



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**BÚSQUEDA DE GENES DE LA FAMILIA PLT, RELACIONADOS
A LA PARTENOGENÉESIS, EN PASTO LLORÓN**

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS:

PRESENTADA POR:

Uriel Suárez

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS:

Dres. Diego Zappacosta y José Carballo

Bahía Blanca, Noviembre 2023

**BÚSQUEDA DE GENES DE LA FAMILIA PLT, RELACIONADOS A LA
PARTENOGENÉISIS, EN PASTO LLORÓN**

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS:

PRESENTADA POR:

Uriel Suárez

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS:

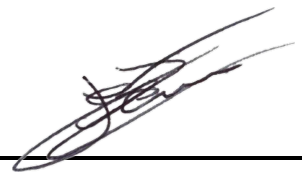
Dres. Diego Zappacosta y José Carballo



Suarez, Uriel



Zappacosta Diego



Carballo, José

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al apoyo incondicional de mi familia. Gracias a su respaldo y confianza, me permitieron estudiar y alcanzar este importante logro.

Agradezco también a mis amigos y amigas, quienes fueron mis pilares, estando a mi lado en todo momento. Sin ellos, esta experiencia sin lugar a dudas no hubiera sido la misma.

Quiero dedicar un agradecimiento especial a mis directores, el Dr. Diego Zappacosta y el Dr. José Carballo, por su dedicación, orientación y paciencia durante la realización de este trabajo. Además, agradezco al Dr. Juan Pablo Selva por su valioso aporte, su experiencia y su guía fueron fundamentales para lograr los objetivos.

También agradezco a la Dra. Viviana Echenique por aceptar ser mi profesora consejera y orientarme en el momento que más lo necesité.

Un agradecimiento especial a mi gata llamada Venus, por su inagotable compañía y por brindar momentos de tranquilidad y alegría durante las intensas jornadas de estudio.

También, expreso mi gratitud hacia todos aquellos que, de una u otra manera, contribuyeron a mi formación.

Por último y no menos importante, quiero expresar mi agradecimiento a la EDUCACIÓN PÚBLICA por brindarme la oportunidad de estudiar, formarme y adquirir los conocimientos necesarios.

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Resumen	5
Introducción	6
Reproducción	6
Importancia de la apomixis	7
Componente genético de la partenogénesis	8
Familia de genes PLETHORA (PLT)	9
<i>Eragrostis curvula</i>	9
Hipótesis	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos.....	12
Materiales y métodos	13
Material vegetal	13
Búsqueda de ortólogos en base de datos	13
Diseño de cebadores	13
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	13
Clonado de fragmentos amplificados	14
Aislamiento de plásmidos y secuenciación	15
Resultados y discusión	16
Búsqueda en bases de datos de genes de la familia PLT en arroz	16
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
Clonado de fragmentos amplificados	20
Análisis de las secuencias clonadas	21
Conclusión	25
Bibliografía	26
Anexos	28

RESUMEN

Las plantas con flores exhiben una notable flexibilidad reproductiva, pudiendo reproducirse tanto sexual como asexualmente. En la reproducción sexual, se produce la doble fertilización en la cual los gametos de cada sexo, reducidos por meiosis, se fusionan para dar origen al embrión y el endosperma respectivamente. No obstante, algunas angiospermas optan por estrategias reproductivas distintas, formando el embrión sin meiosis ni fecundación, generando descendientes genéticamente idénticos a la planta madre; este fenómeno se conoce como apomixis. En la apomixis, la falta de meiosis (apomeiosis) y la ausencia de fecundación dan lugar al embrión por partenogénesis. La manipulación de la apomixis tiene como objetivo fijar la heterosis para rasgos de interés, presuponiendo que los híbridos apomícticos mantendrán su potencial y constitución multigénica compleja a lo largo de generaciones mediante la propagación clonal por semilla.

Eragrostis curvula, también conocido como pasto llorón, es una pastura perteneciente a la familia Poaceae. Es originario de Sudáfrica y se ha naturalizado en regiones semiáridas de Argentina. Esta especie presenta diversos citotipos con distintas ploidías (2x-8x) y diferentes modos reproductivos, incluyendo apomícticos obligados, facultativos y sexuales. Uno de los elementos clave en la apomixis es la partenogénesis, un proceso poco conocido a nivel genético. En investigaciones previas en *Pennisetum squamulatum*, se identificó que el gen PsASGR-BABY BOOM-like, también llamado PLT6, el cual desempeña un papel crucial como determinante de la partenogénesis, encontrándose en múltiples copias en una región ligada a la apomixis.

Actualmente, *E. curvula* cuenta con extensos recursos de secuenciación genética, transcriptómica y epigenética, lo que nos permite determinar la expresión y la posible función de la familia Plethora (PLTs), que incluye a BBM. El presente estudio se enfocó en la búsqueda de genes ortólogos a la familia de genes PLTs de arroz en *E. curvula*.

En primer lugar se tomaron los genes de la familia de PLTs de arroz de bases de datos y se buscaron ortólogos en pasto llorón. Se realizó un alineamiento de los genes y se construyó un árbol filogenético. Posteriormente, se diseñaron cebadores específicos para obtener amplicones de genotipos con diferentes modos reproductivos (sexual: OTA-S, apomíctico facultativo: Don Walter y apomíctico obligado: Tanganyika). Los amplicones fueron clonados, secuenciados y analizados en busca de diferencias. Los resultados revelaron la presencia de los genes PLT5 y PLT6 tanto en el genotipo sexual OTA-S como en los genotipos apomícticos facultativos Don Walter y obligados Tanganyika. Se confirmó la presencia de los genes PLTs en genotipos de *E. curvula*, respaldando la hipótesis de conservación de la familia PLT en la familia Poaceae. Además, se identificaron variaciones alélicas en PLT5 y PLT6, resaltando la diversidad genética de *E. curvula* y sugiriendo posibles implicaciones en la regulación y expresión génica asociadas a la partenogénesis.

Introducción

Reproducción

Las plantas con flores, conocidas como angiospermas, presentan una notable flexibilidad reproductiva, lo que les permite llevar a cabo tanto la reproducción sexual como la asexual. En el típico proceso de reproducción sexual, durante la formación del saco embrionario (gametofito femenino), la célula madre de la megaspora (CMM) experimenta una división meiótica, dando lugar a cuatro megasporas reducidas (n) dispuestas en forma lineal. Normalmente las tres megasporas que están más cerca del micrópilo degeneran, mientras que la restante continúa el proceso de formación del gametofito. Esta megaspora en crecimiento experimenta tres divisiones mitóticas sucesivas, lo que resulta en un saco embrionario (SE) que contiene un total de ocho núcleos. Posteriormente, se forman las paredes celulares diferenciándose siete células: tres antípodas situadas en el extremo del SE próximo a la chalaza, dos sinérgidas, la oosfera u ovocélula (situadas cerca del micrópilo) y finalmente una célula central en la que se encuentran los dos núcleos llamados polares (Figura 1A).

Una vez formado el gametofito femenino, se produce un proceso crucial denominado doble fecundación, en el cual uno de los núcleos del grano de polen (gametofito masculino) se fusiona con la oosfera, dando lugar a un cigoto $2n$ que se desarrollará posteriormente para formar el embrión de la semilla (Figura 1B). Otro núcleo del gametofito masculino se fusiona con los dos núcleos reducidos de la célula central, resultando en un núcleo triploide ($3n$) que dará lugar al endospermo (Cortés Benavides, 1985). A través de múltiples divisiones mitóticas, se forma finalmente una semilla madura que contendrá tanto el embrión como el endospermo.

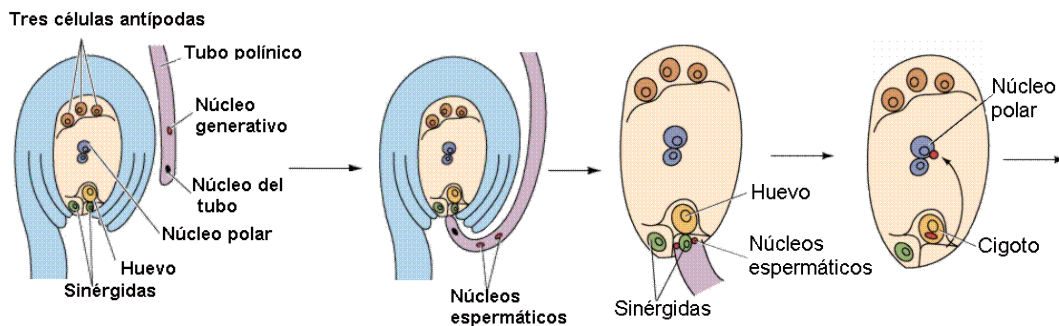


Figura 1. Posición de células y núcleos en el saco embrionario y tubo polínico. Proceso de doble fecundación (Tomado de <http://www.biologia.edu.ar/plantas/flores.htm>).

Es importante destacar que la formación del SE descrito es el proceso más frecuente en las angiospermas para la formación de semillas. Sin embargo, no todas las angiospermas siguen este patrón reproductivo. Algunas utilizan estrategias reproductivas alternativas que les permiten generar descendientes genéticamente idénticos a la planta madre, es decir, clones. Estas formas alternativas de reproducción asexual por semilla se conocen como apomixis (Bicknell et al., 2016).

La apomixis en plantas se puede clasificar en esporofítica, en la cual el embrión se forma a partir de células somáticas del tegumento del óvulo, o gametofítica en la cual el SE desarrolla a partir de la CMM o células no reducidas del nucelo. A su vez la apomixis gametofítica se divide en diplospórica o apospórica dependiendo de si el SE desarrolla a partir de la CMM o de células del nucelo, respectivamente.

La apomixis está constituida por tres componentes claves: apomeiosis (falta de meiosis), partenogénesis (desarrollo del embrión sin fecundación) y pseudogamia. En el contexto de la apomixis diplospórica, la apomeiosis es el proceso central que distingue este fenómeno. La CMM, en lugar de someterse a una reducción meiótica, lleva a cabo 2 o 3 divisiones mitóticas sucesivas. Este evento conduce a la formación de un SE que contiene un número variable de núcleos no reducidos ($2n$), estableciendo la base para el desarrollo apomítico de la semilla.

En las plantas apomíticas el endospermo puede formarse a partir de la fusión de los núcleos polares presentes en el SE con un núcleo espermático proveniente del polen (pseudogamia) o, esta fusión no es necesaria, y el endospermo se desarrolla de manera autónoma.

Por otro lado, la partenogénesis es un aspecto distintivo de la apomixis gametofítica. Esta, se caracteriza por la ausencia de fecundación resultando en el desarrollo del embrión sin la necesidad de la contribución de gametos masculinos. Este proceso, junto con la apomeiosis, lleva a la producción de descendientes genéticamente idénticos a la planta madre.

Importancia de la apomixis

Comprender los mecanismos genéticos que regulan la apomixis no solo reviste una gran importancia en el ámbito de la biología evolutiva, sino que también podría generar un profundo impacto en la agricultura. Se ha estimado que los beneficios derivados de este conocimiento podrían superar ampliamente los logros de la revolución verde (Grossniklaus et al., 1998). Uno de los objetivos primordiales de manipular la apomixis está relacionado al mejoramiento vegetal con la posibilidad de asegurar la heterosis en la primera generación de cruzamientos (F_1) para la incorporación de rasgos de interés (Kumar et al., 2017). La eliminación de la reproducción sexual y, por ende, la recombinación genética, permitiría la consolidación de combinaciones genéticas favorables. La utilización de esta tecnología se convertiría en una herramienta sumamente valiosa para el mejoramiento genético. Cualquier combinación genética que albergue características deseables y porte los factores que gobiernan la apomixis podría mantenerse o multiplicarse como una réplica exacta durante innumerables generaciones a través de la multiplicación por semillas. Esto eliminaría la necesidad de realizar cruzamientos anuales en las especies donde se utilizan híbridos.

La implementación de esta tecnología aceleraría la producción de semillas, además de reducir significativamente los costos de producción de híbridos a gran escala. Esto, a su vez, facilitaría la propagación por semilla de variedades que han demostrado ser comercialmente exitosas y suelen propagarse vegetativamente por sus niveles de heterosis.

Componente genético de la partenogénesis

Uno de los componentes de la apomixis es la partenogénesis (desarrollo espontáneo de un embrión a partir de un óvulo no fecundado). Debido al gran interés que existe sobre este proceso, se han llevado a cabo esfuerzos para identificar los genes involucrados en la partenogénesis.

Durante mucho tiempo se pensó que la partenogénesis en las angiospermas es un proceso disparado por la apomeiosis y se desconocía si ocurre independientemente de ella. Además, se supuso que el control genético de la partenogénesis y la apomeiosis dependían de un solo gen (maestro) o de un locus con genes estrechamente vinculados (Mogie, 1992). Sin embargo, algunos modelos genéticos (Richards, 1970; Nogler, 1984; Asker y Jerling, 1992), el mapeo genético y otros estudios (Vijverberg y van Dijk, 2007; Hand y Koltunow, 2014), muestran que la partenogénesis es capaz de segregarse de la apomeiosis en algunas especies apomícticas. Una de las primeras pruebas de esto proviene de cruzamientos en el diente de león (*Taraxacum officinale*), donde se observó que la partenogénesis, la apomeiosis y la formación autónoma del endospermo se regulan independientemente (van Dijk et al., 1999). Poco después, se demostró la herencia separada de apomeiosis y partenogénesis en *Erigeron annuus* (Noyes, 2000; Noyes y Rieseberg, 2000). Otros estudios posteriores confirmaron la existencia de un locus determinante de la formación autónoma del endospermo, que se halla separado de los que regulan la apomeiosis y la partenogénesis (Noyes et al., 2007).

Aunque es poco conocida su base genética, en *Pennisetum squamulatum*, se halló un locus fuertemente ligado a la partenogénesis, en el cual se encuentran múltiples copias de un gen de la familia de BBM (Conner et al., 2015). A este locus se lo denominó región genómica específica de la aposporia (ASGR; apospory-specific genomic region). Plantas transgénicas con el gen *PsASGR-BABY BOOM-like* (*PsASGR-BBML*) pueden inducir partenogénesis en el pariente sexual tetraploide *Pennisetum glaucum*, respaldando su función. En un estudio más reciente, se demostró en plantas transgénicas de arroz y maíz que el gen *PsASGR-BBML* también es capaz de inducir partenogénesis en óvulos reducidos (Conner et al., 2017). Esto demuestra claramente que la partenogénesis es completamente funcional en contextos reducidos y no reducidos, y confirma que la partenogénesis es capaz de actuar independientemente de la ploidía de la ovocélula.

El gen *PsASGR-BBML* forma parte de la familia de los PLTs los cuales cuentan con al menos un dominio APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF). En *Arabidopsis thaliana*, existen ocho genes aintegumenta-like (AIL) dentro de los cuales se encuentran los genes BBM, AINTEGUMENTA (ANT) y PLETHORA (PLT) (Horstman et al., 2014). La secuencia de la proteína *PsASGR-BBML* es muy similar a otros genes BBML de especies apomícticas relacionadas: *Cenchrus ciliaris* y *Pennisetum* spp., pero también a los genes BBM en *Setaria italica* (mijo cola de zorro), *Oryza sativa* (arroz), *Zea mays* y *Sorghum bicolor* (Conner et al., 2015). Se descubrió que el gen BBM1 de arroz (Os-BBM1) también es capaz de iniciar la embriogénesis en óvulos no fecundados en plantas de arroz transgénicas (Khanday et al., 2019). Esto respalda la estrecha relación entre *PsASGR-BBML* con Os-BBM1 y su funcionalidad asociada a la partenogénesis.

Familia de genes PLETHORA (PLTs)

La familia de genes Plethora (PLTs) comprende un conjunto de 10 genes que codifican factores de transcripción con el dominio AP2. Entre las funciones de algunos de estos genes se destacan: La regulación del desarrollo embrionario y la embriogénesis en plantas, incluyendo funciones esenciales para la proliferación y el mantenimiento de las CMM entre otras (Luongt et al., 2021).

La similitud funcional y estructural entre estos genes y PsASGR-BABY BOOM-like (también conocido como PLT6) es fundamental para comprender los mecanismos detrás de la partenogénesis y la apomixis en plantas. Se han identificado 10 miembros de OsPLT en arroz (Figura 2). Según este análisis, el patrón de expresión de los genes OsPLT podría clasificarse en tres tipos: preferencial de raíz (OsPLT1-5), preferencial de tallo (OsPLT7-9) y preferencial de semillas (OsPLT6 y OsPLT10). Los patrones de expresión de cada gen, como OsPLT2-5 en raíz primaria y base del tallo, OsPLT1 en distintos tejidos, y OsPLT10 en semilla, indican funciones diferenciadas en el desarrollo vegetal (Luongt et al., 2021).

Eragrostis curvula

El pasto llorón, originario de Sudáfrica y miembro de la familia Poaceae, se ha extendido por todo el mundo gracias a sus excepcionales características como planta forrajera y su habilidad para estabilizar médanos en entornos áridos con suelos arenosos. Esta gramínea, se distingue por su notable rusticidad, demostrando su capacidad para prosperar en suelos con baja fertilidad, al mismo tiempo que consolida terrenos de textura suelta propensos a la erosión. En Argentina, se cultiva extensamente como forraje en la zona semiárida templada del país, con un potencial para abarcar una superficie que supera las 252.000 hectáreas de pasto llorón implantado, según datos del INDEC en 2018.

Esta especie comprende un conjunto de citotipos con diferentes niveles de ploidía, que van desde 2X hasta 8X (donde X = 10), siendo los diploides raros en la naturaleza, y la mayoría son poliploides, existiendo además formas aneuploides (Meier, 2019). Esta especie forrajera, se ha convertido en un modelo para el estudio de la apomixis, ya que presenta genotipos sexuales, apomícticos obligados y apomícticos facultativos en los cuales coexisten en una misma planta sacos embrionarios sexuales y apomícticos. *Eragrostis curvula* presenta una forma única de desarrollo del SE conocida como tipo Eragrostis. Esta peculiaridad se distingue por la ausencia completa de meiosis y la realización de dos rondas de mitosis en lugar de tres durante el desarrollo del SE. La falta de una ronda de mitosis produce un SE tetranucleado en el cual se diferencian el núcleo polar, dos sinérgidas y la ovocélula. Este desarrollo del SE se caracteriza por mantener la misma relación de ploidía entre el embrión (2n) y el endospermo (3n), tanto en semillas originadas por sexualidad como por apomixis, un rasgo muy deseable para la potencial transferencia de la apomixis a otras especies de importancia económica, ya que desbalances en esta relación pueden provocar semillas inviables (Voigt y Bashaw, 1976). Este tipo de apomixis ha convertido a *E. curvula* en un modelo excepcional para el estudio y la transferencia de este carácter (Carballo et al., 2021).



Figura 2. Analisis de la secuencia y dominios de los genes PLETHORA de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<https://www.ncbi.nlm.nih>).

Esta especie comprende un conjunto de citotipos con diferentes niveles de ploidía, que van desde 2X hasta 8X (donde X = 10), siendo los diploides raros en la naturaleza, y la mayoría son poliploides, existiendo además formas aneuploides (Meier, 2019). Esta especie forrajera, se ha convertido en un modelo para el estudio de la apomixis, ya que presenta genotipos sexuales, apomícticos obligados

y apomícticos facultativos en los cuales coexisten en una misma planta sacos embrionarios sexuales y apomícticos. *Eragrostis curvula* presenta una forma única de desarrollo del SE conocida como tipo Eragrostis. Esta peculiaridad se distingue por la ausencia completa de meiosis y la realización de dos rondas de mitosis en lugar de tres durante el desarrollo del SE. La falta de una ronda de mitosis produce un SE tetranucleado en el cual se diferencian el núcleo polar, dos sinérgidas y la ovocélula. Este desarrollo del SE se caracteriza por mantener la misma relación de ploidía entre el embrión ($2n$) y el endospermo ($3n$), tanto en semillas originadas por sexualidad como por apomixis, un rasgo muy deseable para la potencial transferencia de la apomixis a otras especies de importancia económica, ya que desbalances en esta relación pueden provocar semillas inviables (Voigt y Bashaw, 1976). Este tipo de apomixis ha convertido a *E. curvula* en un modelo excepcional para el estudio y la transferencia de este carácter (Carballo et al., 2021).

El pasto llorón, sigue siendo un objeto de interés destacado en la investigación biológica debido a su asombrosa diversidad reproductiva y las valiosas aplicaciones que posee en el ámbito agrícola. Actualmente, *E. curvula* dispone de una rica colección de recursos de secuenciación genética, transcriptómica y epigenética que podrían servir como una base fundamental para la identificación de la familia de genes ortólogos a los PLTs de arroz, que incluye a BBML. Estos recursos genómicos y transcriptómicos representan una oportunidad para avanzar en la comprensión de los mecanismos que participan en los procesos de la apomixis en esta especie.

Hipótesis:

La familia de genes PLT esta conservada en la familia Poaceae y está presente en genotipos apomícticos de *E. curvula*.

Objetivos:

Objetivo general:

Identificar y clasificar la familia de los PLTs en *E. curvula*. Estudiar *in silico* la presencia/ausencia de genes de la familia PLT en *E. curvula* y utilizando cebadores diseñados sobre secuencias genómicas de genotipos sexuales y apomícticos.

Objetivos específicos:

1. Búsqueda en bases de datos de genes de la familia PLT en especies de la familia Poaceae, como por ejemplo, arroz.
2. Identificación de los PLTs en pasto llorón a través de análisis bioinformáticos sobre bases de datos disponibles en nuestro laboratorio.
3. Analizar comparativamente la estructura de los genes y la filogenia.
4. Diseñar cebadores para amplificar regiones específicas de los genes en distintos genotipos de pasto llorón.
5. Analizar la secuencia de los genes amplificados en genotipos de *E. curvula*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron plantas de los genotipos Don Walter (DW, apomítico facultativo), Tanganyika (T, apomítico obligado) y OTA-S (OTA, sexual), tomadas de la colección de germoplasma existente en el CERZOS-CCT Bahía Blanca. Las plantas utilizadas en esta tesis se encuentran en macetas de 3 L en el invernadero del CERZOS con riego periódico, fotoperiodo natural y a una temperatura de 25 +/- 5°C.

Búsqueda de ortólogos en base de datos

Con el fin de identificar los genes ortólogos de la familia de los PLTs en *E. curvula*, se consultaron las bases de datos de la especie la cual cuenta con la anotación de los dominios para cada uno de los genes. De esta forma, se aislaron todas las secuencias que contienen el dominio AP2/ERF (pfam ID.00847) en los genotipos Victoria y Don Walter. Para clasificar la familia de los PLTs en *E. curvula*, se utilizaron los genes previamente identificados en arroz (Li et al., 2011). Para ello, se descargaron las secuencias codificantes de los PLTs de arroz desde la base de datos Ensembl Plants (EMBL-EBI, 2023). Luego, se empleó el software Bioedit (Hall, 1999) para realizar alineamientos de pares entre las secuencias de los PLTs de arroz y las obtenidas con dominio AP2/ERF en *E. curvula*. Finalmente, se construyeron árboles filogenéticos utilizando MEGAX (Kumar et al., 2018) con el modelo Maximum Likelihood para cada uno de los genotipos pudiendo identificar y clasificar los genes ortólogos a los PLTs de arroz en *E. curvula*.

Diseño de cebadores

En el proceso de diseño de cebadores, se empleó la herramienta PrimerQuest (www.idtdna.com). Para asegurar la eficacia y especificidad de los cebadores se siguieron los parámetros estándar proporcionados por el software. Como punto de partida para el diseño de cebadores se utilizaron las secuencias genómicas obtenidas a partir del análisis del árbol filogenético. Se generó un par de cebadores, uno en sentido directo (forward) y otro en sentido inverso (reverse), para cada una de las secuencias genómicas seleccionadas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con los cebadores diseñados, se realizaron reacciones de PCR con ADN de distintos genotipos de *E. curvula* utilizando un ciclador BioRad MyCycler. El ciclo de PCR consistió de una desnaturalización inicial del ADN durante 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificación de 30 seg a 94°C, 30 seg a 58°C y 30 seg a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. Para garantizar la especificidad de los cebadores, se calculó la temperatura de hibridación (annealing) de manera que fuera menor o igual a la temperatura más baja de fusión (Melting) de todos los pares de cebadores utilizados. Una vez obtenidos los productos de PCR, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8) a voltaje constante de 90V. Para la

visualización de los fragmentos de ADN, se utilizó el colorante Eco gel, y los geles se revelaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador. Luego se analizaron los tamaños de los fragmentos usando como referencia un marcador de peso molecular conocido (DNA ladder 100 pb, Genbiotech).

Clonado de fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados por PCR fueron clonados en vectores pGEM®-T Easy (Promega) para su posterior incorporación en bacterias, purificación del plásmido y secuenciación. Para realizar la ligación de los productos de PCR, se empleó el kit pGEM®-T Easy siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (Tabla 2). Además, se realizó un control positivo (previsto por el kit), y un control negativo. Los reactivos se mezclaron por pipeteo y se incubaron durante toda la noche a 4°C, siguiendo el protocolo para obtener el número máximo de transformaciones.

Tabla 2. Composición de la reacción de clonado con el kit pGEM®-T Easy.

2X Buffer de ligado rápido, T4 ADN ligasa	1,75 µl
pGEM - T Easy Vector (50ng)	0,35 µl
T4 ADN ligasa	0,35 µl
Producto de PCR	1,1 µl

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli* cepa DH5α competentes, previamente tratadas con Ca²⁺. Para la transformación, se tomaron 50 µL de bacterias, se les agregó el producto de la ligación (3,55 µl) y se realizó un shock térmico para aumentar la permeabilidad de las membranas celulares y permitir que las bacterias incorporaran los plásmidos con los genes de interés. Este procedimiento se realizó de la siguiente manera:

1. Se colocaron los tubos en un baño de hielo y se incubaron durante 20 min.
2. Se realizó el shock térmico transfiriendo los tubos a un baño de agua a 42°C durante 45-50 seg, evitando agitar los tubos.
3. Luego, los tubos se volvieron a colocar sobre hielo y se incubaron durante 2 min.

Al finalizar el procedimiento, se adicionaron 600 µl de medio LB sin ampicilina a cada tubo, lo que permite a las células transformadas expresar el gen de resistencia a la ampicilina presente en el plásmido. Posteriormente, los tubos se incubaron a 37°C durante 60 min con agitación (150 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la centrifugación de los tubos a 3500 rpm para eliminar el sobrenadante. Luego, se recolectaron los sedimentos celulares (pellets) y se sembraron 50 µl de cada uno de los tubos en cajas de Petri previamente preparadas con medio LB selectivo.

Para el cultivo de las bacterias se prepararon placas de Petri con medio LB selectivo que consistió en 200 ml de medio LB con agar, a la que se agregaron 0,32 ml de X-gal (50 mg/ml), 0,2 ml de ampicilina (100 mg/ml) y 1 ml de IPTG 0,12 M. El crecimiento selectivo de las bacterias transformadas se produce por la presencia en el medio del antibiótico de selección. Luego, el sistema IPTG/ X-gal es el que permite distinguir las bacterias que solo tienen el vector (azules) de aquellas que tienen vector+inserto (blancas). Se tomaron 3 colonias blancas de cada una de las 7 placas de Petri pertenecientes a las bacterias transformadas con el producto de ligación. Estas

colonias se transfirieron a tubos individuales que contenían 5 ml de medio LB líquido con ampicilina. En total, se prepararon 21 tubos para este procedimiento, los cuales se incubaron en agitación a 37°C durante toda la noche.

Purificación del ADN plasmídico (Miniprep)

Se utilizó el kit DNA Puriprep P-kit (Inbio Highway®). Al comenzar, se tomaron 1,5 ml de cada tubo de cultivo de bacterias y se sometieron a una centrifugación de 2 min a 12.000 g, se descartó el sobrenadante y se volvió a agregar cultivo de bacterias repitiendo este proceso tres veces. Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet (sedimentos bacterianos) en un total de 250 µl de buffer BR, que contenía ARNasa, luego se utilizó un vórtex para asegurar que no queden cúmulos sin resuspender. Después, se agregaron 250 µl de buffer BL y se agitaron 5 veces por inversión, evitando el uso del vortex para prevenir la degradación del ADN plasmídico. Se incubó la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 350 µl de buffer BN para neutralizar el lisado y se invirtió el tubo varias veces, lo que produjo la formación de un precipitado blanco. Finalmente, la muestra se centrifugó durante 10 min a 12.000 g.

Para la purificación del plásmido se realizaron las siguientes etapas:

1. Colocar una columna en un tubo colector individual para cada uno de los 21 tubos.
2. Transferir el sobrenadante de cada tubo a su respectiva columna, con especial cuidado para evitar que pasen rastros de sedimento. Luego, se centrifugó durante 1 min a 12.000 g.
3. Vaciar el tubo colector y volver a colocar la columna en él.
4. Agregar sobre las paredes de la columna 500 µl de buffer BLav1. Centrifugar 1 min a 12.000g. Descartar el filtrado. Colocar la columna en el tubo colector.
5. Agregar sobre las paredes de la columna 700 µl de buffer BLav2. Centrifugar 1 min a 12.000g. Descartar el filtrado. Colocar la columna en el tubo colector.
6. Realizar una segunda centrifugación de 3 min a 12.000 g para eliminar cualquier resto de buffer BLav2.
7. Colocar las columnas en tubos de 1,5 ml etiquetados y dejarlos destapados durante 15 min para permitir la evaporación de los restos de etanol.
8. Agregar 50 µl de agua en cada columna y dejar incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
9. Finalmente, se centrifugó durante 2 min a 12.000 g para provocar la elución del ADN plasmídico en el tubo.
10. Los plásmidos obtenidos se conservaron a -20°C para su posterior uso

Para evaluar la calidad de los fragmentos genómicos insertos en los plásmidos obtenidos, se llevó a cabo la digestión de los plásmidos con la enzima de restricción *EcoRI*, seguida de una electroforesis en geles de agarosa al 1,5%.

Una alícuota de los plásmidos fue enviada para ser secuenciada utilizando los servicios de Secuenciación de Macrogen (Corea del Sur).

Resultados y Discusión

Búsqueda en bases de datos de genes de la familia PLT en arroz

Para clasificar la familia de los PLTs en *E. curvula*, se utilizaron los genes previamente identificados en arroz (Tabla 1, Li y Xue, 2011).

Tabla 1. Miembros de la familia de genes Plethora (PLT) en *Oryza sativa*. Modificado de Li y Xue (2011).

Gen	TIGR locus ID	pares de bases (pb)	Dominio
OsPLT1	LOC_Os04g55970	3887	AP2
OsPLT2	LOC_Os06g44750	3363	AP2
OsPLT3	LOC_Os02g40070	4145	AP2
OsPLT4	LOC_Os04g42570	3874	AP2
OsPLT5	LOC_Os01g67410	3676	AP2
OsPLT6	LOC_Os11g19060	4863	AP2
OsPLT7	LOC_Os03g56050	3394	AP2
OsPLT8	LOC_Os07g03250	4689	AP2
OsPLT9	LOC_Os03g12950	3722	AP2
OsPLT10	LOC_Os03g07940	4148	AP2

Con el objetivo de identificar genes ortólogos a la familia de los PLTs de arroz que albergan el dominio AP2/ERF, se localizaron en las bases de datos de *E. curvula* aquellos genes que poseen el dominio (Pfam PF00847). Se identificaron 367 genes pertenecientes al genotipo DW y 140 al genotipo Victoria. Ya que no todos los genes que contienen el dominio AP2/ERF corresponden con PLTs (i.e.; todos los PLTs tienen dominio AP2/ERF pero no todos los genes que contienen AP2/ERF son PLTs), se realizó un primer filtrado generando arboles filogenéticos y descartando aquellos genes que no agruparon con los PLTs de arroz. Para realizar un análisis comparativo de las proteínas, se llevaron a cabo alineamientos de a pares utilizando el software BioEdit (ANEXO A). Este proceso implicó la comparación entre las secuencias de los PLTs de arroz y aquellas obtenidas con dominio AP2/ERF en *E. curvula* para los genotipos DW (Figura 3) y Victoria (Figura 4).

410 420 430 440 450 460 470 480 490

LOC OsPLT1
LOC OsPLT2
LOC OsPLT3
LOC OsPLT4
LOC OsPLT5
LOC OsPLT6
LOC OsPLT7
LOC OsPLT8
LOC OsPLT9
LOC OsPLT10
maker-ScA7Agc_33-augustus-gene
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro
maker-ScA7Agc_731-augustus-gen
maker-ScA7Agc_1380-snap-gene-0
maker-ScA7Agc_573-snap-gene-0
maker-ScA7Agc_815-snap-gene-89
maker-ScA7Agc_718-augustus-gen
maker-ScA7Agc_2019-augustus-gen
maker-ScA7Agc_718-snap-gene-48
maker-ScA7Agc_718-snap-gene-90

410 420 430 440 450 460 470 480 490

LOC OsPLT1
LOC OsPLT2
LOC OsPLT3
LOC OsPLT4
LOC OsPLT5
LOC OsPLT6
LOC OsPLT7
LOC OsPLT8
LOC OsPLT9
LOC OsPLT10
maker-ScA7Agc_33-augustus-gene
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro
maker-ScA7Agc_731-augustus-gen
maker-ScA7Agc_1380-snap-gene-0
maker-ScA7Agc_573-snap-gene-89
maker-ScA7Agc_718-augustus-gen
maker-ScA7Agc_2019-augustus-gen
maker-ScA7Agc_718-snap-gene-48
maker-ScA7Agc_718-snap-gene-90

Figura 3. Alineamiento de secuencias proteicas del genotipo Don Walter con dominio AP2/ERF con PLTs de arroz.

410 420 430 440 450 460 470 480 490

LOC OsPLT1
LOC OsPLT2
LOC OsPLT3
LOC OsPLT4
LOC OsPLT5
LOC OsPLT6
LOC OsPLT7
LOC OsPLT8
LOC OsPLT9
LOC OsPLT10
maker-Contig10-snap-gene-122.2
maker-Contig10-snap-gene-191.2
maker-Contig10-snap-gene-124.3
augustus_masked-Contig12-proce
augustus_masked-Contig8-proce
augustus_masked-Contig3-proce
maker-Contig6-augustus-gene-40
maker-Contig3-snap-gene-416.22
maker-Contig6-augustus-gene-38
maker-Contig6-augustus-gene-42
maker-Contig30-augustus-gene-2
maker-Contig12-augustus-gene-3
maker-Contig38-snap-gene-68.4

410 420 430 440 450 460 470 480 490

LOC OsPLT1
LOC OsPLT2
LOC OsPLT3
LOC OsPLT4
LOC OsPLT5
LOC OsPLT6
LOC OsPLT7
LOC OsPLT8
LOC OsPLT9
LOC OsPLT10
maker-Contig10-snap-gene-122.2
maker-Contig10-snap-gene-191.2
maker-Contig10-snap-gene-124.3
augustus_masked-Contig12-proce
augustus_masked-Contig8-proce
augustus_masked-Contig3-proce
maker-Contig6-augustus-gene-40
maker-Contig3-snap-gene-416.22
maker-Contig6-augustus-gene-38
maker-Contig6-augustus-gene-42
maker-Contig30-augustus-gene-2
maker-Contig12-augustus-gene-3
maker-Contig38-snap-gene-68.4

Figura 4. Alineamiento entre secuencias proteicas del genotipo Victoria con dominio AP2/ERF con PLTs de arroz.

Los resultados de los alineamientos de proteínas de los genes de DW y los genes de Victoria, comparados con las secuencias proteicas de los PLTs de arroz, revelan la conservación y presencia del dominio AP2. Es relevante señalar que, aunque el PLT9 de arroz ha sido clasificado como PLT, durante este análisis no se identificó el dominio AP2.

A continuación, se generaron árboles filogenéticos mediante el software MEGA X (Kumar et al., 2018) utilizando el modelo de Maximum Likelihood (Figura 5). El análisis de estos árboles tuvo como objetivo identificar qué PLTs, previamente identificados en arroz, se corresponden con las secuencias genéticas identificadas en *E. curvula*. Este proceso resultó fundamental para el diseño de nuevos cebadores destinados a amplificar estas regiones específicas en los genotipos de DW, OTA y T.

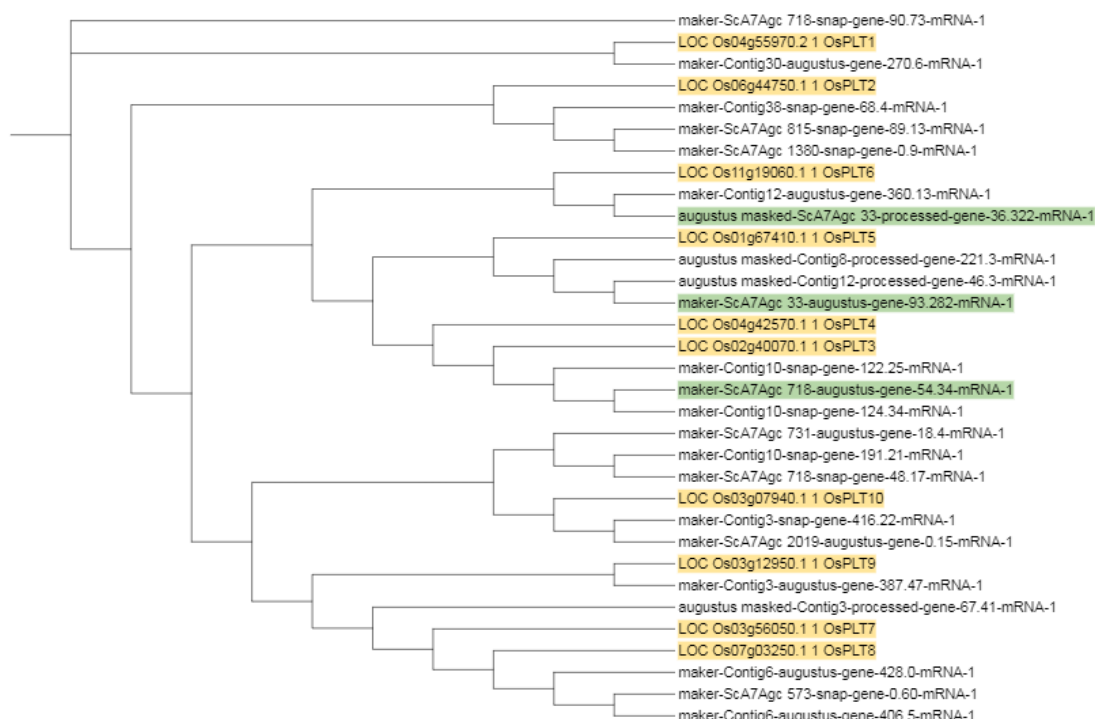


Figura 5. Árbol filogenético entre PLTs de arroz y genes con dominio AP2 de Don Walter y Victoria utilizando el modelo de Maximum Likelihood. Se observan remarcados en amarillo los PLTs identificados en arroz y remarcados con verde los genes utilizados para la generación de cebadores.

El análisis filogenético de los PLTs demostró que, si bien existen algunos agrupamientos ambiguos, los 10 genes PLTs de arroz tendrían un gen ortólogo en *E. curvula*. Algunos genes de arroz, entre ellos el PLT5 y PLT6 que corresponden a BBM3 y BBM1 respectivamente, presentaron agrupación inequívoca con los genes hallados en los genotipos DW y Victoria. De este análisis se generaron los cebadores que se utilizaron para la amplificación de los fragmentos de PLTs en ADN.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de los genes PLT 3, 5.3 y 6.3 se diseñaron y utilizaron los cebadores de la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores específicos utilizados la amplificación de los PLT 3, 5 y 6 en los genotipos Don Walter, OTA-S y Tanganyika.

Primers	Secuencia	Temperatura de Melting
PLT 3 Forward	CAAGCAAGGATAGGGAGAGTTG	62°C
PLT 3 Reverse	CCAGTTGTTGGCGGAGTAG	64°C
PLT 3qPCR	TACCAGTTCTCGCAGGGAT	58°C
PLT 5 Forward	TGCTTCAACATCCCTCAAGAT	60°C
PLT 5 Reverse	CCAGCTCCTTCTCGTAGTTATTT	66°C
PLT 6 Forward	GCACAGATGGACAGGAAGAT	60°C
PLT 6 Reverse	CCCTTCCAATTCTTGCTTGC	60°C

Se logró amplificar el fragmento esperado con los cebadores diseñados de PLT 3F/R, 3.5q F/R, 5.3 F/R y 6.3 F/R. En el caso del PLT 3, se obtuvo únicamente la amplificación de la secuencia dentro del genotipo T (Figura 6). Para el PLT 3q, solo se observó la amplificación perteneciente al genotipo DW (Figura 6). En cuanto a los cebadores para los PLT 5 (Figura 6) y PLT 6 (Figura 7), se logró la amplificación en los tres genotipos evaluados.

El hecho de que los genes PLT5 y PLT6, asociados previamente con la partenogénesis, estén presentes en los tres genotipos estudiados, donde el genotipo OTA es sexual, sugiere que las variaciones en los mecanismos de reproducción podrían atribuirse a diferencias en la expresión de estos genes o a otros mecanismos regulatorios.



Figura 6. Gel de agarosa al 1% donde se observa la amplificación con los cebadores diseñados para los PLT en genotipos de *E. curvula* (flechas naranjas). Calles 1 a 4: PLT 3 en los genotipos DW, OTA y T y blanco. Calles 5 a 8: PLT 3q en los genotipos DW, OTA y T y blanco. Calles 9 a 12: PLT 5 en los genotipos DW, OTA y T y blanco.. Calle L: Marcador de peso molecular 100pb (flecha azul indica fragmento de 500 pb).

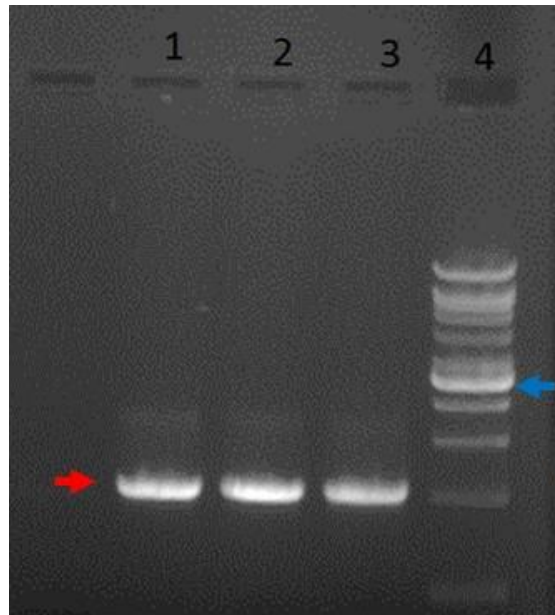


Figura 7. Gel de agarosa al 1% donde se observa el fragmento amplificado (flecha roja) con los cebadores diseñados para el PLT 6 en los genotipos Don Walter (calle 1), OTA-S (2) y T (3). Calle 4: Marcador de peso molecular 500 pb (flecha indica fragmento de 2500 pb).

Clonado de fragmentos amplificados

Se seleccionaron las colonias de bacterias que fueron transformadas con el fragmento amplificado por PCR (colonias blancas). Para chequear la inserción del fragmento deseado se llevó a cabo la digestión de los plásmidos con la enzima *EcoRI*, seguida de una electroforesis en gel para evaluar la calidad de los fragmentos genómicos insertos en los plásmidos obtenidos. En la Figura 8 se observa que solo dos colonias de las bacterias evaluadas no presentaron el plásmido con el inserto (3 y 4), observándose en el gel solo el plásmido (una sola banda).



Figura 8. Gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio donde se observa la digestión de los plásmidos aislados de *E. coli*. Calle 1: Marcador de peso molecular 500 pb. Calles 2 a 4: Colonias con fragmento PLT 3 de T. Calles 5 a 7: Colonias con fragmento PLT 5 de OTA. Calles 8 a 10: Colonias con fragmento PLT 5 de DW. Calles 11 a 13: Colonias con fragmento PLT.3 de T. Calle 14: Plásmido control positivo. Calles 15 a 17: Colonias con fragmento PLT 6 de OTA. Calles 18 a 20: Colonias con fragmento PLT 6 de DW. Calles 21 a 23: Colonias con fragmento PLT 6 de T. Calle 24: Plásmido control positivo.

Análisis de las secuencias clonadas

Se recibieron las secuencias para cada uno de los 19 plásmidos que presentaron el fragmento de interés. Utilizando el software BioEdit se limpiaron, eliminando las secuencias pertenecientes al plásmido y los sectores con mala calidad de secuenciación.

Luego, las secuencias de los fragmentos amplificados por los cebadores por PLT5 y PLT6 fueron sometidas a un análisis detallado para su caracterización. Estas secuencias fueron alineadas con el gen del cual derivaron los cebadores, con el objetivo de destacar posibles variaciones presentes en el exón, que pudieran tener un impacto en la expresión génica. Se utilizó BioEdit (Salón, 2017) con la herramienta de alineación múltiple ClustalW (Figuras 9 y 10).

Si bien se encontraron diferencias entre genotipos y la secuenciación se realizó por triplicado, existen errores inherentes al propio proceso de secuenciación que podrían generar inserciones y deleciones que no son reales. Sin embargo, y con fines exploratorios a continuación se detallan todas las diferencias encontradas en la secuenciaciones realizados en los PLT 5 y PLT 6.

Realizando un análisis de la Figura 9, se pueden constatar las siguientes diferencias:

- **PLT5 de DW replica 1:** Difiere en una base en las posiciones (pc) 189, 480, 818, 1537 y 1553. Todos los genotipos presentan una deleción en pc 275 y 637 .
- **PLT5 de T rep. 2:** Difiere en una base en pc 331.
- **PLT5 de DW rep. 2 y PLT5 de OTA rep. 1:** Difieren en una base con respecto a las demás secuencias en pc 407.
- **PLT5 de OTA rep. 1 y PLT5 de OTA rep. 2:** Difieren en una base con respecto a las demás secuencias en pc 782.
- **PLT5 de T rep. 3:** Difiere en una base en pc 1357 y 1530.
- **PLT5 de DW rep. 2, PLT5 de DW rep. 3, PLT5 de OTA rep. 1 y PLT5 de OTA rep. 2:** Difieren en una base en pc 1375 y 1543.
- **PLT5 de T rep. 1, PLT5 de T rep. 2 y PLT5 de T rep. 3:** Difieren en una base en pc 1483.

Considerando todas las diferencias observadas, se puede deducir que el PLT5 ortólogo de *E. curvula* presenta 8 alelos distintos.

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

DW PLT5 rep.1 AGCCGCTAGAGCTTATGATTGGCTGCTCTGAAGTACTGGGGTCCACGACCAACAATTTCCGGTATGTTGATAT GTATTACTGAAGAJ
 DW PLT5 rep.2 AGCCGCTAGAGCTTATGATTGGCTGCTCTGAAGTACTGGGGTCCACGACCAACAATTTCCGGTATGTTGATAT GCACTCTGAAGAJ
 DW PLT5 rep.3 AGCCGCTAGAGCTTATGATTGGCTGCTCTGAAGTACTGGGGTCCACGACCAACAATTTCCGGTATGTTGATAT GCACTCTGAAGAJ
 OTa PLT5 rep.1 AGCCGCTAGAGCTTATGATTGGCTGCTCTGAAGTACTGGGGTCCACGACCAACAATTTCCGGTATGTTGATAT GCACTCTGAAGAJ
 OTa PLT5 rep.2 AGCCGCTAGAGCTTATGATTGGCTGCTCTGAAGTACTGGGGTCCACGACCAACAATTTCCGGTATGTTGATAT GCACTCTGAAGAJ
 Tusda PLT5 rep.1 AGCCGCTAGAGCTTATGATTGGCTGCTCTGAAGTACTGGGGTCCACGACCAACAATTTCCGGTATGTTGATAT GCAGTATTACTGAAGAJ
 Tusda PLT5 rep.2 AGCCGCTAGAGCTTATGATTGGCTGCTCTGAAGTACTGGGGTCCACGACCAACAATTTCCGGTATGTTGATAT GCAGTATTACTGAAGAJ
 Tusda PLT5 rep.3 AGCCGCTAGAGCTTATGATTGGCTGCTCTGAAGTACTGGGGTCCACGACCAACAATTTCCGGTATGTTGATAT GCAGTATTACTGAAGAJ
 maker-ScA7Aac 694-snap-gene-0. AGCCGCTAGAGCTTATGATTGGCTGCTCTGAAGTACTGGGGTCCACGACCAACAATTTCCGGTATGTTGATAT GCAGTATTACTGAAGAJ

Figura 9, Secuencias consenso de PLT5 y exon del gen de *E. curvula* del cual se generaron los cebadores.

110 120 130 140 150 160 170 180 190

Tusda PLT6 rep.1 CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCAATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTATCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAATGGTTCTT A1
 Tusda PLT6 rep.2 CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCAATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTATCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAATGGTTCTT A1
 Tusda PLT6 rep.3 CCTCTGTAATTCATATAAAATTATGCAATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTATCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAATGGTTCTT A1
 DW PLT6 rep.1 CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCAATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTATCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAATGGTTCTT A1
 DW PLT6 rep.2 CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCAATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTATCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAATGGTTCTT A1
 DW PLT6 rep.3 CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCAATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTATCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAATGGTTCTT A1
 OTa PLT6 rep.1 CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCAATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTATCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAATGGTTCTT A1
 OTa PLT6 rep.2 CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCAATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTATCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAATGGTTCTT A1
 OTa PLT6 rep.3 CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCAATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTATCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAATGGTTCTT A1
 augustus_masked-ScA7Aac_33-pro CTAAGTTTCCAATGGTTCTT A1

210 220 230 240 250 260 270 280 290

Tusda PLT6 rep.1 ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ
 Tusda PLT6 rep.2 ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ
 Tusda PLT6 rep.3 ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ
 DW PLT6 rep.1 ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ
 DW PLT6 rep.2 ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ
 DW PLT6 rep.3 ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ
 OTa PLT6 rep.1 ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ
 OTa PLT6 rep.2 ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ
 OTa PLT6 rep.3 ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ
 augustus_masked-ScA7Aac_33-pro ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAAGTAAGTTACACAAATGCAGTCAATTTTGCATTTCTTGGCACTCTGTGCTGAJ

310 320 330 340 350 360 370 380 390

Tusda PLT6 rep.1 GAATATGACATTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ
 Tusda PLT6 rep.2 GAATATGACATTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ
 Tusda PLT6 rep.3 GAATATGACATTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ
 DW PLT6 rep.1 GAATATGACATTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ
 DW PLT6 rep.2 GAATATGACATTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ
 DW PLT6 rep.3 GAATATGACATTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ
 OTa PLT6 rep.1 GAATATGACATTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ
 OTa PLT6 rep.2 GAATATGACATTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ
 OTa PLT6 rep.3 GAATATGACATTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ
 augustus_masked-ScA7Aac_33-pro GGATACGATAAAGAGAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACTJ

510 520 530 540 550 560 570 580 590

Tusda PLT6 rep.1 GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ
 Tusda PLT6 rep.2 GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ
 Tusda PLT6 rep.3 GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ
 DW PLT6 rep.1 GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ
 DW PLT6 rep.2 GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ
 DW PLT6 rep.3 GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ
 OTa PLT6 rep.1 GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ
 OTa PLT6 rep.2 GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ
 OTa PLT6 rep.3 GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ
 augustus_masked-ScA7Aac_33-pro ACCGAAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGCTCJ

1010 1020 1030 1040 1050 1060

Tusda PLT6 rep.1 TATCAACTGTTCTTGTAAAATATAGGCACCAACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG
 Tusda PLT6 rep.2 TATCAACTGTTCTTGTAAAATATAGGCACCAACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG
 Tusda PLT6 rep.3 TATCAACTGTTCTTGTAAAATATAGGCACCAACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG
 DW PLT6 rep.1 TATCAACTGTTCTTGTAAAATATAGGCACCAACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG
 DW PLT6 rep.2 TATCAACTGTTCTTGTAAAATATAGGCACCAACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG
 DW PLT6 rep.3 TATCAACTGTTCTTGTAAAATATAGGCACCAACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG
 OTa PLT6 rep.1 TATCAACTGTTCTTGTAAAATATAGGCACCAACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG
 OTa PLT6 rep.2 TATCAACTGTTCTTGTAAAATATAGGCACCAACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG
 OTa PLT6 rep.3 TATCAACTGTTCTTGTAAAATATAGGCACCAACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG
 augustus_masked-ScA7Aac_33-pro CACCACAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAAATGGAAAGGG

Figura 10. Alineamiento de secuencias consensos de PLT6 y exón del gen de *E. curvula* del cual se generaron los cebadores.

Considerando todas las diferencias observadas, se puede deducir que el PLT6 tendría 5 alelos distintos en *E. curvula*.

Analizando la Figura 10, se observan las siguientes diferencias:

- **PLT6 de T rep. 3:** Difiere en una base con respecto a los demás en pc. 177, 180, 191, 206, 395, 524, 578.
- **PLT6 de DW rep. 2 y PLT6 de DW rep. 3:** Comparten una inserción en pc. 194.
- **PLT6 de DW rep. 1:** Difiere en una base en pc. 593.
- **PLT6 de OTA rep. 1 y PLT6 de OTA rep. 3:** Difieren en una base con respecto a las demás en pc. 598.
- **PLT6 de T rep. 2:** Difiere en una base con respecto a las demás en pc. 1029.

Teniendo en cuenta que tanto el PLT5 como el PLT6 están presentes tanto en el genotipo sexual (OTA) como en los genotipos apomícticos facultativos (DW) y obligados (T), si bien puede existir errores de secuenciación, estos resultados sugieren que las variaciones alélicas identificadas en la secuencia codificante del gen podrían desempeñar un papel significativo en la expresión genética y la regulación de la partenogénesis en los distintos modos reproductivos de *E. curvula*. Para poder determinar si las variaciones encontradas en este trabajo son reales o producto de errores de secuenciación, se planea aumentar el número de réplicas con el fin de concluir con mayor certeza sobre el origen de las secuencias.

Conclusión

Se concluye que los genes PLTs están presentes en genotipos de *E. curvula* apomícticos como no apomícticos, lo cual respalda la hipótesis de la conservación de la familia PLT en la familia Poaceae, reforzando la importancia evolutiva y funcional de los PLTs. La presencia de estos PLT5 y PLT6 sugiere que la partenogénesis en *E. curvula* también podría estar regulada por estos genes, sin embargo, para poder confirmar esto son necesarios análisis de la expresión temporal y espacial de estos genes.

El descubrimiento de alelos de PLT5 y PLT6 dentro de *E. curvula* resalta la diversidad genética de esta especie. Estas variaciones genéticas sugieren posibles implicaciones en la regulación y expresión génica de la partenogénesis, lo que abre nuevas perspectivas para investigaciones futuras sobre la expresión y función específica de estos genes.

Bibliografía

- Asker, S. & Jerling L. (1992). Apomixis in Plants. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Bicknell, R.A. & Koltunow, A.M. (2004). Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell* 16, S228-S245.
- Carballo, J., Zappacosta, D., Selva, J.P., Caccamo, M. & Echenique, V. (2021). *Eragrostis curvula*, a model species for diplosporous apomixis. *Plants* 10, 1818.
- Conner, J.A., Mookkan, M., Huo, H., Chae, K. & Ozias-Akins, P. (2015). A parthenogenesis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. *Proceeding National Academy of Sciences U.S.A.* 112, 11205-11210.
- Conner, J.A. & Ozias-Akins, P. (2017). Apomixis: engineering the ability to harness hybrid vigor in crop plants. *Methods in Molecular Biology* 1669, 17-34.
- Cortés Benavides, F. (1985). Cuadernos de histología vegetal (2ª ed.). Marbán.
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.P., Hoepfner, M. & Gagliano, W. (1998). Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in Arabidopsis. *Science* 280, 446.
- Hand, M.L., & Koltunow, A.M. (2014). The genetic control of apomixis: Asexual seed formation. *Genetics* 197, 441–450.
- Horstman, A., Willemsen, V., Boutilier, K. & Heidstra, R. (2014). AINTEGUMENTA-Like proteins: hubs in a plethora of networks. *Trends Plant Science* 19, 146–157.
- Khanday, I., Skinner, D., Yang, B., Mercier, R. & Sundaresan, V. (2018). A male- expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds. *Nature* 565, 91–95.
- Kumar, S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547.
- Kumar, S. (2017). Epigenetic control of apomixis: A new perspective of an old enigma. *Advances in Plants and Agriculture Research*, 7, 00243.
- Li, P. & Xue, H. (2011). Structural characterization and expression pattern analysis of the rice PLT gene family. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43, 688–697.
- Luong, A.M., Adam, H., Gauron, C., Affortit, P., Ntakirutimana, F., Khong, N.G., Le, Q.H., Le, T.N., Fournel, M., Lebrun, M., Tregear, J. & Jouannic, S. (2021). Functional diversification of euANT/PLT genes in determining the panicle architecture of *Oryza sativa*. *Frontiers in Plant Science* 12, 692955.
- Meier, M.S. (2019). Localización genómica de regiones asociadas a la diplosporía a través de mapeo genético de alta densidad y determinación de la herencia del carácter en *Eragrostis curvula*. Tesis de Doctorado en Agronomía, Universidad Nacional del Sur.

Mogie, M. (1992). The Evolution of Asexual Reproduction in Plants. London: Chapman & Hall.

Nogler, G. A. (2007). The discovery of parthenogenesis: a long journey to the truth. En: Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives, Vol. 147, eds E. Hörandl, U. Grossniklaus, P. J. van Dijk, and T. F. Sharbel (Ruggell: Gantner Verlag), pag. 25-35.

Noyes, R.D., Baker, R. & Mai, B. (2007). Mendelian segregation for two-factor apomixis in *Erigeron annuus* (Asteraceae). Heredity, 98, 92-98.

Noyes, R.D. (2000). Biogeographical and evolutionary insights on *Erigeron* and allies (Asteraceae) from ITS sequence data. Plant Systematics and Evolution, 220, 93-114.

Noyes, R.D. & Rieseberg, L.H. (2000). Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. Genetics, 155, 379–390.

Richards, A.J. (1970). Eutriploid facultative agamospermy in *Taraxacum*. New Phytologist, 69, 761-774.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.

van Dijk, P. J., Tas, I. C., Falque, M., and Bakx-Schotman, T. (1999). Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). II. The breakdown of apomixis. Heredity 83, 715–721.

Vijverberg, K., and van Dijk, P. J. (2007). Genetic linkage mapping of apomixis loci. En: Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives, Vol. 147, eds E. Hörandl, U. Grossniklaus, P. J. van Dijk, and T. F. Sharbel (Ruggell: Gantner Verlag), pag. 137-158.

Voigt, P.W. & Bashaw, E.C. (1976). Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. Crop Science, 16, 803–806.

Anexo

A)

```
LOC OsPLT1
LOC OsPLT2
LOC OsPLT3
LOC OsPLT4
LOC OsPLT5
LOC OsPLT6
LOC OsPLT7
LOC OsPLT8
LOC OsPLT9
LOC OsPLT10
maker-ScA7Agc_33-augustus-gene
augustus masked-ScA7Agc_33-pro
maker-ScA7Agc_731-augustus-gene
maker-ScA7Agc_1380-snap-gene-0
maker-ScA7Agc_573-snap-gene-0
maker-ScA7Agc_718-augustus-gene
maker-ScA7Agc_2019-augustus-gene
maker-ScA7Agc_718-snap-gene-48
maker-ScA7Agc_718-snap-gene-90

10 20 30 40 50 60 70 80 90
-----MDMDTSHHYF--WLNFSLAHHCMEEEE-----
-----MASANNWLGFSLSGQENPQP--HQDSSPPAA--IDVSGAGDFYGLPTSQPTAADAHLGVAHGHHNASYGIMEAFI
-----MASADNWLGFSLSGQGNPQH--HQNGSPSAAGDAIDISGSGDFYGLPTPD--AHHIGMAGED--APYGVMDAFI
-----MATMNNWLAFSLSPQDLPPSQTNSTLISA--AATTTTAGDSSTGI
-----MASITNWLGFSSSSFSAGADPVLPHPP--L
MASGNSSSSSSGSMAATAGG--VGGWLGFSLSPHMATYCAAGVDDVGHHHHHVHQHQQQHGGGLFYIPAAVASSFYGGGHDAVVTSAAGGGS
-----MASGGGSSNWLGFSLSPHPAMEVP-----
-----MRHRQAQAS-----CRTTDHLRRSKTIS
-----MSTVNNWVPFSLFPQG--LPLSQDTSALISA--ATT--DDVSGI
-----MGSANNWL--AAAGFSAGAVP-----
-----MDMMSSTYPHHWLSFSLSNYNNHGLEAFSN-----
MTNNNGSSNNGGGVSNGGSSNAASGWLGFSLSPHMASSTMD--DHHHHVQQQQHQHQHGG--LFFPSVTAAYGLGAGGDVATSSP--
-----MDMMSSTYPHHWLSFSLSNYNNHGLEAFSN-----
-----MASANNWLGFSLSGQENAPNHQDASPAAG--IDISGSGDFYGLPTQP--ASDGHGGLVDH--ASYGIMEAFI
MDMNN--GWLGFSLSSAAAR--GYGDGGGGGSGSGDGGSCSSPAA--
-----IPVSVSLDREKSTG-----
-----MSPP1

110 120 130 140 150 160 170 180 190
-----RGAAAEALAAIAGAAP-----PPKLEDFLGGCNGGS-----
EADQWNMRGLDYNGGSELMLVSSGGK--RAAAVEE--TEPKLEDFLGGNSFVSEQDHH--AAI
ETQDWAMRGLDYGGSSDLMLVSSGGG--RRTVAGDGVGEAPKLENFLDGNFSFDVHQ--AAI
IPQDWSMRGSELALVA--EPKLEDFLGGISFSEQHHGKGKGVIPSSAAACVASSGSSVGLYPPPSI
AYEGGGTVAAAGGEETA--APKLEDFLGMQ--
FSSMPLKSDGSLCIMEALRGDQEQQGVV--VSASPKLEDFLGAGP--AMALSLDNSAFYYGGHHGQGHQAQGGVAGGDPHHG
SSSEPSTAHHHHHHHP--PAAAAAGAMS
MASTSWAHR--TQWRRRR--CTTPAAAAAASSTDPCRS--PAS--SRGSG--
IPQVWSMRGSELSEPV--EPKLEDFLGGISFSEQ--HRKATSSIMVASSSTSYASSRSAGYQDP--
-----SHGEE--PPKLEDFLGVQ--
-----MAATEPRSPGPTATPA--PPPPPEERHG--
-----SSAPQLGEEGAVEE--TPKMEFLGG--
LASMPKSDGSLCIMEALRRSDQDHG--PKLEDFLGAAQSQAMALSLDNASSFY--YHYGGG--AAGVGGGHHHGG
-----SSAPQLGEEGAVEE--TPKMEFLGG--
ETQDWNIRGMDYNGGSELMLVSSGGGGGGNGKRAVEDQ--SEPKLEDFLGGNSFVSEQDQ--
LVAMPQLSDGSLPYGSPDWRAE--AKGPKLEDFMSVTCNSKSGSMQDADQAKYHEVHDLPQLGSSYYYHHGSGGG
AANKSSTSHRSGTRQLP--PRARATSSQRE--
LARRAYPRAGGLPPDAL--LFPFVDSFPAEDFFVAD--PK

210 220 230 240 250 260 270 280 290
GGACPPVQTAPTAAELYESELKFLAAGFQLSGAAGAAPPVP--
SGVPMASS--TNSNSGSSNTMELSMIKTWLRNNGQVPAHQPPQQQAAAAAAQQQAHEAAEMSTDASASSFGCSDAMGRSHNNGGAVSAAAGGI
SGSAGVGGAGGYSNGCCGGGTIELSMIKTWLRN--QSQQQP--SPQHADQGMSTDASASSYACSDVLVSGCGGGGAGGTAS--
FADSVMATSPVVAHDGVSGGGMVSA--AAAASGNGG--IGLSMIKNWLRSQPAPQALSLSMNAGTTTAQGGGAMALLAGAGERGRTTI
VQQETAAAAAGHGRGSSSVVGLSMIKNWLRSQPPAVVGGEDAMMALAVSTASPPVDA
QCAVIPGAGAGHDAALVHDQSAALVAAGAAAMHGGGYDIANAADDVCAAGPIIPTGGHLHPLTMSMSAGSGSSC
-----SPPDSATTNCFLSPPAACMVAPSPGYYYVGGAYGDG--
-----RQCTCRNGQRRRCRSPCRP--LPRARRRCRRRCRWSASPLRRS
FADPIVVVSS--PGADEDGIGVLSAATAPNGVASAAGDNGGNIGLSVDKNWLLNQPASPPNTRAADCAHAEL--AFSLYNNMGDAETG
QOETPAPATGRFPAGSANSIGLSMIKNWLRSGPAPGASDS
DAPDAPAAAGSDPAPVAAAAGAGGEIAALDQKLVAGAGGAGG
GGAG--APPPGPAEDHLGGGELGSIAGFLRQYPATGTGPENP
PCAGADVYGGSSAALVADDDAAAA--TAMAS--WVAARAEQAASFLSQQQQHNTLALMSGSA--SLSSC
GGAG--APPPGPAEDHLGGGELGSIAGFLRQYPATGTGPENP
SGVPMASS--TNSNSGSSNTMELSMIKTWLRNNGQVNPQQP--PATHQPPQAEEMSTDASANSFGCS--DSLGRN--GTVATAG--
INVNAPPSCDHRVLAPQDHHHQQHQHFLPHGQQQYFLGTPAANFSPAGAMPVPMYNAAGVGSSMSISGKSW
TNFRSRPPRHGETSPILFTKNKQFINDWKKMGGRNRENTPHQREK
GADQQRLLQLPSSSAGTSGCVGCCCHHAKQGLPMATPASP

310 320 330 340 350 360 370 380 390
-----ALLPA-AALEQDETQKALPPQAAVAPPPEOKKAVDSFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
LALSMSTGSHSHLPVVAGGGNAGGGAA--ESTSSENKRASGAMDSPGGGAIEAVPRKSIDTFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
LALSMSTGS--VAAAGGGGAVAA--SSSENKR--VDSGGAVDGAVPKRKSIDTFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
LSTSAHGATTATMAGGRKEINEGSSGA--GAVVAVGESGGSGAVVAGAAAAAARMKSVDTFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
-----TVPACTIS--PDGMSKAADGGGAEEAAAAAARMKAMDTFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
-----VTQAAAAAGEPYMMAMDAVEKKRGGADR--AGQKQPVHR--KSIDTFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
-----TSTAGVYYSHLPVMPKISDGLCIMEGMPSSSPKLEDFLGCNGSGGHDPATYYSQQQ--
-----RISSVASPIDGLDLETRITCOTTLAG--RKARPKKE
LAGMEQGRTESELS--APFPVGA--TALAAYSTDGSGASFEA--TAAMETVHTFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSFRREI
-----AALVT--LEPADKVAANG--ESGAVVEAAMOKKAPAEFTFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
-----BERPQA--ASASTSGGGGGK--LVAETMRKYAAPRSSRFGVTRIKWSK--YEAHLWNTSQVEI
-----GAVTI--AMGTVDVADSDQTRRP--AETFGQRTSIYR--EIKWS
-----VTTAGAGGEYGGALASAAAMDDGRKRGAAGKQKPVHHRKSIDTFGQRTSIYR--WTGR--YEAHLWNSCKKEI
-----GAVTI--AMGTVDVADSDQTRRP--AETFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
LALSMSTGSHMPMVVAGGGGGSAGAAASESTSSENKRASGAMDSPGSGAVEAVPRKSIDTFGQRTSIYRSVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
-----LRESMYPVDRSSALSRAVDVFGPLPAPMFVAR--RPAQTFFGQRTSIYR--TRVTNNAI
-----AIDKQESSPGSGGRERKGRCEPPSLYPSPTSSPTNFSSPFLRPLPSRGRSSPSADRRRLAPSPICQI
-----EVATT--TAITVAGDAASSARAPAP--PAPALPLVHAAGTRTSSYRGVTRHRNTGR--YEAHLWNSCRREI
```


	810	820	830	840	850	860	870	880	890																																																																																		
LOC_OsPLT1	I	F	G	M	E																																																																																						
LOC_OsPLT2	L	F	G	M	E																																																																																						
LOC_OsPLT3	S	G	A	A	G	G	Y	Q	L	S	Q	S	S	A	S	-	T	V	S	I	A	R	A	N	-	G	Y	S	A	N	W	S	S	P	F	N	G	A	M	G																																																			
LOC_OsPLT4	Y	A	A	M	R	S	A	Y	E	L	S	Q	S	S	S	S	S	V	A	K	A	A	N	G	Y	P	D	N	W	S	S	P	F	N	G	M	G																																																						
LOC_OsPLT5	D	N	G	G	G	G	G	Y	I	M	A	P	M	S	A	V	S	A	T	A	T	A	V	A	S	S	H	D	H	G	G	D	G	K	Q	V	M	O	Y	D	S	Y	L	V	G	A	D	A	Y	G	G	G	G	A	G	R	M	P	S	W	A	M	T	P	A	S	A	P	A	A	T	S	S	S	D	M	T	G	V	C	H	G	A	Q	L	F	S	V	N	D	T
LOC_OsPLT6	G	S	L	L	A	D	V	E	K	E	G	D	Y	Q	S	V	G	G	N	S	W	L	P	T																																																																			
LOC_OsPLT7	L	P	M	F	A	A	W	T	D	A																																																																																	
LOC_OsPLT8	M	P	L	F	A	A	W	T	D	A																																																																																	
LOC_OsPLT9																																																																																											
LOC_OsPLT10	L	P	V	F	A	L	W	N	D																																																																																		
maker-ScA7Agc_33-augustus-gene																																																																																											
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro	D	S	P	L	G	D	S	G	K	D	N	A	Y	V	Q	G	V	E	Y	E	N	W	V	S	S	E	P	V	M	A	C	K	A	T	D	A	L	A	S	H	G	L	P	L	F	S	L	K																																											
maker-ScA7Agc_731-augustus-gen																																																																																											
maker-ScA7Agc_1380-snap-gene-0	L	F	G	M	E	K	N	T	Q	V	N	N	R	K	K	M	L	E	T	N	S	T	P	Y	F	K	H	Q	W	F	E	G	E	V	K	L	K	K	R	A	F	T	G	N	F	W	T																																												
maker-ScA7Agc_573-snap-gene-0	L	P	L	F	A	A	W	T	D	A																																																																																	
maker-ScA7Agc_815-snap-gene-89	L	F	G	M	E	K	N	T	Q											W	F	E	G	E	V	K	L	K	K	R	A	F	T	G	N	F	W	T																																																					
maker-ScA7Agc_718-augustus-gen																																																																																											
maker-ScA7Agc_2019-augustus-ge	L	P	V	F	A	L	W	N	D																																																																																		
maker-ScA7Agc_718-snap-gene-48																																																																																											
maker-ScA7Agc_718-snap-gene-90																																																																																											

Figura A: Alineamiento de secuencias proteicas del genotipo Don Walter con dominio AP2/ERF con PLTs de arroz.

LOC_OsPLT1
LOC_OsPLT2
LOC_OsPLT3
LOC_OsPLT4
LOC_OsPLT5
LOC_OsPLT6
LOC_OsPLT7
LOC_OsPLT8
LOC_OsPLT9
LOC_OsPLT10
maker-Contig10-snap-gene-122.2
maker-Contig10-snap-gene-191.2

310 320 330 340 350 360 370 380 390

P FEQKKAVDSFGQRTSIY

AGGTSQSGLSLMSSTGSHS--HLPIVAGGG--NAGGGGA-ESTSSENKRASGAMDSPGGGAEIAPVPRKSIDTFQQRTSIY

S-SHQGGLSLMSSTGS--VAAGGG--GAVVAAESSSENKR--VDSPGGAVDAVAPVPRKSIDTFQQRTSIY

GGGAMALLAGAG-ERGRITPASELSLTAHGAATTAMAGGRKINEBGSQAGAV-VAVGSESGSG--AVVEAGAAAAAARGVDTFQQRTSIY

-----MSG-----KADGGG--ALEAAAAAAGR-----MKAMDDTFQQRTSIY

AGPIPTGGHLLPLTSLMSG-AGSQSSCVTVQ-----AAA--AGEPYMAMDVSVKKRGGADRAGQKQPVLR-KSIDTFQQRTSQY

SLS-MSPGQSSSCVSAAPG--QHQQMAVVA--AAAAAGDGGGNSNDDGGGRVKKRKTGKQKQPVLR-KSIDTFQQRTSQY

G--SSQSLSLMSSTGSHM--PMVAVGGGGG--SASGAAAEESTSSENKRASGAMDSPGGGAEIAPVPRKSIDTFQQRTSIY

-----ADDRRLAPSTRTSESE

LOC_OsPLT11
LOC_OsPLT2
LOC_OsPLT3
LOC_OsPLT4
LOC_OsPLT5
LOC_OsPLT6
LOC_OsPLT7
LOC_OsPLT8
LOC_OsPLT9
LOC_OsPLT10
maker-Contig10-snap-gene-124.3
augustus_masked-Contig12-proce
augustus_masked-Contig8-proce
augustus_masked-Contig3-proce
maker-Contig6-augustus-gene-40
maker-Contig3-snap-gene-416.22
maker-Contig3-augustus-gene-38
maker-Contig6-augustus-gene-42
maker-Contig30-augustus-gene-2
maker-Contig12-augustus-gene-3
maker-Contig38-snap-gene-68.4

LOC_OsPLT1
LOC_OsPLT2
LOC_OsPLT3
LOC_OsPLT4
LOC_OsPLT5
LOC_OsPLT6
LOC_OsPLT7
LOC_OsPLT8
LOC_OsPLT9
LOC_OsPLT10
maker-Contig10-snap-gene-122.2
maker-Contig10-snap-gene-191.2
maker-Contig10-snap-gene-124.3
augustus_masked-Contig12-proce
augustus_masked-Contig8-proce
augustus_masked-Contig3-proce
maker-Contig6-augustus-gene-40
maker-Contig3-snap-gene-416.22
maker-Contig3-augustus-gene-38
maker-Contig6-augustus-gene-42
maker-Contig30-augustus-gene-2
maker-Contig12-augustus-gene-3
maker-Contig38-snap-gene-68.4

LOC_OsPLT1
LOC_OsPLT2
LOC_OsPLT3
LOC_OsPLT4
LOC_OsPLT5
LOC_OsPLT6
LOC_OsPLT7
LOC_OsPLT8
LOC_OsPLT9
LOC_OsPLT10
maker-Contig10-snap-gene-122.2
maker-Contig10-snap-gene-191.2
maker-Contig10-snap-gene-124.3
augustus_masked-Contig12-proce
augustus_masked-Contig8-proce
augustus_masked-Contig3-proce
maker-Contig6-augustus-gene-40
maker-Contig3-snap-gene-416.22
maker-Contig3-augustus-gene-38
maker-Contig6-augustus-gene-42
maker-Contig30-augustus-gene-2
maker-Contig12-augustus-gene-3
maker-Contig38-snap-gene-68.4

LOC_OsPLT1
LOC_OsPLT2
LOC_OsPLT3
LOC_OsPLT4
LOC_OsPLT5
LOC_OsPLT6
LOC_OsPLT7
LOC_OsPLT8
LOC_OsPLT9
LOC_OsPLT10
maker-Contig10-snap-gene-122.2
maker-Contig10-snap-gene-191.2
maker-Contig10-snap-gene-124.3
augustus_masked-Contig12-proce
augustus_masked-Contig8-proce
augustus_masked-Contig3-proce
maker-Contig6-augustus-gene-40
maker-Contig3-snap-gene-416.22
maker-Contig3-augustus-gene-38
maker-Contig6-augustus-gene-42
maker-Contig30-augustus-gene-2
maker-Contig12-augustus-gene-3
maker-Contig38-snap-gene-68.4

```

710      720      730      740      750      760      770      780      790
LOC_OsPLT1  QQLGFLYS--SGVNLDFAN--ANGNGAMSNCTYTNVSLHEQQQQR---QHQQEQEQDDQDDQSSSSNNCSGIPFATPIAFSG-----
LOC_OsPLT2  PASAFDTYGCSSGVNVDFTMTSSSHSGSNSSSSSSAIWGTAAAG--AMGRQQN---GSSNKQSNYSYSGNNIPYAAAAAMTSG-----
LOC_OsPLT3  AAVAAAAHSLQDLQQLHLG--SAAAHNFFQASSSTTYNGGGGG---YQQLGGNAFLMPASTVVAADQGHSSSTATNHGNTCSYGN---EEQGI
LOC_OsPLT4  -AVIAAGHCATDLQHLHLG--SGGAAATHNFFQQPASSSAVYGN---GGGGGGNAFMMPGAVVAAADHG---GSSAYGGG---DESGRI
LOC_OsPLT5  HAVIAAAHSLQDLHHLNLGA--AAAAHDFFSQAMQQQHGLGSIDN-ASLEHSTGSNSVYVN--GDNNGGGGGYIMAPMSAVSATATAVASS-HDH
LOC_OsPLT6  SSVVTAQNHLNHLHFSS--LGYTHNFFQQSDVDVTHGFVDAP---SRSSDSYSFRYNGTNGFHLPGGISYAMPVATVDQGGIGHGYGDX
LOC_OsPLT7  LQDIVSTVD-----AAGAPPRAPHMSMAATSLNSREQSPDRGVGGGGGGVLTATLFAKPAASKLYS-----PVPLN
LOC_OsPLT8  HQQQQQ-----QQHMSMS--AASSLVTSLSNSREGSPDR---GGG---LSMLFAKPSPAVAASAQQQASTKLMAAPLPLG-----
LOC_OsPLT9  AAGVDVVVAPGDHQQISAG--GGGASDNSDTASDGHRAHLLHG---LQYAHAMKFEAGESSGGGGGGGATTNWMMAAAAAAAR-----
LOC_OsPLT10 VGSLLRSKADLFMQQSDGDETMVNGGGSSNSDNGDAENSAS-----GGGAGSFLMAPSSTVVAADQGHSSSTANQGSTCSYGGG---GDERGI
maker-Contig10-snap-gene-122.2 -QDAAAHSLODLQQLHLG--HNFFQASSSYNGGGYHQGLGG---GGGAGSFLMAPSSTVVAADQGHSSSTANQGSTCSYGGG---GDERGI
maker-Contig10-snap-gene-191.2 HAVIAAAHSLQDLHHLNLGAAPAGANDFFSPAGMPQSDTNSIDN-ASLERNTS--LVVYKQ-----GDSNNGGGGGYMPM-MNASSATTTAMVSAPQGD
augustus_masked-Contig12-proce HAVIAAAHSLQDLHHLNLG--SAAAHNFFQASSSTTYNGGGGG---YQQLGGNAFLMPASTVVAADQGHSSSTATNHGNTCSYGN---EEQGI
augustus_masked-Contig3-proces LHDIVSVEADNNNAHGGNASAQHMSNASSLATSVTNSREQSPDR---GGGG---LAMLFAKSAASAKLAYHHQ-----QLPMG
maker-Contig6-augustus-gene-40 VLHDLQVATS-----AAQHMPMSATSSSLVTSLSNSREGSPDR---GG---LSMLFSKPPSPSQ-HHHQASKMSPSPSLPLG-----
maker-Contig3-snap-gene-416.22 LHGIALGLDFS-----NSSSLVTSLSNSREGSPERLG---PSMVYTKHPDAAVS-----LATMN
maker-Contig6-augustus-gene-42 VLHDLQVATS-----AAQHMPMSATSSSLVTSLSNSREGSPDR---GG---LSMLFSKPPSPSQ-HHHQASKMSPSPSLPLG-----
maker-Contig30-augustus-gene-2 QSLGFLYS--SGVNLDFAS--SGGAGAMAHGYANGASHEQYQQQ---QDQQQQ---DQSQGAN-SCSSIPYATPIAFSG-----
maker-Contig12-augustus-gene-3 HEGVAAARNLHNLQYFTN--VSGTHNFFQPSALQDETGTTEMP---SRSLDNSAMYNQGVSYHGAVGRRGGYAMPVARLAS---CYEDDX
maker-Contig38-snap-gene-68.4- SASAFDAYG--SGVNVDFMTGSSSHSSN--NSGGGVMMGATTG---AMGQDD---IISNRQSNYSY-GSNIPYAAPVAMVSG-----

810      820      830      840      850      860      870
LOC_OsPLT1  -----SYESSMTAAGTFGYYPN-VAAF-QTPIFGME-----
LOC_OsPLT2  -----SAL-YGGSTGSNGTVMASNTSTAPHFYNYLFGME-----
LOC_OsPLT3  DAMAMASG-----AAGGGYQLSQGS-ASTVSIAR--ANGYSAN-WSSPFNGAMG-----
LOC_OsPLT4  DGVVDPYA--AMRSAYELSGSSSSSVSAK--AANGYPDNWSSPFNGMG-----
LOC_OsPLT5  KQVQMGYDSYLVGADAYGGGAGRMPSWAMTPAS-APAAATSSSDMTG--VCHG-AQLFSVWNTD-----
LOC_OsPLT6  DTTHDLYG--SRNVYLYSEGSLLADVEKEGDYQGVSGGNSWVLPTP-----
LOC_OsPLT7  -----TNASPSPAVSSVPARAGVSIHLPMFAAWTDA-----
LOC_OsPLT8  -----SWVSSPPAS--ARPPAVSIAHMLPFAAWTDA-----
LOC_OsPLT9  -----PVAGIPTTVHHQLPVFALWNTD-----
LOC_OsPLT10 -----
maker-Contig10-snap-gene-122.2 -----
maker-Contig10-snap-gene-191.2 DAAAMAVGDPYAAARTNGGYQFSQGSAASTVSIAR--ANGYSANNWSSPFNGMG-----
maker-Contig10-snap-gene-124.3 -----
augustus_masked-Contig12-proce KQAQMAENYLVNAEAYGGG--GRMSSWTPASAPVAAAASSNDMAGGGVGHGGAQIFSVWNTD-----
augustus_masked-Contig3-proces -----SWVSPPP--VSARPAVSIHLPMFAAWTDA-----
maker-Contig6-augustus-gene-40 -----SWASTPPPP--ARPAAVSIAHLPLFAAWTDA-----
maker-Contig3-snap-gene-416.22 -----PMMQMPAPH--LLRPGNVSHLPVFAANADA-----
maker-Contig6-augustus-gene-42 -----SWASTPPPPP--ARPAAVSIAHLPLFAAWTDA-----
maker-Contig30-augustus-gene-2 -----SYESSMTPS-PFGYYPN-VAAFQTPYIGME-----
maker-Contig12-augustus-gene-3 GTVPDLYN--SQKMYFFSQDSPLGDSGKDNAYVQGVYENWVSSEPVMAQKATDALASHGLPLFLSLK
maker-Contig38-snap-gene-68.4- -----SAAGYEGSTGNNGTWVTSTTTSTAPGFYNYLFGME-----

```

Figura B: Alineamiento de secuencias proteicas del genotipo Victoria con dominio AP2/ERF con PLTs de arroz.

[illegible]

36

D)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
Tusda   PLT6 rep.1  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTT  GGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAGGTAATATATTTT
Tusda   PLT6 rep.2  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTT  GGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAGGTAATATATTTT
Tusda   PLT6 rep.3  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTT  GGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAGGTAATATATTTT
DW       PLT6 rep.1  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTT  GGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAGGTAATATATTTT
DW       PLT6 rep.2  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTT  GGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAGGTAATATATTTT
DW       PLT6 rep.3  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTT  GGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAGGTAATATATTTT
OTA      PLT6 rep.1  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTT  GGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAGGTAATATATTTT
OTA      PLT6 rep.2  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTT  GGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAGGTAATATATTTT
OTA      PLT6 rep.3  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTT  GGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAGGTAATATATTTT
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro  GCACAGATGGACAGGAAGATATGAAGCCCATCTTTGGGCAACAGCTGCAGAAGAGAAGGTCAGACTCGCAAGGGTCGACAAG

      110      120      130      140      150      160      170      180      190
Tusda   PLT6 rep.1  CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
Tusda   PLT6 rep.2  CCT--GTAATTCATACAAAATTATGCATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
Tusda   PLT6 rep.3  CCTTCTGTAATTCATATAAAATCATGCATCATCTGTACTATTTATCATATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
DW       PLT6 rep.1  CCT--GTAATTCATACAAAATTATGCATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
DW       PLT6 rep.2  CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
DW       PLT6 rep.3  CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
OTA      PLT6 rep.1  CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
OTA      PLT6 rep.2  CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
OTA      PLT6 rep.3  CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro  CCT--GTAATTCATATAAAATTATGCATCATCTGTACTATTTATCGTATAAAATATTTTATTCCTCCCAAGCTAAAGTTTCCAAATGGTTTCTT- A1
                                     CTAAGTTTCCAAATGGTTTCTTTA1

      210      220      230      240      250      260      270      280      290
Tusda   PLT6 rep.1  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATAATGTTACACAATTGCAGTCAATATTTTGCATTCCTTCGCACCTCTGTGCTGAJ
Tusda   PLT6 rep.2  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATAATGTTACACAATTGCAGTCAATATTTTGCATTCCTTCGCACCTCTGTGCTGAJ
Tusda   PLT6 rep.3  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATAATGTTACACAATTGCAGTCAATATTTTGCATTCCTTCGCACCTCTGTGCTGAJ
DW       PLT6 rep.1  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATAATGTTACACAATTGCAGTCAATATTTTGCATTCCTTCGCACCTCTGTGCTGAJ
DW       PLT6 rep.2  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATAATGTTACACAATTGCAGTCAATATTTTGCATTCCTTCGCACCTCTGTGCTGAJ
DW       PLT6 rep.3  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATAATGTTACACAATTGCAGTCAATATTTTGCATTCCTTCGCACCTCTGTGCTGAJ
OTA      PLT6 rep.1  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATAATGTTACACAATTGCAGTCAATATTTTGCATTCCTTCGCACCTCTGTGCTGAJ
OTA      PLT6 rep.2  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATAATGTTACACAATTGCAGTCAATATTTTGCATTCCTTCGCACCTCTGTGCTGAJ
OTA      PLT6 rep.3  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATAATGTTACACAATTGCAGTCAATATTTTGCATTCCTTCGCACCTCTGTGCTGAJ
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro  ACTCTTGATTGGATGGACTCCCTTCAGTATACCTTGGTAAATG

      310      320      330      340      350      360      370      380      390
Tusda   PLT6 rep.1  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
Tusda   PLT6 rep.2  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
Tusda   PLT6 rep.3  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
DW       PLT6 rep.1  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
DW       PLT6 rep.2  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
DW       PLT6 rep.3  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
OTA      PLT6 rep.1  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
OTA      PLT6 rep.2  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
OTA      PLT6 rep.3  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro  GAATATGACATTTTGTGCAATTTAGGTGGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/
                                     GGATACGATAAAGAAGAGAAAGCTGCCAGGGCTTATGATTTAGCTGCTCTCAAGTACTGGGGCAACACT/

      410      420      430      440      450      460      470      480      490
Tusda   PLT6 rep.1  TACAAATTTTCCGGTATCACATAACTGATACCTTGTGGTCAATTCACATATTGCTTTATATACATTTTATTTGGCCATCATTGACATTACATGAGCATGG/
Tusda   PLT6 rep.2  TACAAATTTTCCGGTATCACATAACTGATACCTTGTGGTCAATTCACATATTGCTTTATATACATTTTATTTGGCCATCATTGACATTACATGAGCATGG/
Tusda   PLT6 rep.3  TACAAATTTTCCGGTATACATAAATGATACCTTGTGGTCAATTCACATATTGCTTTATATACATTTTATTTGGCCATCATTGACATTACATGAGCATGG/
DW       PLT6 rep.1  TACAAATTTTCCGGTATCACATAACTGATACCTTGTGGTCAATTCACATATTGCTTTATATACATTTTATTTGGCCATCATTGACATTACATGAGCATGG/
DW       PLT6 rep.2  TACAAATTTTCCGGTATCACATAACTGATACCTTGTGGTCAATTCACATATTGCTTTATATACATTTTATTTGGCCATCATTGACATTACATGAGCATGG/
DW       PLT6 rep.3  TACAAATTTTCCGGTATCACATAACTGATACCTTGTGGTCAATTCACATATTGCTTTATATACATTTTATTTGGCCATCATTGACATTACATGAGCATGG/
OTA      PLT6 rep.1  TACAAATTTTCCGGTATCACATAACTGATACCTTGTGGTCAATTCACATATTGCTTTATATACATTTTATTTGGCCATCATTGACATTACATGAGCATGG/
OTA      PLT6 rep.2  TACAAATTTTCCGGTATCACATAACTGATACCTTGTGGTCAATTCACATATTGCTTTATATACATTTTATTTGGCCATCATTGACATTACATGAGCATGG/
OTA      PLT6 rep.3  TACAAATTTTCCGGTATCACATAACTGATACCTTGTGGTCAATTCACATATTGCTTTATATACATTTTATTTGGCCATCATTGACATTACATGAGCATGG/
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro  TACAAATTTTCCGGTA

      510      520      530      540      550      560      570      580      590
Tusda   PLT6 rep.1  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/
Tusda   PLT6 rep.2  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/
Tusda   PLT6 rep.3  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCACTTAGGAGGCATGTCTC/
DW       PLT6 rep.1  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/
DW       PLT6 rep.2  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/
DW       PLT6 rep.3  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/
OTA      PLT6 rep.1  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/
OTA      PLT6 rep.2  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/
OTA      PLT6 rep.3  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro  GCTATTTTTCAGGTAAACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/
                                     ACCGAATACGAAAAAGAGTTGGAAGAGATGAAGGATATGACTCGACAAGAAATATGTTGCATCCCTTAGGAGGCATGTCTC/

      610      620      630      640      650      660      670      680      690
Tusda   PLT6 rep.1  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/
Tusda   PLT6 rep.2  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/
Tusda   PLT6 rep.3  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/
DW       PLT6 rep.1  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/
DW       PLT6 rep.2  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/
DW       PLT6 rep.3  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/
OTA      PLT6 rep.1  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/
OTA      PLT6 rep.2  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/
OTA      PLT6 rep.3  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/
augustus_masked-ScA7Agc_33-pro  AACTTTTGACCCATATTGAAGATATCCCTTAGGAAGCATATGGCTTAATCCATTGATTTTCACACTGATTTGACATTACATATATATTGTGATGCAC/

      710      720      730      740      750      760      770      780      790

```



```

Tusda    PLT6 rep.1  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGGTATGAATTGACCAAGCTTTACTTTCTATAA TAAGGTCATTTCCATT/
Tusda    PLT6 rep.2  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGGTATGAATTGATCAGCTTTACTTTCTAAAAATAAGGACATTTTATT/
Tusda    PLT6 rep.3  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGGTATGAATTGATCAGCTTTACTTTCTAAAAATAAGGACATTTTATT/
DW       PLT6 rep.1  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGGTATGAATTGACCAAGCTTTACTTTCTATAA TAAGGTCATTTCCATT/
DW       PLT6 rep.2  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGGTATGAATTGACCAAGCTTTACTTTCTATAA TAAGGTCATTTCCATT/
DW       PLT6 rep.3  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGGTATGAATTGACCAAGCTTTACTTTCTATAA TAAGGTCATTTCCATT/
OTA      PLT6 rep.1  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGGTATGAATTGACCAAGCTTTACTTTCTATAA TAAGGTCATTTCCATT/
OTA      PLT6 rep.2  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGGTATGAATTGACCAAGCTTTACTTTCTATAA TAAGGTCATTTCCATT/
OTA      PLT6 rep.3  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGGTATGAATTGACCAAGCTTTACTTTCTATAA TAAGGTCATTTCCATT/
augustus_masked-ScA7Aqc_33-pro  AGCAGTGGATTCTCTCGTGGAGCATCAATGTACCGAGGAGTTACCAAGG-----

      810      820      830      840      850      860      870      880      890
Tusda    PLT6 rep.1  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/
Tusda    PLT6 rep.2  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/
Tusda    PLT6 rep.3  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/
DW       PLT6 rep.1  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/
DW       PLT6 rep.2  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/
DW       PLT6 rep.3  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/
OTA      PLT6 rep.1  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/
OTA      PLT6 rep.2  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/
OTA      PLT6 rep.3  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/
augustus_masked-ScA7Aqc_33-pro  TCAGATCCAGCTCTTTTGTAACTGACAGTTCCTTAGGAATTTGAATACAGTTGTAGTAGTTAATTAAGAGGTGTGATTGAGTACATCAGT/

      910      920      930      940      950      960      970      980      990
Tusda    PLT6 rep.1  TTTCATCACAAAAGAGTATTGCAAAAGACAGTTTCTCAGTGCTGATCATGGTCTATTAGATCCTATTGTATTGGCTATCATGCTATTGTTTAA/
Tusda    PLT6 rep.2  -----AGTATTGCAAAAAGACAGTTTCTCAATGTTGACCATGGTCCAT AGAT -----GTATTTTCTATATGCTATTGTTTAA/
Tusda    PLT6 rep.3  -----AGTATTGCAAAAAGACAGTTTCTCAATGTTGACCATGGTCCAT AGAT -----GTATTTTCTATATGCTATTGTTTAA/
DW       PLT6 rep.1  TTTCATCACAAAAGAGTATTGCAAAAGACAGTTTCTCAGTGCTGATCATGGTCTATTAGATCCTATTGTATTGGCTATCATGCTATTGTTTAA/
DW       PLT6 rep.2  TTTCATCACAAAAGAGTATTGCAAAAGACAGTTTCTCAGTGCTGATCATGGTCTATTAGATCCTATTGTATTGGCTATCATGCTATTGTTTAA/
DW       PLT6 rep.3  TTTCATCACAAAAGAGTATTGCAAAAGACAGTTTCTCAGTGCTGATCATGGTCTATTAGATCCTATTGTATTGGCTATCATGCTATTGTTTAA/
OTA      PLT6 rep.1  TTTCATCACAAAAGAGTATTGCAAAAGACAGTTTCTCAGTGCTGATCATGGTCTATTAGATCCTATTGTATTGGCTATCATGCTATTGTTTAA/
OTA      PLT6 rep.2  TTTCATCACAAAAGAGTATTGCAAAAGACAGTTTCTCAGTGCTGATCATGGTCTATTAGATCCTATTGTATTGGCTATCATGCTATTGTTTAA/
OTA      PLT6 rep.3  TTTCATCACAAAAGAGTATTGCAAAAGACAGTTTCTCAGTGCTGATCATGGTCTATTAGATCCTATTGTATTGGCTATCATGCTATTGTTTAA/
augustus_masked-ScA7Aqc_33-pro  TTTCATCACAAAAGAGTATTGCAAAAGACAGTTTCTCAGTGCTGATCATGGTCTATTAGATCCTATTGTATTGGCTATCATGCTATTGTTTAA/

      1010     1020     1030     1040     1050     1060
Tusda    PLT6 rep.1  TATCAACTGTTCTTGTAAATATAGGCCACCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG
Tusda    PLT6 rep.2  TGTCAACTGTTCTTGTAAATATAGGCCACCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG
Tusda    PLT6 rep.3  TGTCAACTGTTCTTGTAAATATAGGCCACCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG
DW       PLT6 rep.1  TGTCAACTGTTCTTGTAAATATAGGCCACCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG
DW       PLT6 rep.2  TGTCAACTGTTCTTGTAAATATAGGCCACCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG
DW       PLT6 rep.3  TGTCAACTGTTCTTGTAAATATAGGCCACCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG
OTA      PLT6 rep.1  TGTCAACTGTTCTTGTAAATATAGGCCACCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG
OTA      PLT6 rep.2  TGTCAACTGTTCTTGTAAATATAGGCCACCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG
OTA      PLT6 rep.3  TGTCAACTGTTCTTGTAAATATAGGCCACCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG
augustus_masked-ScA7Aqc_33-pro  -----CACCCAGCATGGAAGGTGGCAAGCAAGAATTGGAAGGG

```

Figura D: Secuencias consenso de PLT6 y exón del gen de *E. curvula* del cual se generaron los cebadores