. Se utilizó el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research #D4008), siguiendo el protocolo del proveedor.

Cada construcción se ligó a pK2GW7 con la T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific #EL0011) siguiendo las instrucciones del proveedor y se transformaron células XL-10 Gold (sección 5.3).

5.10. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Las células de la línea C58 de *Agrobacterium tumefaciens* se transformaron con el vector pK2GW7 que contenía las construcciones de interés. Las transformaciones se realizaron de la siguiente manera:

1. Se descongelaron las células en hielo, se agregó el vector con las construcciones y se mezcló suavemente.
2. Se congelaron las células en nitrógeno líquido por 5 min.
3. Se incubaron las células a 37 °C por 25 min.
4. Se agregó 1 mL de LB y se incubaron las células en agitación constante a 225 rpm por 3 horas a 28°C.
5. Finalmente, se plaquearon las células LB sólido con rifampicina (50 µg/mL) y espectinomicina (50 µg/mL).

5.11. Secuenciación

Para confirmar la presencia de las dos construcciones en pK2GW7 purificadas de células transformantes de *E. coli* XL10GOLD se enviaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las construcciones se secuenciaron por el método de Sanger con terminadores fluorescentes y electroforesis capilar.

Para la secuenciación las muestras se prepararon en agua: ChiP_mPlum_Sc10 a de 176.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y ChiP _Sc10 a 129.13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se utilizaron los oligonucleótidos pK2F (secuencia: 5'-GAGCTCAGATCTCTTTTGTACTTTTCCC-3') y pK2R (secuencia: 5'- CCCGGGCTAGATATAGTACA-3') junto con un oligonucleótido sentido que se une al péptido señal de la Sc10-RNasa (SC10 F, secuencia: 5' – ATGCTTAACTCACCGCTCACATCAGTCCTC – 3'). Se prepararon 20 μL de cada oligonucleótido a 10 μM en agua.

5.12. Análisis de secuencias

Para el análisis de los resultados de la secuenciación se utilizaron como referencia secuencias de ChiP (Murfett *et al.*, 1994), mPlum (número de acceso de GenBank HQ398619) y la Sc10-RNasa (número de acceso de GenBank U45959.1).

Los archivos ABI de la secuenciación se analizaron de manera preliminar en Unipro UGENE (Versión 42.0, 2022) para determinar la calidad de la secuenciación.

Posteriormente, estos archivos se convirtieron a formato FASTA utilizando Abi to Fasta Sequence Converter (http://sequenceconversion.bugaco.com/converter/biology/sequences/abi_to_fasta.php). Para las secuencias que se obtuvieron con los oligonucleótidos antisentido se utilizó Reverse Complement (<http://reverse-complement.com/>) para obtener su complemento inverso.

Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias de referencia utilizando Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

5.13. Confirmación de la clonación de las construcciones por PCR a partir de colonias de *A. tumefaciens*

Se realizaron reacciones de PCR de 3 colonias de *A. tumefaciens* transformadas con ChiP_mPlum_Sc10 y de 3 colonias transformadas con ChiP_Sc10 con los oligonucleótidos pK2 F y

pK2 R para confirmar la presencia de estas construcciones. Para cada colonia la mezcla para PCR se realizó de la siguiente manera (la colonia se puso directamente en el tubo de reacción):

- 0.5 μ L oligonucleótido pK2 F (10 μ M)
- 0.5 μ L oligonucleótido pK2 R (10 μ M)
- 5 μ L PCR BIO VeriFi Mix (PCR BIOSYSTEMS #PB10.43-01) (compuesto de polimerasa PCR BIO VeriFi, 6mM MgCl₂, 2mM dNTPs, enhancers y estabilizadores)
- Volumen total: 10 μ L

Para la reacción se emplearon las condiciones indicadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones empleadas para la PCR de las colonias de *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	45 s	30
Alineamiento	58	45 s	
Elongación	72	1 min 30 s	
Elongación final	72	15 min	1

5.14. Transformación de hojas de *Nicotiana tabacum*

Se obtuvieron hojas jóvenes y sanas de plantas silvestres de *N. tabacum* cultivadas en condiciones de invernadero.

Nota: Todo el trabajo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

Para desinfectar las hojas se pusieron en agitación por 15 minutos en una solución con 10% de cloro y 1 mL de Tween-20. Posteriormente se realizaron múltiples lavados con agua estéril para eliminar el cloro y el Tween-20.

Para cada construcción se hizo lo siguiente:

1. Se preparó un precultivo de la clona de *A. tumefaciens* con la construcción de interés en 5 mL de medio LB líquido con 50 µg/mL de espectinomicina y 50 µg/mL de rifampicina.
2. Se inocularon 40 mL de LB líquido con 500 µL del precultivo y se dejó incubando a 30°C hasta obtener una densidad óptica de 0.47 a 600 nm.
3. Las células se centrifugaron a 2800 g por 10 min y se resuspendieron en medio NAP₆₋₃ con acetosiringona (150 µM).
4. Se eligieron tres hojas desinfectadas de *N. tabacum* y se cortaron en cuadrados de 1 cm² evitando el tejido vascular. Con un bisturí se realizaron pequeñas heridas en la superficie de estas hojas.
5. Los explantes se incubaron con *A. tumefaciens* en agitación suave por 15 min.
6. Se eliminó el exceso de bacterias de los explantes con papel filtro estéril.
7. Los explantes se colocaron con el haz hacia arriba en medio NAP₆₋₃ con acetosiringona y se mantuvieron en oscuridad a 25 °C por 3 días.
8. Posteriormente se enjuagaron los explantes en medio líquido NAP₆₋₃ con los antibióticos cefotaxima (250 mg/L) y vancomicina (250 mg/L) por 5 min.
9. Finalmente, se colocaron los explantes con el haz hacia arriba en medio NAP₆₋₃ con cefotaxima (250 mg/L), vancomicina (250 mg/L) y kanamicina (150 mg/L).

5.15. Cultivo de tejidos

Los explantes se mantuvieron en el medio NAP₆₋₃ con cefotaxima, vancomicina y kanamicina durante 2 semanas. Después se subcultivaron a medio nuevo.

6. RESULTADOS

6.1. Construcciones diseñadas

En la Figura 5 se presenta un esquema a escala de las dos construcciones: una con el promotor *ChiP*, la *S_{C10}-RNasa* y su péptido señal (*ChiP_S_{C10}*) y otra construcción similar a la que se agregó la secuencia de la proteína fluorescente roja mPlum (*ChiP_mPlum_S_{C10}*). Las secuencias de estas construcciones se pueden observar en los Anexos 5 y 6.

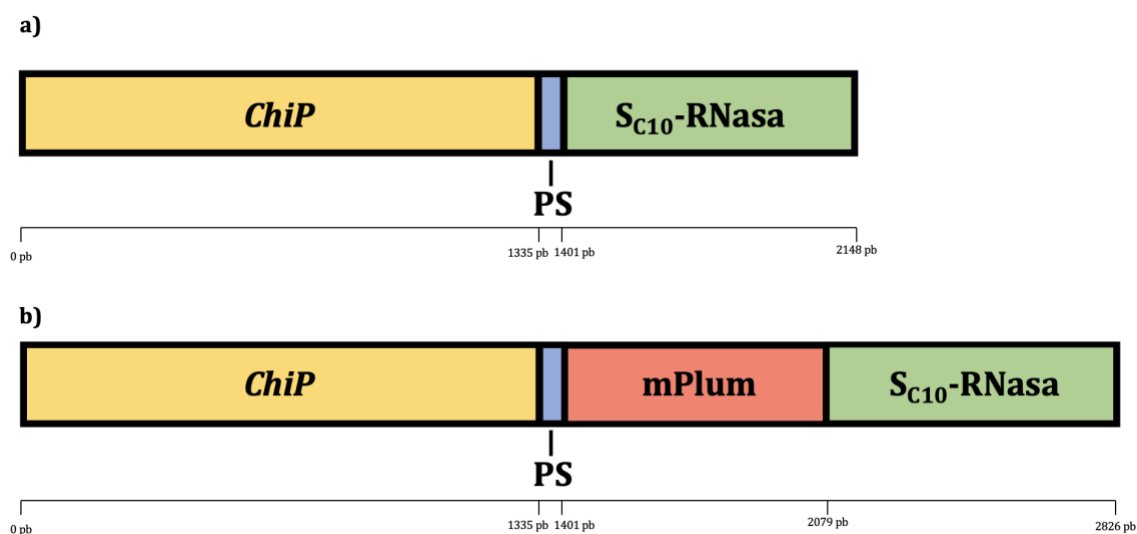


Figura 5. Esquema a escala de las construcciones diseñadas. **(a)** Construcción con las secuencias del promotor de la quitinasa del jitomate (*ChiP*), del péptido señal de la *S_{C10}-RNasa* (PS), y de la *S_{C10}-RNasa*. **(b)** Construcción con las secuencias de *ChiP*, de PS, de la proteína fluorescente roja (mPlum) y de la *S_{C10}-RNasa*.

6.2. Presencia de las construcciones en pUC57

La presencia de estas construcciones en pUC57 se confirmó mediante el análisis de restricción con *EcoRI* y *NheI* (Figura 6). *EcoRI* digiere en la secuencia interna de la *S_{C10}-RNasa* y *NheI* en la secuencia interna del promotor *ChiP*, por lo que se esperaban y obtuvieron fragmentos de 2979 pb y 1714 pb en el caso de *ChiP_mPlum_S_{C10}*; y fragmentos de 2979 pb y 1036 pb en el caso de *ChiP_S_{C10}*.

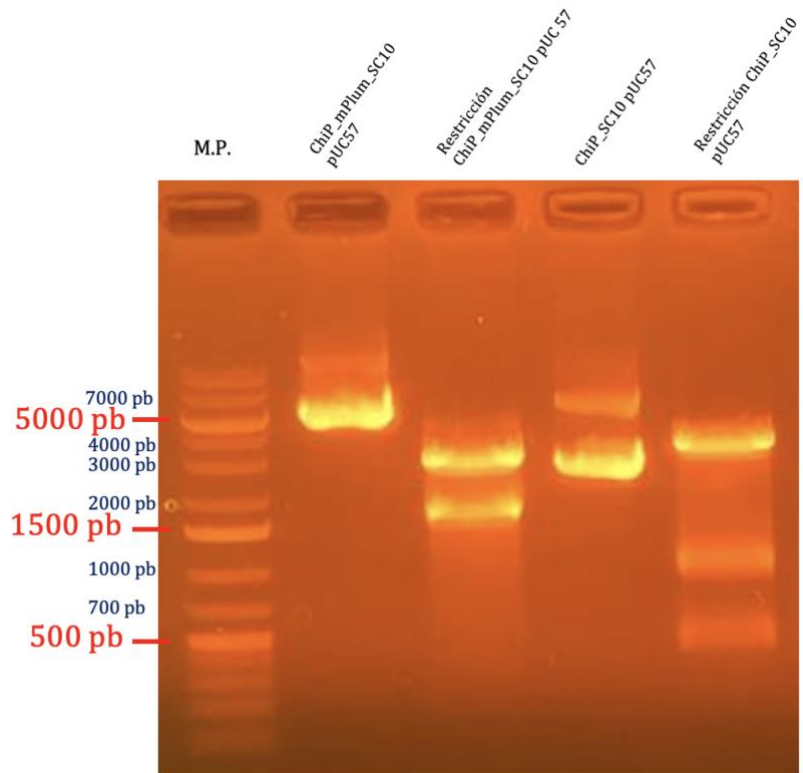


Figura 6. Análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *NheI* para confirmar la presencia de las construcciones ChiP_mPlum_SC10 y ChiP_SC10 en pUC57. En el caso de ChiP_mPlum_SC10 se esperan fragmentos de 2979 pb y 1714 pb. En el caso de ChiP_SC10 se esperan fragmentos de 2979 pb y 1036 pb. M.P. indica el marcador de peso molecular.

6.3. Presencia de los sitios de restricción de *SacI* y *XmaI*

En la Figura 7 se muestran los resultados del análisis por electroforesis de la reacción de amplificación por PCR de las dos construcciones realizada con los oligonucleótidos para introducir los sitios de restricción de las enzimas *SacI* y *XmaI*.

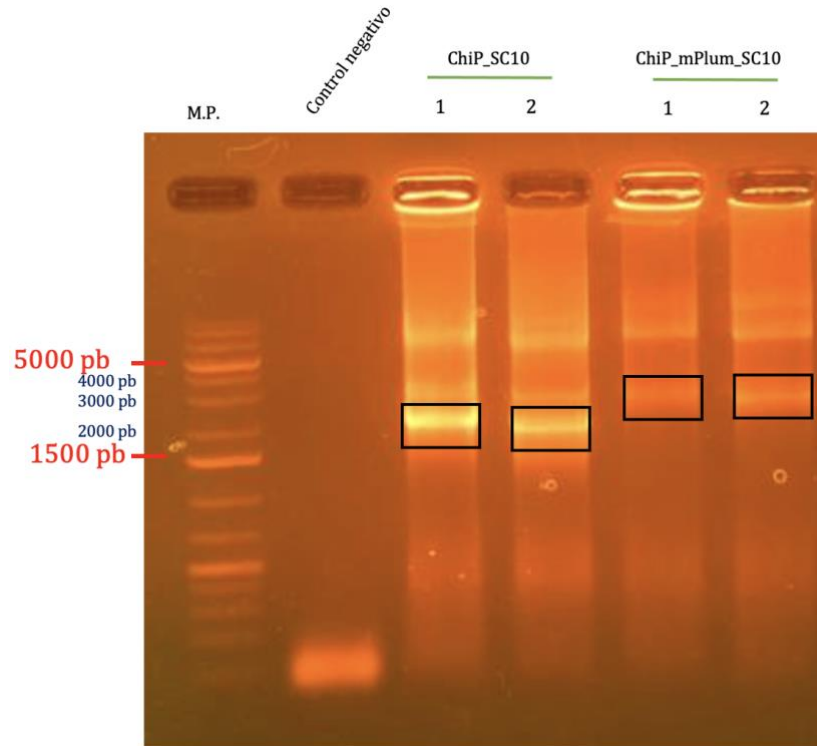


Figura 7. Análisis por electroforesis de los productos de la PCR con los oligonucleótidos pK2 F y pK2 R de las construcciones diseñadas en pUC57. Los recuadros negros marcan las bandas para ChiP__{SC10} (2148 pb) y ChiP_mPlum__{SC10} (2826 pb), las cuales se cortaron y purificaron para su clonación en pJET1.2/blunt. M.P. indica el marcador de masa molecular.

6.4. Clonación al vector pK2GW7

Los productos de la amplificación se purificaron y se ligaron en el vector pJET1.2/blunt. Se hizo una reacción de restricción de las construcciones en pJET1.2/blunt y del vector pK2GW7 con *SacI* y *XmaI* (Figura 8) para su posterior ligación y transformación a *A. tumefaciens*.

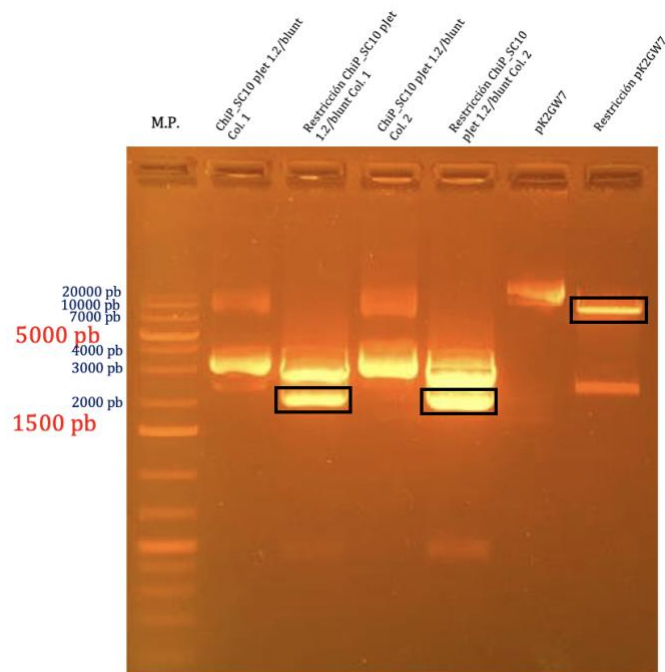


Figura 8. Restricción con *SacI* y *XmaI* de ChiP__{SC10} y del vector pK2GW7 para su posterior ligación con la T4 ligasa. En el caso de pK2GW7 la banda deseada es de 8783 pb. Los recuadros negros marcan la banda para ChiP__{SC10} (2148 pb) y la banda deseada de pK2GW7 (8783 pb), las cuales se cortaron y purificaron para su posterior ligación. M.P. indica el marcador de peso molecular.

Se confirmó por secuenciación la presencia de ChiP__{SC10} y ChiP_mPlum__{SC10} en el vector pK2GW7. Los resultados detallados del análisis de estas secuencias se pueden observar en los Anexos 7 a 13. En la Figura 9 se presenta un esquema de los puntos en las construcciones a las que se unieron estos oligonucleótidos utilizados.

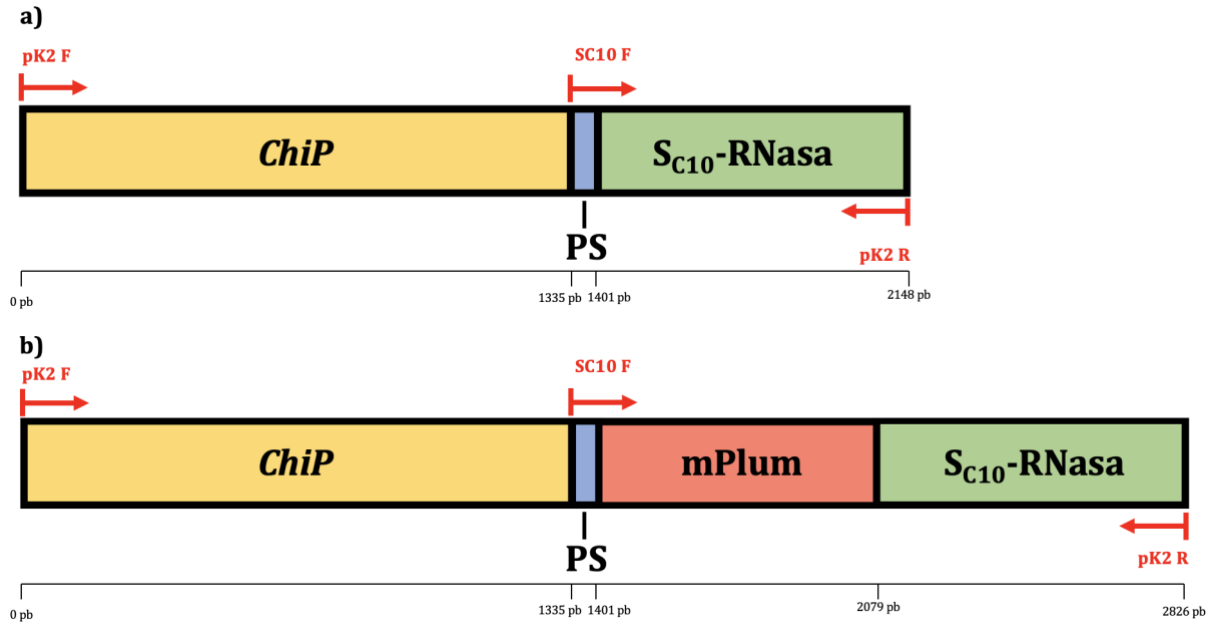


Figura 9. Esquema de los puntos en las construcciones a las que se unieron los oligonucleótidos pK2 F, pK2 R y SC10 F en la secuenciación. **(a)** ChiP_Sc10. **(b)** ChiP_mPlum_Sc10.

6.5. Presencia de las construcciones en *Agrobacterium tumefaciens*

En la Figura 10 se muestran los resultados de una reacción de PCR de tres colonias de *A. tumefaciens* con los oligonucleótidos pK2 F y pK2 R para confirmar la presencia de ChiP_Sc10. En la Figura 11 se observan los resultados de la PCR similar para confirmar la presencia de ChiP_mPlum_Sc10.

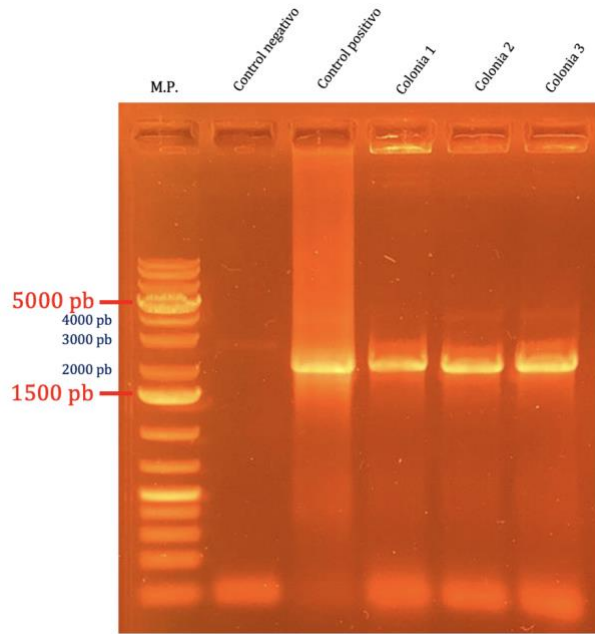


Figura 10. PCR de colonia con los oligos pK2 F y pK2 R para confirmar la presencia de ChiP_{Sc10} (2148 pb) en pK2GW7 en *Agrobacterium tumefaciens*. M.P. indica el marcador de peso molecular.

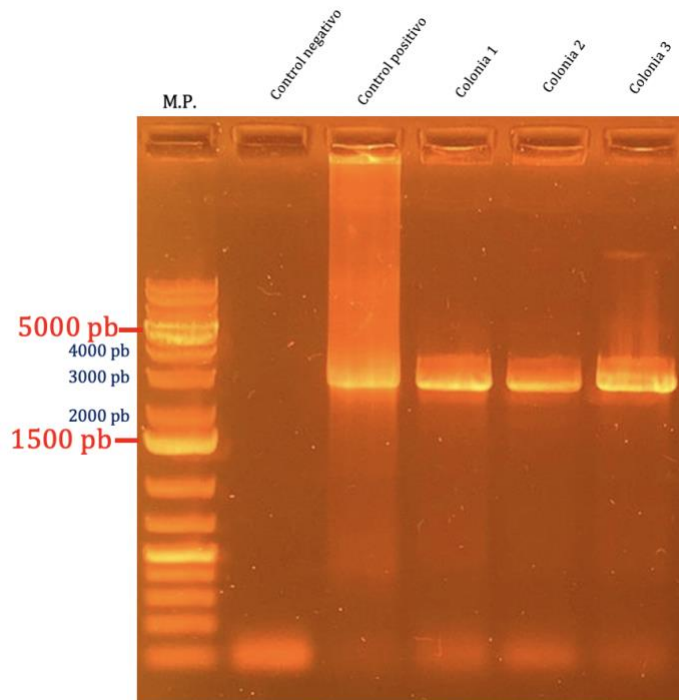


Figura 11. PCR de colonia con los oligos pK2 F y pK2 R para confirmar la presencia de ChiP_{mPlum_Sc10} (2826 pb) en pK2GW7 en *Agrobacterium tumefaciens*. M.P. indica el marcador de peso molecular.

6.6. Transformación de hojas de *Nicotiana tabacum* y cultivo de tejidos

Se transformaron los explantes de hoja de *N. tabacum* con las cepas *A. tumefaciens* que portaban las construcciones en pK2GW7 (se utilizaron la colonia 2 de *A. tumefaciens* con ChiP_SC10 y la colonia 1 de *A. tumefaciens* con ChiP_mPlum_SC10 en las Figuras 10 y 11, respectivamente). En la Figura 12 se observan algunos de los explantes en medio NAP₆₋₃ con cefotaxima, vancomicina y kanamicina.



Figura 12. Explantes de hoja de *Nicotiana tabacum* transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción ChiP_SC10 en medio NAP₆₋₃ con cefotaxima (250 mg/L), vancomicina (250 mg/L) y kanamicina (150 mg/L)

Finalmente, en el cultivo de tejidos se obtuvieron callos resistentes a kanamicina de *N. tabacum* transformados con *A. tumefaciens* con cada una de las dos construcciones (Figura 13).

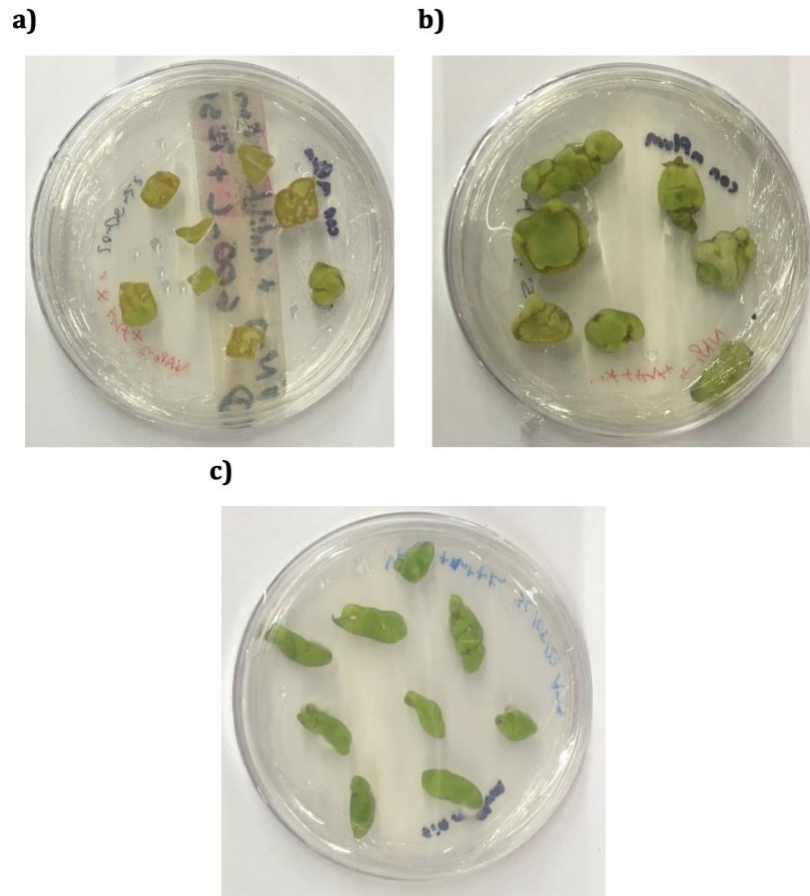


Figura 13. Explantes de *N. tabacum* en cultivo de tejidos. **(a)** Explantes transformados con *A. tumefaciens* con ChiP_mPlum_S_{C10} que no desarrollaron callos. **(b)** Explantes transformados con *A. tumefaciens* con ChiP_mPlum_S_{C10} que desarrollaron callos. **(c)** Explantes transformados con *A. tumefaciens* con ChiP_S_{C10} que desarrollaron callos.

7. DISCUSIÓN

En *N. tabacum* la expresión únicamente de la S_{A2} -RNasa o S_{C10} -RNasa es suficiente para provocar el rechazo de su propio polen y del polen de *N. glutinosa* (Murfett *et al.*, 1996), y la expresión únicamente de la S_{9811} -RNasa es suficiente para provocar el rechazo de su propio polen (Beecher *et al.*, 2001), indicando la presencia de una vía de rechazo del polen dependiente únicamente de S-RNasa. El objetivo de este trabajo fue generar líneas de *N. tabacum* que expresen a la S_{C10} -RNasa para ser utilizadas en estudios futuros que permitan definir los mecanismos moleculares y celulares involucrados en esta vía.

Al diseñar las construcciones (Figura 5) se decidió utilizar el promotor *ChiP* porque este dirige una alta expresión de los genes bajo su control de manera específica en el tejido de transmisión del estilo maduro (Harikrishna *et al.*, 1996) y se ha utilizado exitosamente para obtener altos niveles de expresión de la S-RNasa y provocar rechazo del polen en plantas de *Nicotiana* transgénicas (Murfett *et al.*, 1994).

Los péptidos señal son secuencias amino-terminales esenciales para guiar y aumentar la eficiencia del transporte transmembranal de algunas proteínas (Izard y Kendall, 1994; Owji *et al.*, 2018). Las proteínas maduras en su destino ya no contienen al péptido señal (Owji *et al.*, 2018). El péptido señal de la S_{C10} -RNasa funciona como otros, por lo que en la construcción en la que la mPlum se encuentra fusionada a la S_{C10} -RNasa, el péptido señal se introdujo antes de mPlum. Dado que los péptidos señal son eventualmente cortados (Owji *et al.*, 2018) no deberían interferir con la función de las proteínas que acompañan.

Para poder observar la localización de la S_{C10} -RNasa durante la polinización y durante el rechazo del polen se decidió utilizar una proteína fluorescente que iba a estar fusionada a esta. En el laboratorio del Dr. Felipe Cruz se cuenta con líneas de *N. tabacum* transgénicas que expresan un marcador verde fluorescente para diferentes componentes subcelulares, por lo que se decidió utilizar a mPlum, una proteína roja fluorescente con propiedades que permiten su observación en tejidos *in vivo* (Faraji y Krylov, 2015) y la expresión de proteínas en células (Kriz *et al.*, 2010). Es importante mencionar que mPlum y la S_{C10} -RNasa poseen tamaños similares (aproximadamente 25 kDa y 30 kDa, respectivamente). No se puede descartar que mPlum

pudiera interferir con el transporte o la actividad de la S_{C10} -RNasa ya que existe evidencia de que las proteínas reporteras fusionadas pueden interferir con la actividad de la proteína de interés (Kobayashi *et al.*, 2014). Por esta razón se diseñó la segunda construcción que presenta únicamente a la S_{C10} -RNasa. En este caso la S_{C10} -RNasa se podrá detectar con anticuerpos específicos para ésta.

El vector binario que se eligió para transformar a *N. tabacum*, pK2GW7 (Figura 4), presenta al promotor CaMV 35S. Este promotor se utilizaba antes en estudios del rechazo alelo *S* específico, pero se ha observado que puede dirigir la expresión de *S*-RNasa a tejidos vegetativos y puede provocar una baja expresión en tejidos reproductivos (Williamson *et al.*, 1989; Murfett *et al.*, 1995). Por esto, y para evitar conflictos con el promotor *ChiP* de las construcciones diseñadas se decidió eliminarlo de pK2GW7. Adicionalmente, pK2GW7 presenta el gen tóxico *ccdB*, el cual se utiliza como un sistema de selección positiva de vectores recombinantes (Green y Sambrook, 2021). Si este gen se mantiene intacto causa la muerte de la célula en la que se encuentra, por lo que su eliminación del vector también era importante. Para resolver estos problemas se diseñaron los oligonucleótidos PK2 F y PK2 R con los sitios de restricción de *SacI* y *XmaI*, ya que pK2GW7 presenta estos sitios, y al cortarlos se elimina el promotor CaMV 35S y se neutraliza a *ccdB*. El hecho de que *SacI* y *XmaI* dejan extremos cohesivos al cortar el DNA, y que por lo tanto permite elegir el sentido en el que entrarán las construcciones, también promovió el que se eligiera utilizar a estas enzimas para introducir *ChiP*_{*S*C10} y *ChiP*_{mPlum}_{*S*C10} al vector binario.

Adicionalmente, se eligió utilizar a pJET1.2/blunt como un vector de clonación para los productos de PCR con los sitios de *SacI* y *XmaI*. Este paso facilitó la clonación de las construcciones en el vector pK2GW7.

GenScript garantiza la presencia de las construcciones sintetizadas por secuenciación. Fuera de esto se confirmó la identidad de estas en pUC 57 a través de un análisis de restricción utilizando *EcoRI*, la cual corta en la secuencia de *SC10*, y *NheI*, la cual corta en la secuencia de *ChiP* (Figura 6). No se poseía una enzima de restricción capaz de cortar en la secuencia de la

proteína mPlum en la construcción que la poseía, pero se pudo asumir su identidad por los tamaños de los fragmentos observados.

La identidad de las construcciones a lo largo del proceso se confirmó por análisis de restricción y el uso de los sistemas de selección positivos de pJET1.2/blunt y pK2GW7 (Figura 8).

Después de transformar a *A. tumefaciens* y antes de transformar a *N. tabacum* se confirmó la identidad de estas construcciones de manera definitiva por secuenciación con el método de Sanger (Anexos 7 a 13). En esta secuenciación los primeros 100 nucleótidos (aproximadamente) no son confiables y los siguientes 600 son confiables. Con el oligonucleótido pK2 F se pudo confirmar la presencia del promotor *ChiP* de las dos construcciones y con pK2 R se pudo confirmar la presencia de la S_{C10} -RNasa. El oligonucleótido SC10 F se une de manera específica al péptido señal de la S_{C10} -RNasa, lo cual permitió confirmar la presencia de mPlum en ChiP_mPlum_ S_{C10} .

En cuanto a la transformación de los explantes, *N. tabacum* ha sido utilizada como organismo modelo en estudios de biología molecular y cultivo de tejidos (Lang *et al.*, 2020; Taalat *et al.*, 2021) y los explantes de hoja de *N. tabacum* se pueden utilizar para generar callos en cultivo de tejidos con una eficiencia elevada (Husseini *et al.*, 2020). La acetosiringona se utilizó porque activa a *A. tumefaciens* y aumenta la eficiencia de la transformación de plantas (Sheikholeslam y Weeks, 1987; Shibolet y Tzfira, 2012). Los antibióticos cefotaxima y vancomicina se utilizaron para eliminar a las bacterias de los explantes de *N. tabacum*. El vector pK2GW7 otorga resistencia a kanamicina, por lo cual se utilizó este antibiótico para seleccionar a las plantas transformantes.

Finalmente, dado que durante el cultivo de tejidos los explantes siempre estuvieron en presencia del marcador de selección (kanamicina), indicando que contenían a pK2GW7, y que se confirmó la presencia de las construcciones en pK2GW7, es altamente probable que los callos resistentes portan la construcción y que en un futuro se pueda expresar la S_{C10} -RNasa en *N. tabacum*.

8. CONCLUSIÓN

Se transformaron hojas de *N. tabacum* utilizando *A. tumefaciens* portando al vector binario pK2GW7 con dos construcciones: una que dirige la expresión de la S_{C10}-RNasa con su péptido señal bajo el control del promotor *ChiP*; y otra a la proteína de fusión mPlum-S_{C10}-RNasa con el péptido señal de la RNasa y bajo el control del promotor *ChiP*. Estos explantes se encuentran en cultivo de tejidos en medio con kanamicina y han generado callos que eventualmente darán lugar a plantas maduras que expresen cada construcción y que servirán para estudios futuros sobre las bases moleculares y celulares del rechazo del polen dependiente únicamente de S-RNasa en *N. tabacum*.

9. PERSPECTIVAS

* Evaluar si a partir de los callos de *N. tabacum* se pueden diferenciar plantas en las que se pueda analizar la vía del transporte de la S_{C10}-RNasa durante la polinización y el rechazo del polen.

10. REFERENCIAS

- Allen, A. M., y Hiscock, S. J. (2008). Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In *Self-incompatibility in flowering plants* (pp. 73-101). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Anderson, M. A., Cornish, E. C., Mau, S. L., Williams, E. G., Hoggart, R., Atkinson, A., Bonig, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P. J., Haley, J. D., Penschow, J. D., Niall, H. D., Tregear, G. W., Coghlan, J. P., Crawford, R. J., y Clarke, A. E. (1986). Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, 321(6065), 38-44.
- Anderson, M. A., McFadden, G. I., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., Tregear, G., Fernley, R., y Clarke, A. E. (1989). Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell*, 1(5), 483-491.
- Ascher, P. D., y Peloquin, S. J. (1968). Pollen tube growth and incompatibility following intra-and inter-specific pollinations in *Lilium longiflorum*. *American Journal of Botany*, 55(10), 1230-1234.
- Baek, Y. S., Covey, P. A., Petersen, J. J., Chetelat, R. T., McClure, B., y Bedinger, P. A. (2015). Testing the S \times SC rule: pollen–pistil interactions in interspecific crosses between members of the tomato clade (*Solanum* section *Lycopersicon*, Solanaceae). *American Journal of Botany*, 102(2), 302-311.
- Bedinger, P. A., Broz, A. K., Tovar-Mendez, A., y McClure, B. (2017). Pollen-pistil interactions and their role in mate selection. *Plant Physiology*, 173(1), 79-90.
- Beecher, B., Murfett, J., y McClure, B. A. (1997). RNaseI from *Escherichia coli* cannot substitute for S-RNase in rejection of *Nicotiana glauca* pollen. *Plant molecular biology*, 36(4), 553-563.
- Beecher, B., Zurek, D., y McClure, B. (2001). Effects of RNases on rejection of pollen from *Nicotiana glauca* and *N. glauca*. *Sexual Plant Reproduction*, 14(1), 69-76.
- Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., Bao, M., Bapaume, L., Barry, C. S., Bliet, M., Boersma, M. R., Borghi, L., Bruggmann, R., Bucher, M., D'Agostino, N., Davies, K., Druege, U., Dudareva, N., Egea-Cortines, M., Delledonne, M., Fernandez-Pozo, N.,

- Franken, P., ... Kuhlemeier, C. (2016). Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature plants*, 2(6), 1-9.
- Bredemeijer, G. M. M., y Blaas, J. (1981). S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theoretical and Applied Genetics*, 59(3), 185-190.
 - Broz, A. K., y Bedinger, P. A. (2021). Pollen-Pistil Interactions as Reproductive Barriers. *Annual review of plant biology*, 72, 615-639.
 - Busot, G. Y., McClure, B., Ibarra-Sánchez, C. P., Jiménez-Durán, K., Vázquez-Santana, S., y Cruz-García, F. (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.
 - Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D67-72 (2016)
 - Cornish, E. C., Pettitt, J. M., Bonig, I., y Clarke, A. E. (1987). Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, 326(6108), 99-102.
 - Cornish, E. C., Pettitt, J. M., y Clarke, A. E. (1988). Self-incompatibility genes in flowering plants. In *Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes* (pp. 117-130). Springer, Vienna.
 - Cruz-García, F., Hancock, C. N., y McClure, B. (2003). S-RNase complexes and pollen rejection. *Journal of experimental botany*, 54(380), 123-130.
 - Cruz-García, F., Nathan Hancock, C., Kim, D., y McClure, B. (2005). Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *The Plant Journal*, 42(3), 295-304.
 - de Nettancourt, D. (1997). Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction*, 10(4), 185-199.
 - de Nettancourt, D. (2001). *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants* (Vol. 3). Springer Science y Business Media.
 - Dodds, P. N., Clarke, A. E., y Newbigin, E. (1996). A molecular perspective on pollination in flowering plants. *Cell*, 85(2), 141-144.

- Duvall, M. R., y Biesboer, D. D. (1988). Nonreciprocal hybridization failure in crosses between annual wild-rice species (*Zizania palustris* X *Z. aquatica*: Poaceae). *Systematic botany*, 229-234.
- Entani, T., Iwano, M., Shiba, H., Che, F. S., Isogai, A., y Takayama, S. (2003). Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes to Cells*, 8(3), 203-213.
- Entani, T., Takayama, S., Iwano, M., Shiba, H., Che, F. S., y Isogai, A. (1999). Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* Vilm. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63(11), 1882-1888.
- Faraji, S., & Krylov, A. I. (2015). On the nature of an extended Stokes shift in the mPlum fluorescent protein. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(41), 13052-13062.
- Franklin-Tong, V. E., y Franklin, F. C. H. (2003). The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1434), 1025-1032.
- Franklin-Tong, V. E., Ride, J. P., Read, N. D., Trewavas, A. J., y Franklin, F. C. H. (1993). The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *The Plant Journal*, 4(1), 163-177.
- Franklin-Tong, V. E., Ride, J. P., y Franklin, F. C. H. (1995). Recombinant stigmatic self-incompatibility (S-) protein elicits a Ca²⁺ transient in pollen of *Papaver rhoeas*. *The Plant Journal*, 8(2), 299-307.
- García-Valencia, L. E., Bravo-Alberto, C. E., Wu, H. M., Rodríguez-Sotres, R., Cheung, A. Y., y Cruz-García, F. (2017). SIPP, a novel mitochondrial phosphate carrier, mediates in self-incompatibility. *Plant Physiology*, 175(3), 1105-1120.
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T. E., Cruz-García, F., y McClure, B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, 439(7078), 805-810.
- Gray, J. E., McClure, B. A., Bonig, I., Anderson, M. A., y Clarke, A. E. (1991). Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca* (S-RNase) on in vitro-grown pollen tubes. *The Plant Cell*, 3(3), 271-283.

- Green, M. R., y Sambrook, J. (2021). Cloning and transformation with plasmid vectors. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(11), pdb-top101170.
- Hancock, C. N., Kent, L., y McClure, B. A. (2005). The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in Nicotiana. *The Plant Journal*, 43(5), 716-723.
- Harder, L. D., Cruzan, M. B., y Thomson, J. D. (1993). Unilateral incompatibility and the effects of interspecific pollination for *Erythronium americanum* and *Erythronium albidum* (Liliaceae). *Canadian Journal of Botany*, 71(2), 353-358.
- Harikrishna, K., Jampates-Beale, R., Milligan, S. B., y Gasser, C. S. (1996). An endochitinase gene expressed at high levels in the stylar transmitting tissue of tomatoes. *Plant molecular biology*, 30(5), 899-911.
- Hiscock, S. J., y Dickinson, H. G. (1993). Unilateral incompatibility within the Brassicaceae: further evidence for the involvement of the self-incompatibility (S)-locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(6), 744-753.
- Hiscock, S. J., y McInnis, S. M. (2003). Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: Brassica and beyond. *Trends in plant science*, 8(12), 606-613.
- Hiscock, S. J., y Tabah, D. A. (2003). The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1434), 1037-1045.
- Hua, Z. H., Fields, A., y Kao, T. H. (2008). Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Molecular Plant*, 1(4), 575-585.
- Hua, Z., Meng, X., y Kao, T. H. (2007). Comparison of *Petunia inflata* S-locus F-box protein (Pi SLF) with Pi SLF-like proteins reveals its unique function in S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell*, 19(11), 3593-3609.
- Hua, Z., y Kao, T. H. (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), 2531-2553.

- Huang, S., Lee, H. S., Karunanandaa, B., y Kao, T. H. (1994). Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell*, 6(7), 1021-1028.
- Hussein, N. M., Yilmaz, K. A. Y. A., y Huyop, F. Z. (2020). An easy and reliable method for establishment and maintenance of tissue cultures of *Nicotiana tabacum* cv TAPM 26. *International Journal of Science Letters*, 2(2), 62-71.
- Ikeda, K., Igc, B., Ushijima, K., Yamane, H., Hauck, N. R., Nakano, R., Sassa, H., lezzoni, A. F., Kohn, J. R. y Tao, R. (2004). Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sexual Plant Reproduction*, 16(5), 235-243.
- loerger, T. R., Gohlke, J. R., Xu, B., y Kao, T. H. (1991). Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sexual Plant Reproduction*, 4(2), 81-87.
- IZARD, J. W., y Kendall, D. A. (1994). Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Molecular microbiology*, 13(5), 765-773.
- Jahnen, W., Batterham, M. P., Clarke, A. E., Moritz, R. L., y Simpson, R. J. (1989). Identification, isolation, and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *The Plant Cell*, 1(5), 493-499.
- Jahnen, W., Lush, W. M., y Clarke, A. E. (1989). Inhibition of in vitro pollen tube growth by isolated S-glycoproteins of *Nicotiana alata*. *The Plant Cell*, 1(5), 501-510.
- Jiménez-Durán, K., McClure, B., García-Campusano, F., Rodríguez-Sotres, R., Cisneros, J., Busot, G., y Cruz-García, F. (2013). NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant physiology*, 161(1), 97-107.
- Juárez-Díaz, J. A., McClure, B., Vázquez-Santana, S., Guevara-García, A., León-Mejía, P., Márquez-Guzmán, J., y Cruz-García, F. (2006). A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana alata* and reduces S-RNase in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3418-3424.
- Kao, T. H., y McCubbin, A. G. (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12059-12065.

- Kao, T. H., y Tsukamoto, T. (2004). The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell*, 16(suppl_1), S72-S83.
- Kipreos, E. T., y Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome biology*, 1(5), 1-7.
- Kobayashi, W., Sekine, S., Machida, S., y Kurumizaka, H. (2014). Green fluorescent protein fused to the C terminus of RAD51 specifically interferes with secondary DNA binding by the RAD51-ssDNA complex. *Genes & genetic systems*, 89(4), 169-179.
- Kondo, K., y McClure, B. (2008). New microsome-associated HT-family proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family. *Molecular Plant*, 1(4), 634-644.
- Kriz, A., Schmid, K., Baumgartner, N., Ziegler, U., Berger, I., Ballmer-Hofer, K., & Berger, P. (2010). A plasmid-based multigene expression system for mammalian cells. *Nature communications*, 1(1), 1-6.
- Kubo, K. I., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S. I., Ando, T., Isogai, A., Kao, T. H., y Takayama, S. (2010). Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science*, 330(6005), 796-799.
- Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G., y Xue, Y. (2002). An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant molecular biology*, 50(1), 29-41.
- Lang, J., Pankowski, J., Grabarz, P., Pluciński, B., y Jedynek, P. (2020). Comparing the effects of different exogenous hormone combinations on seed-derived callus induction in *Nicotiana tabacum*. *Acta Biochimica Polonica*, 67(4).
- Lee, H. S., Huang, S., y Kao, T. H. (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, 367(6463), 560-563.
- Li, W., y Chetelat, R. T. (2010). A pollen factor linking inter-and intraspecific pollen rejection in tomato. *Science*, 330(6012), 1827-1830.
- Liang, M., Cao, Z., Zhu, A., Liu, Y., Tao, M., Yang, H., Xu, Q., Jr., Wang, S., Liu, J., Li, Y., Chen, C., Xie, Z., Deng, C., Ye, J., Guo, W., Xu, Q., Xia, R., Larkin, R. M., Deng, X., Bosch,

- M., Franklin-Tong, V. E., y Chai, L. (2020). Evolution of self-compatibility by a mutant S-RNase in citrus. *Nature plants*, 6(2), 131-142.
- Lind, J. L., Bacic, A., Clarke, A. E., y Anderson, M. A. (1994). A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 6(4), 491-502.
 - Lind, J. L., Bönig, I., Clarke, A. E., y Anderson, M. A. (1996). A style-specific 120-kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana alata* in vivo. *Sexual Plant Reproduction*, 9(2), 75-86.
 - Luu, D. T., Qin, X., Morse, D., y Cappadocia, M. (2000). S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, 407(6804), 649-651.
 - Matsui, K., y Yasui, Y. (2020). Buckwheat heteromorphic self-incompatibility: genetics, genomics and application to breeding. *Breeding Science*, 70(1), 32-38.
 - Matton, D. P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D., y Cappadocia, M. (1997). Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *The Plant Cell*, 9(10), 1757-1766.
 - Matton, D. P., Mau, S. L., Okamoto, S., Clarke, A. E., y Newbigin, E. (1995). The S-locus of *Nicotiana alata*: genomic organization and sequence analysis of two S-RNase alleles. *Plant molecular biology*, 28(5), 847-858.
 - Matton, D. P., Nass, N., Clarke, A. E., y Newbigin, E. (1994). Self-incompatibility: how plants avoid illegitimate offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(6), 1992-1997.
 - McClure, B. (2004). S-RNase and SLF determine S-haplotype-specific pollen recognition and rejection. *The Plant Cell*, 16(11), 2840-2847.
 - McClure, B. A., Cruz-Garcia, F., Beecher, B., y Sulaman, W. (2000). Factors affecting inter-and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Annals of Botany*, 85(suppl_1), 113-123.
 - McClure, B. A., Gray, J. E., Anderson, M. A., y Clarke, A. E. (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, 347(6295), 757-760.

- McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., y Clarke, A. E. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, 342(6252), 955-957.
- McClure, B. A., Mou, B., Murfett, J. M., y Zurek, D. M. (1996). *Nicotiana glauca* SC10-RNase precursor gene, partial cds. GenBank: U45959
- McClure, B. A., y Franklin-Tong, V. (2006). Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta*, 224(2), 233-245.
- McClure, B., Cruz-García, F., y Romero, C. (2011). Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals of botany*, 108(4), 647-658.
- McClure, B., Mou, B., Canevascini, S., y Bernatzky, R. (1999). A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana glauca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13548-13553.
- McCubbin, A. G., y Kao, T. H. (1996). Molecular mechanisms of self-incompatibility. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(2), 150-154.
- McCubbin, A. G., y Kao, T. H. (1999). The emerging complexity of self-incompatibility (S-loci). *Sexual Plant Reproduction*, 12(1), 1-5.
- Meng, X., Sun, P., y Kao, T. H. (2011). S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia inflata*. *Annals of Botany*, 108(4), 637-646.
- Minamikawa, M., Kakui, H., Wang, S., Kotoda, N., Kikuchi, S., Koba, T., y Sassa, H. (2010). Apple S locus region represents a large cluster of related, polymorphic and pollen-specific F-box genes. *Plant molecular biology*, 74(1), 143-154.
- Murfett, J., Atherton, T. L., Mou, B., Gassert, C. S., y McClure, B. A. (1994). S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*, 367(6463), 563-566.
- Murfett, J., Cornish, E. C., Ebert, P. R., Bonig, I., McClure, B. A., y Clarke, A. E. (1992). Expression of a Self-Incompatibility Glycoprotein (S2-Ribonuclease) from *Nicotiana glauca* in Transgenic *Nicotiana tabacum*. *The Plant Cell*, 4(9), 1063-1074.

- Murfett, J., Ebert, P. R., Haring, V., y Clarke, A. E. (1995). An S-RNase promoter from *Nicotiana glauca* functions in transgenic *N. glauca* plants but not *Nicotiana glauca*. *Plant molecular biology*, 28(5), 957-963.
- Murfett, J., Strabala, T. J., Zurek, D. M., Mou, B., Beecher, B., y McClure, B. A. (1996). S RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *The Plant Cell*, 8(6), 943-958.
- Narayanapur, V. B., Suma, B., y Minimol, J. S. (2018). Self-incompatibility: a pollination control mechanism in plants. *International Journal of Plant Sciences (Muzaffarnagar)*, 13(1), 201-212.
- O'Brien, M., Kapfer, C., Major, G., Laurin, M., Bertrand, C., Kondo, K., Kowyama, Y., y Matton, D. P. (2002). Molecular analysis of the stilar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *The Plant Journal*, 32(6), 985-996.
- O'Brien, M., Kapfer, C., Major, G., Laurin, M., Bertrand, C., Kondo, K., Kowyama, Y., y Matton, D. P. (2002). Molecular analysis of the stilar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *The Plant Journal*, 32(6), 985-996.
- Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A., & Ghasemi, Y. (2018). A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *European journal of cell biology*, 97(6), 422-441.
- Pinheiro, F., Cafasso, D., Cozzolino, S., y Scopece, G. (2015). Transitions between self-compatibility and self-incompatibility and the evolution of reproductive isolation in the large and diverse tropical genus *Dendrobium* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 116(3), 457-467.
- Qiao, H., Wang, F., Zhao, L., Zhou, J., Lai, Z., Zhang, Y., Robbins, T. P. y Xue, Y. (2004a). The F-box protein AhSLF-S2 controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell*, 16(9), 2307-2322.

- Qiao, H., Wang, H., Zhao, L., Zhou, J., Huang, J., Zhang, Y., y Xue, Y. (2004b). The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *The Plant Cell*, *16*(3), 582-595.
- Royo, J., Kunz, C., Kowiyama, Y., Anderson, M., Clarke, A. E., y Newbigin, E. (1994). Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(14), 6511-6514.
- Sassa, H., Kakui, H., Miyamoto, M., Suzuki, Y., Hanada, T., Ushijima, K., Kusaba, M., Hirano, H., y Koba, T. (2007). S locus F-box brothers: multiple and pollen-specific F-box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics*, *175*(4), 1869-1881.
- Sassa, H., Kakui, H., y Minamikawa, M. (2010). Pollen-expressed F-box gene family and mechanism of S-RNase-based gametophytic self-incompatibility (GSI) in Rosaceae. *Sexual plant reproduction*, *23*(1), 39-43.
- Sehgal, N., y Singh, S. (2018). Progress on deciphering the molecular aspects of cell-to-cell communication in Brassica self-incompatibility response. *3 Biotech*, *8*(8), 1-17.
- Sheikholeslam, S. N., y Weeks, D. P. (1987). Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, *8*(4), 291-298.
- Shibolet, Y., y Tzfira, T. (2012). *Agrobacterium*-mediated plant genetic transformation. In *Plant biotechnology and agriculture* (pp. 99-116). Academic Press.
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S., y Kao, T. H. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, *429*(6989), 302-305.
- Silva, N. F., y Goring, D. R. (2001). Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *58*(14), 1988-2007.

- Stevens, V. A. M., y Murray, B. G. (1982). Studies on heteromorphic self-incompatibility systems: physiological aspects of the incompatibility system of *Primula obconica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 61(3), 245-256.
- Taalat, K., Javed, M. A., Huyop, F. Z., y Yilmaz, K. A. Y. A. (2021). Plant tissue culture of *Nicotiana tabacum* cv. TAPM 26 and its minimum inhibition against herbicide-Dalapon. *MANAS Journal of Engineering*, 9(Special 1), 35-42.
- Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M., Che, F. S., Watanabe, M., Iwano, M. y Isogai, A. (2001). Direct ligand–receptor complex interaction controls Brassica self-incompatibility. *Nature*, 413(6855), 534-538.
- Takayama, S., y Isogai, A. (2005). Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 467-489.
- Taylor, C. B., y Green, P. J. (1991). Genes with homology to fungal and S-gene RNases are expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 96(3), 980-984.
- Thomas, S. G., y Franklin-Tong, V. E. (2004). Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature*, 429(6989), 305-309.
- Torres-Rodríguez, M. D., Cruz-Zamora, Y., Juárez-Díaz, J. A., Mooney, B., McClure, B. A., y Cruz-García, F. (2020). NaTrxh is an essential protein for pollen rejection in *Nicotiana* by increasing S-RNase activity. *The Plant Journal*, 103(4), 1304-1317.
- Tsukamoto, T., Ando, T., Watanabe, H., Marchesi, E., y Kao, T. H. (2005). Duplication of the S-locus F-box gene is associated with breakdown of pollen function in an S-haplotype identified in a natural population of self-incompatible *Petunia axillaris*. *Plant Molecular Biology*, 57(1), 141-153.
- Unipro UGENE [software de computadora]. (2022). Obtenido de: <http://ugene.net/download-all.html>
- Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Tao, R., y Hirano, H. (2003). Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell*, 15(3), 771-781.

- Vieira, J., Fonseca, N. A., y Vieira, C. P. (2008). An S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system evolved only once in eudicots. *Journal of Molecular Evolution*, 67(2), 179-190.
- Wang, N., y Kao, T. H. (2012). Self-incompatibility in Petunia: a self/nonselself-recognition mechanism employing S-locus F-box proteins and S-RNase to prevent inbreeding. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(2), 267-275.
- Wheeler, D., y Newbigin, E. (2007). Expression of 10 S-class SLF-like genes in *Nicotiana alata* pollen and its implications for understanding the pollen factor of the S locus. *Genetics*, 177(4), 2171-2180.
- Williams, J. S., Der, J. P., dePamphilis, C. W., y Kao, T. H. (2014a). Transcriptome analysis reveals the same 17 S-locus F-box genes in two haplotypes of the self-incompatibility locus of *Petunia inflata*. *The Plant Cell*, 26(7), 2873-2888.
- Williams, J. S., Natale, C. A., Wang, N., Li, S., Brubaker, T. R., Sun, P., y Kao, T. H. (2014b). Four previously identified *Petunia inflata* S-locus F-box genes are involved in pollen specificity in self-incompatibility. *Molecular plant*, 7(3), 567-569.
- Williamson, J. D., Hirsch-Wyncott, M. E., Larkins, B. A., y Gelvin, S. B. (1989). Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant physiology*, 90(4), 1570-1576.
- Zhao, H., Zhang, Y., Zhang, H., Song, Y., Zhao, F., Zhang, Y. E., Zhu, S., Zhang, H., Zhou, Z., Guo, H., Li, M., Li, J., Gao, Q., Han, Q., Huang, H., Copsey, L., Li, Qun, Chen, H., Coen, E., Zhang, Y., y Xue, Y. (2022). Origin, loss, and regain of self-incompatibility in angiosperms. *The Plant Cell*, 34(1), 579-596.
- Zhou, J., Wang, F., Ma, W., Zhang, Y., Han, B., y Xue, Y. (2003). Structural and transcriptional analysis of S-locus F-box genes in *Antirrhinum*. *Sexual Plant Reproduction*, 16(4), 165-177.
- Zurek, D. M., Mou, B., Beecher, B., y McClure, B. (1997). Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana alata* disrupts pollen recognition. *The Plant Journal*, 11(4), 797-808.

11. ANEXOS

Anexo 1. Secuencia de *ChiP*

AGATCTCTTTTGTACTTTTCCCGTCTTCTTCATAATTCTTTAAGAATAAAACAATCGTGGTGATAATATGTT
ATGAAATTATATAAAATTTAGAAGAAGAAGAAAATAGGAAAAAGAGAAAAGATTTCTTATTTATCTTGA
AGTATATTCAGGATTCATTAATCTTTCACAAATCGTATTTACAATGAAGGAAAACCTTCATTTATAGGGAA
AACCTTACTTGGTCCCAAATAAGATTACTAACCATATCCTACAAGAACTCCACATAATTAGACATTCCT
GTAATACAAAATTGTTTATAACACATTCCATATTTGTCTCTCAAATGTGTTAACAATCACAAAGTGAAAG
CCGAACAGTAGAAATTAGTTGATCTGGTCTAAGTAATCAAGATACCAGAATGAAAGTGGAATATATATT
TTGTGATTGGCTAGCGTCAAACCTTTTAAGAAATGCATTATGCATATCCATAAGTATATTAACCTTTGTCGT
AACTGGTAATTTTGAGTAGTATAAAATTAATAAATAGACATATTCATTCTATATGACATTTTATATTTAA
GTTTTATGTTTTTATGACGTTATACGTGTATTATATCATGTAACACATTATATATTTATTTATTTTATACAA
ATTTGAATTACCTGTACAATAAATTCAAATTAATAAATAAATTATCCGCTAAAATTAATTAATAAATCA
TATTTATGTAATATGTCAAACGAAACAAAGACCAAAGTCAAACCAGTAACAAATTGTTTATTCTTTAATT
ATTATTTTAAAAAATTCTTCTCAAGACTCGGTAAAAGTCTTTTTCTGCCACTCCATTAAGTTAAAGACCG
ACTAAAATACATGTGATGTGTGGCCAAGAGCAAGCATAACACAATGGGCTGTGTTAGGTTTAATTCAAAT
TATTTTAATTTTTTTTAAAATTTGATCCATAAGTAAATAATATTATTTGTAAAATATTTTATATATTATTAG
ATAAATATTATCAAAGGTGGATGAAAAATAATAAAGAGGACACAATTAATACAAAAATGAAAAATAATA
AAGAGGACACAATTAATACAAAAGATTATTTTTGAACTTATTTTCACTATATTCCTAACATTCAGAGAC
GTTTTTTTCATTTTTAATAAACATAATCTATTAATAAAAAACATCTTCTTTTGTACCAAACAGACCAAACAA
GTCATACTTCTCCACTCAGAATAAGTTAATACATGAAAATTCAATTGAAAATTCTTCACCTCTTCGTTCTAT
ATTTTTTCTCTATAAATACCAATCATTTTCTCAATTATAATAAAAAAGAAAATAGATCT

Anexo 2. Secuencia de *mPlum*

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGAGCACATGGAGGGCTCCG
TGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCAGACCCG
CAGGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGATCATGTA
CGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGG

CTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCC
TGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGGTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAA
TGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAA
GGGCGAGATGAAGATGAGGCTGAGGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACC
TACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCCGCGCCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCC
CACAAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGCC

Anexo 3. Secuencia del péptido señal de la S_{C10}-RNasa

ATGCTTAACTCACCGCTCACATCAGTCCCTCTTCGTATTGCTTTTTGTTCTTTTCGCCATTTATGGG

Anexo 4. Secuencia de la S_{C10}-RNasa

GCATTCGAGTACATGCAACTGGTGTTACAATGGCCAACAGCTTTTTGCCACACCACTCCCTGCAAAAAGAA
TTCCAAACAACCTTTACAATCCATGGGCTTTGGCCGGATAACGTGAGCACAACTCTCAATTACTGCGCTGC
CAAAGAAAACCTTTAAAAATATAGAAGTAAGTTTAGACACTATCTTCCTAAGGACCTGTATGTTTCCATGT
TGATTTTAATTTATTTTTTTTCAGTTCAGCTTATTACTTTTCCTATATCTACAGGATGACACGAAAAAAGAT
GATCTATATAAACGCTGGCCAGACCTAACCACCGCAGAAACATATTGTAAGCAACATCAAATTTCTGGA
GACATGAATATAATAAGCACGGAAAGTGTTGTTGAGAGAGCTACAACCGAGAACAATATTTTGATTTAG
CCATGGCCTTAAAAGACAAGTTTGATCTTTTGTCATCTTTGAGAAATCACGGAATTATTCCTGGAAGGGG
AATGAAATACACCGTTCAGAAAATCAATAGCACCATCAAGAAAATAACTCAAGGGTATCCTAACCTGTCA
TGCACTAAAGGAATAATGGAACCTGTGGAGATAGGCATATGTTTCGACTCGATGGTTAAAAATGTAATT
AATTGTCCTCATCCCAAGACATGCAAACCTACGGGAAGTAATGAGATTAAGTTTCCATGACAATATGTTT
TACTTTTGCTATTTATGCTATGTAATAAAAAATGTAATATATCTAG

Anexo 5. Secuencia de ChiP_mPlum_S_{C10}

AGATCTTTTTGTACTTTTCCCGTCTTCTTCATAATTCTTTAAGAATAAAACAATCGTGGTGATAATATGTT
ATGAAATTATATAAAATTTAGAAGAAGAAGAAAATAGGAAAAAGAGAAAAGATTTCTTATTTATCTTGA

AGTATATTCAGGATTCATTAATCTTTCACAAATCGTATTTACAATGAAGGAAAACCTTCATTTATAGGGAA
AACCTTACTTGGTCCCCAAATAAGATTACTAACCATATCCTACAAGAACTCCACATAATTAGACATTCACT
GTAATACAAAATTGTTTATAACACATTCCATATTTTGTCTCTCAAATGTGTTAACAATCACAAAGTGAAAG
CCGAACAGTAGAAATTAGTTGATCTGGTCTAAGTAATCAAGATACCAGAATGAAAGTGGAATATATATT
TTGTGATTGGCTAGCGTCAAACTTTTAAGAAATGCATTATGCATATCCATAAGTATATTAACTTTGTCTGTT
AACTGGTAATTTTGTAGTAGTATAAAATTAATAAATAGACATATTCATTCTATATGACATTTTATATATAA
GTTTTATGTTTTTATGACGTTATACGTGTATTATATCATGTAACACATTATATATTTATTTATTTATACAA
ATTTGAATTACCTGTACAATAAATTCAAAATTAATAAATAAATTATCCGCTAAAATTAATAAATAAATCA
TATTTATGTAATATGTCAAACGAAACAAAGACCAAAGTCAAACCCAGTAACAAATTGTTTATTCTTTAATT
ATTATTTTAAAAAATTCTTCTCAAGACTCGGTTAAAAGTCTTTTTCTGCCACTCCATTAAGTTAAAGACCG
ACTAAAATACATGTGATGTGTGGCCAAGAGCAAGCATAACACAATGGGCTGTGTTAGGTTTAATTCAAAT
TATTTTAATTTTTTTTAAAATTTGATCCATAAGTAAATAATATTATTTGTAAAATATTTTATATATTATTAG
ATAAATATTATCAAAGGTGGATGAAAAATAATAAAGAGGACACAATTAATACAAAATGAAAAATAATA
AAGAGGACACAATTAATACAAAAGATTATTTTTGAACTTATTTTCACTATATTCCTAACATTGAGAGAC
GTTTTTTTCATTTTTAATAAACATAATCTATTAATAAATAAATCTTCTTTTGTACCAAACAGACCAAACAA
GTCATACTTCTCCACTCAGAATAAGTTAATACATGAAAATTCAATTGAAAATTCTTACCTCTTCGTTCTAT
ATTTTTTCTCTATAAATACCAATCATTTTCTCAATTATAATAAAAAGAAAATAGATCTATGCTTAACTCACC
GCTCACATCAGTCCTCTTCGATTGCTTTTTGTTCTTTTCGCCATTTATGGGATGGTGAGCAAGGGCGAG
GAGGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGAGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGA
GATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAGGCTGAAGGTGACCAAG
GGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGATCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGA
AGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGA
TGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCT
ACAAGGTGAAGGTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGC
TGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATGAAGATGAGGC
TGAGGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAGAAGCCCGTG
CAGCTGCCCGGCCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATC
GTGGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGCCGCATTGAGTACATGCAACTGGT
GTTACAATGGCCAACAGCTTTTTGCCACACCACTCCCTGCAAAGAATTCAAACAACCTTTACAATCCATG

GGCTTTGGCCGGATAACGTGAGCACAACCTCTCAATTACTGCGCTGCCAAAGAAAACCTTTAAAAATATAG
AAGTAAGTTTAGACACTATCTTCCTAAGGACCTGTATGTTCCATGTTGATTTAATTTATTTTTTTTTCAGT
TCAGCTTATTACTTTTCCTATATCTACAGGATGACACGAAAAAAGATGATCTATATAAACGCTGGCCAGA
CCTAACCACCGCAGAAACATATTGTAAGCAACATCAAATTTCTGGAGACATGAATATAATAAGCACGG
AAAGTGTGTTTCAGAGAGCTACAACCGAGAACAATATTTTGATTTAGCCATGGCCTTAAAAGACAAGTTT
GATCTTTTGTTCATCTTTGAGAAATCACGGAATTATTCCTGGAAGGGGAATGAAATACACCGTTCAGAAAA
TCAATAGCACCATCAAGAAAATAACTCAAGGGTATCCTAACCTGTCATGCACTAAAGGAATAATGGAAC
TTGTGGAGATAGGCATATGTTTCGACTCGATGGTTAAAAATGTAATTAATTGTCCTCATCCCAAGACATG
CAAACCTACGGGAAGTAATGAGATTAAGTTTCCATGACAATATGTTTTACTTTTGTCTATTTATGCTATGT
AATAAAAAATGTACTATATCTAG

Anexo 6. Secuencia de ChiP_Sc10

AGATCTCTTTTGTACTTTTCCCGTCTTCTTCATAATTCTTTAAGAATAAAACAATCGTGGTGATAATATGTT
ATGAAATTATATAAAATTTAGAAGAAGAAGAAAATAGGAAAAAGAGAAAAGATTTCTTATTTATCTTGA
AGTATATTCAGGATTCATTAATCTTTCACAAATCGTATTTACAATGAAGGAAAACCTTCATTTATAGGGAA
AACCTTACTTGGTCCCAAATAAGATTACTAACCATATCCTACAAGAACTCCACATAATTAGACATTCCT
GTAATACAAAATTGTTTATAACACATTCCATATTTTGTCTCTCAAATGTGTTAACAATCACAAAGTGAAAG
CCGAACAGTAGAAATTAGTTGATCTGGTCTAAGTAATCAAGATACCAGAATGAAAGTGGAATATATATT
TTGTGATTGGCTAGCGTCAAACTTTTAAGAAATGCATTATGCATATCCATAAGTATATTAACCTTTGTCGTT
AACTGGTAATTTTGGAGTAGTATAAAATTAATAAATAGACATATTCATTCTATATGACATTTTATATTA
GTTTTATGTTTTTATGACGTTATACGTGTATTATATCATGTAACACATTATATATTTATTTATTTTATACAA
ATTTGAATTACCTGTACAATAAATTCAAAATTAATAAATAAATTATCCGCTAAAATTAATAAATAAATCA
TATTTATGTAATATGTCAAACGAAACAAAGACCAAAGTCAAACCCAGTAACAAATTGTTTATCTTTAATT
ATTATTTTAAAAAATTCTTCTCAAGACTCGGTTAAAAGTCTTTTTCTGCCACTCCATTAAGTTAAAGACCG
ACTAAAATACATGTGATGTGTGGCCAAGAGCAAGCATAACAATGGGCTGTGTTAGGTTAATTCAAAT
TATTTAATTTTTTTTAAAATTTGATCCATAAGTAATAAATATTATTTGTAATAATTTTATATATTATTTAG
ATAAATATTATCAAAGGTGGATGAAAAATAATAAAGAGGACACAATTAATACAAAATGAAAAATAATA
AAGAGGACACAATTAATACAAAAGATTATTTTTGAACTTATTTTCACTATATTCCTTAACATTCAGAGAC

GTTTTTTCATTTTAAATAAACATAATCTATTAATAAAAAACATCTTCCTTTGTACCAAACAGACCAAACAA
GTCATACTTCTCCACTCAGAATAAGTTAATACATGAAAATTCAATTGAAAATTCTTCACCTCTTCGTTCTAT
ATTTTTCTCTATAAATACCAATCATTTTCTCAATTATAATAAAAAGAAAATAGATCTATGCTTAACTCACC
GCTCACATCAGTCCTCTTCGTATTGCTTTTTGTTCTTTGCCCCATTTATGGGGCATTTCGAGTACATGCAACT
GGTGTACAATGGCCAACAGCTTTTTGCCACACCACTCCCTGCAAAAAGAATTCCAAACAACCTTTACAATC
CATGGGCTTTGGCCGGATAACGTGAGCACAACCTCTCAATTACTGCGCTGCCAAAGAAAACCTTTAAAAAT
ATAGAAGTAAGTTTAGACACTATCTTCCTAAGGACCTGTATGTTCCATGTTGATTTAATTTATTTTTTTT
CAGTTCAGCTTATTACTTTTCTATATCTACAGGATGACACGAAAAAGATGATCTATATAAACGCTGGC
CAGACCTAACCCGCAGAAACATATTGTAAGCAACATCAAATTTCTGGAGACATGAATATAATAAGC
ACGGAAAGTGTTGTTTCAGAGAGCTACAACCGAGAACAATTTTTGATTTAGCCATGGCCTTAAAAGACA
AGTTTGATCTTTTGTATCTTTGAGAAATCACGGAATTATTCCTGGAAGGGGAATGAAATACACCGTTCA
GAAATCAATAGCACCATCAAGAAAATAACTCAAGGGTATCCTAACCTGTCATGCACTAAAGGAATAAT
GGAACCTGTGGAGATAGGCATATGTTTCGACTCGATGGTTAAAAATGTAATTAATTGTCCTCATCCCAAG
ACATGCAAACCTACGGGAAGTAATGAGATTAAGTTTCCATGACAATATGTTTTACTTTTGTCTATTTATGC
TATGTAATAAAAAATGTAATATATCTAG

Anexo 7. Alineamiento de *ChiP* y *ChiP_mPlum_Sc10* en *pK2GW7* utilizando el oligonucleótido *pK2 F*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

CHIP          agatctctttgtacttttcccgctcttcttcataattctttaagaataaaacaatcgtgg 60
CMP_enPK2_oPK2_F  -----nnnnnnnnnnnnnnncttttagatanncaatcgtgg 36
                  * * * *****

CHIP          tgataatatgttatgaaattatataaaaatttagaagaagaagaaaataggaaaagagaa 120
CMP_enPK2_oPK2_F  tgataatatgttatgaaattatataaaaatttagaagaagaagaaaataggaaaagagaa 96
                  *****

CHIP          aagatttcttattttatcttgaagtatattcaggattcattaatctttcaciaaatcgtatt 180
CMP_enPK2_oPK2_F  aagatttcttattttatcttgaagtatattcaggattcattaatctttcaciaaatcgtatt 156
                  *****

CHIP          tacaatgaaggaaaaccttcatttataggaaaaccttacttggtcccaataagatta 240
CMP_enPK2_oPK2_F  tacaatgaaggaaaaccttcatttataggaaaaccttacttggtcccaataagatta 216
                  *****

CHIP          ctaaccatatacctacaagaactccacataattagacattcactgtaatacaaaaattgttt 300
CMP_enPK2_oPK2_F  ctaaccatatacctacaagaactccacataattagacattcactgtaatacaaaaattgttt 276
                  *****

CHIP          ataacacattccatattttgtctctcaaatgtgttaacaatcacaagtgaaagccgaac 360
CMP_enPK2_oPK2_F  ataacacattccatattttgtctctcaaatgtgttaacaatcacaagtgaaagccgaac 336
                  *****

CHIP          agtagaaattagttgatctggtctaaagtaatacaagataccagaatgaaagtggaatatat 420
CMP_enPK2_oPK2_F  agtagaaattagttgatctggtctaaagtaatacaagataccagaatgaaagtggaatatat 396
                  *****

CHIP          attttgtgattggctagcgtcaaaacttttaagaaatgcattatgcatatccataagtata 480
CMP_enPK2_oPK2_F  attttgtgattggctagcgtcaaaacttttaagaaatgcattatgcatatccataagtata 456
                  *****

CHIP          ttaactttgtcgttaactggtaattttgagtagtataaaaattaaataatagacatatct 540
CMP_enPK2_oPK2_F  ttaactttgtcgttaactggtaattttgagtagtataaaaattaaataatagacatatct 516
                  *****

CHIP          attctatatgacattttatattaagttttatgtttttatgacgtttatcgtgtattat 600
CMP_enPK2_oPK2_F  attctatatgacattttatattaagttttatgtttttatgacgtttatcgtgtattat 576
                  *****

CHIP          atcatgtaaacacattatataatttatttttatacaaaattgaaattacctgtacaataa 660
CMP_enPK2_oPK2_F  atcatgtaaacacattatataatttatttttatacaaaattgaaattacctgtacaataa 636
                  *****

CHIP          attcaaaattaaataataattatccgctaaaattaaattaaaaatcatatttatgtaa 720
CMP_enPK2_oPK2_F  attcaaaattaaataataattatccgctaaaattaaattaaaaatcatatttatgtaa 696
                  *****

CHIP          tatgtcaaacgaaacaaagaccaaagtcaaaaccagtaacaaattgtttattctttaatt 780
CMP_enPK2_oPK2_F  tatgtcaaacgaaacaaagaccaaagtcaaaaccagtaacaaattgtttattctttaatt 756
                  *****

CHIP          attattttaaaaaattcttctcaagactcggttaaaagtctttttctgccactccattaa 840
CMP_enPK2_oPK2_F  attattttaaaaaattcttctcaagactcggttaaaagtctttttctgccactccattaa 816
                  *****

CHIP          gttaaagaccgactaaaatacatgtgatgtgtggccaagagcaagcatacacaaatgggct 900
CMP_enPK2_oPK2_F  gttaaagaccgactaaaatacatgtgatgtgtggccaagagcaagcatacacaaatgggct 876
                  *****

CHIP          gt-gttaggtttaattcaaattattttaa--tttttttaaaaatttgatccataagtaa 956
CMP_enPK2_oPK2_F  gtggttaggttaattcaaattattttaa--tttttttaaaaatttgatccataagtaa 936
                  ***** * *****

```

CHIP	ataatattatttgtaaaatatttt-atatattatttagataaatattatcaaaggtgga-	1014
CMP_enPK2_oPK2_F	ataatattatttgtaaaatattttatatattatttagataaatattatcaannntggga	996

CHIP	tgaaaaataataaaggagacacaattaatacaaaaatgaaaaataataaaggagacacaa	1074
CMP_enPK2_oPK2_F	tgaaaaataataaaggagacannattaatacaaaaatgaaaaataataaagan--	1054

CHIP	ttaatacaaaaagattatttttgaacttattttcactatattccttaacattcagagacg	1134
CMP_enPK2_oPK2_F	-----	1054
CHIP	tttttttcatttttaataaacataatctattaaaaaaacatcttcctttgtaccacaa	1194
CMP_enPK2_oPK2_F	-----	1054
CHIP	agaccaaaaagtcataacttctccactcagaataagttaatacatgaaaattcaattgaa	1254
CMP_enPK2_oPK2_F	-----	1054
CHIP	aattcttcacctcttcggtctatatttttctctataaataccaatcattttctcaatta	1314
CMP_enPK2_oPK2_F	-----	1054
CHIP	taataaaaagaaaatagatct	1335
CMP_enPK2_oPK2_F	-----	1054

Anexo 8. Alineamiento de *Sc10* y *ChiP_mPlum_Sc10* en *pK2GW7* utilizando el oligonucleótido **pK2 R**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oPK2_R_RC ncagggaacggcgaggtttcatntacaagggtgaagntgcbgcccnccaaactttccc 60

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oPK2_R_RC ntnncnncnccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggat 120

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oPK2_R_RC gtaccccgaggacggcgccctgaaggcgagatgaagatgaggctgaggctgaaggacgg 180

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oPK2_R_RC cggccactacgacgccgaggtcaagaccacctacatggccaagaagcccgtcagctgcc 240

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oPK2_R_RC cggcgccctacaagaccgacatcaagctggacatcacctcccacaacgaggactacacat 300

SC10 -----gcattcgagtacat 14
CMP_enPK2_oPK2_R_RC cgtggaacagtaacgagcgcgcgagggccgccactccaccggcgcgcgattcgagtacat 360
*****

SC10 gcaactggtgttacaatggccaacagctttttgccacaccactcctgcaaaagaattcc 74
CMP_enPK2_oPK2_R_RC gcaactggtgttacaatggccaacagctttttgccacaccactcctgcaaaagaattcc 420
*****

SC10 aaacaactttacaatccatgggctttggccggataacgtgagcacaactctcaattactg 134
CMP_enPK2_oPK2_R_RC aaacaactttacaatccatgggctttggccggataacgtgagcacaactctcaattactg 480
*****

SC10 cgctgccaagaaaaactttaaaaatatagaagtaagtttagacactatcttcctaaggac 194
CMP_enPK2_oPK2_R_RC cgctgccaagaaaaactttaaaaatatagaagtaagtttagacactatcttcctaaggac 540
*****

SC10 ctgtaatgtttccatgttgattttaattatTTTTTTTcagttcagcttattacttttct 254
CMP_enPK2_oPK2_R_RC ctgtaatgtttccatgttgattttaattatTTTTTTTcagttcagcttattacttttct 600
*****

SC10 atatctacaggatgacacgaaaaaagatgatctatataaacgctggccagacctaaccac 314
CMP_enPK2_oPK2_R_RC atatctacaggatgacacgaaaaaagatgatctatataaacgctggccagacctaaccac 660
*****

SC10 cgcagaaacatatgtgaagcaacatcaaaatttctggagacatgaatataataagcacgg 374
CMP_enPK2_oPK2_R_RC cgcagaaacatatgtgaagcaacatcaaaatttctggagacatgaatataataagcacgg 720
*****

SC10 aaagtgtgttcagagagctacaaccgagaacaatattttgatttagccatggccttaaa 434
CMP_enPK2_oPK2_R_RC aaagtgtgttcagagagctacaaccgagaacaatattttgatttagccatggccttaaa 780
*****

SC10 agacaagtttgatctttgtcatctttgagaaatcacggaattatcctggaaggggaat 494
CMP_enPK2_oPK2_R_RC agacaagtttgatctttgtcatctttgagaaatcacggaattatcctggaaggggaat 840
*****

SC10 gaaatacacccgttcagaaaaatcaatagcaccatcaagaaaataactcaagggtatcctaa 554
CMP_enPK2_oPK2_R_RC gaaatacacccgttcagaaaaatcaatagcaccatcaagaaaataactcaagggtatcctaa 900
*****

SC10 cctgtcatgcactaaaggaataatggaacttgtggagataggcatatgtttcgactcgat 614
CMP_enPK2_oPK2_R_RC cctgtcatgcactaaaggaataatggaacttgtggagataggcatatgtttcgactcgat 960
*****

SC10 ggtaaaaaatgtaattaattgtcctcatcccaagacatgcaaacctacgggaagtaatga 674
CMP_enPK2_oPK2_R_RC ggtaaaaaatgtaattaattgtcctcatcccaagacatgcaaacctacgggaagtaatga 1020
*****

```

```
SC10          gattaagtttccatgacaatatgttttacttttgtctatttatgctatgtaataaaaaat 734
CMP_enPK2_oPK2_R_RC  gattaagtttccatgacaatatgttttanntntnnnnnnnnngnnnnnnnn----- 1071
***** * *

SC10          gtactatatctag747
CMP_enPK2_oPK2_R_RC -----1071
```


Anexo 9. Alineamiento de la secuencia de mPlum y ChiP_mPlum_Sc10 en pK2GW7 utilizando el oligonucleótido SC10 F

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

mPlum      -----atggtgagcaagggcga      17
CMP_enPK2_oSC10_F  nnnnnnnnnnnntgctttttgttctttcgccatttatgggatggtgagcaagggcga      60
                        *****

mPlum      ggaggtcatcaaggagtctatgcttcaaggagcacatggaggctccgtgaacggcca      77
CMP_enPK2_oSC10_F  ggaggtcatcaaggagtctatgcttcaaggagcacatggaggctccgtgaacggcca      120
                        *****

mPlum      cgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgcccctacgagggcaccagaccgcccag      137
CMP_enPK2_oSC10_F  cgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgcccctacgagggcaccagaccgcccag      180
                        *****

mPlum      gctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcgctgggacatcctgtcccctcagat      197
CMP_enPK2_oSC10_F  gctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcgctgggacatcctgtcccctcagat      240
                        *****

mPlum      catgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccgcccgcacatcccgactacttgaagct      257
CMP_enPK2_oSC10_F  catgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccgcccgcacatcccgactacttgaagct      300
                        *****

mPlum      gtccttccccgagggttcaagtgggagcgctgatgaacttcgaggacggcgcgctggt      317
CMP_enPK2_oSC10_F  gtccttccccgagggttcaagtgggagcgctgatgaacttcgaggacggcgcgctggt      360
                        *****

mPlum      gaccgtgaccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaagtgagggtgcg      377
CMP_enPK2_oSC10_F  gaccgtgaccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaagtgagggtgcg      420
                        *****

mPlum      cggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggc      437
CMP_enPK2_oSC10_F  cggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggc      480
                        *****

mPlum      ctctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatgaagatgaggct      497
CMP_enPK2_oSC10_F  ctctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatgaagatgaggct      540
                        *****

mPlum      gaggctgaaggacggcgccactacgacgcccaggtcaagaccacctacatggccaagaa      557
CMP_enPK2_oSC10_F  gaggctgaaggacggcgccactacgacgcccaggtcaagaccacctacatggccaagaa      600
                        *****

mPlum      gcccgctgacgtgcccggcgccctacaagaccgacatcaagctggacatcacctcccaca      617
CMP_enPK2_oSC10_F  gcccgctgacgtgcccggcgccctacaagaccgacatcaagctggacatcacctcccaca      660
                        *****

mPlum      cgaggactacaccatcgtggaacagtacgagcgcgagggccgcccactccaccggcgc      677
CMP_enPK2_oSC10_F  cgaggactacaccatcgtggaacagtacgagcgcgagggccgcccactccaccggcgc      720
                        *****

mPlum      C-----      678
CMP_enPK2_oSC10_F  cgcattcgagtacatgcaactggtgttacaatggccaacagctttttgcccacaccactcc      780
                        *

mPlum      -----      678
CMP_enPK2_oSC10_F  ctgcaaaagaattccaaacaactttacaatccatgggctttggccgataaacgtgagcac      840

mPlum      -----      678
CMP_enPK2_oSC10_F  aactctcaattactgctgccaagaaaaactttaaaaatatagaagtaagtttagacac      900

mPlum      -----      678
CMP_enPK2_oSC10_F  tatcttctaaggacctgtatgtttccatgtgattttaatttatttttttttcagttca      960

mPlum      -----      678
CMP_enPK2_oSC10_F  gcttattacttttctctatctacnntatgacacgaaaaaanatgatctatataaacgc      1020

```

mPlum ----- 678
CMP_enPK2_oSC10_F tggcccaganctaaccnccgcannaaaacatnatttgnaagccaacaatnn 1072

Anexo 10. Alineamiento de *Sc10* y ChIP_mPlum_*Sc10* en pK2GW7 utilizando el oligonucleótido

SC10 F

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F nnnnnnnnnnnntgctttttgttctttcgccatttatgggatggtgagcaagggcga 60

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F ggaggtcatcaaggagttcatgcttcaaggagcacatggaggctccgtgaacggcca 120

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F cgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgccctacgagggcaccagaccgccag 180

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F gctgaaggtgaccaaggtggccccctgccttcgctgggacatcctgtccctcagat 240

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F catgtacggctccaaggctacgtgaagcaccgccgacatcccgcactacttgaagct 300

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F gtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggt 360

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F gaccgtgaccaggactcctcctcgagacggcgagttcatctacaagtggaagtgcg 420

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F cggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggc 480

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F ctcctccgagcggatgtacccccgaggacggcgccctgaagggcgagatgaagatgaggct 540

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F gaggtggaaggacggcggcactacgacgccgaggtcaagaccacctacatggccaagaa 600

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F gccctgcagctgcccgccctacaagaccgacatcaagctggacatcacctcccacaa 660

SC10 ----- 0
CMP_enPK2_oSC10_F cgaggactacaccatcgtggaacagtacgagcgcgccgagggccgcaactccaccggcgc 720

SC10 ----- 59
CMP_enPK2_oSC10_F -gcattcgagtacatgcaactgggtttacaatggccaacagctttttgccacaccactcc 780
cgcattcgagtacatgcaactgggtttacaatggccaacagctttttgccacaccactcc
*****

SC10 ----- 119
CMP_enPK2_oSC10_F ctgcaaaagaattccaaacaactttacaatccatgggctttggccggataaacgtgagcac 840
ctgcaaaagaattccaaacaactttacaatccatgggctttggccggataaacgtgagcac
*****

SC10 ----- 179
CMP_enPK2_oSC10_F aactctcaattactgcgctgccaagaaaaactttaaaaatagaagtaagtttagacac 900
aactctcaattactgcgctgccaagaaaaactttaaaaatagaagtaagtttagacac
*****

SC10 ----- 238
CMP_enPK2_oSC10_F tatcttcctaaggacctgtatgtttccatggtgattttaattatttttttcagtt-ca 960
tatcttcctaaggacctgtatgtttccatggtgattttaattatttttttcagttca
***** **

SC10 ----- 297
CMP_enPK2_oSC10_F gctta-ttacttttctatatctacaggatgacacgaaaaaagatgatctatataaacgc 1020
gcttattacttttctatatctacnntatgacacgaaaaaagatgatctatataaacgc
***** * *****

```

SC10	tggccagacctaaccaccgcagaaaacatatt--gtaagcaacatcaaaatcttgagac	355
CMP_enPK2_oSC10_F	tggcccagancctaaccnccgcannaaaacatnatttgnagccaacaatnn----- ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1072
SC10	atgaatataataagcacggaaagtgtttcagagagctacaaccgagaacaatattttg	415
CMP_enPK2_oSC10_F	-----	1072
SC10	atthagccatggccttaaagacaagtttgatcttttgcacatctttgagaaatcacggaa	475
CMP_enPK2_oSC10_F	-----	1072
SC10	ttattcctggaaggggaatgaaatacacccgttcagaaaatcaatagcaccatcaagaaaa	535
CMP_enPK2_oSC10_F	-----	1072
SC10	taactcaaggtatcctaacctgtcatgcactaaaggaataatggaacttgaggagatag	595
CMP_enPK2_oSC10_F	-----	1072
SC10	gcataatgttgcactcgatgggttaaaaatgtaattaattgtcctcatccaagacatgca	655
CMP_enPK2_oSC10_F	-----	1072
SC10	aacctacgggaagtaatgagattaagtttccatgacaatatgtttacttttgtctattt	715
CMP_enPK2_oSC10_F	-----	1072
SC10	atgctatgtaataaaaaatgtactatatctag	747
CMP_enPK2_oSC10_F	-----	1072

CHIP	aataataaagagg-acacaattaatacaaaaatg-aaaaataataaagagg--acacaat	1075
SMP_enPK2_oPK2_F	aaataataaagaggacacaaatthaatannaaaangaaaaanaataaaggaggaccnn	1059
	** * ** * ***** * ** **** * * * ** **	
CHIP	taatacaaaagattatTTTTgaaacttattttcactatattccttaacattcagagacgt	1135
SMP_enPK2_oPK2_F	caattaattacn-----	1071
	*** * *	
CHIP	TTTTTcattTTTtaataaacataatctattaaaaaaacatcttcttttgtaccaaaca	1195
SMP_enPK2_oPK2_F	-----	1071
CHIP	gaccaaacaagtcatacttctccactcagaataagttaatacatgaaaattcaattgaaa	1255
SMP_enPK2_oPK2_F	-----	1071
CHIP	attcttcacctcttcggtctatatttttctctataaataccaatcattttctcaattat	1315
SMP_enPK2_oPK2_F	-----	1071
CHIP	aataaaaagaaaatagatct	1335
SMP_enPK2_oPK2_F	-----	1071

Anexo 12. Alineamiento de *Sc10* y ChiP_ *Sc10* en pK2GW7 utilizando el oligonucleótido pK2 R

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SC10 ----- 0
SMP_enPK2_oPK2_R_RC tnaataccaaaaaggnnttatTTTTGAAAactttatTTTcactatattcNTTTaaCnttc 60

SC10 ----- 0
SMP_enPK2_oPK2_R_RC agagacgTTTTTTTcattTTTtaataaacataatctattAAAAAaacatcttCctttt 120

SC10 ----- 0
SMP_enPK2_oPK2_R_RC gtaccaaacagaccaacaagtcatacttctccactcagaataagttaatacatgaaaat 180

SC10 ----- 0
SMP_enPK2_oPK2_R_RC tcaattgaaaattcttcacctcttcgTtctatattTTTTtctataaataccaatcattt 240

SC10 ----- 0
SMP_enPK2_oPK2_R_RC tctcaattataataaaaagaaaatagatctatgcttaactcaccgctcacatcagTctc 300

SC10 -----gcattcgagtacatgcaactggTg 24
SMP_enPK2_oPK2_R_RC ttcgTattgctTTTTgttcttccgccatttatggggcattcgagtacatgcaactggTg 360
*****

SC10 ttacaatggccaacagctTTTTGCCacaccactccctgcaaaagaattccaaacaacttt 84
SMP_enPK2_oPK2_R_RC ttacaatggccaacagctTTTTGCCacaccactccctgcaaaagaattccaaacaacttt 420
*****

SC10 acaatccatgggcttTGGccggataacgtgagcacaactctcaattactgCGctgcaaaa 144
SMP_enPK2_oPK2_R_RC acaatccatgggcttTGGccggataacgtgagcacaactctcaattactgCGctgcaaaa 480
*****

SC10 gaaaactTTAAAAatagaagtaagTttagacactatcttCctaaggacctgtatgttt 204
SMP_enPK2_oPK2_R_RC gaaaactTTAAAAatagaagtaagTttagacactatcttCctaaggacctgtatgttt 540
*****

SC10 ccattgtgattTTAatttattTTTTTcagttcagcttattactTTTctatattctacag 264
SMP_enPK2_oPK2_R_RC ccattgtgattTTAatttattTTTTTcagttcagcttattactTTTctatattctacag 600
*****

SC10 gatgacagaaaaagatgatctatataaacgctggccagacctaacaccgcagaaaaca 324
SMP_enPK2_oPK2_R_RC gatgacagaaaaagatgatctatataaacgctggccagacctaacaccgcagaaaaca 660
*****

SC10 tattgtaagcaacatcaaaatttctggagacatgaatataataagcacggaaagtgtTg 384
SMP_enPK2_oPK2_R_RC tattgtaagcaacatcaaaatttctggagacatgaatataataagcacggaaagtgtTg 720
*****

SC10 tcagagagctacaaccgagaacaatattTtgatttagccatggccttaaagacaagTtt 444
SMP_enPK2_oPK2_R_RC tcagagagctacaaccgagaacaatattTtgatttagccatggccttaaagacaagTtt 780
*****

SC10 gatctttTgcatctTtgagaaatcacggaattattcctggaaggggaatgaaatacacc 504
SMP_enPK2_oPK2_R_RC gatctttTgcatctTtgagaaatcacggaattattcctggaaggggaatgaaatacacc 840
*****

SC10 gttcagaaaatcaatagcaccatcaagaaaataactcaagggtatcctaacctgtcatgc 564
SMP_enPK2_oPK2_R_RC gttcagaaaatcaatagcaccatcaagaaaataactcaagggtatcctaacctgtcatgc 900
*****

SC10 actaaaggaataatggaactTgtggagataggcatatgTtTcgactcgatggttaaaaat 624
SMP_enPK2_oPK2_R_RC actaaaggaataatggaactTgtggagataggcatatgTtTcgactcgatggttaaaaat 960
*****

SC10 gtaattaattgtcctcatcccaagacatgcaaacctacgggaagtaatgagattaagTtt 684
SMP_enPK2_oPK2_R_RC gtaattaattgtcctcatcccaagacatgcaaacctacgggaagtaatgagattaagTtt 1020
*****

```


Anexo 13. Alineamiento de *Sc10* y ChIP_ *Sc10* en pK2GW7 utilizando el oligonucleótido SC10 F

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

SC10	-----gcattcgagtacatgc	16
SMP_enPK2_oSC10_F	nnnnnnnnnnnnatgntttttgttctttcgccatttatggggcattcgagtacatgc *****	60
SC10	aactgggtgtacaatggccaacagctttttgccacaccactccctgcaaaagaattccaa	76
SMP_enPK2_oSC10_F	aactgggtgtacaatggccaacagctttttgccacaccactccctgcaaaagaattccaa *****	120
SC10	acaactttacaatccatgggctttggccggataacgtgagcacaactctcaattactgcg	136
SMP_enPK2_oSC10_F	acaactttacaatccatgggctttggccggataacgtgagcacaactctcaattactgcg *****	180
SC10	ctgccaaagaaaactttaaaaatagaaagtaagtttagacactatcttcctaaggacct	196
SMP_enPK2_oSC10_F	ctgccaaagaaaactttaaaaatagaaagtaagtttagacactatcttcctaaggacct *****	240
SC10	gtatgtttccatggtgattttaattttttttcagttcagcttattacttttctat	256
SMP_enPK2_oSC10_F	gtatgtttccatggtgattttaattttttttcagttcagcttattacttttctat *****	300
SC10	atctacaggatgacacgaaaaagatgatctatataaacgctggccagacctaacaccg	316
SMP_enPK2_oSC10_F	atctacaggatgacacgaaaaagatgatctatataaacgctggccagacctaacaccg *****	360
SC10	cagaaacatatgtgaagcaacatcaaaaatttctggagacatgaatataataagcacggaa	376
SMP_enPK2_oSC10_F	cagaaacatatgtgaagcaacatcaaaaatttctggagacatgaatataataagcacggaa *****	420
SC10	agtgttgttcagagagctacaaccgagaacaatattttgatttagccatggccttaaaag	436
SMP_enPK2_oSC10_F	agtgttgttcagagagctacaaccgagaacaatattttgatttagccatggccttaaaag *****	480
SC10	acaagtttgatcttttgtcatctttgagaaatcacggaattattcctggaaggggaatga	496
SMP_enPK2_oSC10_F	acaagtttgatcttttgtcatctttgagaaatcacggaattattcctggaaggggaatga *****	540
SC10	aatacaccggttcagaaaatcaatagcaccatcaagaaaataactcaagggtatcctaacc	556
SMP_enPK2_oSC10_F	aatacaccggttcagaaaatcaatagcaccatcaagaaaataactcaagggtatcctaacc *****	600
SC10	tgtcatgcactaaaggaataatggaacttgtggagataggcatatgtttcgactcgatgg	616
SMP_enPK2_oSC10_F	tgtcatgcactaaaggaataatggaacttgtggagataggcatatgtttcgactcgatgg *****	660
SC10	ttaaaaatgtaattaattgtcctcatccaagacatgcaaacctacgggaagtaatgaga	676
SMP_enPK2_oSC10_F	ttaaaaatgtaattaattgtcctcatccaagacatgcaaacctacgggaagtaatgaga *****	720
SC10	ttaagtttccatgacaatatgttttacttttctatattatgctatgtaataaaaaatgt	736
SMP_enPK2_oSC10_F	ttaagtttccatgacaatatgttttacttttctatattatgctatgtaataaaaaatgt *****	780
SC10	actatatctag-----	747
SMP_enPK2_oSC10_F	actatatctagccccggcgacggatggtgatccccctggccagtgacgctctgctgtcag *****	840
SC10	-----	747
SMP_enPK2_oSC10_F	ataaagctcccgtgaactttaccgggtggtgcataatcggggatgaaagctggcgcatga	900
SC10	-----	747
SMP_enPK2_oSC10_F	tgaccaccgatatggccagtgtgccggtctccggttatcggggaagaagtggctgatctca	960
SC10	-----	747
SMP_enPK2_oSC10_F	gccaccgcgaaaaatgacatcaaaaaacccattaacctgatgtttctgggggaaatata	1020

SC10	-----	747
SMP_enPK2_oSC10_F	aatgncnncttcccnnaatacnnccagnnnnnnnn	1058