

Universidad del Papaloapan

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

“Caracterización bioinformática de los genes IF1 y UK7 en ecotipos contrastantes frente a inundaciones de *Brachypodium distachyon* y el desarrollo de marcadores moleculares mediante regiones polimórficas”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

MARIO DE JESÚS MARTÍNEZ ARAGÓN

Director: **Dr. Julián Mario Peña Castro**

San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca

2024

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección del Dr. Julián Mario Peña Castro.

La investigación fue realizada con el financiamiento otorgado al proyecto CONACYT Ciencia Básica 287137.

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN DE ESTE TRABAJO

Congreso:

Martínez-Aragón M.J., Hernández-Martínez A., Medina-Chávez L., Peña-Castro JM, 2024. Caracterización del gen INHIBITION FACTOR 1 en ecotipos contrastantes de *Brachypodium distachyon* frente a inundaciones. Avances en la investigación Básica y Aplicada en el Agro Mexicano. 14 y 15 Marzo 2024.

Hernández-Martínez A., **Martínez-Aragón M.J.**, Medina-Chávez L., Peña-Castro JM, 2024. Análisis del locus MICU en ecotipos de *Brachypodium distachyon* con tolerancia diferencial a la inundación. Avances en la investigación Básica y Aplicada en el Agro Mexicano. 14 y 15 Marzo 2024.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec** por brindarme la oportunidad de formar parte de su comunidad estudiantil.

Al **Dr. Julián M. Peña Castro** cuya dedicación, paciencia, conocimiento y tiempo han sido fundamentales en mi formación. Un excelente mentor en el ámbito profesional y personal, para mí es un honor haber formado parte de su grupo de trabajo.

A la **Dra. Blanca E. Barrera Figueroa** por su apoyo y valiosos conocimientos compartidos a lo largo de este proyecto. Su calidez y amabilidad siempre fueron inspiradoras.

A la **Mtra. Lucisabel Medina Chávez**, quien me explicó pacientemente cada detalle y siempre estuvo dispuesta a ayudar. Sus consejos han sido cruciales para mi desarrollo.

A la **Mtra. Saribel Zilli Gutiérrez**, por su apoyo en las técnicas de laboratorio y por crear un ambiente de trabajo positivo.

A **Adriana Hernández Martínez**, con quien compartí aprendizajes y que siempre fue un pilar de apoyo académico y emocional.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 El cambio climático como factor de las inundaciones	16
1.2 Crecimiento poblacional y seguridad alimentaria.....	17
1.3 Las plantas y su respuesta a las inundaciones	18
1.4 La biotecnología de respuesta al estrés hídrico en plantas	21
1.5 Tolerancia diferencial a la inundación en ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i>	23
1.6 El factor inhibidor 1 de la ATPasa mitocondrial F ₁ -F ₀	26
1.7 UK7 un gen de función desconocida	29
2. JUSTIFICACIÓN.....	30
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo general.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Análisis bioinformático.....	33
6.1.1 Obtención de secuencias de consulta	33
6.1.2 Diseño de oligonucleótidos	33
6.1.3 Análisis filogenético.....	33
6.1.4 Sitios de dominio	34
6.1.5 Análisis de expresión en inundación	34
6.1.6 Parámetros proteicos	35
6.1.7 Predicción de estructura	35
6.1.8 Estructura de proteína con región intrínsecamente desordenada	35
6.1.9 Análisis de promotor	36
6.2 Cultivo de <i>Brachypodium distachyon</i> y extracción de ADN genómico	36

6.3 Preparación y evaluación de la calidad de los oligonucleótidos	38
6.3.1 Condiciones de operación de los oligonucleótidos	38
6.3.2 Programa de PCR para genotipificación	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
7.1 Bradi3g449950	41
7.1.1 Homología de secuencias	41
7.1.2 Predicción estructural	43
7.1.3 Identificación de homólogos de IF1 en <i>Brachypodium distachyon</i>	46
7.1.4 de dominio con MEME suite	47
7.1.5 Diferencia de número de copias entre ecotipos de <i>Brachypodium</i>	49
7.1.6 Expresión de las copias de IF1 en <i>B. distachyon</i> en inundación.....	49
7.1.7 Diferencia entre las secuencias proteicas de IF1-A.....	49
7.1.8 Identificación de zonas polimórficas	50
7.1.9 Identificación de zonas polimórficas para genotipificación	56
7.1.10 PCR en gradiente	58
7.1.11 PCR para genotipificación de IF1.....	59
7.2 Bradi1g68957	63
7.2.1 Identificación de secuencias homólogas.....	64
7.2.2 Análisis de dominio con MEME	64
7.2.3 Generalidades de la secuencia proteica.....	66
7.2.4 Predicción estructural	67
7.2.5 Análisis de expresión en inundación	70
7.2.6 Identificación de zonas polimórficas.....	71
7.2.7 Identificación de zonas polimórficas para genotipificación	75
7.2.8 PCR en gradiente	77
7.2.9 PCR para genotipificación de UK7	78
8. CONCLUSIONES	83

9. PERSPECTIVAS	84
10. REFERENCIAS.....	85
11. Material suplementario.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pronóstico multi modelo del aumento o disminución de la frecuencia de inundaciones y sequías a nivel mundial.....	16
Figura 2. Proyecciones del rendimiento mundial de los cultivos de cereales más consumidos para el año 2050.....	18
Figura 3. Síntomas del estrés por inundación en <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
Figura 4. Diferentes escenarios de inundación en plantas.	19
Figura 5. Interconexión de diferentes procesos bioquímicos y moleculares en el estrés por inundación en plantas.....	21
Figura 6. Respuestas moleculares al estrés por inundación en arroz.....	22
Figura 7. Tolerancia diferencial en ecotipos Bd21 y Bd21-3 de <i>Brachypodium</i>	24
Figura 8. Expresión de los genes IF1 y UK7 de <i>Brachypodium distachyon</i> en tratamientos de sumersión y baja luz.	25
Figura 9. Estructura de la F0-F1 ATP sintasa.	26
Figura 10. Modelo atómico de diferentes ATPasas siendo inhibidas.	27
Figura 11. Esquema de inhibición de hidrólisis por IF1.....	28
Figura 12. Coordenadas ascendentes y descendentes del promotor.....	36
Figura 13. Estructura genómica del gen Bradi3g44950 obtenida de Phytozome.....	41
Figura 14. Características de IF1 en animales.	42
Figura 15. Predicción de la estructura de IF1 de <i>Brachypodium distachyon</i>	44
Figura 16. Predicción de la interacción de monómeros de IF1 en <i>Brachypodium distachyon</i>	45
Figura 17. Alineamiento de secuencias homólogas del gen Bradi3g44950 de la tabla 5	48
Figura 18. Parálogos de IF1 en Bd21 y Bd21-3 de <i>Brachypodium distachyon</i>	51
Figura 19. Análisis de expresión entre ortólogos de IF1 en <i>B.distachyon</i>	52
Figura 20. Polimorfismos que coinciden con la matriz principal de la secuencia consenso de probables sitios de unión a factores de transcripción en IF1-A.	55
Figura 21. Localización de zonas polimórficas para genotipificación de IF1-A.	57
Figura 22. Gel de agarosa al 2% de la PCR en gradiente de oligonucleótidos de los polimorfismos que flanquean a IF1.....	58
Figura 23. Gel de agarosa al 3% de reacción de PCR para genotipificación de IF1	59
Figura 24. Gel de agarosa al 3% de reacción de PCR para genotipificación de IF1.....	60
Figura 25. Gel de agarosa al 4% PCR para genotipificación de IF1.	61
Figura 26. Gel de acrilamida al 6% de PCR de genotipificación de IF1.....	62

Figura 27. Estructura genómica del gen Bradi1g68957 obtenida de Phytozome.....	63
Figura 28. Árbol filogenético en forma cuadrada con el análisis de dominio de MEME de las secuencias examinadas de UK7.....	65
Figura 29. Distribución de residuos ácidos y básicos de UK7.....	67
Figura 30. Predicción estructural de UK7 de Bd21 utilizando AlphaFold2.....	68
Figura 31. Predicción de estructura de UK7 por I-TASSER.	69
Figura 32. Grado de desorden de Metapredict de la proteína predicha de UK7.....	70
Figura 33. Análisis de expresión entre ortólogos de UK7 en ecotipos de <i>B.distachyon</i> y en diferentes condiciones.	72
Figura 34. Polimorfismos que coinciden con la matriz principal de la secuencia consenso de probables sitios de unión a factores de transcripción en UK7-A.	74
Figura 35. Localización de zonas polimórficas para genotipificación de UK7-A.	76
Figura 36. Gel de agarosa al 2% de PCR en gradiente de oligonucleótidos de UK7.....	77
Figura 37. Gel de agarosa al 3% para genotipificación de UK7 entre ecotipos de <i>B.distachyon</i>	79
Figura 38. Gel de agarosa al 3% para genotipificación de UK7 entre ecotipos de <i>B.distachyon</i>	80
Figura 39. Gel de agarosa al 3% para genotipificación de UK7 entre ecotipos de <i>B.distachyon</i>	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de buffer de extracción.....	37
Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR de oligonucleótidos.....	39
Tabla 3. Programa de PCR para los oligonucleótidos	39
Tabla 4. Componentes del gel de acrilamida	40
Tabla 5. Secuencias homólogas de IF1 en plantas.....	47
Tabla 6. Polimorfismos río arriba que coinciden con matriz principal de secuencia consenso de IF1.....	53
Tabla 7. Diseño de oligonucleótidos para genotipificación	56
Tabla 8. Condiciones para PCR de genotipificación de IF1.	62
Tabla 9. Secuencias homólogas de UK7.....	64
Tabla 10. Composición de aminoácidos.....	66
Tabla 11. Polimorfismos río arriba que coinciden con matriz principal de secuencia consenso de UK7 ...	73
Tabla 12. Diseño de oligonucleótidos para genotipificación.	75
Tabla 13. Condiciones para PCR de genotipificación de UK7	82

ABREVIACIONES

IF1	INHIBITOR FACTOR 1
UK7	UNKNOWN 7
STF1	STABILIZATION FACTOR 1
NST1	NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR 1
BLAST	Basic Local Alignment Sequence Tool
PCR	Polymerase chain reaction
MEME	Multiple Expectation maximations for Motif Elicitation
TEMED	Tetrametiletlenodiamina

RESUMEN

El cambio climático ha incrementado la frecuencia de las inundaciones, afectando negativamente los cultivos y la productividad agrícola. Por tal razón, es importante investigar los mecanismos de tolerancia de las plantas para desarrollar cultivos que puedan sobrevivir y mejorar su producción ante estos eventos. Recientemente, se ha observado que el ciclo circadiano de las plantas se altera debido a las inundaciones, con respuestas diferentes en plantas con alta y baja tolerancia, como se observó en *Brachypodium distachyon*. El análisis transcriptómico diurno de los ecotipos Bd21 (sensible) y Bd21-3 (tolerante) identificó genes con expresión diferencial. Se destacaron, el INHIBITOR FACTOR 1 de la ATPasa mitocondrial F1-F0 (Bradi3g44950), que mostró un aumento significativo en su expresión en tratamientos de sumersión, y el gen UK7 (Bradig68957), de función desconocida, que no solo aumentó su expresión, sino que también presentó una oscilación circadiana distinta bajo estrés por inundación.

En el presente trabajo se caracterizaron mediante métodos bioinformáticos las secuencias de los genes IF1 y UK7. La caracterización de IF1 sugirió que en *B. distachyon* conservaría la función de inhibidor endógeno de la ATPasa mitocondrial, similar a la reportada en animales. Se encontraron diferencias en el número de copias de IF1 entre ecotipos, y solo BdiBd21-3.3G0596600 de Bd21-3 mostró una expresión significativamente aumentada en condiciones de inundación. Para UK7, la predicción estructural indicó que posee una región intrínsecamente desordenada desde el aminoácido 554, con una alta proporción de serinas, que pueden ser sitios de modificación postraducciona. Además, el análisis de promotores indicó sitios que podrían afectar la detección por factores de transcripción de ambos genes y explicar su diferencia de expresión.

Para ambos genes se encontraron zonas polimórficas y se demostró su utilidad como marcadores moleculares de PCR. En futuras investigaciones, se propone generar líneas isogénicas que evalúen la influencia de IF1-A y UK7-A en la tolerancia al estrés por inundación. Dado que UK7 no tiene información reportada y presenta una región desordenada, es un candidato ideal para generar líneas Knockouts que permitan estudiar su función, en la respuesta al estrés por inundación. Estas propuestas contribuirán a entender los mecanismos de tolerancia al estrés por inundación y podrían transferirse a cultivos de importancia nutricional en el futuro.

SUMMARY

Climate change has increased the frequency of floods, adversely affecting crops and agricultural productivity. For this reason, it is important to investigate the mechanisms of plant tolerance to develop crops that can survive and improve their output in the face of these events. Recently, it has been observed that the circadian cycle of plants is altered due to flooding, with different responses in plants with high and low tolerance, as observed in *Brachypodium distachyon*. Day-to-day transcriptomic analysis of eco-types Bd21 (sensitive) and Bd-21-3 (tolerant) identified genes with differential expression. Highlighted were the INHIBITOR FACTOR 1 of mitochondrial ATPase F1-F0 (Bradi3g44950), which showed a significant increase in its expression in submersion treatments, and the UK7 gene (Bradig68957), of unknown function, which not only increased its expression, but also presented a distinct circadian oscillation under flood stress.

In this study, the sequences of IF1 and UK7 genes were characterized by bioinformatical methods. The characterization of IF1 suggested that in *B. distachyon* it would retain the function of an endogenous inhibitor of mitochondrial ATPase, similar to that in animals. Differences in the number of copies of IF1 between eco-types were found, and only BdiBd21-3.3G0596600 of Bd21-3 showed significantly increased expression in flood conditions. For UK7, the structural prediction indicated that it possesses an intrinsically disorderly region from amino acid 554, with a high proportion of serins, which can potentially be post-translational modification sites. In addition, the promoter analysis indicated sites that could affect transcription factor detection of both genes and explain their differential expression.

For both genes, useful polymorphic zones were found and their utility was tested as molecular markers by PCR. In future research, it is proposed to cross Bd21 and Bd-21-3 to generate isogenic lines that evaluate the influence of IF1-A and UK7-A on flood stress tolerance. Since UK7 has no reported information and presents a disorderly region, it is an ideal candidate for generating Knockouts lines that allow to study its role, in the response to flood stress. These proposals will help to understand the mechanisms of flood stress tolerance and could be transferred to nutritionally important crops in the future.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cambio climático como factor de las inundaciones

El cambio climático es uno de los desafíos que ha tomado relevancia en la actualidad debido a sus diversos impactos en los sistemas naturales y humanos (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2022). A partir de la revolución industrial, la actividad humana ha sido responsable del aumento de emisiones de gases como el dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄) que se liberan a la atmósfera, alterando el equilibrio de la radiación solar que sale de la Tierra, dando origen al fenómeno conocido como efecto invernadero (Waters *et al.*, 2016). Esta retención de energía conduce en última instancia a un calentamiento global que se interconecta con otros aspectos del sistema climático. Sus efectos pueden repercutir tanto en la salud humana, como en la alimentación, economía e infraestructura (Myers *et al.*, 2017).

Se estima que para el año 2100, una temperatura global por encima de 2°C podría ocasionar que algunas zonas costeras enfrenten hasta seis amenazas en simultáneo como olas de calor, sequías, tormentas e incendios (Mora *et al.*, 2018).

Dentro de los mayores desastres climáticos se encuentran las inundaciones (figura 1; Hirabayashi *et al.*, 2013). Esto se debe a que el calentamiento propicia la evaporación del agua e incrementa la capacidad del aire para mantenerse húmedo, alterando los patrones de precipitación y temporadas de lluvia de algunos lugares que normalmente deberían estar secos, y ahora tengan periodos de lluvia prolongados, y viceversa (Thornton *et al.*, 2018).

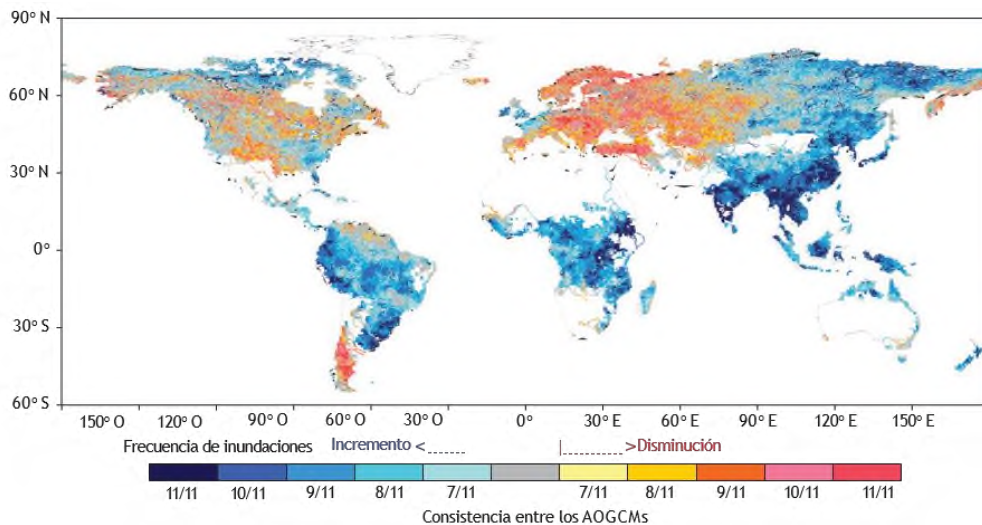


Figura 1. Pronóstico multi modelo del aumento o disminución de la frecuencia de inundaciones y sequías a nivel mundial. Se señalan en azul las zonas que serían más afectadas por inundación en el modelo climático más extremo (RCP 8.5) (Hirabayashi *et al.*, 2013).

Las inundaciones van asociadas a las temporadas de huracanes y ciclones que ocasionan pérdidas económicas en el orden de billones de dólares (National Academies Press [NAS], 2019). Entre los daños que ocasionan, impactan en el sector agrario al dañar las cosechas por la inundación prolongada así como por la disminución de la calidad del suelo al aumentar la concentración de metales pesados (cadmio, mercurio, plomo), sales (cloruros y fluoruros) e hidrocarburos (Mora *et al.*, 2018). Los países en desarrollo, como los localizados en Latinoamérica, son especialmente susceptibles, al estar tecnológicamente menos preparados (Thornton *et al.*, 2018).

1.2 Crecimiento poblacional y seguridad alimentaria

Aunado a los desastres ambientales, la agricultura enfrenta otro serio reto que superar: la creciente demanda alimenticia. En los últimos años y debido a la urbanización, la población en todo el mundo ha ido en constante aumento, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria, es decir, afectando la accesibilidad de los alimentos y su distribución (Ray *et al.*, 2013; Thornton *et al.*, 2018).

Entre las cosechas que sustentan la base de la alimentación global se encuentran el maíz, el arroz y el trigo que abastecen a las dos terceras partes de las calorías consumidas, y cuyos rendimientos productivos son clave para satisfacer las demandas futuras (Myers *et al.*, 2017). Se pronostica que para el año 2050 la producción agrícola de estos cultivos requerirá incrementar sus rendimientos entre un 60 y 110%. Diversos autores proponen alcanzar esta eficiencia sin promover la deforestación de más zonas de selvas y bosques para su labrado. Sin embargo, en diferentes regiones del mundo los rendimientos mejorados no superan el 24% y 39% en sus áreas de cultivo más importantes, lo que dificulta la posibilidad de cumplir con los objetivos (figura 2; Ray *et al.*, 2013).

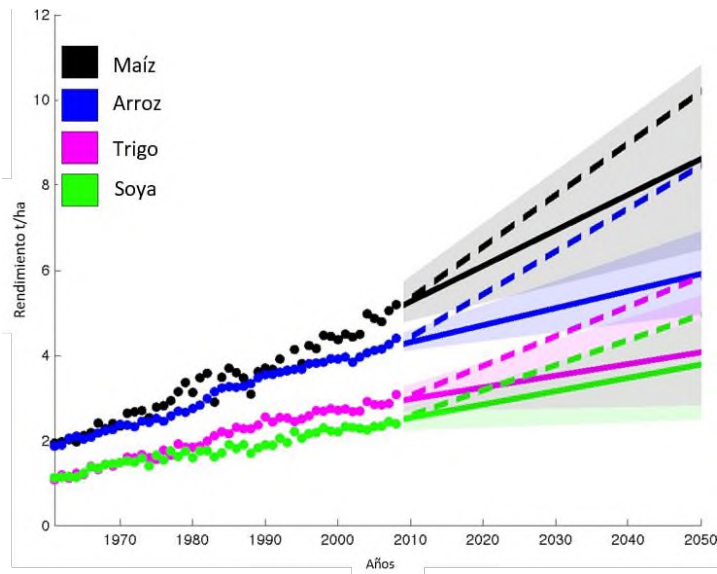


Figura 2. Proyecciones del rendimiento mundial de los cultivos de cereales más consumidos para el año 2050. Se presenta en líneas discontinuas cómo debería ir mejorando la eficiencia y duplicar su producción contrastando con la línea continua de un crecimiento lineal (Ray *et al.*, 2013).

El aumento del rendimiento de las cosechas no sólo traería consigo la seguridad alimentaria; también sería capaz de reducir la pobreza y desnutrición, pues el sector mayoritario que constituye a este grupo vulnerable son los mismos agricultores. Se estima que hay más de 608 millones de granjas familiares en todo el mundo (FAO, 2021).

1.3 Las plantas y su respuesta a las inundaciones

Por lo anterior, es importante conocer la respuesta vegetal ante eventos adversos para incidir sobre los problemas de su producción. Las plantas son organismos sésiles que han desarrollado estrategias fisiológicas y moleculares para hacer frente a diferentes tipos de estreses abióticos y bióticos, determinando así, su capacidad para proliferar en diferentes tipos de hábitats con climas y condiciones particulares (Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

El estrés por inundación puede afectar a las plantas de diversas formas, causando la clorosis (coloración amarillenta en las hojas), el aletargamiento del crecimiento, la necrosis en sus tejidos, e incluso la muerte del organismo completo (figura 3). Estos efectos pueden persistir incluso después de terminado el periodo de inundación, afectando su crecimiento y producción de manera prolongada (Peña-Castro, 2014).



Figura 3. Síntomas del estrés por inundación en *Arabidopsis thaliana*. Las plántulas se sometieron a periodos de inundación y se rescataron en el día que se indica. Se observan manchas amarillentas y finalmente muerte del organismo (Peña-Castro, 2014).

La inundación puede manifestarse de diferentes maneras (figura 4). Se clasifica en sumersión cuando todos los órganos quedan cubiertos de agua, en anegamiento cuando sólo las raíces están inundadas y un estadio intermedio que es la sumersión parcial (Pucciariello *et al.*, 2014; Sasidharan *et al.*, 2017).

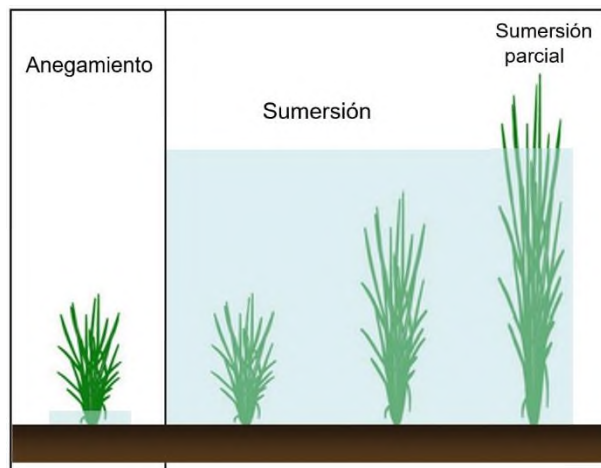


Figura 4. Diferentes escenarios de inundación en plantas. Clasificación según el incremento del nivel del agua (Bailey-Serres *et al.*, 2010).

Durante todos los tipos de inundación, las plantas sufren un estrés compuesto debido a perturbaciones en la difusión del oxígeno atmosférico (O_2), lo que genera hipoxia, un fenómeno

que se caracteriza por presentar una concentración de oxígeno menor a la atmosférica (<21%) en los tejidos (Sasidharan *et al.*, 2017); pero también debido a la alteración del flujo de CO₂, etileno (C₂H₄), óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS) y la captación de energía luminosa (Fukao *et al.*, 2019; Voesenek & Bailey-Serres, 2015). Por estas razones, las investigaciones se han centrado principalmente en la crisis energética ocasionada por la limitada actividad fotosintética y la disminución de la eficiencia de las rutas aeróbicas de síntesis de ATP, como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena de transporte de electrones.

Al censar una baja disponibilidad de oxígeno, las plantas inducen la expresión de genes conocidos como “genes centrales de hipoxia” (GCH), que están conformados por factores de transcripción, transductores, chaperonas, hemoglobinas y enzimas del metabolismo fermentativo como la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la piruvato descarboxilasa (PDC). Estos genes permiten que la célula cambie al metabolismo anaerobio para obtener ATP y NAD⁺, por vía de la glucólisis y propician que la fermentación etanólica se convierta en la ruta catabólica predominante. Adicionalmente, se administran las reservas de almidón mediante la regulación de hormonas como el ácido giberélico (GA), ácido abscísico (ABA), óxido nítrico (NO) y etileno, que son reguladas por factores de transcripción conocidos como *Ethylene Response Factors* (ERFs) y regulaciones postraduccionales como la regla N-terminal; (figura 5; Peña-Castro, 2014; Fukao *et al.*, 2019).

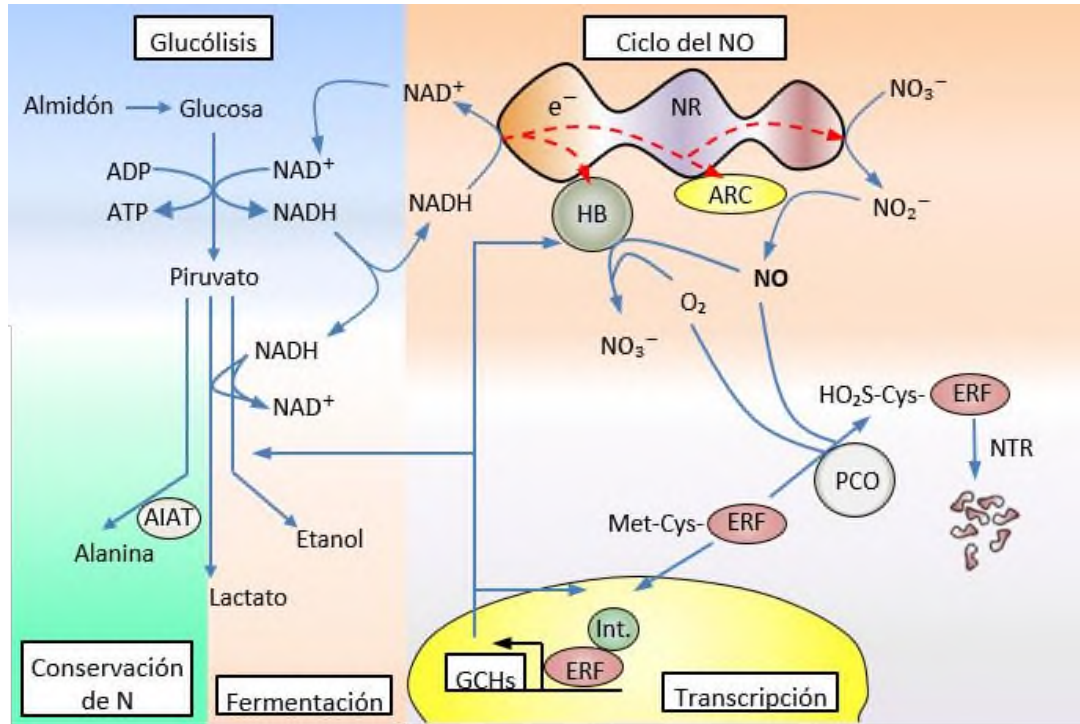


Figura 5. Interconexión de diferentes procesos bioquímicos y moleculares en el estrés por inundación en plantas. Vías metabólicas de la glucólisis y fermentación, asimilación del nitrógeno y ciclo de NO importantes en la respuesta al estrés. Incluye disponibilidad de TFs controlados por la regla N-terminal (Fukao *et al.*, 2019).

1.4 La biotecnología de respuesta al estrés hídrico en plantas

El arroz es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial que presenta la capacidad de germinar y crecer en un amplio espectro de condiciones de inundación (Pucciariello *et al.*, 2014). De tal manera, al usar la diversidad genética del arroz, se han podido desarrollar dos tipos de cultivares de arroz para mantener la productividad aún en condiciones adversas. El primer tipo son las variedades de arroz que tienen la capacidad de elongar sus hojas y parte de sus tallos hasta 25 cm por día como estrategia de escape frente a una inundación parcial o completa (Kuroha *et al.*, 2018). Sin embargo, si la inundación persiste durante un periodo prolongado, la planta puede agotar sus reservas de energía rápidamente, provocando su muerte en cuestión de días.

Por lo anterior, se han desarrollado los cultivares del segundo tipo que son derivados del arroz que modula el consumo de carbohidratos de reserva cuando la producción de energía se ve

comprometida (Bailey-Serres *et al.*, 2010). También, a través de un mapeo molecular, se identificó en el cromosoma 9, el locus de rasgo cuantitativo (QTL), SUBMERGENCE 1 (SUB1), al cual se debe la mayor variación fenotípica (70%) en el estrés por inundación en arroz quiescente.

Cuando se realizaron retrocruzas entre dos líneas parentales en el que un fragmento del ADN del parental donante se transfirió a un receptor y se generaron líneas casi isogénicas (NILs). Esta introgresión se ha realizado a diferentes variedades de arroz para generar líneas tolerantes a la inundación mediante el uso de marcadores moleculares de SUB1 (Bailey-Serres *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2013).

La generación de NILs de los ecotipos de arroz de latitudes bajas y de aguas profundas, permitió la identificación de SUB1A, SUB1B y SUB1C que son genes que codifican para ERFs de unión al ADN. Los cultivares de arroz sensibles a excesos de agua prolongados contienen los genes SUB1B y SUB1C en su genoma, mientras que los cultivares tolerantes también poseen el gen SUB1A, que es controlado por el etileno, permitiendo interrumpir la elongación como estrategia de escape (figura 6; Bailey-Serres *et al.*, 2010).

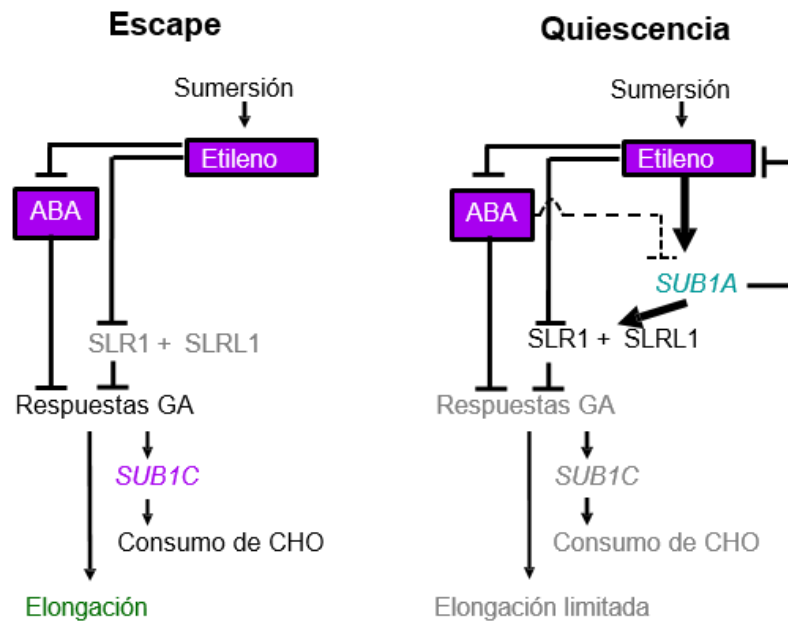


Figura 6. Respuestas moleculares al estrés por inundación en arroz. A la izquierda, el mecanismo de escape usando como intermediarios ácido absísico y ácido giberélico en la elongación. A la derecha, la respuesta de las variedades tolerantes inducida por el etileno que incrementa como consecuencia de la sumersión (Bailey-Serres *et al.*, 2010).

Estos hallazgos representan casos exitosos de la aplicación de la biotecnología para generar conocimiento y utilizarlo de manera aplicativa pues posibilitaron la obtención de cultivares de arroz de alto rendimiento capaces de soportar inundaciones de diferente tipo (Pucciariello *et al.*, 2014).

1.5 Tolerancia diferencial a la inundación en ecotipos de *Brachypodium distachyon*

No obstante estos avances, la mayor parte de las gramíneas (a diferencia del arroz) no tienen una historia evolutiva de reto ante inundaciones. De ahí que el uso de plantas modelo de rápido crecimiento sea una alternativa para investigar rasgos generales de la respuesta a la inundación. Tal es el caso de *Brachypodium distachyon* que es una gramínea con características similares a los cereales más consumidos en el mundo. El tamaño de su genoma es similar al de *Arabidopsis thaliana*, y es uno de los genomas más simples reportados en pastos. Además, tiene tiempos de germinación cortos y la secuencia genómica de varios ecotipos se encuentra reportada en bases de datos especializadas como Phytozome, lo que la convierte en un modelo de estudio adecuado para realizar análisis que permitan identificar sus respuestas y trasladarlas a cultivares superiores (Vogel *et al.*, 2010).

En el caso de la inundación, se han caracterizado fisiológica y molecularmente diferentes ecotipos de *B. distachyon* frente a la inundación, y se han encontrado ecotipos tolerantes y sensibles. Cuando se compararon los transcriptomas de los ecotipos Bd21 (sensible) y Bd2-3 (tolerante), se descubrió que el manejo de ROS en el ecotipo tolerante era un factor relevante de tolerancia (Rivera-Contreras *et al.*, 2017). Posteriormente, en otro estudio transcriptómico, se contrastó a Bd21 y Bd21-3 en un diseño experimental diurno en el que se descubrieron más de 3000 transcritos que varían su expresión dependiendo, no sólo del estrés, sino también de la hora del día, involucrando así al ciclo circadiano en la respuesta a la inundación (figura 7, Medina-Chávez *et al.*, 2023).

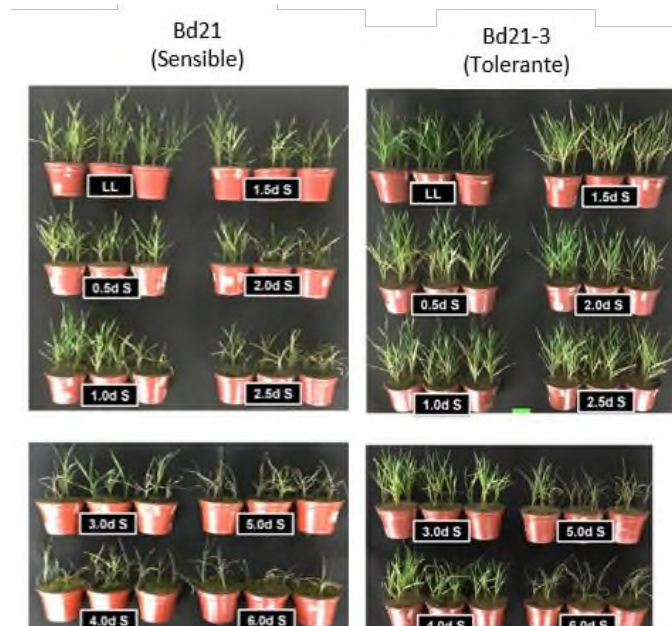


Figura 7. Tolerancia diferencial en ecotipos Bd21 y Bd21-3 de *Brachypodium*. Las plántulas de 14 días de germinación se sometieron simultáneamente en tratamientos de sumersión con condiciones de baja luz. Bd21 presenta síntomas de estrés después de un día de tratamiento, mientras que Bd21-3 presenta hasta después de 4 días (Medina-Chávez *et al.*, 2023). Controles de baja luz (LL) y sumersión (S).

Adicionalmente, sus ecotipos Bd21 (sensible) y Bd21-3 (tolerante) presentan tolerancia diferencial a la inundación (Rivera-Contreras, 2017; Medina-Chávez *et al.*, 2023). Esta diferencia de expresión fenotípica a periodos de inundación pudo permitir contrastar los efectos asociados a estos eventos e identificar genes potencialmente relacionados con la tolerancia al estrés por inundación.

En el trabajo de Medina-Chavez *et al.*, (2023), que es antecedente directo del presente, se analizaron 5 tiempos correspondientes al segundo día de inundación. Lo anterior permitió observar la expresión diferencial de genes con expresión diurna, como los asociados a la actividad fotosintética, y al propio ciclo circadiano. El ciclo circadiano le permite a las plantas regular su expresión de genes ante cambios ambientales diarios y estacionales (Inoue *et al.*, 2018). Estos cambios dinámicos indican que la modulación de la respuesta a la inundación varía según el momento del día (Medina-Chávez *et al.*, 2023).

Estos experimentos de sumersión en periodos de oscuridad y luz utilizando los ecotipos Bd21 y Bd21-3 de *Brachypodium distachyon* permitieron el análisis transcriptómico que reveló la expresión diferencial de genes entre ambos ecotipos. Entre los transcritos que poseen una anotación de actividad biológica está Bradi3g44950 (IF1) que codifica para INHIBITOR FACTOR 1, que no había sido involucrado en la respuesta a la inundación, y que aumentó su expresión en al menos 5 veces en Bd21-3 en inundación desde el comienzo del registro y especialmente a partir de las 16 horas que alcanzó un incremento de 13 veces en estrés por inundación. En comparación, en Bd21 no se observó una expresión diferencial con los controles (figura 8A).

Asimismo, se identificaron genes que no poseen una identidad bioquímica estudiada, es decir, son de función desconocida, y que aumentaron su expresión, y también adquirieron una oscilación circadiana distinta a sus controles sin estrés por inundación (condición de luz normal y baja). Tal es el caso de Bradi1g68957 (UK7) que en Bd21-3 mostró un aumento en su expresión de 5 veces durante las primeras horas, disminuyendo a las 16 horas, punto donde comenzó a ir en aumento nuevamente. Sin embargo, su expresión no cambió significativamente en Bd21 (figura 8B; Medina-Chávez *et al.*, 2023). Este descubrimiento indica el valor de uso de ecotipos diferenciales en el estudio de la inundación y podría llevar a la razón por la cual no se había involucrado en esta respuesta previamente.

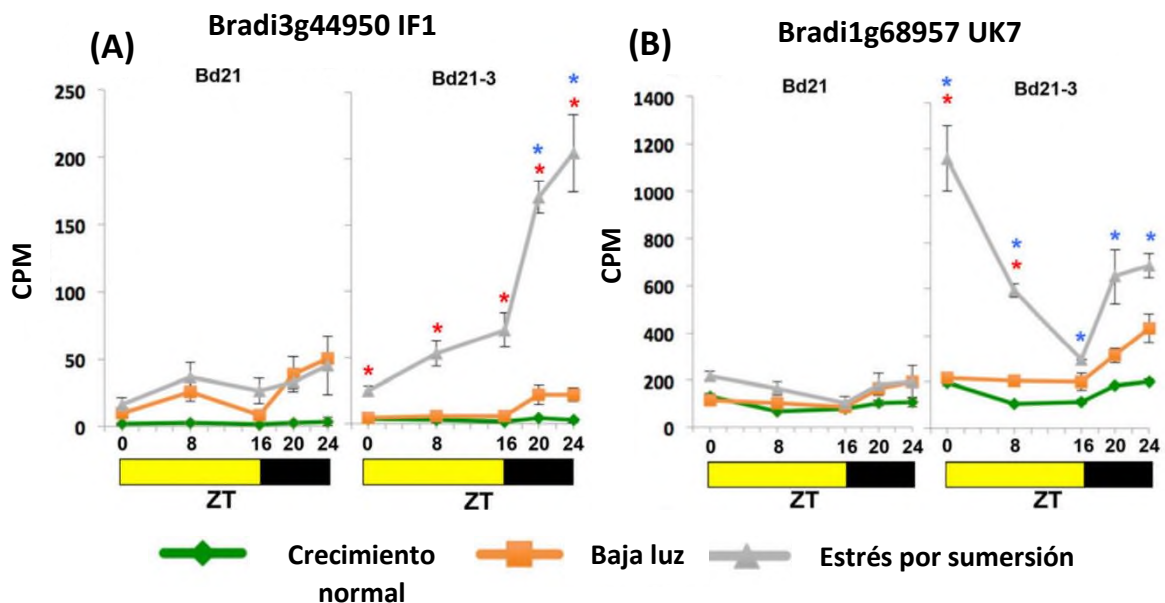


Figura 8. Expresión de los genes IF1 y UK7 de *Brachypodium distachyon* en tratamientos de sumersión y baja luz. Ambos genes aumentaron su expresión en estrés por inundación, pero UK7 (Desconocido) parece oscilar según el ciclo circadiano. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (rojo) y entre ecotipos (azul).

1.6 El factor inhibidor 1 de la ATPasa mitocondrial F₁-F₀

El gen Bradi3g44950 posee identidad con ATP5IF1 de *Bos Taurus*, que es un inhibidor proteico de la F₁-F₀ ATP sintasa, un nanomotor reversible que puede sintetizar o hidrolizar ATP según el gradiente de protones transmembranal (Noji & Ueno, 2022). Es un único mecanismo con el cual los organismos vivos convierten el potencial de membrana en energía química, siendo así una de las mayores fuentes de energía de la célula (Kühlbrandt, 2019). Se encuentra en la membrana de mitocondrias, cloroplastos y bacterias (Junge & Nelson, 2015). Está compuesta por un dominio de membrana llamado F₀ y una cabeza F₁. Este último se compone a su vez por 3 subunidades α y β intercaladas entre sí, con 3 sitios catalíticos que se encuentran en las subunidades β en la interfase con las subunidades α (figura 9; Cabezón *et al.*, 2003).

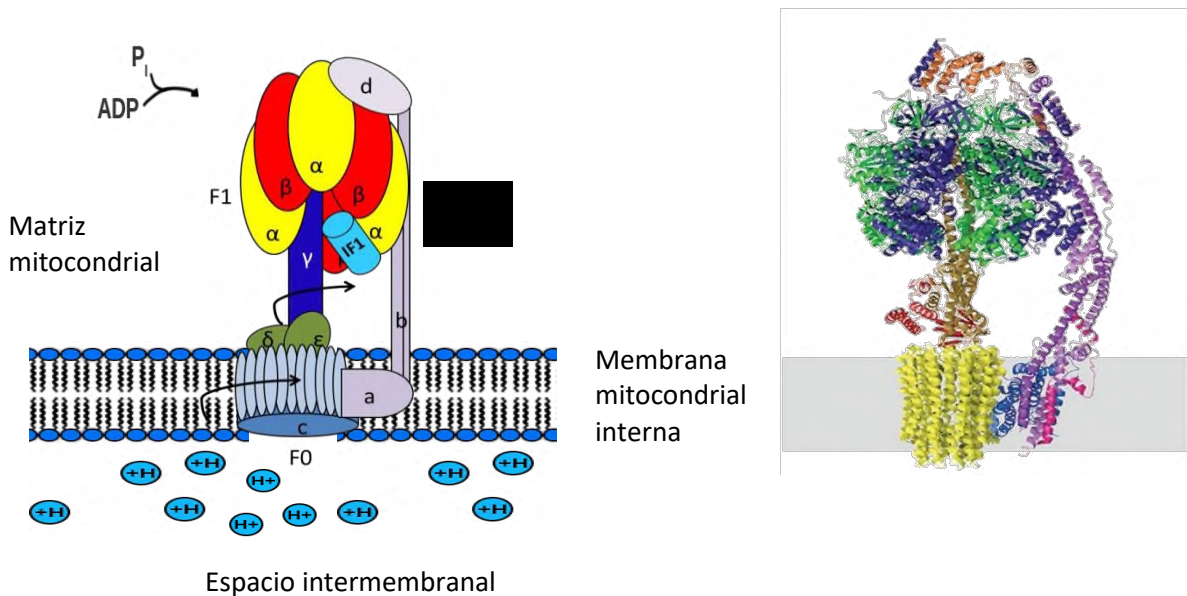


Figura 9. Estructura de la F₀-F₁ ATP sintasa. Representación esquemática (izquierda) y estructura cristalográfica (derecha) de ATPasa mitocondrial de bovino. La subunidad γ une ambos dominios y junto a las subunidades δ y ϵ forman el rotor de la enzima. El cilindro rotor es el anillo de subunidades c , que requiere la translocación del mismo número de protones para girar 360°, que en mamíferos es 11, es decir, el coste bioenergético es de 3.7 protones/molécula de ATP (Bermúdez-García, 2015; Kühlbrandt, 2019).

Cuando la célula sufre hipoxia y el gradiente de protones disminuye, la síntesis de ATP cambia a hidrólisis y la rotación invierte su dirección (contrario a las manecillas del reloj, CCW). Dado que puede suponer un consumo inútil de trabajo, la enzima cuenta con mecanismos de

inhibición de dicha hidrólisis basados en cambios conformacionales de la subunidad β (que se requiere para la catálisis) o directamente bloqueando la rotación de la subunidad γ . Entre los mecanismos de inhibición se encuentra la inhibición por Mg-ADP, el mecanismo de bloqueo de giro del rotor central por la subunidad ϵ (presente en bacterias) y por la subunidad ζ (presente en α -proteobacterias), un puente disulfuro redox regulado por luz de la subunidad γ (encontrado en la ATPasa cloroplástica) y el factor inhibidor de la ATPasa mitocondrial que inhibe estrictamente la hidrólisis de ATP (figura 10; Mendoza-Hoffmann *et al.*, 2022).

IF1 es una proteína corta (84-110 aminoácidos) y de bajo peso molecular, que inhibe la actividad de hidrólisis de ATP de forma exclusiva en la mitocondria (Chen *et al.*, 2020; Gatto *et al.*, 2022). Se ha descrito la existencia de 3 isoformas de la proteína, fruto del splicing alternativo (Xu *et al.*, 2009), sin embargo solo la isoforma 1 parece expresarse considerablemente, mientras que las otras son apenas perceptibles. Cuenta con una pre-secuencia de localización mitocondrial formada por los primeros los primeros 25 aminoácidos N-terminal que se escinden durante su transporte (Xu *et al.*, 2009).

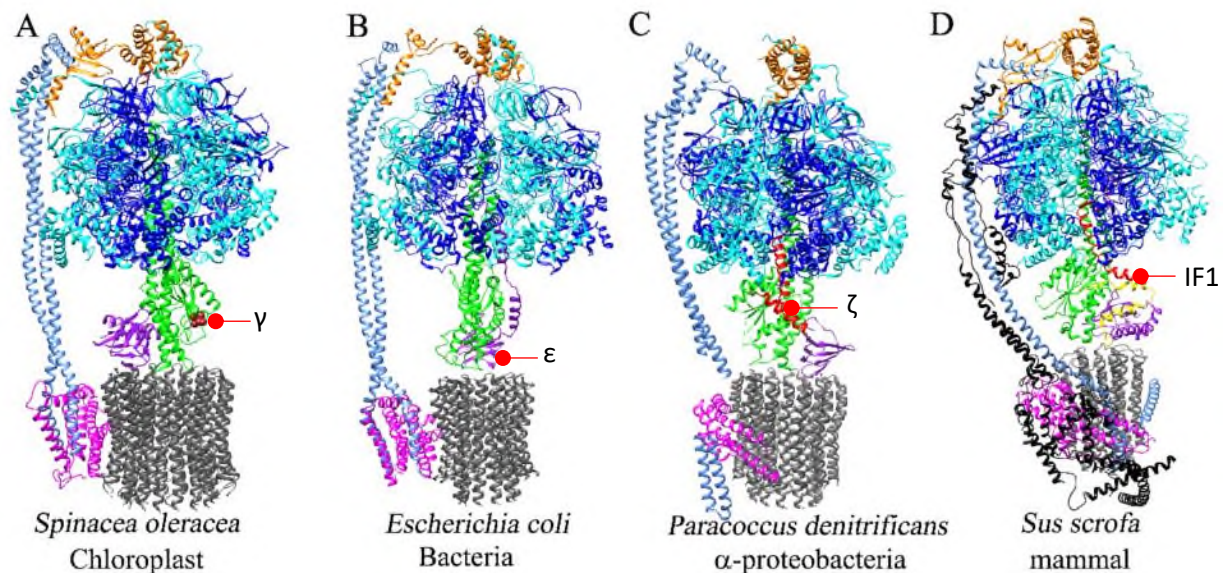


Figura 10. Modelo atómico de diferentes ATPasas siendo inhibidas. A) ATPasa cloroplástica (PDB_id 6VON). Las cisteínas reguladoras de la subunidad γ se representan en esferas café. B) ATPasa bacteriana (PDB_id 5T4O) es inhibida por su subunidad ϵ . C) ATPasa de α -proteobacteria (PDB_id 5DN6) es inhibida por su subunidad ζ . D) ATPasa mitocondrial (PDB_id 6J5I) que es inhibida por el IF1.

El dominio inhibidor altamente conservado se encuentra en la región N-terminal interactuando con la subunidad β . Para la unión específica se requiere que IF1 interactúe con la conformación abierta (E), que pasará a la conformación cerrada (DP) después de la hidrólisis de 2 ATP (figura 11). Estudios indican la presencia de un importante puente salino entre Glu30 en el inhibidor y el residuo Arg408 de la subunidad β_{DP} (Bermúdez-García, 2015; Ichikawa *et al.*, 2005).

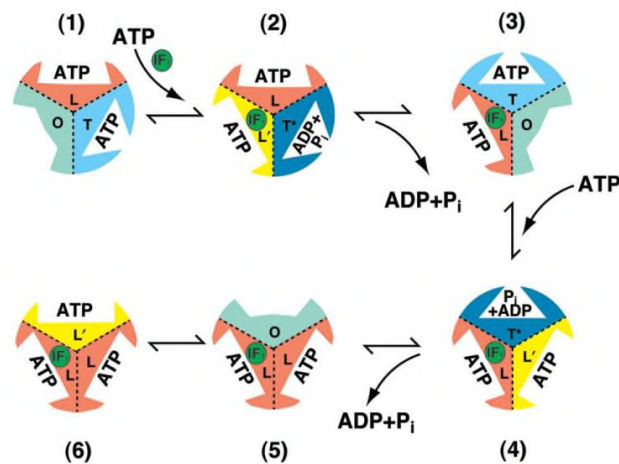


Figura 11. Esquema de inhibición de hidrólisis por IF1. IF1 se une en la conformación abierta (O) junto a un ATP, resultando en la hidrólisis de ATP en el sitio ajustado (T) (paso 1, 2 y 3). Un segundo ATP entra en la ahora conformación abierta y se hidroliza otro ATP de la conformación ajustada (paso 4 y 5). Un tercer ATP entra en la conformación que ahora es la abierta y el mecanismo deja de hidrolizar (Cabezón *et al.*, 2003).

En plantas, la secuencia de IF1 se determinó en arroz (*Oryza sativa*) y su análisis con la proteína verde fluorescente (GFP) indicó una localización mitocondrial (Nakazono *et al.*, 2000). Estudios bioinformáticos revelaron que IF1 en plantas es un ortólogo de otros IF1 en eucariotas y que algunas contienen múltiples copias del gen debido a eventos de duplicación genómica (Chen *et al.*, 2020).

El estudio de IF1 en plantas indica que comparte la misma función que en mamíferos, aunque su estudio es incipiente (Chen *et al.*, 2020, 2021). En *Arabidopsis thaliana* su función se ha conservado como inhibidor endógeno, jugando un rol importante en el crecimiento y desarrollo de la planta, particularmente en su fertilidad (Chen *et al.*, 2021). En el caso de la hipoxia

generada por inundación en *B. distachyon*, pareciera lógica su expresión en el contexto de la conservación de energía en el ecotipo tolerante a través de su mecanismo inhibitorio de IF1.

1.7 UK7 un gen de función desconocida

Por su parte, UK7 está reportado como un gen de función desconocida. No obstante, su aumento de expresión en el ecotipo tolerante y su aparente patrón oscilatorio bajo condiciones de inundación, lo convierte en un candidato interesante para su caracterización pues podría ofrecer información sobre los mecanismos o vías de señalización en los que participa.

2. JUSTIFICACIÓN

El cambio climático global y la predicción de futuras demandas de mayor abastecimiento alimenticio, requieren buscar estrategias que favorezcan la producción de cultivos capaces de sobrevivir estos eventos. Para ayudar a esta meta, es necesario conocer los mecanismos de respuesta a factores adversos para la economía agrícola, como la inundación.

Como caso exitoso del potencial de la biotecnología está el arroz, cuya capacidad de germinar y proliferar en distintos ambientes con excesos de agua permitió identificar a SUB1A, que al transferirlo mediante cruza y seguimiento con marcadores moleculares a otros cultivares permitió hacer disponibles nuevos germoplasmas tolerantes a periodos más largos de inundación.

Para caracterizar nuevos candidatos genéticos de mejoramiento vegetal, se pueden tomar estudios genéticos del estrés por inundación en plantas sin historia evolutiva en ambientes inundados y que posean amplias herramientas de investigación. Tal es el caso de *Brachypodium distachyon* y sus ecotipos, Bd21 (sensible) y Bd21-3 (tolerante) que presentan tolerancia contrastante a la inundación, en los que su evaluación transcriptómica reveló a un grupo de genes que aumentaron su expresión diferencial entre ambos ecotipos, suponiendo una relación en la respuesta al estrés por inundación. Tal es el caso del gen IF1 (Bradi3g44950), que codifica para una proteína inhibidora de la ATP sintasa, y UK7 (Bradi1g68957), cuyo transcrito tiene función desconocida pero alta de expresión oscilatoria diurna en estrés.

La caracterización de estos genes, se puede lograr al comparar sus secuencias con el uso de herramientas bioinformáticas con varios fines. Entre ellos, el diseñar oligonucleótidos que funcionen como marcadores moleculares, los cuales permitirán el rastreo de cruza, a fin de generar líneas isogénicas de la variedad sensible, pero con el gen del ecotipo tolerante para comprobar el rol e importancia individual de los genes en la respuesta a estrés por inundación.

De manera concomitante, también permite comparar la secuencia del gen UK7 para descubrir análogos, estructura predicha, clasificación, hacer alineamientos con otras secuencias de organismos que cuenten con un alto porcentaje de similitud para atribuirle funciones teóricas a su transcrito, sitios de dominio, y participación en el metabolismo celular.

3. HIPÓTESIS

Las secuencias de los genes IF1 y UK7 de los ecotipos de *Brachypodium distachyon* Bd21 y Bd21-3 presentarán diferencias que permitirán su aplicación como marcadores de estos ecotipos.

4. OBJETIVOS

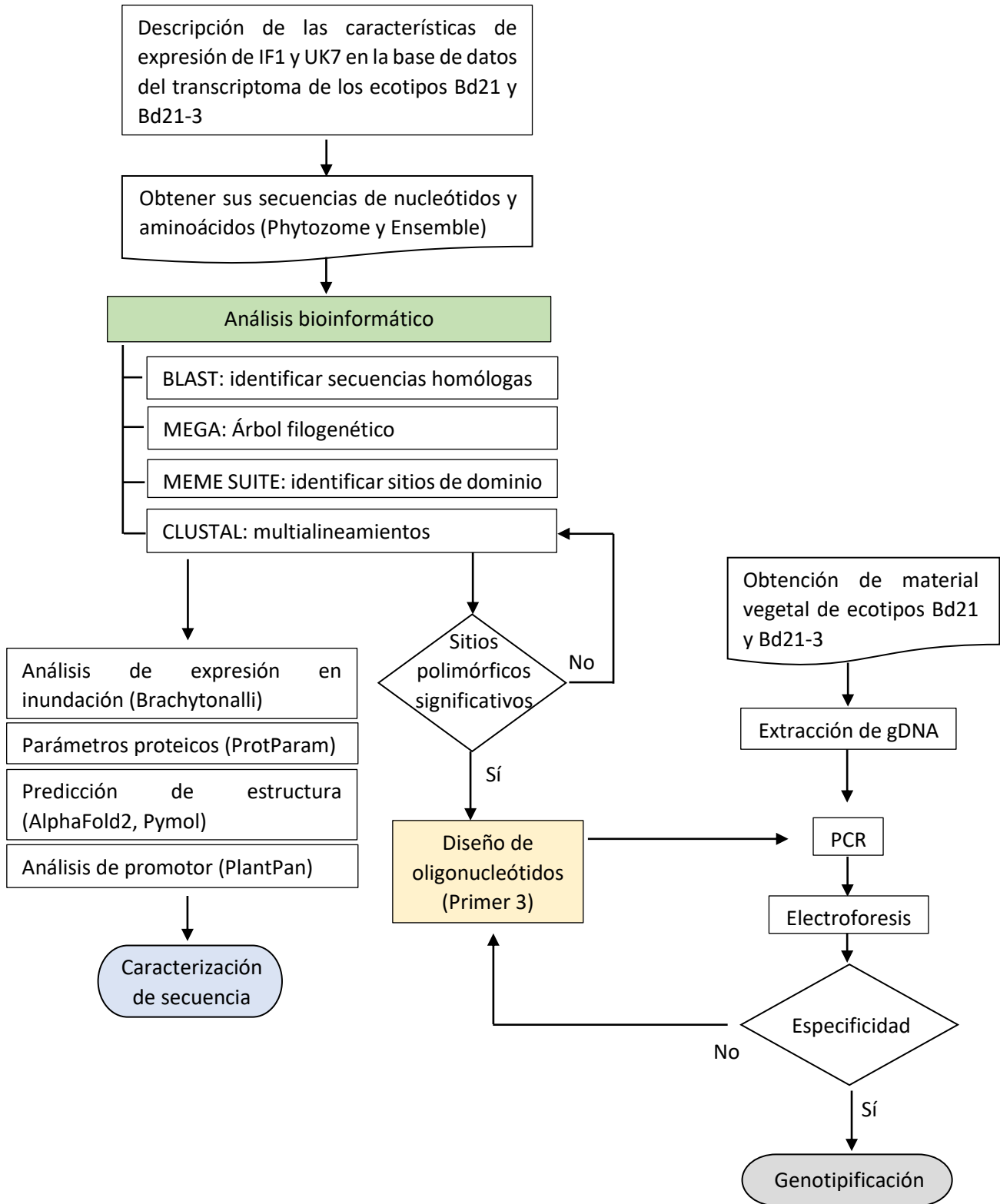
4.1 Objetivo general

Diseñar marcadores moleculares de los genes IF1 y UK7 de los ecotipos Bd21 y Bd21-3 de *Brachypodium distachyon* que permitan diferenciar su origen alélico.

4.2 Objetivos específicos

- I. Describir bioinformáticamente a las secuencias de los genes IF1 y UK7 para proponer características funcionales teóricas.
- II. Analizar mediante métodos bioinformáticos las secuencias de los genes IF1 y UK7 para identificar zonas polimórficas entre los ecotipos Bd21 y Bd21-3.
- III. Diseñar oligonucleótidos que permitan identificar las secuencias polimórficas de la variedad tolerante a inundación.
- IV. Detectar por PCR ambos marcadores en los ecotipos Bd21 y Bd21-3.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Análisis bioinformático

6.1.1 Obtención de secuencias de consulta

Se utilizó la base de datos especializada en plantas Phytozome V.13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>; Goodstein *et al.*, 2012), para obtener las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los alelos Bradi3g44950 (IF1) y Bradi1g68957 (UK7) de *Brachypodium distachyon* V3.2 (Phytozome genome ID: 556, NCBI taxonomy ID: 15368) seleccionado como el ecotipo sensible a la inundación (Rivera-Contreras, 2017; Medina-Chávez *et al.*, 2023) y cuyas secuencias sirvieron como referencia de consulta. Se buscaron los mismos genes en Bd21-3 (v1.2, Phytozome genome ID: 537, NCBI taxonomy ID: 15368), seleccionado como el ecotipo tolerante a inundación, utilizando la matriz de comparación BLOSUM62 con un valor umbral de expectativa (E) de -1.

6.1.2 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para PCR de genotipificación se diseñaron buscando tanto la secuencia codificante como la de su extremo derecho e izquierdo con el Genomic Browser de Phytozome, sin alcanzar a los genes adyacentes. Se hizo la excepción con genes sobrelapantes o muy cercanos (~500 pb).

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias mediante “Clustal Omega” (Sievers & Higgins, 2018) del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para la identificación de sitios polimórficos.

Se tomaron en consideración las secciones de la secuencia que presentaron brecha (gap) significativa ≥ 16 pb por ser el mínimo visible en electroforesis, y se alimentaron en el sitio web Primer3 v0.4.0, ± 300 pb con condiciones de amplicón mínimo de 80 pb. La síntesis de los oligonucleótidos se llevó a cabo por la compañía OligoT4 (<https://t4oligo.com/oligohome/>).

6.1.3 Análisis filogenético

Para la búsqueda de homólogos tanto en *Brachypodium* como en otras especies de plantas, se realizó un análisis BLAST por cada gen a través de Phytozome y Ensemble (Benson *et al.*, 2017; Harrison *et al.*, 2024), donde se alimentó con las secuencias de consulta de aminoácidos mencionadas en el apartado 7.1.1, buscando en los organismos objetivo Bd21-3 (v1.2, Phytozome genome ID: 537, NCBI taxonomy ID: 15368) y Bd21 (V3.2, Phytozome genome ID: 556, NCBI taxonomy ID: 15368). Adicionalmente, se incluyeron las especies objetivo *Triticum*

aestivum (v2.2, Phytozome genome ID: 296, NCBI taxonomy ID: 4565), *Zea mays* (RefGen_V4, Phytozome genome ID: 493, NCBI taxonomy ID: 4577), *Oryza sativa* (v7.0, Phytozome genome ID: 323, NCBI taxonomy ID: 39947), y *Arabidopsis thaliana* (TAIR10, Phytozome genome ID: 167, NCBI taxonomy ID: 3702).

Para la búsqueda de homólogos en animales se hizo un análisis BLAST a través de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Sayers *et al.*, 2021), en *Bos taurus* (Taxonomy ID: 9913) y *Homo sapiens* (Taxonomy ID: 9606) para Bradi3g44950 (IF1), y sin organismo objetivo para Bradi1g68957 (UK7). Para este último, se ejecutó un análisis tblastn (Zhang *et al.*, 1997), para la identificación de similitudes con la secuencia de consulta en los genomas al traducir una secuencia de nucleótidos en las seis posibles fases de lectura y revelar posibles regiones que codifiquen al gen que aún no estén reportadas.

Las secuencias que indicaron los análisis BLAST fueron descargadas para la construcción de árboles filogenéticos en el software MEGA 7 (S. Kumar *et al.*, 2016), en versión gráfica (<https://www.kent.ac.uk/software/mega-7>), mediante el método “Construct/Test Neighbor-Joining Tree (1000 *bootstrap* modelo de *Poisson*, *uniform rates* y *Pairwise deletion*)”.

6.1.4 Sitios de dominio

Para identificar dominios conservados, las secuencias de todos los aminoácidos obtenidos del análisis previo se estudiaron en MEME suite (<https://meme-suite.org/meme/>; Bailey *et al.*, 2009) mediante el método de Multiple Maximum Expectation (MME), con cero o una ocurrencia por secuencia (zoops) y con una longitud mínima de 6 y máxima de 50 por cada motivo.

6.1.5 Análisis de expresión en inundación

Para analizar el nivel de expresión en tratamientos de estrés energético de los genes homólogos de IF1 y UK7 de *Brachypodium distachyon* obtenidos como se describió en el apartado 7.1.3, se utilizó la base de datos Brachytonalli (<https://brachytonalli.shinyapps.io/tonalli/>); considerando como umbral de regulación un valor de Log2FC de 1.5/-1.5, un recuento mínimo de expresión de 15 CPM y un FDR máximo de 0.000005 como significativo (Medina-Chávez *et al.*, 2023).

6.1.6 Parámetros proteicos

Para el caso de Bradi1g68957 (UK7), de *Brachypodium distachyon* V3.2, cuya función no ha sido reportada, se comenzó su análisis desde lo fundamental, analizando su secuencia de aminoácidos con la herramienta ProtParam del portal de recursos ExPasy del Instituto suizo de bioinformática (SIB) (<https://web.expasy.org/protparam/>; Gasteiger *et al.*, 2005), para el cálculo de parámetros físicos y químicos como el peso molecular, punto isoeléctrico teórico, composición de aminoácidos y vida media estimada.

6.1.7 Predicción de estructura

Se utilizó AlphaFold2 para predecir el plegado de proteínas mediante el sitio Neurosnap (<https://neurosnap.ai/>; Jumper *et al.*, 2021), se alimentaron las secuencias de consulta mencionadas en el apartado 7.1.1, sin introducir un archivo de plantilla o alineación múltiple de secuencias (MSA) personalizada, con un modelo automático de predicción y 5 números de reciclos. Se usó el servidor MolProbity de la Escuela de medicina de la Universidad de Duke (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>; Rose *et al.*, 2018), para validar la estructura predicha mediante un gráfico de Ramachandran.

Se usó la herramienta Pymol 3.0 (<http://www.pymol.org/pymol>; Schrödinger & DeLano, 2020), para la visualización y análisis de la estructura en archivo PDB.

6.1.8 Estructura de proteína con región intrínsecamente desordenada

Para predecir la estructura secundaria de Bradi1g68957 (UK7), que posee una región candidata a proteína intrínsecamente desordenada, se utilizaron los siguientes softwares: I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>; Yang *et al.*, 2015), YASSPP (<http://glaros.dtc.umn.edu/yasspp/>; Karypis, 2006), PSIPRED 4.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>; Buchan & Jones, 2019), YASPIN (<https://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>; Lin *et al.*, 2005), ASSP2 (<http://crdd.osdd.net/raghava/apssp2/>; Krippahl, 2006), Uva FASTA Server (https://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?Rm=misc1; Pearson & Lipman, 1988), y NetSurfP-3.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetSurfP-3.0/>; Høie *et al.*, 2022), los cuales se alimentaron con la secuencia de aminoácidos en formato fasta y se corrió con los parámetros predeterminados establecidos.

Para corroborar la predicción de proteína con región intrínsecamente desordenada se usó Metapredict online v2.4 (<https://metapredict.net/>; Lotthammer *et al.*, 2023), como predictor de consenso.

6.1.9 Análisis de promotor

Se realizó un alineamiento introduciendo la secuencia de 2000 nucleótidos río arriba de la región 5'UTR de los alelos Bradi3g44950 (IF1) y Bradi1g68957 (UK7) de Bd21 y Bd21-3 mediante CLUSTAL Omega, para la detección de polimorfismos entre ambos ecotipos. Se hizo un escrutinio identificando cada una de las mutaciones. Estos sitios fueron analizados mediante el software PlantPan v4.0 (<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/plantpan3/download/index.php>; Chow *et al.*, 2024), para evaluar si el polimorfismo coincidía con un probable factor de transcripción, alterando su secuencia consenso. Dentro de la interfaz de PlantPan se utilizó la herramienta "Gene search" de *Brachypodium distachyon*, introduciendo el código Gramene (<https://www.gramene.org/>; Tello-Ruiz *et al.*, 2022), KQJ99736 y KQK22714 de IF1 y UK7 respectivamente como identificador del gen, siguiendo las coordenadas ascendentes del promotor del programa (figura 12).

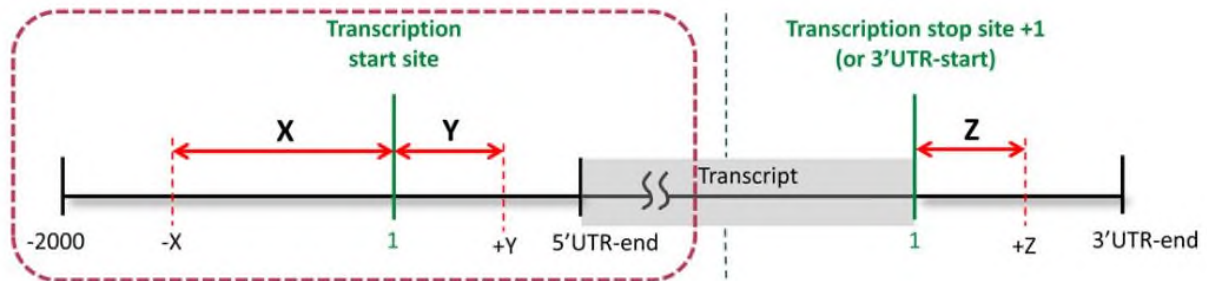


Figura 12. Coordenadas ascendentes y descendentes del promotor. La región utilizada comprende del sitio de inicio de transcripción a la posición -2,000.

6.2 Cultivo de *Brachypodium distachyon* y extracción de ADN genómico

Para la obtención del material genético se utilizaron semillas de los ecotipos Bd21 y Bd21-3 de *Brachypodium distachyon* obtenidas de la colección del laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad del Papaloapan (UNPA), provenientes del Departamento de Agricultura de Estados Unidos a través del Dr. David Garvin (USDA).

Las semillas se desinfectaron en tandas máximas de 100 semillas, con una solución de 40 mL de hipoclorito de sodio al 1.6% w/v, en agitación durante 5 min, realizando 3 ciclos de enjuague usando 50 mL agua destilada estéril y agitando durante 1 min. Posteriormente, se adicionó agua desionizada estéril para romper la dormancia y se incubaron a 4 °C en oscuridad durante 3 días para sincronizar la germinación.

Las semillas germinaron en una mezcla de sustrato Cosmopeat y perlita (3:1), previamente esterilizada (121 °C durante 15 min a 15 psi), y adicionada con fertilizante Nitrofoska (relación NPK 15-15-20) en una concentración 2% p/p (16.4 g por cada 4 L).

Se utilizaron macetas de 150 mL rotuladas con el nombre de los ecotipos y fecha de siembra. Se sembraron 5 semillas por maceta y se dejaron germinar durante 5 días. Las plántulas crecieron en el cuarto de crecimiento vegetal del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan en condiciones de luz oscuridad de 16h /8 h con una intensidad lumínica de 150-180 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 60% de humedad, 23±2 °C de temperatura ambiente y riego con agua potable filtrada cada 2 días, durante 3 semanas.

Se colectaron hojas sanas y se almacenaron -80 °C hasta su uso. Se extrajo el ADN genómico (gDNA) triturando las hojas con un mini pistilo estéril utilizando nitrógeno líquido como congelante externo. Posteriormente, se añadieron 500 μL de buffer de extracción (tabla 1) y se incubó por 30 min a 65 °C en un termobloque.

Tabla 1. Componentes de buffer de extracción

Componentes	Cantidades
EDTA 0.5 M (pH 8)	1.0 mL
NaCl 2.5 M	2.0 mL
Tris 1 M	0.5 mL
SDS 10%	0.4 mL
H ₂ O desionizada	6.1 mL
Volumen final	10.0 mL

Se añadieron 500 μL de fenol-cloroformo (24:1) y se mezclaron en un vortex por 10 s; después se centrifugó a 14,000 g (velocidad máxima) por 10 min a temperatura ambiente para obtener una separación de fases de la cual se recolectó la fase sobrenadante. Se colocó en un

tubo nuevo y se agregaron 500 μL de isopropanol y se incubó por 30 min a temperatura ambiente seguido de una centrifugación a 14,000 g por 15 min para la precipitación del ADN. Se decantó el sobrenadante dejando la pastilla de ADN en el fondo del tubo.

La pastilla de ADN se lavó usando 750 μL de etanol al 70%, se mezcló con un vortex y se centrifugó a velocidad máxima durante 7 min para posteriormente decantar el etanol. Se agregó 500 μL de agua destilada desionizada (ddH_2O) adicionada con 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de RNasa y se incubó a 37 °C por 30 min en un termobloque.

La integridad del gDNA se observó en un gel de agarosa al 1% utilizando un buffer de corrida TAE 1X y se visualizó en un fotodocumentador utilizando como marcador de referencia de longitud a 1 Kb Plus DNA Ladder de la marca Invitrogen (10787018/10787026). Se guardó hasta su uso a -20 °C.

6.3 Preparación y evaluación de la calidad de los oligonucleótidos

6.3.1 Condiciones de operación de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se resuspendieron en agua bidestilada estéril filtrada (Filtro Walkman 0.02 μm) e irradiada con luz UV para obtener la solución stock a una concentración de 100 mM. Se realizó una dilución 1:10 para cada oligonucleótido (45 μL de ddH_2O y 5 μL de oligonucleótidos).

Se realizaron pruebas de PCR en gradiente para determinar la mejor temperatura de alineamiento de cada par de primers, en un intervalo de +/- 5°C de la temperatura de alineamiento calculada por la compañía OligoT4. Se utilizó como molde el ADN genómico del ecotipo Bd21 y con un tiempo de extensión de 30 segundos. Se observaron en un gel de agarosa al 2% utilizando un buffer de corrida TAE 1X y se visualizó en un fotodocumentador.

6.3.2 Programa de PCR para genotipificación

Para la PCR, se utilizó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (Thermo scientific, K1082). Se preparó una mezcla con los componentes de la tabla 2 para cada par de oligonucleótido previamente diseñados en el apartado 7.1.2. El gDNA extraído de Bd21 y Bd21-3 se usó en una dilución 1:50. Como control negativo se usó un tubo sin molde.

Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR de oligonucleótidos

Componente	Cantidad
ddH ₂ O	5 µL
DreamTaq Green MM	10 µL
Oligo F	2 µL
Oligo R	2 µL
gDNA 1:50	1 µL
Volumen total	20 µL

Se utilizó el programa de ciclado como se muestra en la tabla 3, en un termociclador (Techne TC-512).

Tabla 3. Programa de PCR para los oligonucleótidos

Desnaturalización inicial a 95 °C	3 min	
Desnaturalización a 95 °C	30 s	35 ciclos
Alineamiento a T _m °C	30 s	
Extensión a 72 °C	1 min/1000 pb	
Elongación final a 72 °C	5 min	

Se simuló un heterocigoto de una cruce de Bd21 y Bd21-3, mezclando 10 µL del ADN del tubo de reacción con amplicón de Bd21 con 10 µL del ADN del tubo de reacción con amplicón de Bd21-3. Esta mezcla contiene una combinación de fragmentos de ADN de ambas variantes parentales.

Los productos cuyos amplicones tuvieran una diferencia entre sí de ≥ 20 pb se corrieron en un gel de agarosa al 3% con buffer de corrida TAE 1X, mientras que los menores a 20 pb se corrieron en un gel de acrilamida 6% con los componentes de la tabla 4.

Tabla 4. Componentes del gel de acrilamida

Componente	Cantidad
Acrilamida 40% 19:1 BIS	750 μ L
TBE 10X	500 μ L
ddH ₂ O	3.75 mL
APS 10X	100 μ L
TEMED	20 μ L
Volumen total	5 mL

Los geles se visualizaron en un fotodocumentador, utilizando como marcador de referencia de longitud a 1 Kb Plus DNA Ladder.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis del gen Bradi3g449950

La base de datos Phytozome indica que el gen Bradi3g44950 está formado por 3 exones, 2 intrones, un extremo 5'UTR de 242 pb y un extremo 3' UTR de 608 pb (figura 13). Se encuentra localizado en el cromosoma 3 en el sitio entre 46,641,836 y 46,643,230 pb en dirección reversa. Su secuencia genómica es de 1,394 nucleótidos, de los cuales 250 nucleótidos pertenecen a intrones y 294 forman parte de la secuencia codificante que da lugar a un péptido de 98 aminoácidos. La anotación en Phytozome lo describe como inhibidor de la F1-F0 ATPasa.

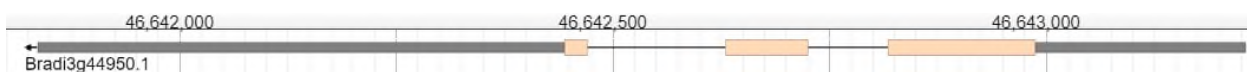


Figura 13. Estructura genómica del gen Bradi3g44950 obtenida de Phytozome. Este gen posee un gen predicho en paralelo inverso (Bradi3g44947) que se omitió de la figura por claridad.

7.1.1 Homología de secuencias

Las secuencias de aminoácidos de IF1 en *Arabidopsis thaliana* y *Bos taurus* tienen un porcentaje de identidad global de 26.74%, mientras que en la región inhibidora (39-72 Aa) comparten un 28.21% con aminoácidos altamente conservados (material suplementario 1). Aunque estos valores son menores en comparación con la homología de la secuencia de IF1 entre humanos y bovinos (71.4% de identidad), permiten delimitar las regiones características que componen a la proteína (figura 14A).

Los aminoácidos de *A. thaliana* y *B. distachyon* son idénticos en un 44.1% de forma global, siendo la región inhibidora la zona con mayor porcentaje de homología (74.29%); (material suplementario 2). El dominio de dimerización reportado en bovinos (C-terminal), responsable de formación del homodímero no parece tener un dominio conservado entre animales y plantas (figura 14B; Cabezon *et al.*, 2000).

La región de inhibición presente en animales tiene un dominio altamente conservado (G...E...A...E...Y). El análisis de estructura en plantas permitió corroborar los aminoácidos que participan en la unión de IF1 con la subunidad β de la ATPasa, como glutamato 30, al cual debe su actividad (figura 14C; Ichikawa *et al.*, 2005).

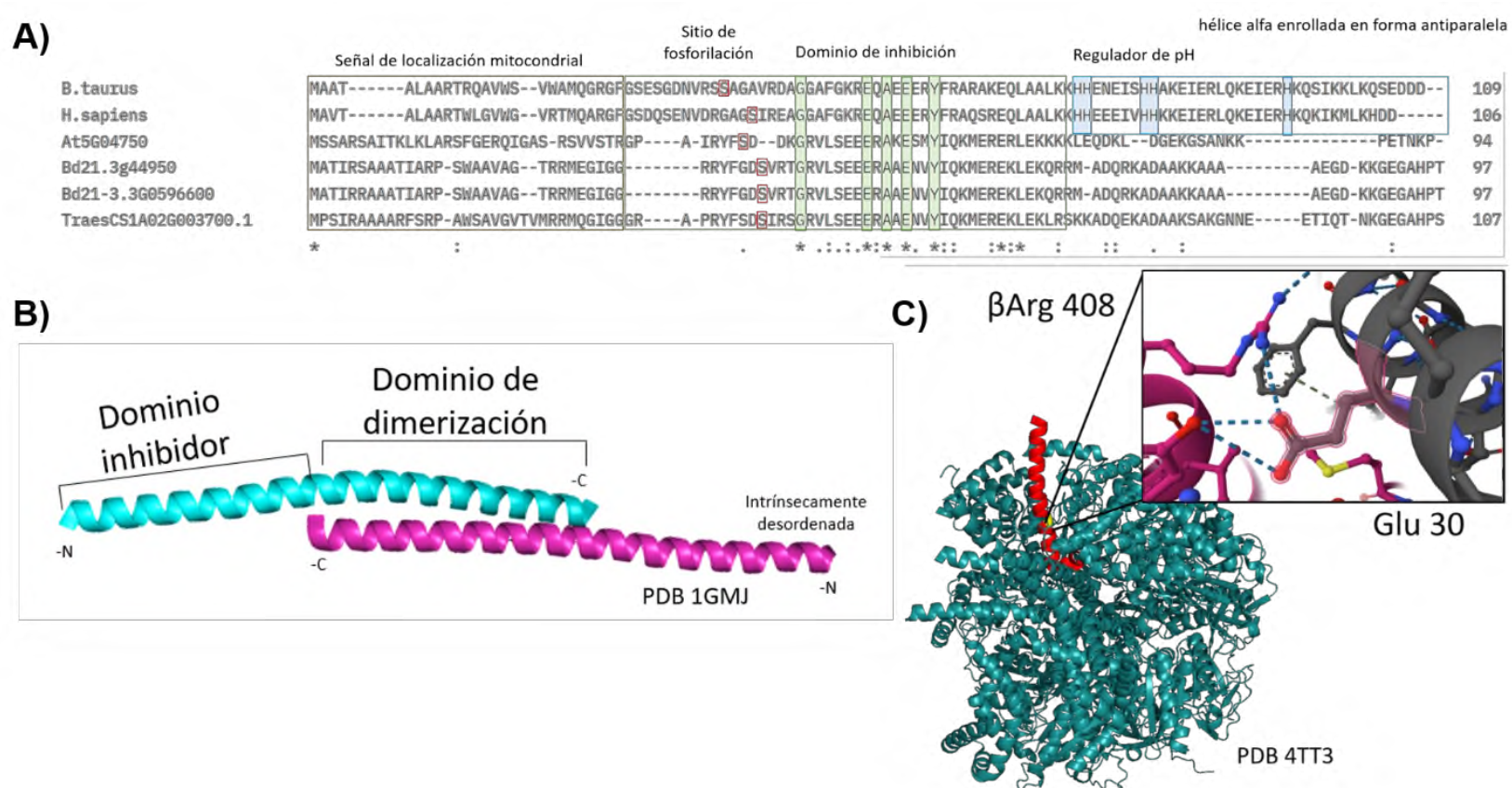


Figura 14. Características de IF1 en animales. A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de IF1 de *B. taurus*, *H. sapiens*, *A. thaliana*, *B. distachyon* Bd21 y Bd21-3 (secuencia de consulta) y *T. aestevium*. Se resalta cada región de la proteína. En café la señal de localización mitocondrial que se escinde en el transporte a la mitocondria (~25 Aa); En verde la región de inhibición, destacando el dominio conservado y en cuadros rojos, las serinas que regulan a la proteína al ser fosforiladas. En azul el dominio hélice alfa reportado en animales y no encontrado en plantas, señalando el doble par de histidinas que regulan la activación por pH de IF1. B) Estructura cristalográfica del homodímero de IF1 bovino (PDB: 1GMJ). Los monómeros (cian y morado), interactúan en su región C-terminal, dejando libre el dominio inhibidor (N-terminal, región intrínsecamente desordenada) que interactuará con la ATPasa en relación 2:2 generando un cambio conformacional y dando estructura definida a la proteína. C) Estructura cristalográfica de monómero de IF1 unido a la subunidad β de la ATPasa de bovino (PDB: 4TT3). Se resalta al glutamato 30 de IF1 que participa en un importante puente salino con arginina 408 que inhibe la actividad de hidrólisis de ATP (Figura original preparada usando como guía a Ichikawa *et al.*, 2005).

7.1.2 Predicción estructural

La predicción estructural realizada en AlphaFold2 utilizando la secuencia de IF1 de *B. distachyon* V3.2 de B21 presenta una hélice β central (29-90 Aa), con regiones desordenadas en los extremos, compartiendo homología con la proteína bovina reportada (figura 15A). Con una alta confianza en el modelo en la región inhibidora y una baja confianza en el extremo N-terminal, característica de regiones intrínsecamente desordenadas y la cual ha sido reportada como tal (figura 15B). Este dato se confirma con la cobertura de multiple sequence alignment (MSA), donde comparte mayor identidad con las secuencias se observa de los 10 a los 40 aminoácidos, con una identidad de 0.2 del aminoácido 70 en adelante (figura 15C)

La validación del 92.9% de residuos situados en regiones favorecidas y el 97.1% en regiones permitidas (material suplementario 3) con el gráfico de Ramachandran (figura 15D), sugiere que IF1 bovino y de *Brachypodium* comparten la misma actividad.

La predicción de interacción entre monómeros (sin la región de señalización mitocondrial) de IF1 mostró una similitud baja a los dímeros de bovino, pues aunque interaccionan en dirección correcta, la unión de los péptidos está desplazada hacia la región N-terminal (figura 16A), cuando la reportada por cristalografía tiende al C-terminal (Carroll *et al.*, 2024). El PAE de los primeros 20 aminoácidos de ambos monómeros muestra un error de posición de más de 25 Å, y el resto un error mínimo (figura 16B). La cobertura de la secuencia parece comportarse igual que la individual (figura 16C). La validación por el gráfico de Ramachandran mostró el 80.3% de residuos situados en regiones favorecidas y el 83.6% en regiones permitidas, con 20 valores atípicos (figura 16D y material suplementario 4). Estos resultados no posicionan a la predicción como una interacción tan confiable y la cual sugiere que se requiere una validación experimental.

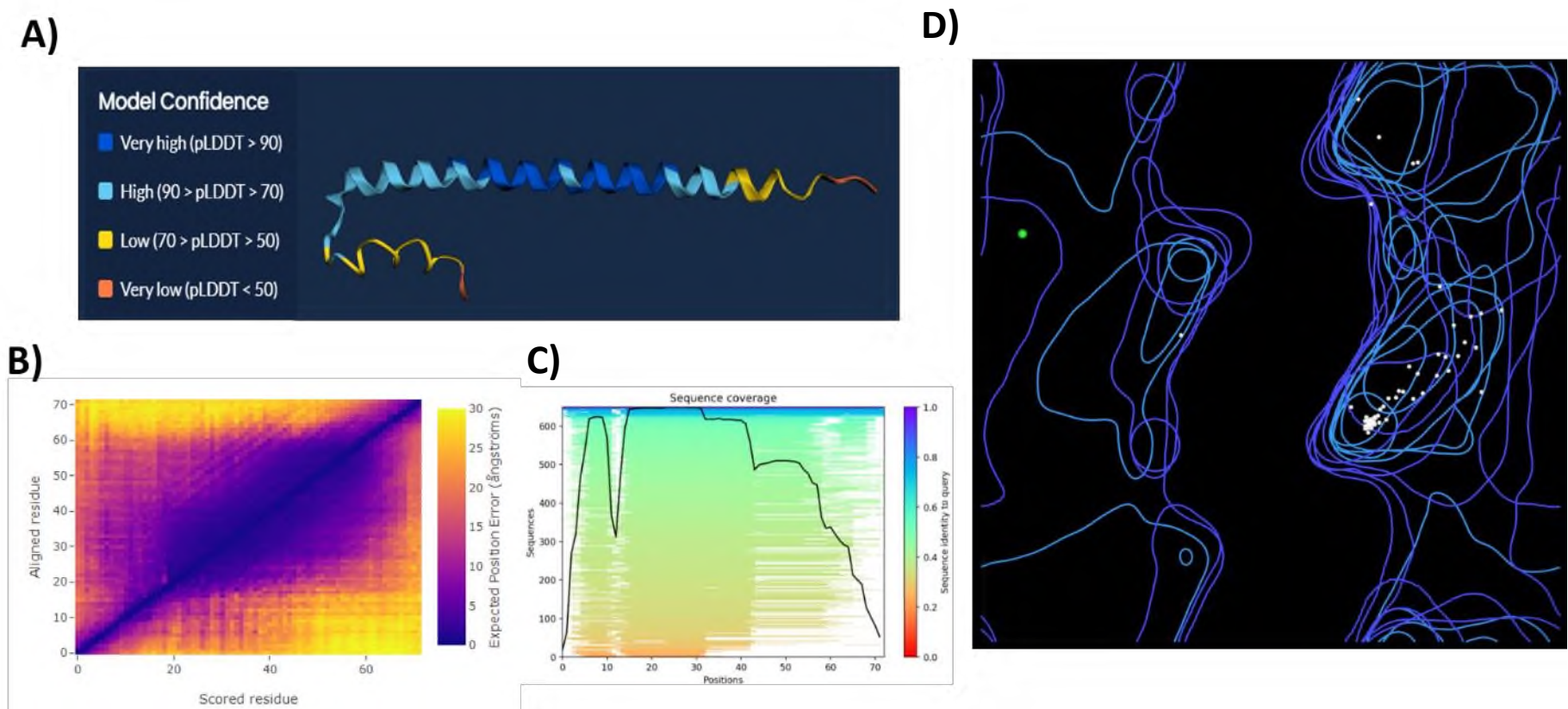


Figura 15. Predicción de la estructura de IF1 de *Brachypodium distachyon*. A) Predicción de estructura tridimensional de IF1 mediante AlphaFold 2. Consta de una región intrínsecamente desordenada y una región de α -hélices. En azul, las zonas de mayor confianza y en amarillo las de menor. B) Predicted Aligned Error (PAE) que mide el error de posición esperado (Armstrongs, \AA) según el residuo (Scored residue) y su posición tridimensional (Aligned residue). Mientras más azul oscuro sea la gráfica, mayor certeza de la disposición espacial del modelo. C) Cobertura de secuencia múltiple alineada (MSA), que mide la identidad de cada posición de la secuencia de consulta (eje X), con respecto a su similitud con otras secuencias (eje Y). Cuanto más alto esté la línea, mayor identidad compartirá con las secuencias consenso. D) Gráfico de Ramachandran. Determina cuántos residuos se encuentran dentro de las regiones permitidas para validar una estructura en PDB. Se resaltan los valores atípicos de glicina 2 (verde) e histidina 70 (azul).

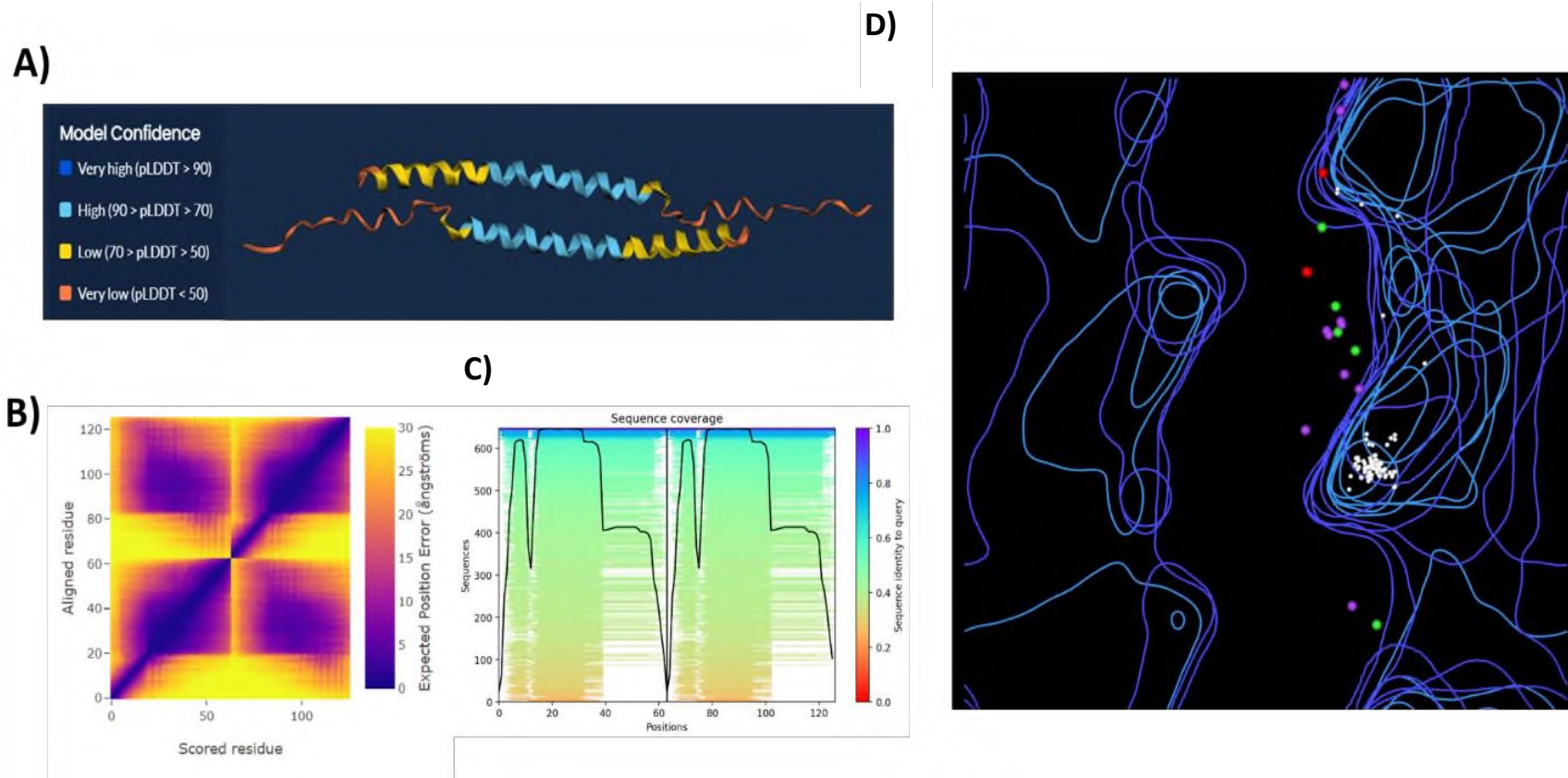


Figura 16. Predicción de la interacción de monómeros de IF1 en *Brachypodium distachyon*. A) Dímeros de IF1. El modelo de interacción proteína-proteína de monómeros de IF1 mediante AlphaFold2 muestra interacción en la región central, dejando libre las regiones C-terminales, contrario a lo reportado en *B.taurus* (Carroll *et al.*, 2024). B) Error Alineado Previsto (PAE) que mide el error de posición esperado (Armstrong, A^o) según el residuo (Scored residue) y su posición tridimensional (Aligned residue). Mientras más azul oscuro sea la gráfica, mayor certeza de la disposición espacial del modelo. C) Cobertura de secuencia múltiple alineada (MSA), que mide la identidad de cada posición de la secuencia de consulta (eje X), con respecto a cuántas secuencias se parece (eje Y). Cuanto más alto esté la línea, mayor identidad compartirá con las secuencias consenso. D) Gráfico de Ramachandran. Determina cuántos residuos se encuentran dentro de las regiones permitidas para validar una estructura en PDB. Se resaltan los valores atípicos.

7.1.3 Identificación de homólogos de IF1 en *Brachypodium distachyon*

Se identificaron secuencias homólogas de Bradi3g44950 en los ecotipos Bd21 y Bd21-3 de *Brachypodium distachyon*, así como en *Arabidopsis thaliana*, maíz, arroz y trigo con diferente número de copias en cada genoma (tabla 5 y material suplementario 5). Este resultado es producto de eventos múltiples de duplicación genómica (Chen *et al.*, 2020). Sin embargo, en el caso de *Arabidopsis thaliana* se identificaron 2 parálogos, y en *Oryza sativa*, 4 parálogos; estas cifras no coinciden con los datos reportados por Chen *et al.*, en 2020, donde solo indica la presencia de uno y dos respectivamente. En el caso de *Brachypodium*, no solo varió el número de copias respecto a los 2 reportados, sino también entre ecotipos. Se encontraron 3 parálogos en Bd21 y 5 parálogos en Bd21-3.

El gen no incluido en el reporte de *A.thaliana* se trata de At2G27730, que codifica una proteína de 114 aminoácidos, con anotación de unión a cobre en Phytozome y reportada como parte del complejo NADH deshidrogenasa (Complejo I); de la cadena respiratoria en plantas (material suplementario 6; Klodmann *et al.*, 2010). No obstante, su porcentaje de homología global es de 31.34% y de 35% en la región inhibidora con la secuencia canónica de IF1 en *A.thaliana* (At5G04750), además de poseer el dominio de inhibición conservado (material suplementario 7), lo que permite no descartarlo del análisis. Ya que *A.thaliana* es la única planta dicotiledónea de las especies examinadas, se incluyó el genoma de *Arabidopsis lyrata* en el análisis como referencia, en la cual también se identificaron 2 parálogos.

Tabla 5. Secuencias homólogas de IF1 en plantas.

Espece	Número de copias
<i>B. distachyon</i> Bd21	3
<i>B. distachyon</i> Bd21-3	5
<i>Zea mays</i>	5
<i>Triticum aestevium</i>	7
<i>Oryza sativa</i>	4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2
<i>Arabidopsis lyrata</i>	2

Adicionalmente, se ha reportado una proteína en levaduras, denominada como STABILIZATION FACTOR 1 (STF1), un péptido de 63 residuos, regulador parcial de la hidrólisis de ATP, que comparte homología en secuencia de IF1 (Venard *et al.*, 2003). Por tanto, se consideró su inclusión en el análisis filogenético para tratar de identificar si las secuencias homólogas obtenidas, en realidad se trataban de parálogos de STF1.

El alineamiento de la secuencia peptídica de STF1 e IF1 reveló que posee el dominio de inhibición de la ATPasa (material suplementario 8), con un porcentaje de identidad global de 30.77% con IF1, sin embargo, dado que es la única región reportada como conservada entre especies, no fue posible discriminar la naturaleza inhibidora de las secuencias obtenidas.

7.1.4 Análisis de dominio con MEME suite

Cuando se realizó el análisis filogenético se observó que Bradi3g44950 se agrupó con las plantas monocotiledóneas, mientras que las dicotiledóneas parecen dividirse en 2 grupos, uno con mayor homología al IF1 de animales y el otro con monocotiledóneas (figura 17A). Sin embargo, todas las secuencias poseen el dominio inhibidor conservado (figura 17B).

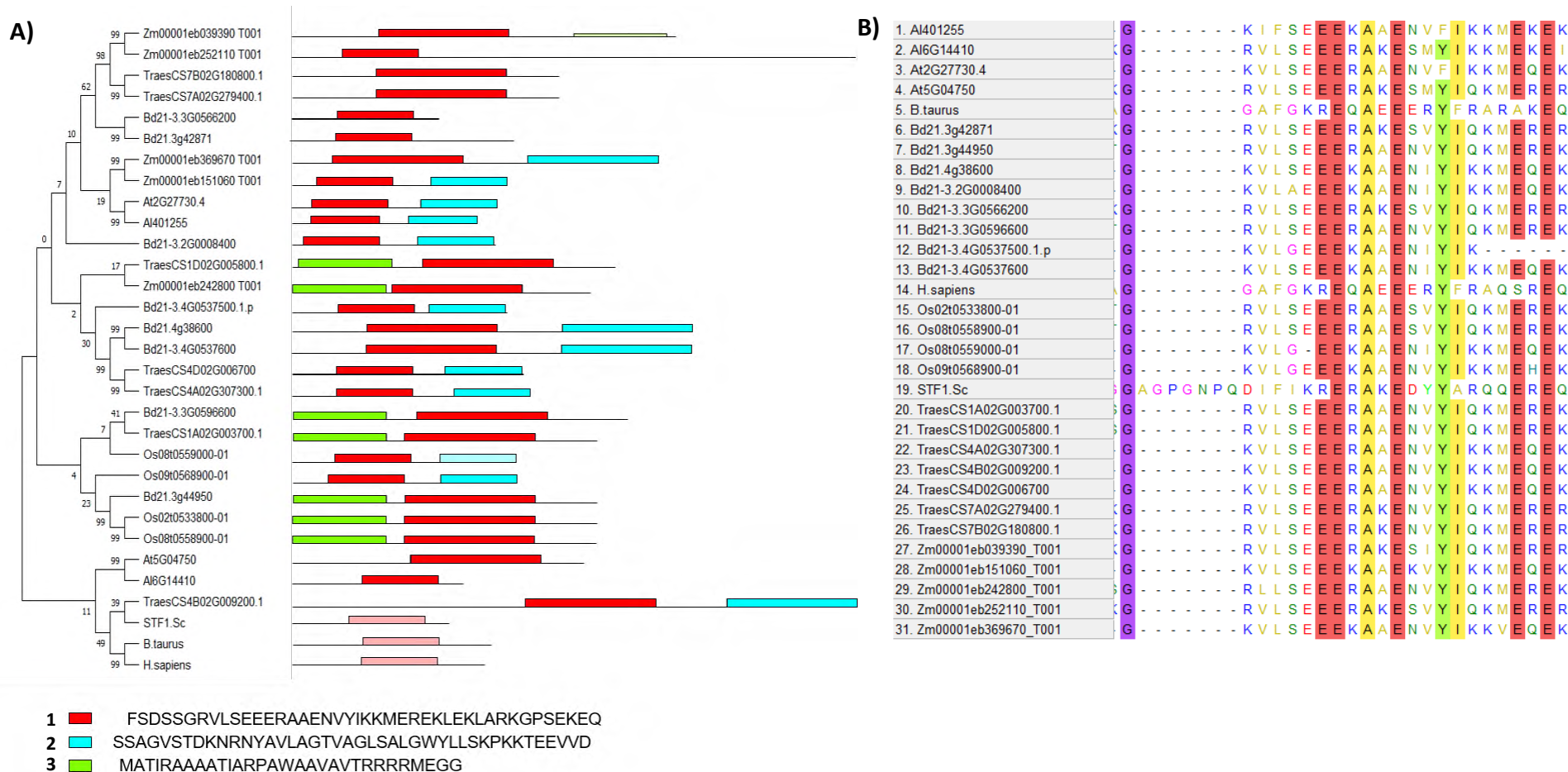


Figura 17. Alineamiento de secuencias homólogas del gen Bradi3g44950 de la tabla 5. A) Árbol filogenético en forma cuadrada de las secuencias homólogas obtenidas (tabla 5). Los nodos indican la frecuencia con la que la ramificación aparece en la creación de múltiples subconjuntos (0-100). B) Análisis de dominios. Los números indican el orden de los dominios encontrados de las secuencias proteicas. B) CLUSTAL de región inhibidora resaltando el dominio de inhibición (39-72) conservado.

7.1.5 Diferencia de número de copias entre ecotipos de *Brachypodium*

El número distinto de copias de IF1 entre ecotipos de *B. distachyon* fue analizado incluyendo la versión genómica V3.1 de Bd21, en la cual se obtuvieron 4 secuencias homólogas. Estas secuencias fueron alimentadas para construir un árbol filogenético que las agrupó en 5 categorías a las que se denominó A, B, C, D y E. Cada categoría engloba a los genes ortólogos de cada versión genómica (figura 18A). Esto supone que los alelos Bradi3g42869 (Bd21.v3.1.3g42869) y Bradi3g42871 (Bd21.v3.2.3g42871) se tratan del mismo, pero renombrados para la versión genómica v3.1 y V3.2 de Bd21 respectivamente. El cuarto parálogo (D) de la versión V3.2 de Bd21, Bradi4g38591, es el ortólogo de BdiBd21-3.3G0566200 (Bd21-3.4G0537500) que fue descartado en la actualización del genoma de la versión v3.2, que es con la cual se realizaron los análisis de esta investigación. El parálogo BdiBd21-3.2G0008400 (Bd21-3.2G0008400), es el único de esta categoría y no se identificó algún ortólogo en Bd21. El alineamiento de las secuencias permitió identificar el dominio inhibidor (figura 18B).

7.1.6 Expresión de las copias de IF1 en *B. distachyon* en inundación

El análisis de expresión se hizo utilizando los datos reportados por Médina-Chavez *et al.*, 2023, y con la herramienta gráfica de Brachytonalli, cuyo tratamiento de datos tiene como base el fondo de expresión de Bd21 V3.0, por lo que no se cuenta con los datos de expresión de las categorías D y E de Bd21-3. Los datos indican que solo los parálogos de la categoría A se expresaron a la alza en inundación. Entre ellos, IF1-A de Bd21-3 mostró una expresión diferencial significativa entre condiciones (Luz baja y crecimiento normal) en todos los puntos de su análisis, siendo la mayor diferencia las 16 horas donde se expresó al menos 13 veces más que en luz baja (Log2FC inundación/luz baja de 3.7); y entre ecotipos a las 20 y 24 horas, con su punto más alto a las 20 horas donde se expresó hasta 6 veces más que Bd21 (Log2FC Bd21/Bd21-3 de -2.8; figura 19A-C).

7.1.7 Diferencia entre las secuencias proteicas de IF1-A

Se alinearon las secuencias de IF1-A de Bd21 y Bd21-3 de *B. distachyon* para identificar diferencias que pudieran estar asociadas a la expresión diferencial en inundación. La única diferencia entre el par de ortólogos es el cambio de una serina (S) por una arginina (R) en la posición 6 de la secuencia de aminoácidos (figura 17D). Sin embargo, el cambio se encuentra en

la región de señalización mitocondrial que se escinde en el transporte (Xu *et al.*, 2009), por lo que se descartó su análisis.

7.1.8 Identificación de zonas polimórficas

Para poder diseñar oligonucleótidos y analizar las probables diferencias de expresión, se analizaron las diferencias existentes entre la secuencia de nucleótidos de la región río arriba de los ortólogos de IF1-A, donde se encuentra el promotor. Dentro de los primeros 2,000 nucleótidos se identificaron 36 polimorfismos, en su mayoría de nucleótido simple (material suplementario 10). Estos sitios fueron examinados para determinar si coincidían con probables sitios de unión a factores de transcripción mediante la base de datos Plantpan. Se encontró que todos los puntos formaban parte de al menos una posible secuencia consenso. Algunos incluso formaban parte de secuencias reconocidas por múltiples factores de transcripción, por lo que se seleccionaron solo aquellas cuyo polimorfismo se encontraba en la matriz principal de la secuencia consenso (tabla 6), siendo las que se encuentran entre los primeros 1,000 nucleótidos los más interesantes, pues podría coincidir con la región promotora (figura 20).

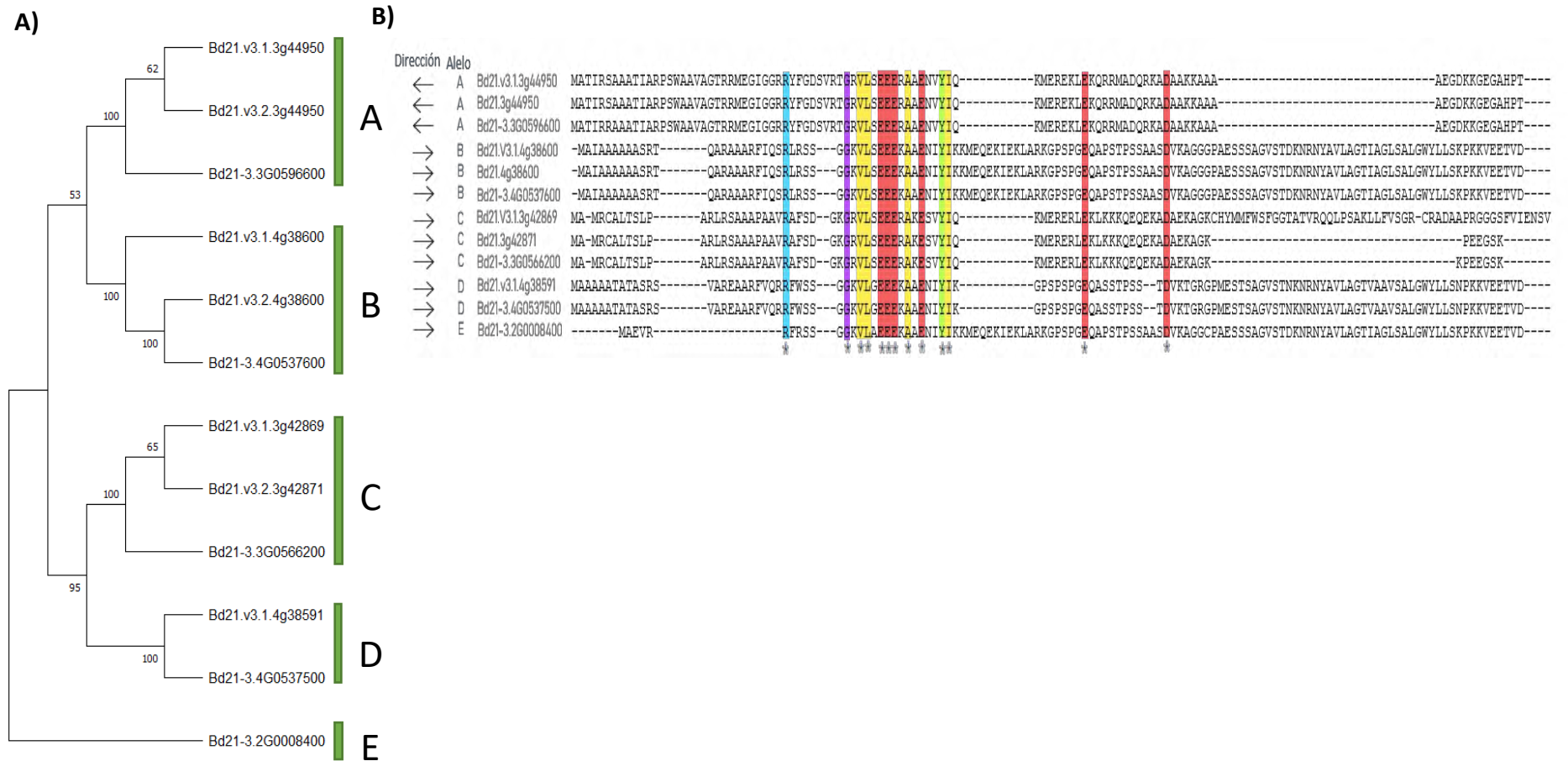


Figura 18. Parálogos de IF1 en Bd21 y Bd21-3 de *Brachypodium distachyon*. A) Árbol filogenético de parálogos entre Bd21 y Bd21-3. Se nombra su categoría en forma sucesiva (A, B, C y E). Debido a similitud del nombre entre secuencias, se renombraron colocando en orden el ecotipo, versión de genoma, posición en el genoma y número de identificación. B) Alineamiento de las secuencias peptídicas de los genes. A la izquierda se indica la dirección en la que se encuentran codificadas, siendo el alelo A, el único de los parálogos en sentido rever

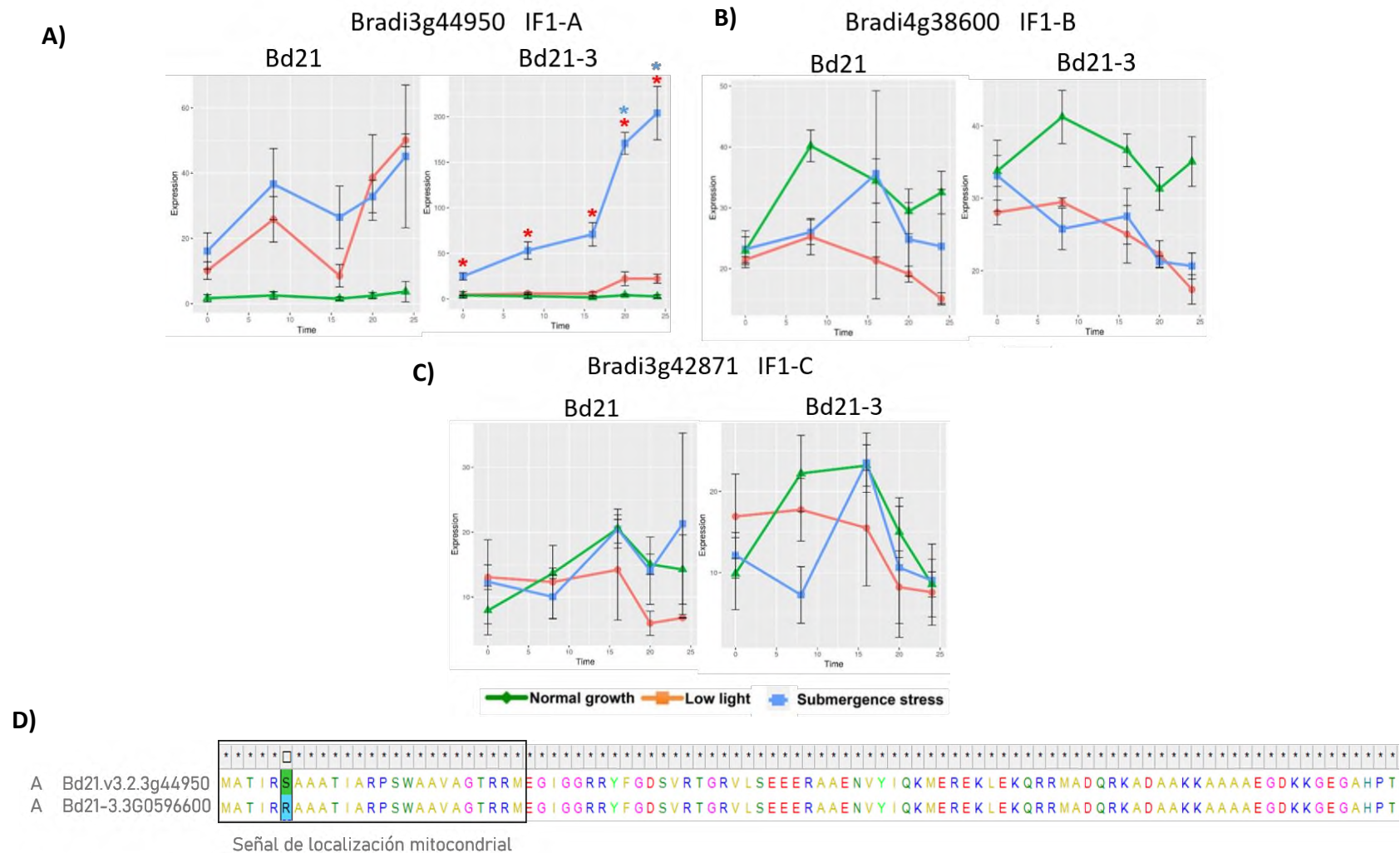


Figura 19. Análisis de expresión entre ortólogos de IF1 en *B. distachyon*. A-C) Gráficas de expresión de IF1 en inundación, luz baja y crecimiento normal. Los asteriscos rojos indican diferencias significativas entre tratamientos y los azules entre ecotipos. D) Alineamiento de ortólogos de la categoría A. Se señala el aminoácido que hace diferente a ambos péptidos y se enmarca la región de señal de localización mitocondrial. Gráficos producidos con la app BrachyTonalli (<http://shiny.unpa.edu.mx:3838/tonalli/>).

Tabla 6. Polimorfismos río arriba que coinciden con matriz principal de secuencia consenso de IF1.

CpG Island	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
	without correspondin g Families	-33	-	tctGGAAA	0.75	tctCGAAA
*	without correspondin g Families	-89	-	aatgtAACGT	0.7	aatgtGACGT
	bZIP	-91	+	gtaatgTAACGt	0.81	gtaatgTGACGt
*	without correspondin g Families	-197	-	ttaaccAAATA	0.91	ttagccAGATA
	MADF; Trihelix	-197	-	tTAACCaaat	1	tTAGCCagat
	MADF	-197	+	tTAACCaaat	1	tTAGCCagat
	C3H Zincfinger	-231	-	tccaCTTTTtg	0.97	tccaCTATTtg
	Dof	-230	-	ccaCTTTTtg	1	ccaCTATTtg
	Trihelix	-287	-	ttttGGTTTtcaaa	0.96	ttttG-GTTTtcaaa
*	MADF; Trihelix	-435	+	caaTTTACTa	0.99	caaTTTAAta
*	GATA	-523	-	cgaaGATCGc	1	cgaaAATCGc
*	without correspondin g Families	-521	-	aaGATCG	0.86	aaAATCG
*	AP2; ERF	-521	-	AAGAT	0.8	AAAAT
*	without correspondin g Families	-677	+	TGCCT	0.8	TGCGT

CpG Island	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
*	HD-ZIP	-685	-	tgcaTTATTgcctt	0.93	tgcaTTATTgcggtt
*	bHLH	-796	-	cgccaCCGACacc	1	cgccaCCAACacc
*	AP2	-794	+	ccaCCGACac	0.99	ccaCCAACac
*	AP2; ERF	-794	+	ccaCCGACac	1	ccaCCAACac
*	B3; ARF	-792	+	acCGACAcc	0.99	acCAACAcc
*	ERF	-799	-	tgccgcCACCGacac	1	tgccgcCACCAacac
*	AP2; ERF	-862	-	agtGCGGCtc	0.95	agtGTGGCtc
*	C3H	-863	-	cagTGCGGctcctcg	0.92	cagTGTGGctcctcg
*	Alpha-amylase	-860	-	tgCGGCTcctc	0.71	tgTGGCTcctc
*	ERF	-860	-	tgCGGCT	0.86	tgTGGCT
*	without corresponding Families	-892	-	ctcCCTGG	0.75	ctcCCTTG
*	AP2	-932	-	ccaccgtcggCGGCGgcggc a	0.91	ccaccgtcggC--- Agcggca
*	AP2; ERF	-928	-	cGTCGGcgg	0.99	cGTC---ag
*	LBD	-922	+	CGGCGgcggcagcgg	0.97	C---agcggcagcgg
*	MYB	-1023	+	gttggTAGGTgccg	0.9	gttggCAGGTgctg
*	Myb/SANT; MYB	-1031	+	cgacctccgttggTAGGTgcc	0.96	cgacctccgttggCAGGT gct

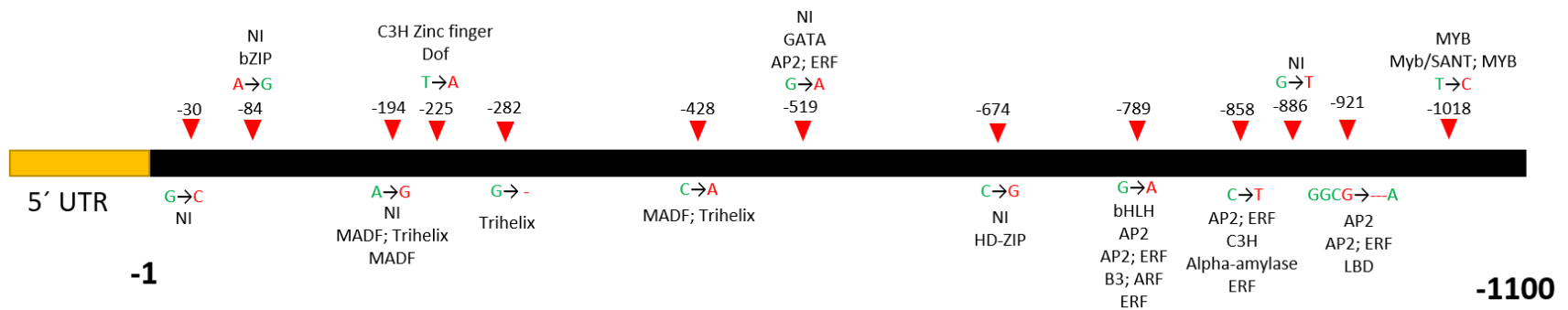


Figura 20. Polimorfismos que coinciden con la matriz principal de la secuencia consenso de probables sitios de unión a factores de transcripción en IF1-A. Los triángulos rojos muestran la posición del polimorfismo, mientras que la flecha indica el cambio entre ecotipos. A la izquierda de la flecha se coloca el nucleótido de Bd21 y a la derecha el de Bd21-3. El color verde indica el nucleótido que coincide con la matriz principal de la secuencia consenso y en rojo, las que no. Se incluye la identidad de la secuencia consenso, donde NI (No information), corresponde a aquellas secuencias que el programa no pudo agrupar o describir.

7.1.9 Identificación de zonas polimórficas para genotipificación

Ya que dentro de los primeros 2,000 nucleótidos solo se identificaron polimorfismos de nucleótido único (SNP), se realizó un análisis expandiendo la de búsqueda río arriba y río abajo para detectar zonas que sirvieran como marcadores moleculares para genotipificación visible en geles electroforéticos (>~16 pb). Se localizaron 2 regiones que cumplen con esta característica. Una en la posición -2790 río arriba donde la secuencia de Bd21 no cuenta con 16 pb y otra a +1320 río abajo de 28 pb que Bd21-3 no tiene (figura 21). El diseño de oligonucleótidos permitió encontrar pares de flancos para cada una de estas regiones y diseñar oligonucleótidos que amplifiquen secciones de ADN entre 88 y 263 pb. Los oligonucleótidos que se sintetizaron en la compañía OligoT4 se presentan en la tabla 7 y material suplementario 11.

Tabla 7. Diseño de oligonucleótidos para genotipificación

ID oligonucleótido	Sec 5'-3'	Tm calculada °C	Amplicón	Diferencia
GenoIF1Bd1F	TTTTTGTCTCCAACCTTGTCGAA	59.76	88 pb Bd21	28 pb
GenoIF1Bd1R	TTTTGCGAGTAAAGATGATGGA	59.72	116 pb Bd21-3	
GenoIF1Bd2F	CGCATTGATCTGTTGTGACC	60.12	262 pb Bd21	16 pb
GenoIF1Bd2R	GGGCAAGCAGTGATCCATTA	61	253 pb Bd21-3	

7.1.10 PCR en gradiente

La extracción de ADN, permitió la obtención de material genético con una concentración de 9,099.68 ng/ μ L y una pureza de 2 en relación 260/280. Los oligonucleótidos se utilizaron en una PCR en gradiente empleando el gDNA de Bd21 como molde. En la figura 22, se muestran los resultados de las reacciones de PCR para ambos pares de oligonucleótidos, obteniendo una temperatura óptima a los 55 °C para ambos pares de oligonucleótidos, y la cual se utiliza para las reacciones de PCR posteriores.

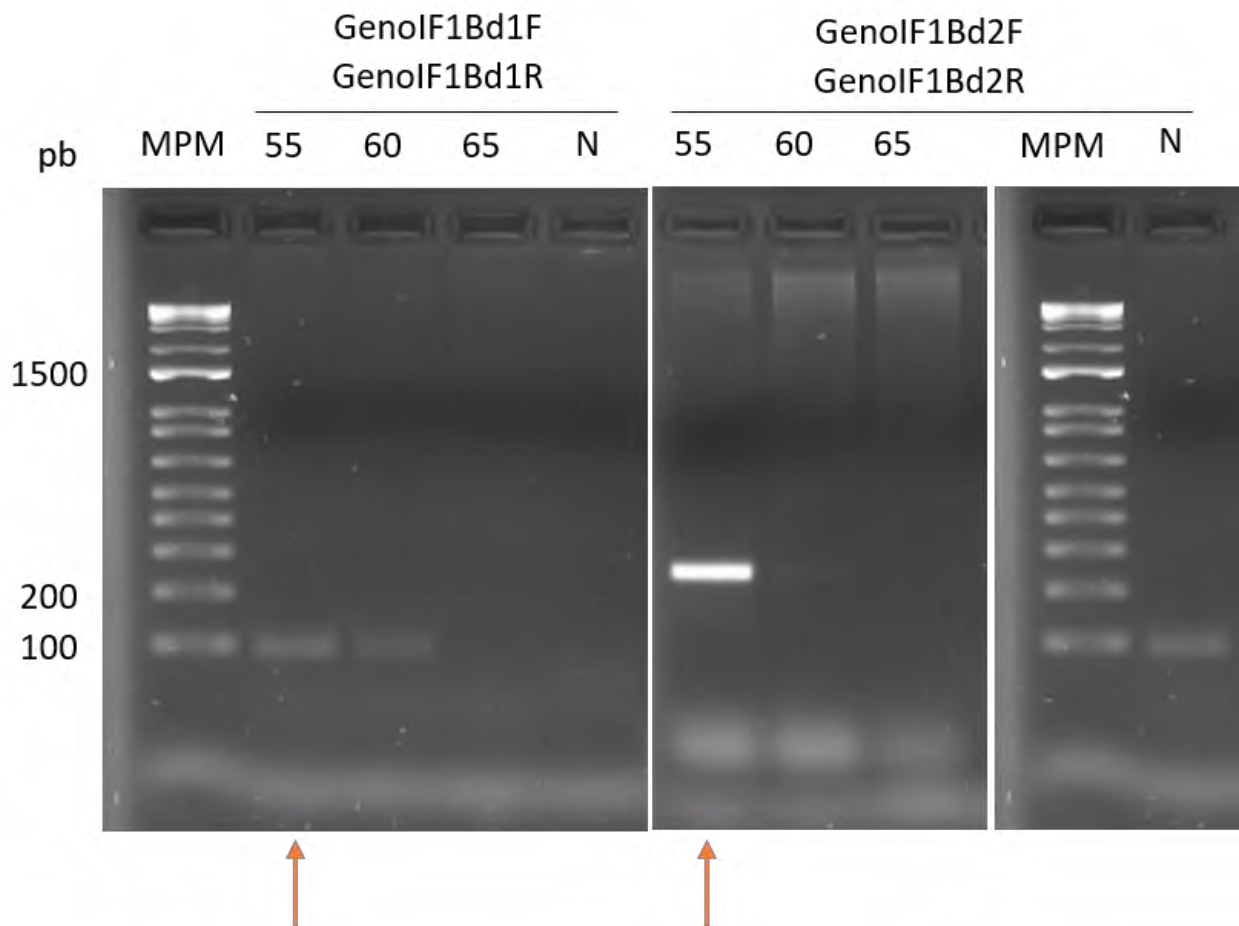


Figura 22. Gel de agarosa al 2% de la PCR en gradiente de oligonucleótidos de los polimorfismos que flanquean a IF1. Las bandas que se observan corresponden al tamaño esperado. Para el control negativo (N) no se agregó molde. MPM: marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder). Se señala con una flecha la mejor temperatura para cada par de oligonucleótidos.

7.1.11 PCR para genotipificación de IF1.

Se realizaron reacciones de PCR para genotipificación utilizando la temperatura de alineamiento obtenida en el apartado anterior. Se usó el gDNA de Bd21 y Bd21-3 y un heterocigoto simulado mezclando 10 μ L de cada tubo de los amplicones obtenidos de la misma reacción. Los resultados se observan en la figura 23, donde para el par de oligonucleótidos GenoIF1Bd1F y GenoIF1Bd1R solo se observó la banda de Bd21 individual y en el heterocigoto simulado, y para el par GenoIF1Bd2F y GenoIF1Bd2R, no fue apreciable la separación.

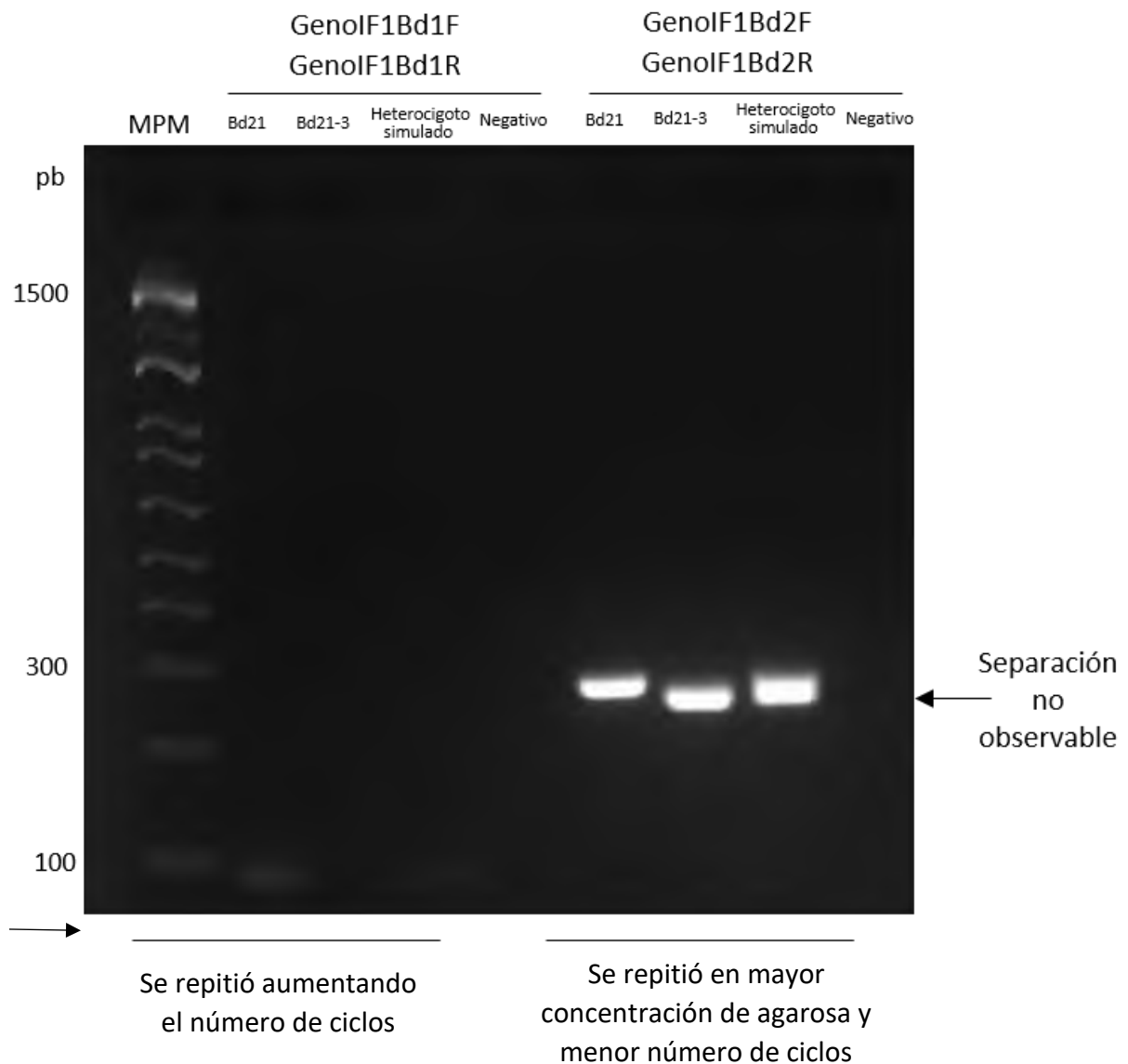


Figura 23. Gel de agarosa al 3% de reacción de PCR para genotipificación de IF1. Para el control negativo se utilizó ddH₂O como molde. MPM: marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder).

Se decidió ajustar las condiciones de reacción. Para el par de oligonucleótidos GenoIF1Bd1F y GenoIF1Bd1R se utilizó 35 ciclos ya que las bandas fueron muy tenues. En estas nuevas condiciones se pudo observar la separación de bandas adecuadamente (figura 24). Para el par GenoIF1Bd2F y GenoIF1Bd2R, se redujeron los ciclos a 25 para disminuir la saturación de producto que probablemente interfería en la visualización de la separación, además corrió en un gel de agarosa al 4%, condiciones que no resultaron favorables para la separación de bandas de electroforesis (figura 25).

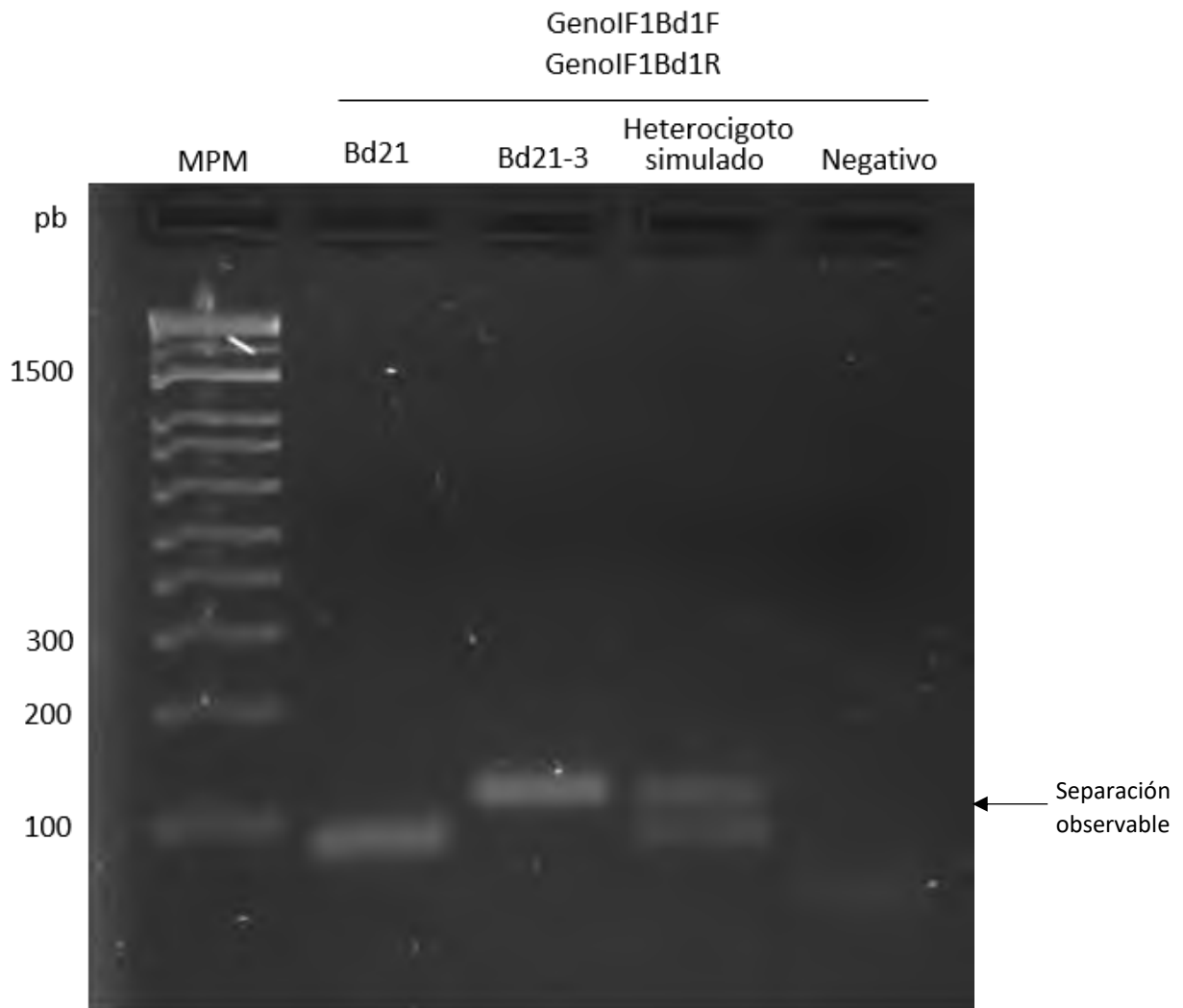


Figura 24. Gel de agarosa al 3% de reacción de PCR para genotipificación de IF1. Para el control negativo solo se utilizó ddH₂O como molde. MPM: marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder). Gel de agarosa al 3%.

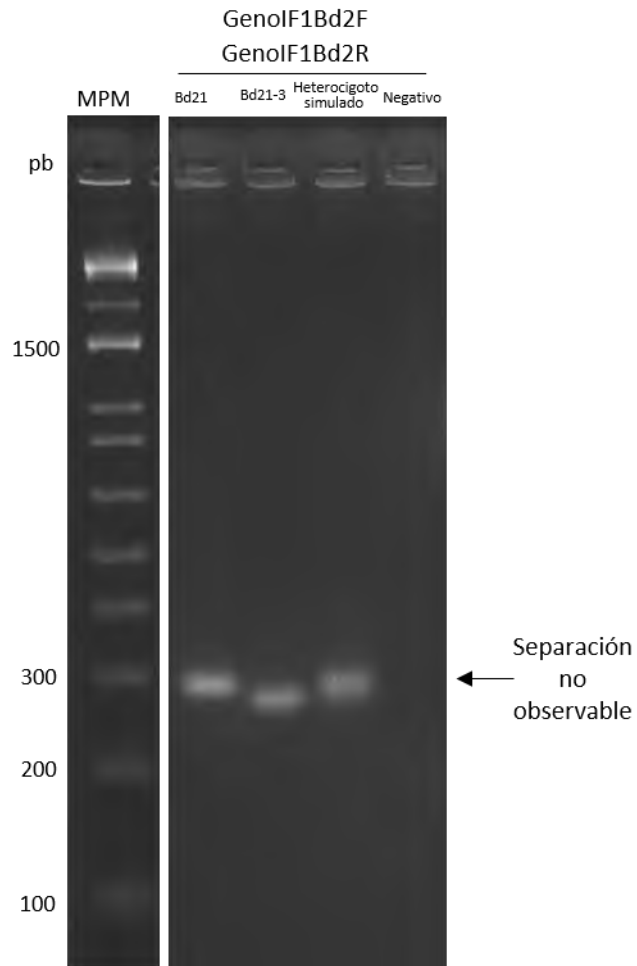


Figura 25. Gel de agarosa al 4% PCR para genotipificación de IF1. Para el control negativo solo se utilizó ddH₂O como molde. MPM: marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder).

Para el par de oligonucleótidos Genof1Bd2F y Genof1Bd2R se decidió utilizar un gel de acrilamida con el fin de mejorar la observación de la separación, en la que resultó exitosa (figura 26). Las condiciones finales donde se observan las separaciones se encuentran recabadas en la tabla 8.

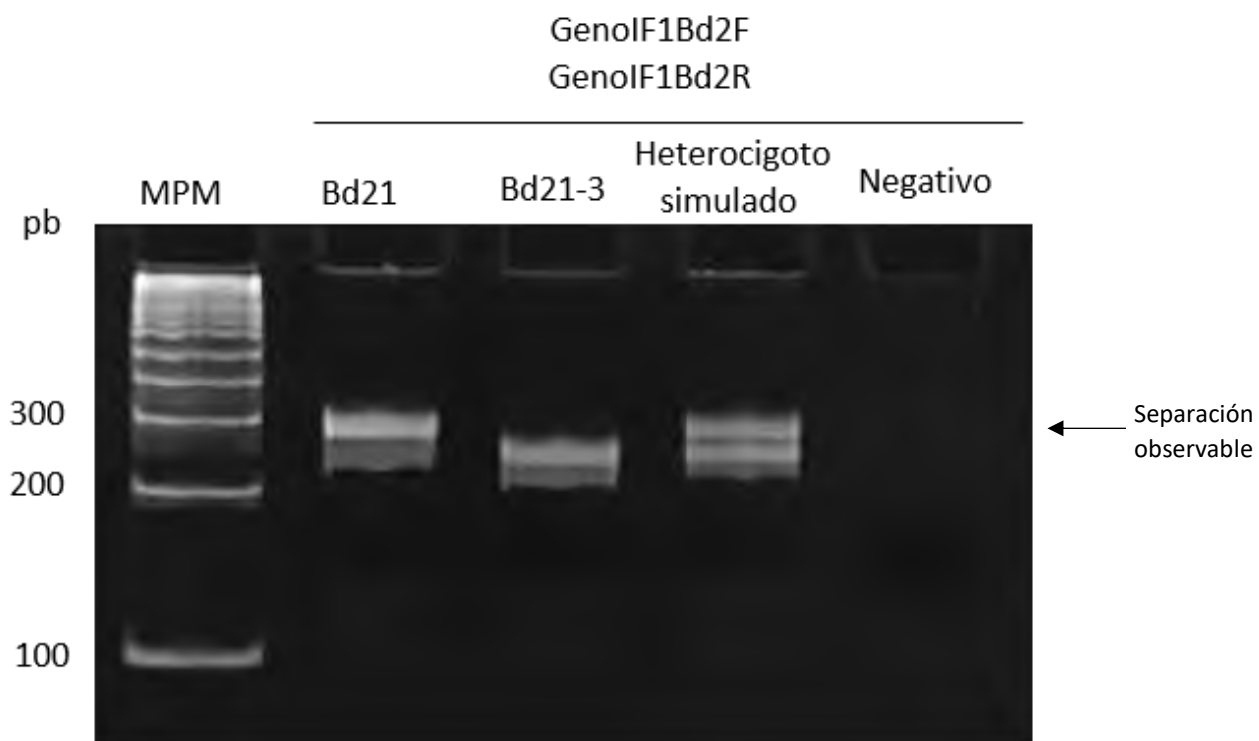


Figura 26. Gel de acrilamida al 6% de PCR de genotipificación de IF1. Las bandas corresponden al tamaño esperado y se observa la diferencia de peso molecular entre ambos ecotipos.

Tabla 8. Condiciones para PCR de genotipificación de IF1.

Zona	ID oligonucleótido	Sec 5' a 3'	T _m °C	Amplicón	Diferencia	Gel	Programa
Río abajo	GenoIF1Bd1F	TTTTGTCTCCAACCTGTCGAA	55	88 pb Bd21	28 pb	Agarosa 3%	35 ciclos, tiempo de extensión 30 s
	GenoIF1Bd1R	TTTTGCGAGTAAAGATGATGGA		116 pb Bd21-3			
Río arriba	GenoIF1Bd2F	CGCATTGATCTGTTGTGACC	55	262 pb Bd21	16 pb	Acrilamida 6%	25 ciclos, tiempo de extensión 30 s
	GenoIF1Bd2R	GGGCAAGCAGTGATCCATTA		253 pb Bd21-3			

7.2 Análisis del gen Bradi1g68957

La base de datos Phytozome indica que el gen Bradi1g68957 está formado por 8 exones, 7 intrones, un extremo 5'UTR de 304 pb y un extremo 3' UTR de 1,549 pb (figura 27). Se encuentra localizado en el cromosoma 1 en el sitio entre 67,636, 969 y 67,645,523 pb en sentido directo. Su secuencia genómica es de 8, 554 nucleótidos, de los cuales 3,203 nucleótidos pertenecen a intrones y 3,474 forman parte de la secuencia codificante que da lugar a un péptido de 1,158 aminoácidos. La anotación en Phytozome describe que tiene un dominio de dedo de zinc tipo RING/FYVE/PHD, sin embargo, no hay información reportada sobre él. De tal forma, Medina-Chavez et.al., (2023), lo consideraron como un gen de función desconocida y se llamó UNKNOWN 7 (UK7).

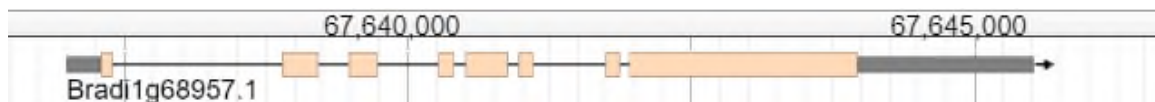


Figura 27. Estructura genómica del gen Bradi1g68957 obtenida de Phytozome. Esta región posee un gen predicho en sentido reverso (Bradi1g68970) que se omitió de la figura por claridad.

La región que Phytozome identifica como dominio de dedo de zinc se trata de la secuencia DKQTLIEQARKNFYCSRCNGLLENFKSLQQE. No obstante, la búsqueda en la literatura sobre secuencias consenso de dedos de zinc, características por poseer repeticiones de cisteínas e histidinas (Ngwa *et al.*, 2021), no concordó con la secuencia identificada por Phytozome.

El sistema de clasificación PANTHER lo asoció con la subfamilia de proteínas de respuesta a estrés NST1 (PTHR16897); (material suplementario 12), cuya secuencia canónica, y la primera de la cual se tiene registro, fue de *Oryza sativa* (Os10g0105400). Esta subfamilia no debe confundirse con el NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR 1 (NST1), del espesamiento de la pared secundaria.

Dada esta clasificación, la secuencia proteica con mayor homología a UK7 es de *Triticum turgidum*, por lo que se decidió incluir a esta especie en la lista examinada.

7.2.1 Identificación de secuencias homólogas

Se identificaron secuencias homólogas de Bradi1g68957 en todos los genomas examinados, siendo el maíz el genoma con mayor número de parálogos ascendiendo a 4 (tabla 9 y material suplementario 13). Sin embargo, no se encontró ningún homólogo en animales con la herramienta BLAST ni con tblastn (material suplementario 14).

Tabla 9. Secuencias homólogas de UK7.

Especie	Número de copias
<i>B. distachyon</i> Bd21	2
<i>B. distachyon</i> Bd21-3	2
<i>Zea mays</i>	4
<i>Triticum aestevium</i>	3
<i>Oryza sativa</i>	2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2
<i>Arabidopsis lyrata</i>	2
<i>Triticum turgidum</i>	2

7.2.2 Análisis de dominio con MEME

Se construyó un árbol filogenético que agrupó las secuencias en dos grupos. A y B. En el grupo A se encuentra la secuencia canónica de *O. sativa* y la mitad de las copias de todos los genomas, a excepción de *T. aestevium*, que contiene sus 3 copias en este grupo, por lo que ninguna de sus copias se agrupó en B. El análisis de dominios con MEME sugiere que las plantas dicotiledóneas no tienen dominios en la región C-terminal, a diferencia de las monocotiledóneas sí los poseen. Un caso específico es *O. sativa*, cuya secuencia canónica no cuenta con los dominios de la región C-terminal. Sin embargo, su segunda copia, que pertenece al grupo B, no contiene los dominios de la región N-terminal, pero sí los del C-terminal (figura 28).

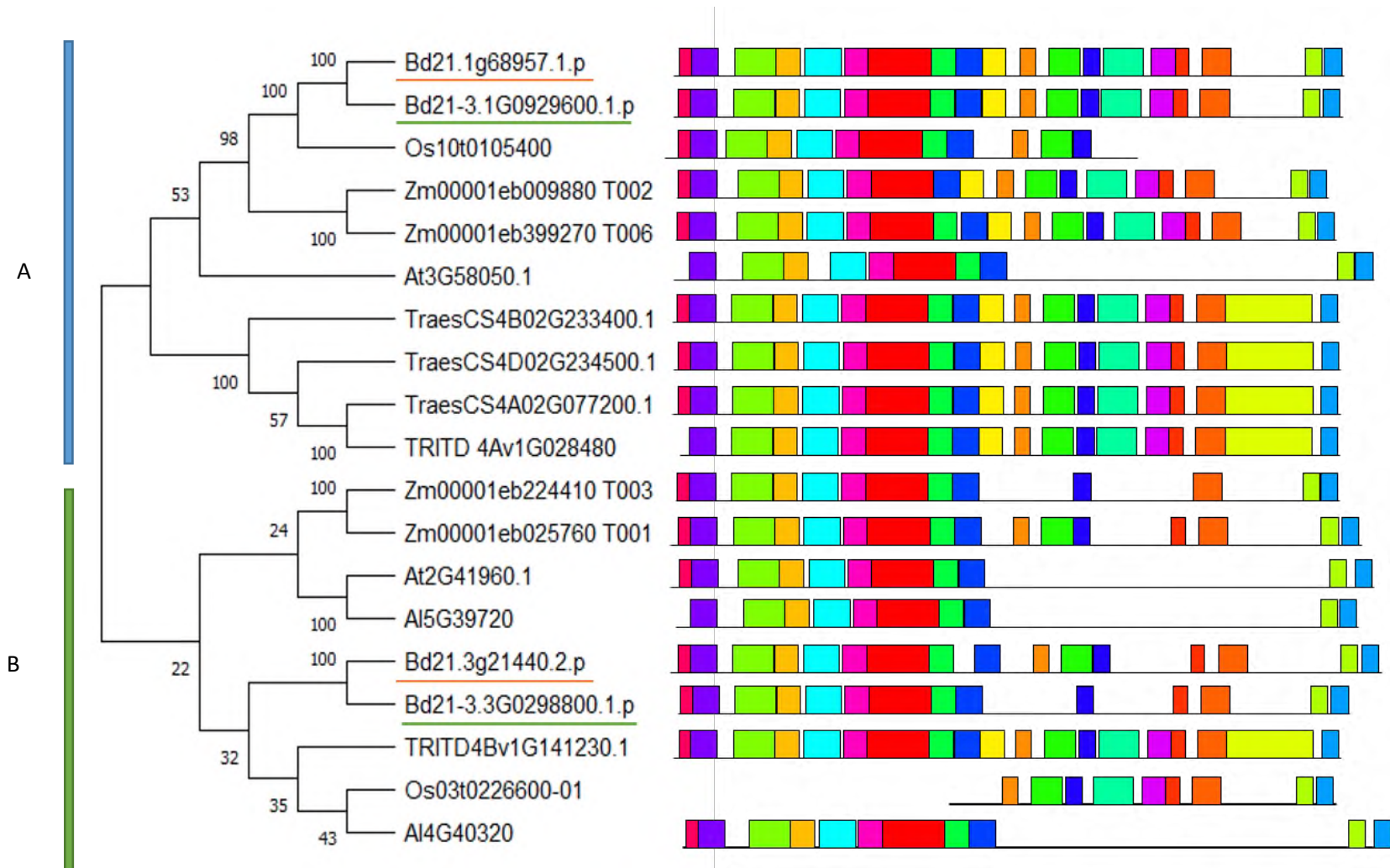


Figura 28. Árbol filogenético en forma cuadrada con el análisis de dominio de MEME de las secuencias examinadas de UK7.

7.2.3 Generalidades de la secuencia proteica

El análisis mediante Expassy, determinó su composición de aminoácidos (tabla 10), y mostró un porcentaje alto de serinas con 11.1%, siendo el más abundante de todos con 129 residuos. La serina tiene la capacidad poder sufrir modificaciones post traduccionales como la fosforilación y suele encontrarse en proporciones de 4-8% (Kumar *et al.*, 2017). Otro aminoácido abundante es el glutamato con 8.6% (100 residuos), sin embargo, este suele ser uno de los más abundantes en las proteínas. El número total de residuos negativos (Asp + Glu) es de 177, y de residuos positivos (Arg + Lys), de 156. Ambos suman un 28.78% de la proteína.

Otros datos del péptido predicho son su peso molecular calculado de 130936.01 KDa, con un punto isoeléctrico teórico de 6.03, y un tiempo estimado de vida media de 30 horas.

Tabla 10. Composición de aminoácidos

Aminoácido		Residuos	Porcentaje
Ala	A	68	5.9%
Arg	R	94	8.1%
Asn	N	51	4.4%
Asp	D	77	6.7%
Cys	C	39	3.4%
Gln	Q	53	4.6%
Glu	E	100	8.6%
Gly	G	62	5.4%
His	H	38	3.3%
Ile	I	38	3.3%
Leu	L	74	6.4%
Lys	K	62	5.4%
Met	M	20	1.7%
Phe	F	49	4.2%
Pro	P	50	4.3%
Ser	S	129	11.1%
Thr	T	65	5.6%
Trp	W	10	0.9%
Tyr	Y	24	2.1%
Val	V	54	4.7%

La búsqueda de zonas con residuos ácidos y polares (figura 29A), reveló que el mayor número de serinas se encuentran distribuidas en la posición C-terminal. Mismo lugar donde radica la única diferencia entre los ortólogos de UK7-A de *B. distachyon*. La predicción de modificaciones postraduccionales, indicó que la tirosina 646 (presente solo en Bd21), es candidata (figura 29B).

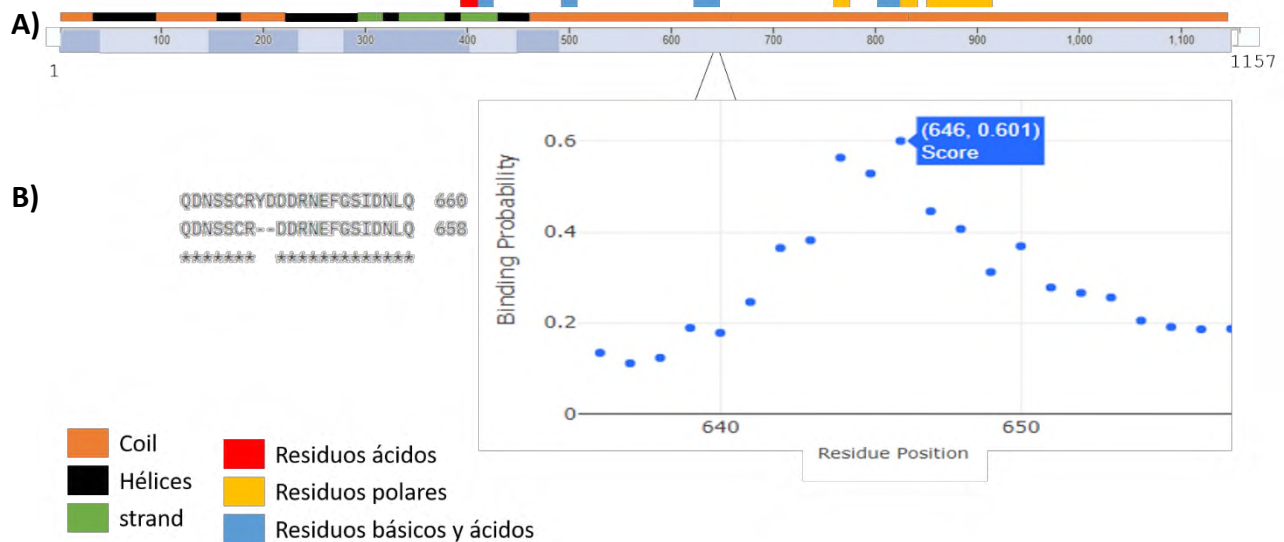
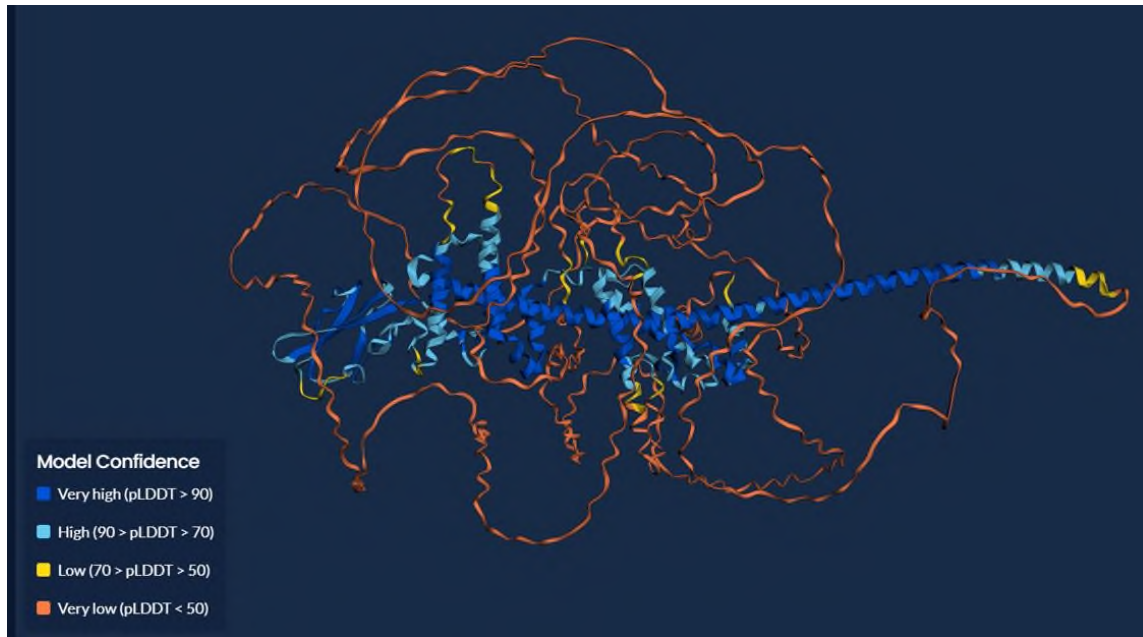


Figura 29. Distribución de residuos ácidos y básicos de UK7. A) Análisis de proteína completa. B) Detalle de polimorfismo detectado en el aminoácido 646 de BdiBd21-3.1G0929600 de Bd21-3. Se señala la diferencia entre UK7-A de Bd21 y Bd21-3, lugar con probabilidad de ser modificado postraduccionamente.

7.2.4 Predicción estructural

La predicción estructural de UK7 en *Brachypodium distachyon* V3.2, mediante AlphaFold2 presenta una α -hélice en el extremo N-terminal, no obstante, la región C-terminal no tiene fidelidad en el modelo, mostrándolo solo como una cadena de péptidos sin orden reconocible que envuelve a la alfa hélice (figura 30A). El gráfico de Ramachandran hace evidente que los predictores de estructura no logran organizar esta región, con solo 67.7% (782/1157) de residuos en regiones favorecidas y 82% (947/1157) en regiones permitidas, con 208 residuos en valores atípicos (figura 30B y material suplementario 15).

A)



B)

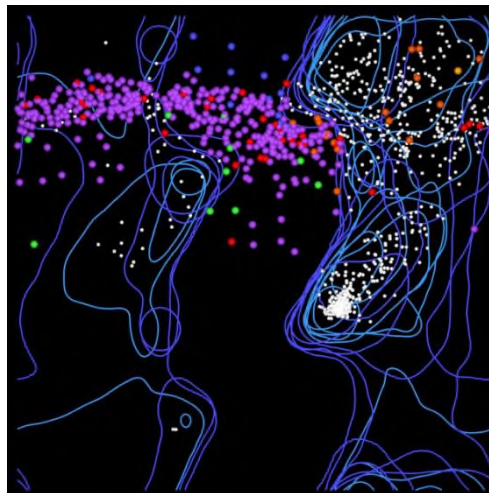


Figura 30. Predicción estructural de UK7 de Bd21 utilizando AlphaFold2. A) Estructura tridimensional de UK7. En rojo la región de baja fidelidad que enrolla a la alfa hélice central. B) Gráfico de Ramachandran. Se colorea los valores atípicos.

La predicción estructural se realizó utilizando softwares adicionales (material suplementario 16) para confirmar la estructura, sin embargo, todos mostraron un comportamiento similar al de Alphafold2 (figura 31). Esta falta de estructura definida podría sugerir que la región C-terminal es intrínsecamente desordenada.

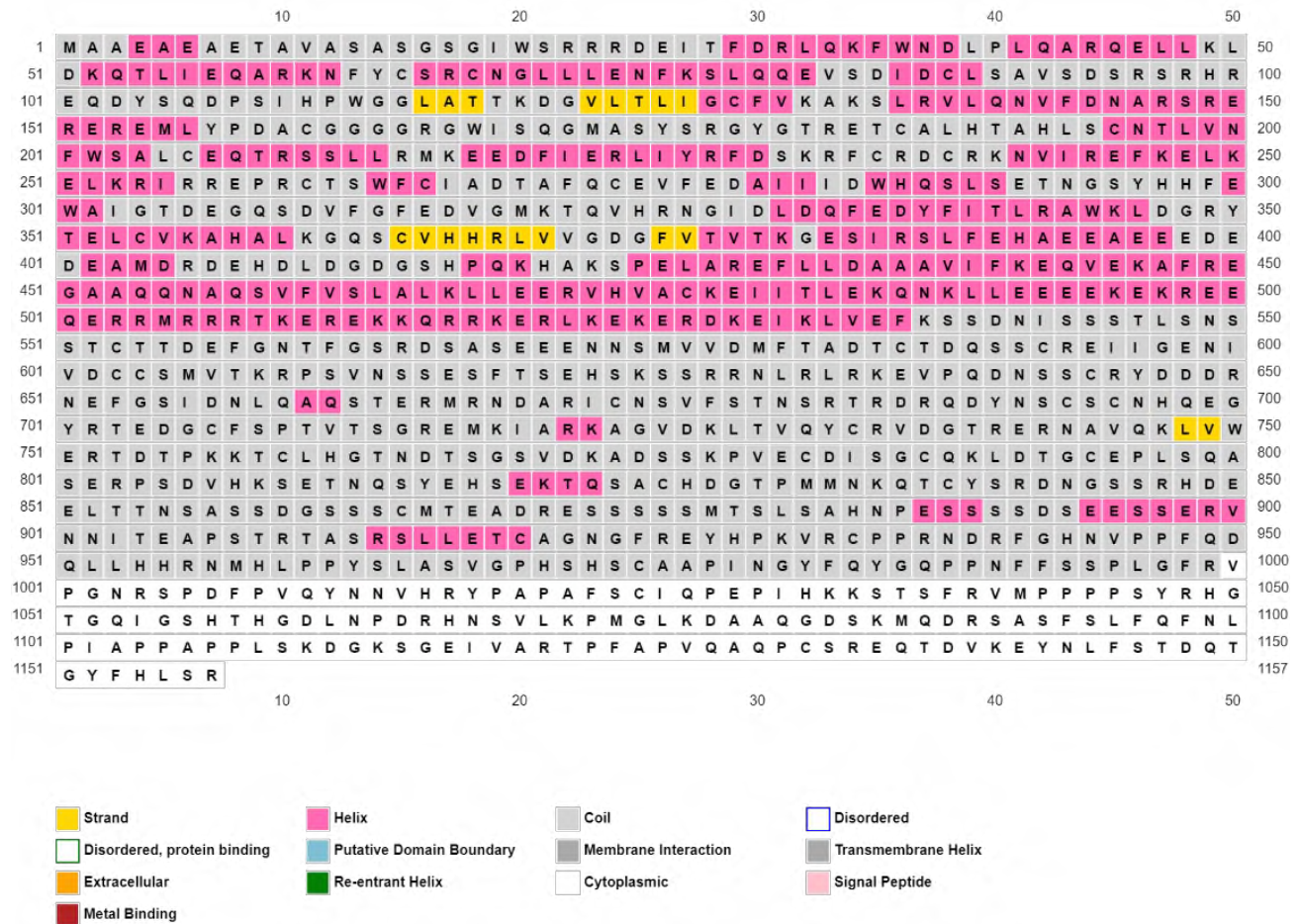


Figura 31. Predicción de estructura de UK7 por I-TASSER. Se observa la región C-terminal sin estructura definida.

Las proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs), se definen por una secuencia de aminoácidos que dan lugar a cadenas polipeptídicas que son incapaces de adquirir una estructura terciaria estable. Pueden tener longitudes de 5-10 residuos hasta más de 1,000 residuos y las zonas más comunes de ubicación son las posiciones terminales. Este tipo de proteínas son esenciales para la función celular incluyendo la transcripción, traducción, biología circadiana, homeostasis, entre otros fenómenos biológicos (Holehouse & Kragelund, 2024).

Ya que la proteína UK7 cuenta con una región candidata a ser intrínsecamente desordenada, se analizó en Metapredict, donde se observa como el grado de desorden incrementa en la región donde la confiabilidad de la predicción de AlphaFold2 disminuye (554-1157 aminoácidos, aproximadamente el 50%), lo que sugiere que UK7 es efectivamente una proteína del tipo intrínsecamente desordenada (figura 32).

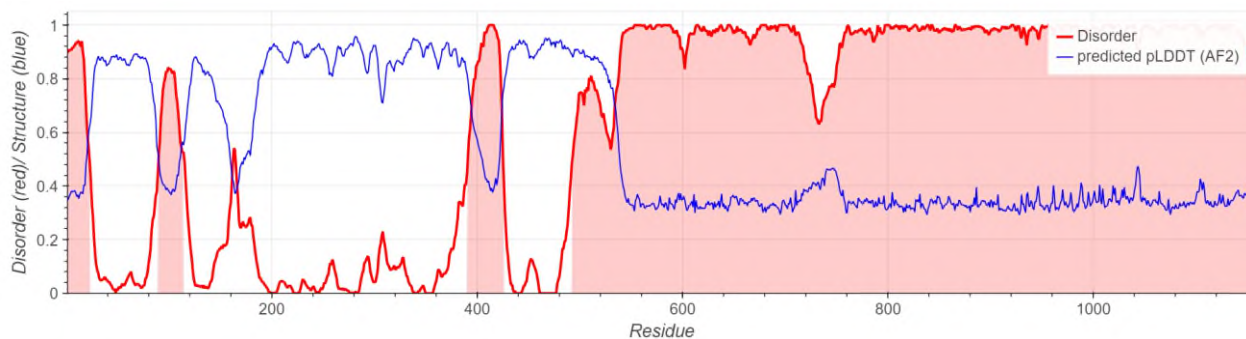


Figura 32. Grado de desorden de Metapredict de la proteína predicha de UK7. La región donde comienza la probable región desordenada (554 aminoácidos) tiene el mayor puntaje de desorden (rojo).

Los IDRs pueden funcionar como enlazadores flexibles, módulos para el reconocimiento molecular, como interfaces de unión para interacciones simultáneas, como sensores moleculares y como impulsores de organización subcelular (Holehouse & Kragelund, 2024). Ya que esta proteína cuenta con una elevada proporción de serinas, es posible que sean modificadas postraduccionalmente mediante fosforilación. Este proceso, común en las células, podría participar en cascadas de señalización celular, influenciando diversas respuestas y funciones biológicas.

7.2.5 Análisis de expresión en inundación

Los datos reportados por Medina-Chavez *et. al.*, 2023, indican que solo UK7-A (Bradi1g68957) de Bd21-3 se expresó positivamente en inundación, con una expresión diferencial significativa entre condiciones (luz baja y crecimiento normal) al inicio del tratamiento y a las 8 horas, posteriormente disminuyó su expresión a las 16 horas y a las 20 horas volvió a tener expresión diferencial, siendo la mayor diferencia al inicio del tratamiento donde expresó al menos

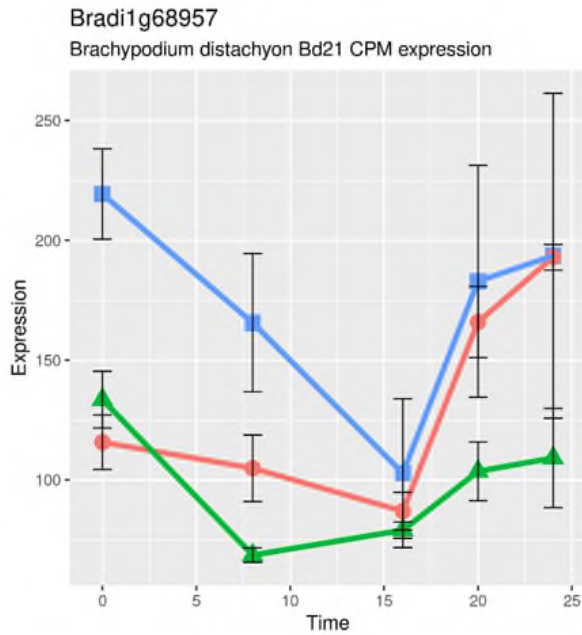
5 veces más que en luz baja (Log2FC inundación/luz baja de 2.4). En Bd21, UK7 no es gen regulado positivamente por ningún estrés ni a lo largo del ciclo circadiano (figura 33 A y B)

Para el caso de UK7-B (Bradi3g21440) de Bd21 y su ortólogo en Bd21-3, mostraron una expresión constitutiva y de baja expresión a lo largo de todos los puntos de análisis, por lo que no resultaron estadísticamente diferentes entre tratamientos ni entre ecotipos (figura 33 C y D).

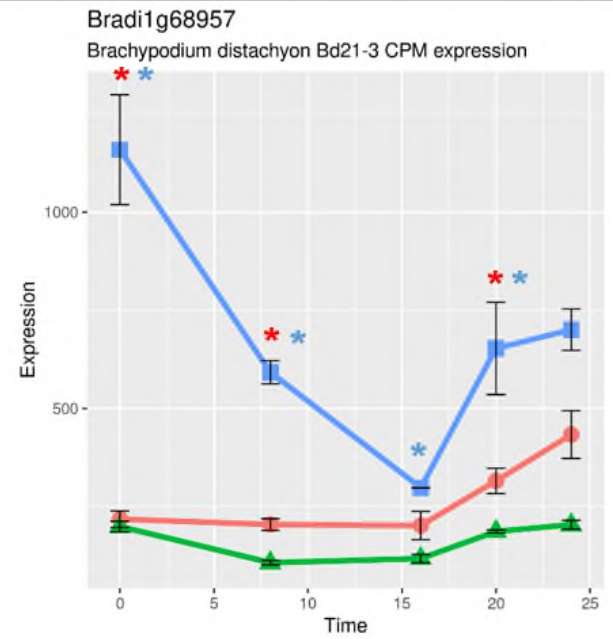
7.2.6 Identificación de zonas polimórficas

Se analizaron las diferencias existentes entre la secuencia de nucleótidos de la región río arriba de los ortólogos de UK7-A en ambos ecotipos, zona donde se encuentra el promotor. Dentro de los primeros 2,000 nucleótidos se identificaron 15 polimorfismos, en su mayoría SNPs (material suplementario 17). Estos sitios fueron examinados para determinar si coincidían con probables sitios de unión a factores de transcripción mediante Plantpan. Se encontró que todos los puntos formaban parte de al menos una posible secuencia consenso. Algunos incluso formaban parte de varias secuencias, por lo que se seleccionaron solo aquellas cuyo polimorfismo se encontraba en la matriz principal de la secuencia consenso (tabla 11 y material suplementario 18), siendo las que se encuentran entre los primeros 1,000 nucleótidos los más interesantes, pues podría coincidir con la región promotora (figura 34). Entre los factores de transcripción encontrados se observó a MYB alfa amilasa, NAC, Myb/Sant, entre otros. Es de interés el de la alfa amilasa pues es un gen de oscilación circadiana conocida.

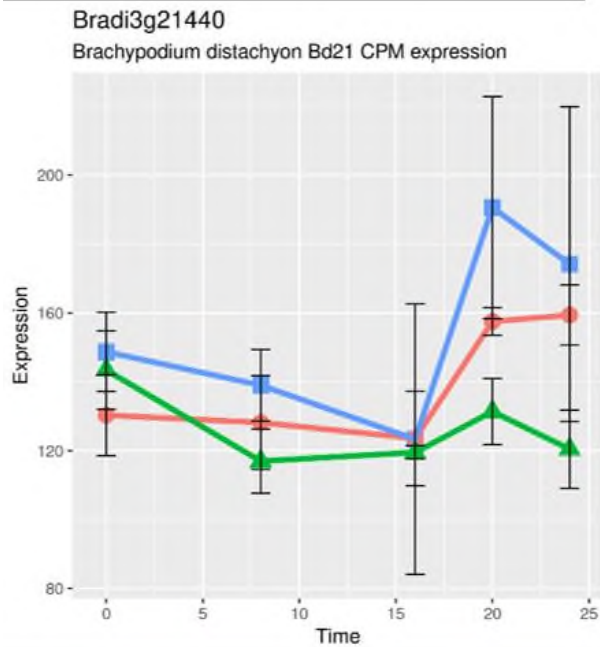
A)



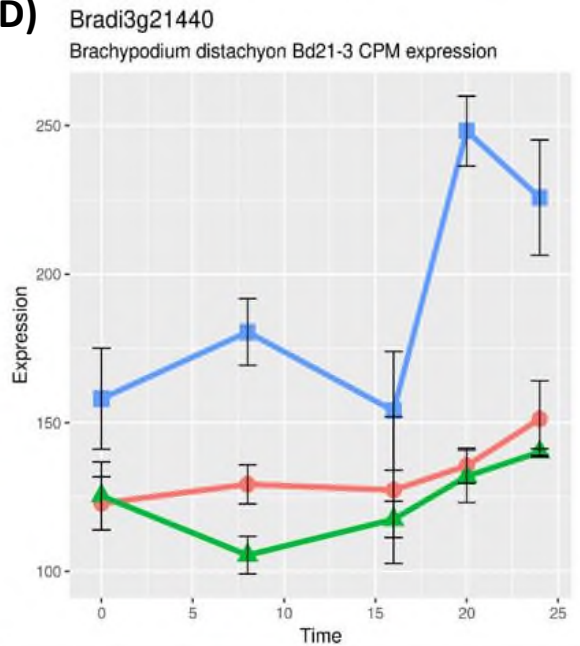
B)



C)



D)




 Normal growth
  Low light
  Submergence stress

Figura 33. Análisis de expresión entre ortólogos de UK7 en ecotipos de *B. distachyon* y en diferentes condiciones. A) Gráficas de expresión de IF1 en inundación, luz baja y crecimiento normal. Los asteriscos rojos indican diferencia significativa entre tratamientos y los azules entre ecotipos. Gráficos producidos con la app BrachyTonalli (<http://shiny.unpa.edu.mx:3838/tonalli/>).

Tabla 11. Polimorfismos río arriba que coinciden con matriz principal de secuencia consenso de UK7

Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
Myb/SANT; MYB	-98	+	aatttGTAACaaaca	0.87	aatttGCAACaaaca
Alpha-amylase	-92	+	TAACAaa	1	CAACAaa
without	-214	-	tgtggcacccatggactaATAAA	0.57	tgtggcacccatggact gCTAAA
Homeodomain	-202	-	gGACTAataa	1	gGACTGctaa
AT-Hook	-201	+	gactAATAAa	1	gactAATGCa
without	-197	+	AATAAa	0.83	AATGCa
Alpha-amylase	-197	+	AATAAa	1	AATGCa
CSD	-197	+	aATAAAa	1	aATGCAaa
Myb/SANT	-358	+	cgacatTAAACcttggaactaa	0.68	cgacatTAAA- cttggaactaa
AP2	-351	+	aAACCTtgga	0.89	aAA-CTtgga
NAC; NAM	-449	+	tTACTaaa	0.78	tTTACAaaa
Dof, Conserved region	-446	+	actTAAAGagc	0.98	actAAAAGagc
Dof	-534	-	ggaCTTTAgtc	0.98	ggaCGTTAgtc
without	-707	-	atcaacAAATA	0.73	atcaacATATA
without	-704	+	AACAAatactac	0.75	AACATatactac
MYB	-706	-	tcAACAAatac	0.99	tcAACATatac
without	-704	+	AACAAatactac	0.75	AACATatactac
NAC; NAM	-873	+	gTACTtac	0.79	gTTAATtac
Myb/SANT; MYB	-1042	-	aagACCTAgttcac	0.88	aagACC---ttcac

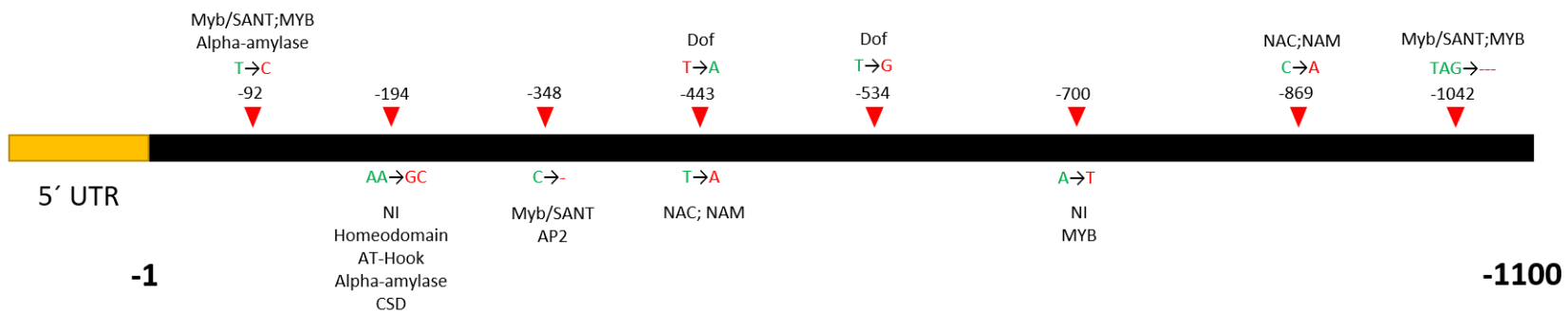


Figura 34. Polimorfismos que coinciden con la matriz principal de la secuencia consenso de probables sitios de unión a factores de transcripción en UK7-A. Los triángulos rojos muestran la posición del polimorfismo, mientras que la flecha indica el cambio entre ecotipos. A la izquierda de la flecha se coloca el nucleótido de Bd21 y a la derecha el de Bd21-3. El color verde indica el nucleótido que coincide con la matriz principal de la secuencia consenso y en rojo, las que no. Se incluye la identidad de la secuencia consenso, donde NI (No information), corresponde a aquellas secuencias que el programa no pudo agrupar o describir.

7.2.7 Identificación de zonas polimórficas para genotipificación

Se realizó un análisis expandiendo el radio de búsqueda río arriba y río abajo para detectar zonas que sirvieran como marcadores moleculares para genotipificación (>~16 pb). Se localizaron 4 regiones que cumplen con esta característica. Una en la posición -1607, otra a -3867 y una tercera a -7693 río arriba. La cuarta se encontró a +4584 río abajo (figura 35). El diseño de oligonucleótidos permitió encontrar pares de flancos para cada una de estas regiones y que amplifiquen sus secciones de ADN. Los oligonucleótidos que se diseñaron y se sintetizaron en la compañía OligoT4 se enlistan en la tabla 12 y material suplementario 19.

Tabla 12. Diseño de oligonucleótidos para genotipificación.

ID oligonucleótido	Sec 5'-3'	Tm calculada °C	Amplicón	Diferencia
GenoUK7Bd1F	TGACGTCACCCCATTTGTAAA	59.82	230 pb Bd21	41 pb
GenoUK7Bd1R	CCGAAAACCTTTGCTTTCAGC	60	189 pb Bd21-3	
GenoUK7Bd2F	TTACTTCGAATCGGCCTGAC	60.21	420 pb Bd21	58 pb
GenoUK7Bd2R	CCCGGAAATACCACATGTTT	59.55	362 pb Bd21-3	
GenoUK7Bd3F	TCCGGAGATTGAGAGTAAGCA	59.96	968 pb Bd21	1,331 pb
GenoUK7Bd3R	GGTGGAGGAACGACCAACT	59.95	2,299 pb Bd21-3	
GenoUK7Bd4F	TTTTACATATGGCACGCAGAA	59.23	920 pb Bd21	29 pb
GenoUK7Bd4R	CCATGTCAATTAACGTACTGTGG	59.32	891 pb Bd21-3	

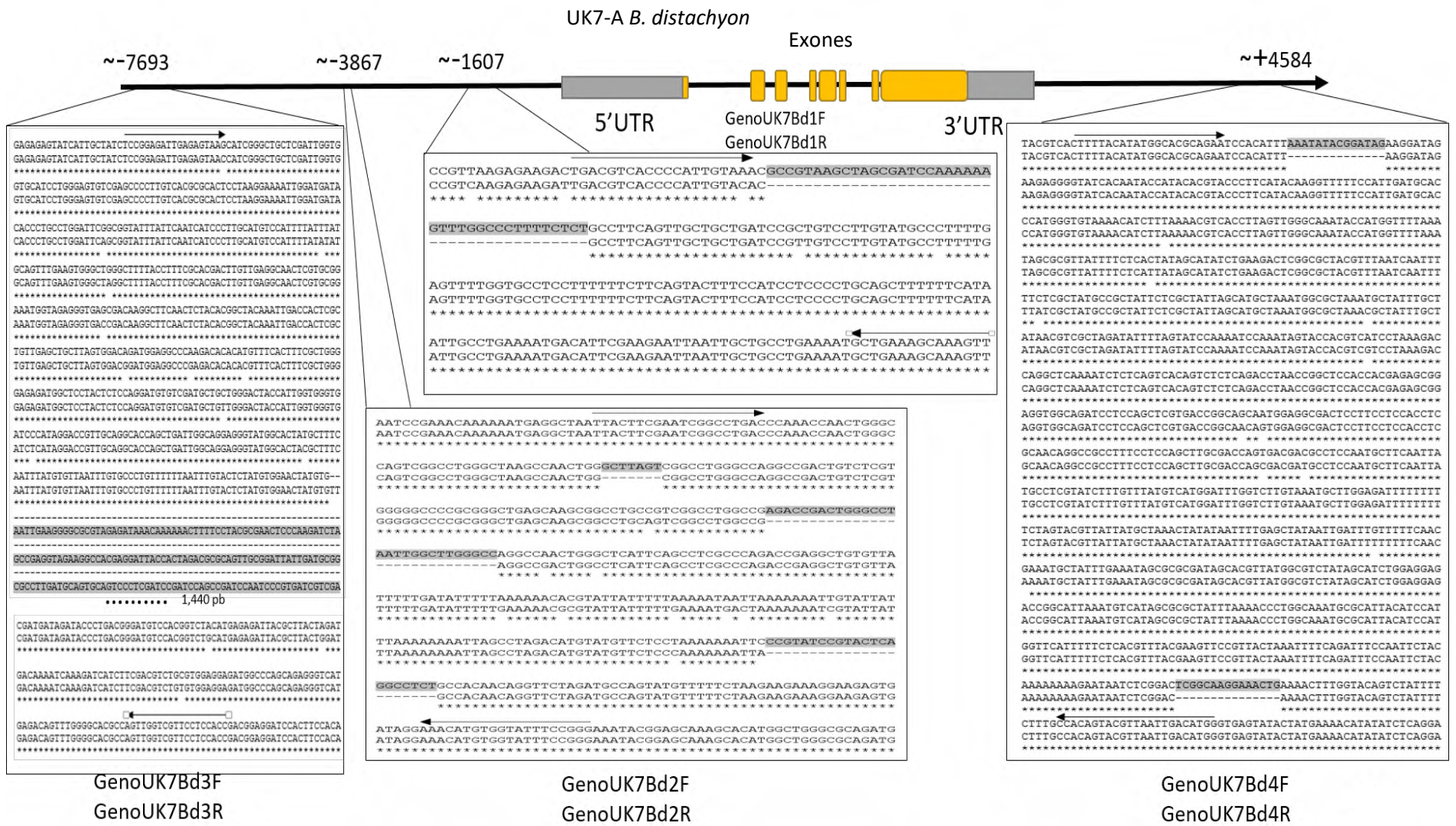


Figura 35. Localización de zonas polimórficas para genotipificación de UK7-A. Las flechas indican donde se encuentran ubicados los pares de flancos que permitirán amplificar la sección de ADN.

7.2.8 PCR en gradiente

Los oligonucleótidos se utilizaron en una PCR en gradiente empleando el gDNA de Bd21 como molde. En la figura 36 A y B, se muestran los resultados de las reacciones de PCR para cada par de oligonucleótidos, teniendo como único resultado desfavorable el del par de oligonucleótidos GenoUK7Bd3F y GenoUK7Bd3R, por lo que se repitió la reacción (figura 36C), obteniendo así todas las temperaturas de alineamiento.

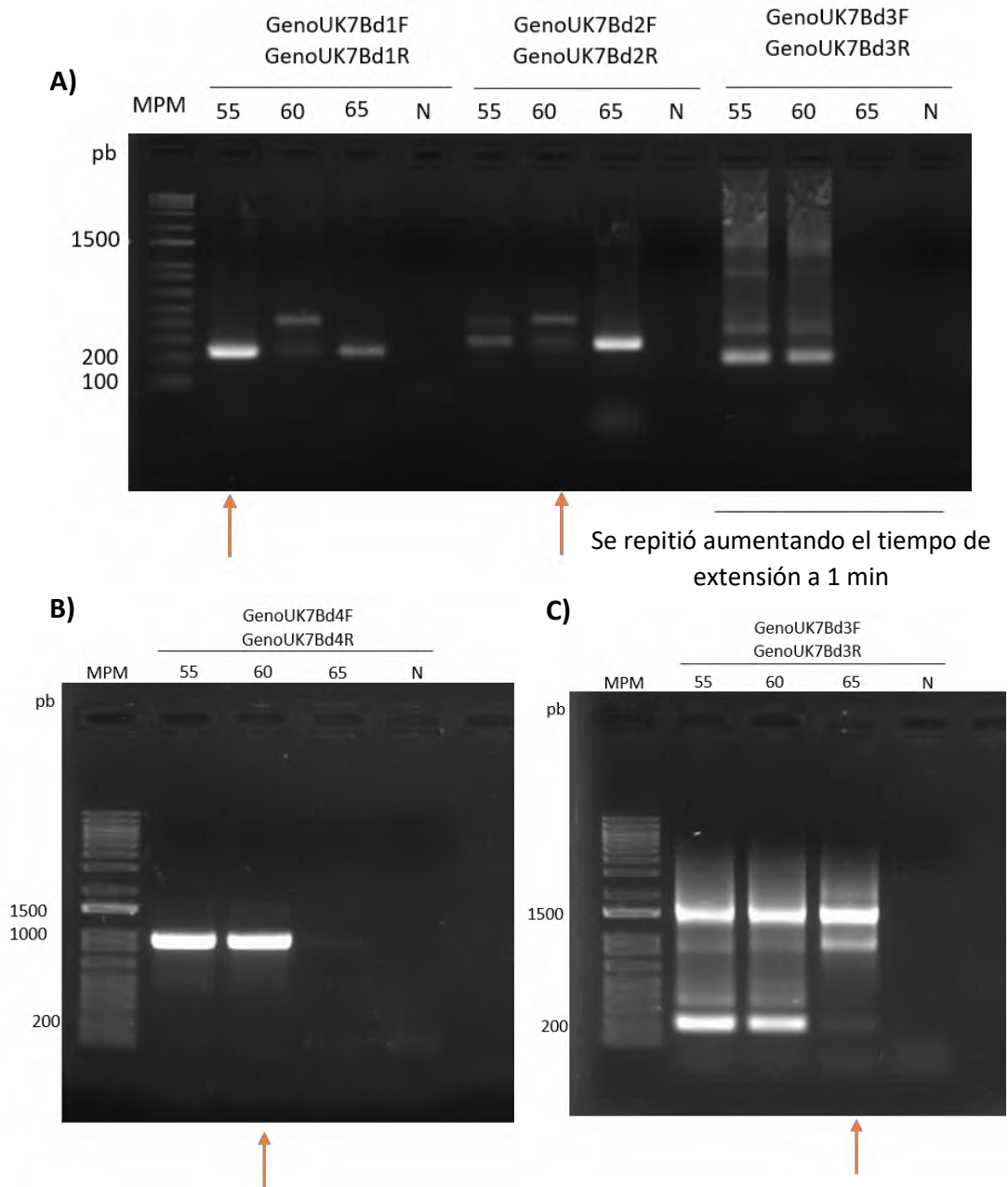


Figura 36. Gel de agarosa al 2% de PCR en gradiente de oligonucleótidos de UK7. Se observan bandas que corresponden al tamaño esperado. Para el control negativo (N) no se agregó molde. MPM: marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA Ladder). Se señala la mejor temperatura para cada par de oligonucleótidos.

7.2.9 PCR para genotipificación de UK7

Se realizaron reacciones de PCR para genotipificación de los polimorfismos detectados de UK7 utilizando la temperatura de alineamiento obtenidas en el apartado anterior. Se usó el gDNA de Bd21 y Bd21-3 y un heterocigoto simulado mezclando 10 µL de cada tubo de los amplicones obtenidos de la misma reacción. Los resultados se observan en la figura 37. Los pares de oligonucleótidos GenoUK7Bd1F, GenoUK7Bd1R y GenoUK7Bd2F, GenoUK7Bd2R mostraron bandas de tamaño correcto y con una separación observable. Se decidió repetir la reacción del par GenoUK7Bd3F y GenoUK7Bd3R, pues no se observa la banda del tamaño esperado en Bd21-3 (figura 38A). El par GenoUK7Bd4F y GenoUK7Bd4R fue descartado debido a mínima diferencia en tamaño de amplicón cercanos a 900 pb, por lo que no se podría observar diferencias significativas entre bandas (figura 38B).

El par GenoUK7Bd3F y GenoUK7Bd3R fue descartado debido a que no volvió a presentar el tamaño de banda esperado en Bd21-3, esto puede deberse a error de ensamblaje de secuenciación, ya que se trata de un fragmento de más de 1,300 pb (figura 39). Las condiciones donde finalmente se pudieron observar las separaciones se encuentran recabadas en la tabla 13.

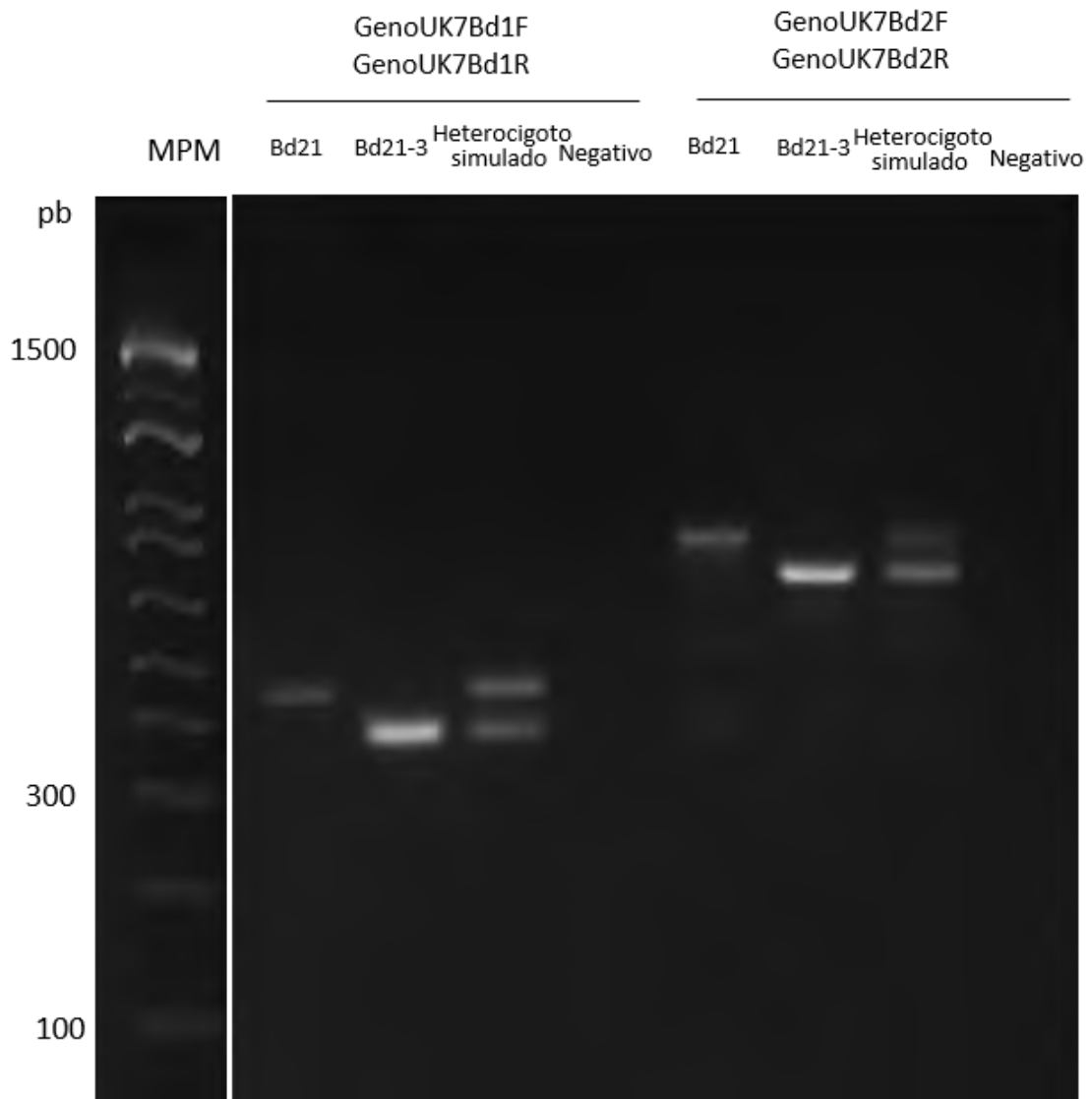


Figura 37. Gel de agarosa al 3% para genotipificación de UK7 entre ecotipos de *B. distachyon*. Las bandas corresponden al tamaño esperado y se observa diferencia de peso molecular entre ambos ecotipos.

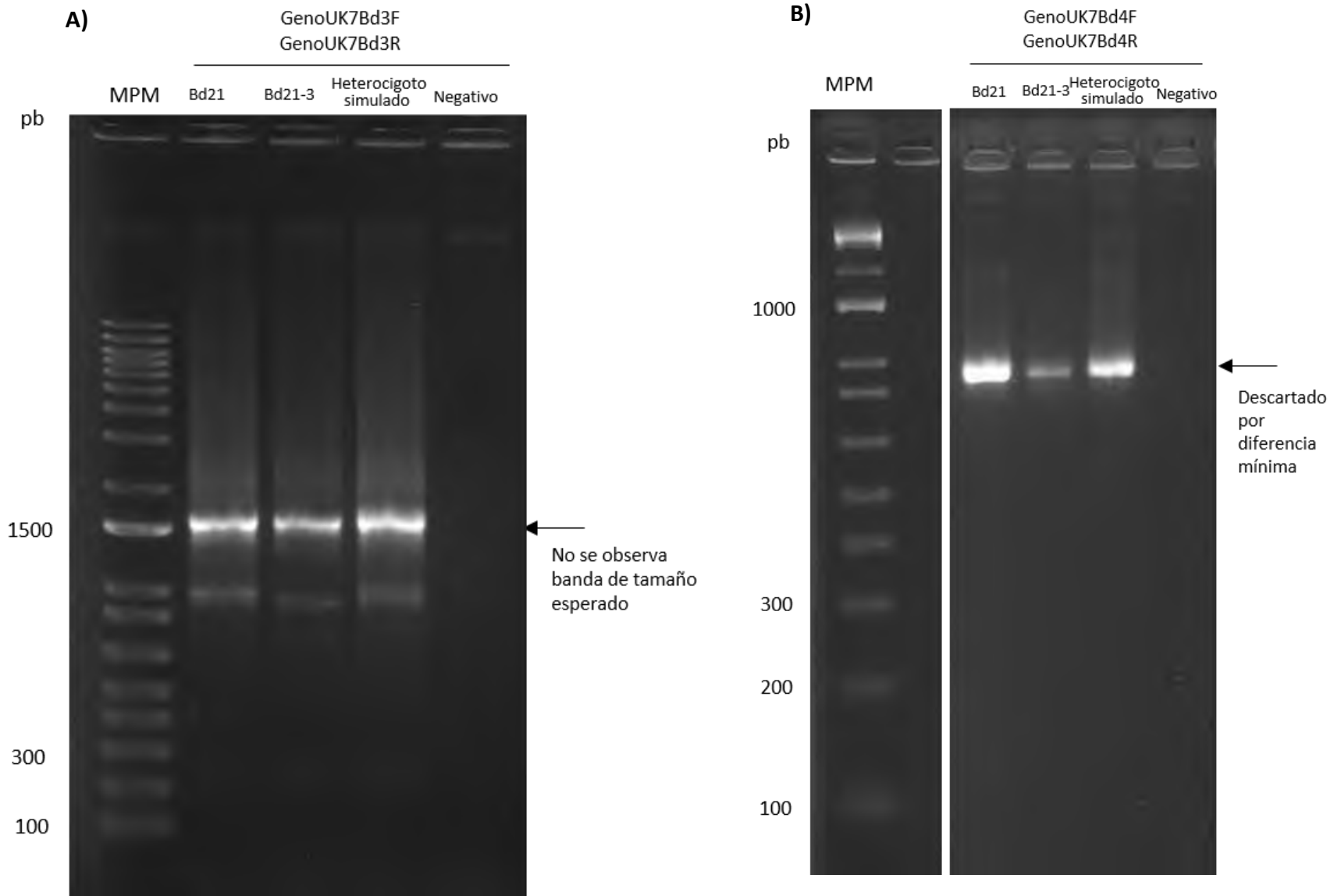


Figura 38. Gel de agarosa al 3% para genotipificación de UK7 entre ecotipos de *B. distachyon*. Las bandas corresponden al tamaño esperado. A) No se observa la diferencia de 1,331 pb en Bd21-3 identificado en el alineamiento de UK7. B) Diferencia no observable debido a tamaño de los amplicones.

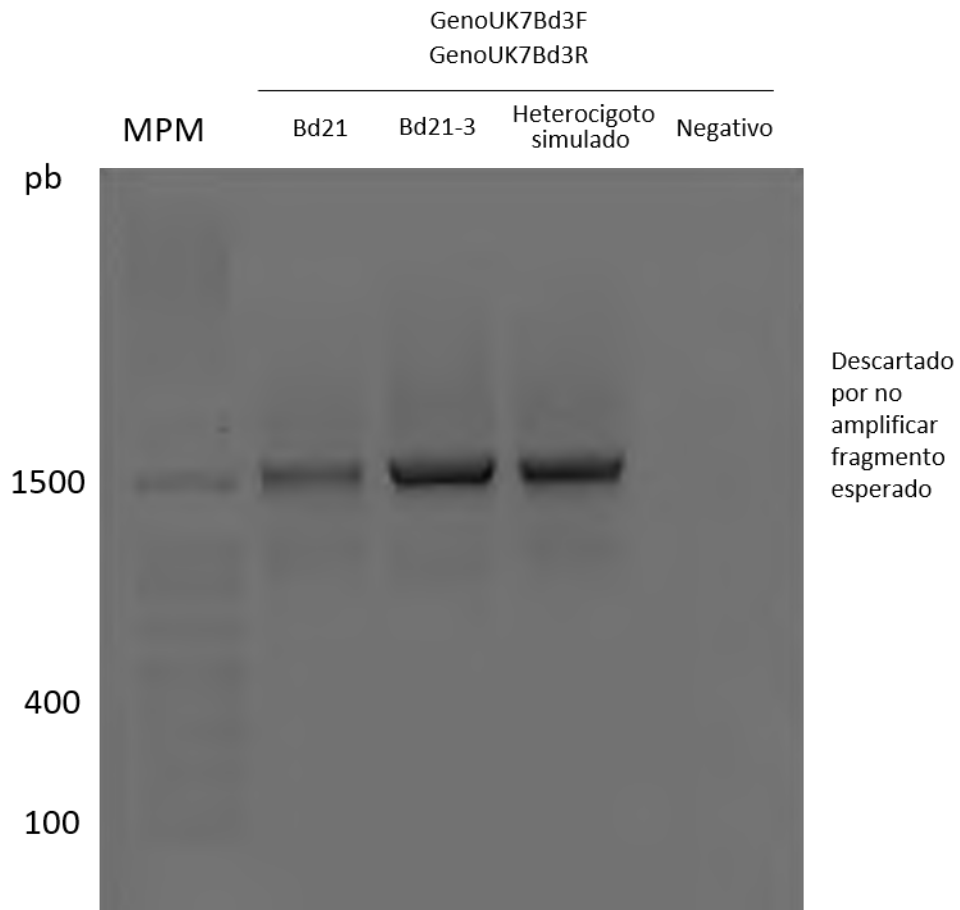


Figura 39. Gel de agarosa al 3% para genotipificación de UK7 entre ecotipos de *B. distachyon*. No amplificó el fragmento esperado.

Tabla 13. Condiciones para PCR de genotipificación de UK7

Zona	ID oligonucleótido	Sec 5' a 3'	T °C	Amplicón	Diferencia	Gel	Programa
Río arriba	GenoUK7Bd1F	TGACGTCACCCCATTGTAAA	55	230 pb Bd21	41 pb	Agarosa 3%	30 ciclos, tiempo de extensión 30 s
	GenoUK7Bd1R	CCGAAACTTTGCTTTCAGC		189 pb Bd21-3			
Río arriba	GenoUK7Bd2F	TTACTTCGAATCGGCCTGAC	60	420 pb Bd21	58 pb	Agarosa 3%	30 ciclos, tiempo de extensión 30 s
	GenoUK7Bd2R	CCCGGAAATACCACATGTTT		362 pb Bd21-3			
Río arriba	GenoUK7Bd3F	TCCGGAGATTGAGAGTAAGCA	65	968 pb Bd21	1,331 pb		Descartado
	GenoUK7Bd3R	GGTGGAGGAACGACCAACT		2,299 pb Bd21-3			
Río abajo	GenoUK7Bd4F	TTTTACATATGGCAGCAGAA	60	920 pb Bd21	29 pb		Descartado
	GenoUK7Bd4R	CCATGTCAATTAACGTACTGTGG		891 pb Bd21-3			

8. CONCLUSIONES

La construcción de árboles filogenéticos e identificación de dominios por homología fue exitosa y permitió el desarrollo de los objetivos específicos planteados.

La caracterización bioinformática sugiere que IF1 en *Brachypodium distachyon* conserva la función de inhibidor endógeno de la ATPasa mitocondrial, similar a la reportada en animales. El análisis BLAST reveló diferencias entre el número de copias de IF1 entre ecotipos, de las cuales, solo BdiBd21-3.3G0596600 de Bd21-3 mostró una expresión significativamente al alza en inundación. El análisis de promotor indica posibles modificaciones que podrían influir en esta regulación en la respuesta al estrés por inundación.

Para el caso de UK7, la predicción estructural indica que al parecer se trata de una proteína con una región intrínsecamente desordenada a partir del aminoácido 554, con una alta proporción de serinas, que probablemente sean sitio de modificación postraduccional. El análisis de expresión en inundación indica que BdiBd21-3.1G0929600 de Bd21-3 no solo aumentó su expresión bajo esta condición, sino que también varía según la hora del día. Esta secuencia cuenta con un polimorfismo de 41 pb en la posición -1607, casi en el límite de donde se encuentra normalmente el promotor de los genes, que no está presente en Bd21-3 y que sirvió para desarrollar un marcador molecular.

Ambos genes poseen zonas polimórficas que pueden ser utilizadas como marcadores moleculares para su genotipificación, por lo que la hipótesis se acepta.

9. PERSPECTIVAS

Para continuar con este trabajo de investigación es posible realizar cruzas de Bd21 y Bd21-3 para generar líneas isogénicas con el fondo genético de Bd21 pero con versión génica de IF1-A y UK7-A de Bd21-3. Esto con el fin de evaluar la influencia individual de los genes en la tolerancia al estrés por inundación.

Además, ya que UK7 no tiene información reportada, y su secuencia parece tener una región desordenada, lo convierte en un candidato ideal para generar líneas Knockout que puedan dar información sobre la función de la proteína y los aminoácidos que participan.

El análisis de promotor da indicios sobre probables sitios que afecten la expresión de los genes, por lo que generar mutantes y evaluar su expresión por qPCR podría ayudar a determinar qué regiones son críticas en la respuesta al estrés por inundación.

Todas estas propuestas aportan a la dilucidación de mecanismos de tolerancia al estrés por inundación, que de ser positivas, en algún futuro puedan ser transferidas a ejemplares de importancia nutricional.

10. REFERENCIAS

1. Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server issue), W202-208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
2. Bailey-Serres, J., Fukao, T., Ronald, P., Ismail, A., Heuer, S., & Mackill, D. (2010). Submergence Tolerant Rice: SUB1's Journey from Landrace to Modern Cultivar. *Rice*, 3(2-3), 138-147. <https://doi.org/10.1007/s12284-010-9048-5>
3. Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2017). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D37-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1070>
4. Bermúdez-García, J. (2015). *Regulación de la expresión y actividad de IF1, el inhibidor fisiológico de la H⁺-ATP sintasa de la mitocondria*. UAM. Departamento de Biología Molecular; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM).
5. Buchan, D. W. A., & Jones, D. T. (2019). The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W402-W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz297>
6. Cabezon, E., Butler, P. J., Runswick, M. J., & Walker, J. E. (2000). Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25460-25464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003859200>
7. Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2003). The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(9), 744-750. <https://doi.org/10.1038/nsb966>
8. Carroll, J., Watt, I. N., Wright, C. J., Ding, S., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2024). The inhibitor protein IF1 from mammalian mitochondria inhibits ATP hydrolysis but not ATP synthesis by the ATP synthase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 300(3). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.105690>
9. Chen, C., Meng, Y., Hu, Z., Yang, J., & Zhang, M. (2021). Identification of New Proteins and Potential Mitochondrial F1F0-ATPase Inhibitor Factor 1-Associated Mechanisms in *Arabidopsis thaliana* Using iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis. *Plants*, 10(11), 2385. <https://doi.org/10.3390/plants10112385>
10. Chen, C., Meng, Y., Shopan, J., Whelan, J., Hu, Z., Yang, J., & Zhang, M. (2020). Identification and characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial F1F0-ATPase inhibitor factor 1. *Journal of Plant Physiology*, 254, 153264. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153264>

11. Chow, C.-N., Yang, C.-W., Wu, N.-Y., Wang, H.-T., Tseng, K.-C., Chiu, Y.-H., Lee, T.-Y., & Chang, W.-C. (2024). PlantPAN 4.0: Updated database for identifying conserved non-coding sequences and exploring dynamic transcriptional regulation in plant promoters. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D1569-D1578. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad945>
12. FAO - Noticias: Los pequeños agricultores familiares producen un tercio de los alimentos del mundo. (2021). <https://www.fao.org/news/story/en/item/1395127/icode/>
13. Feng, S., Chen, Z., Zhang, C., Xie, Y., Ovchinnikov, S., Gao, Y., & Liu, S. (2023). *ColabDock: Inverting AlphaFold structure prediction model for protein-protein docking with experimental restraints* (p. 2023.07.04.547599). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.07.04.547599>
14. Fukao, T., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P., & Peña-Castro, J. M. (2019). Submergence and Waterlogging Stress in Plants: A Review Highlighting Research Opportunities and Understudied Aspects. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00340>
15. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. https://web.expasy.org/docs/expasy_ref.html
16. Gatto, C., Grandi, M., Solaini, G., Baracca, A., & Giorgio, V. (2022). The F1Fo-ATPase inhibitor protein IF1 in pathophysiology. *Frontiers in Physiology*, 13, 917203. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.917203>
17. Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D1178-D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
18. Harrison, P. W., Amode, M. R., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barba, M., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Campbell, L. I., Martinez, M. C., Charkhchi, M., Chougule, K., ... Yates, A. D. (2024). Ensembl 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D891-D899. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1049>
19. Hirabayashi, Y., Mahendran, R., Koirala, S., Konoshima, L., Yamazaki, D., Watanabe, S., Kim, H., & Kanae, S. (2013). Global flood risk under climate change. *Nature Climate Change*, 3(9), 816-821. <https://doi.org/10.1038/nclimate1911>
20. Hoegh-Guldberg, O., Jacob, D., Taylor, M., Bindi, M., Brown, S., Camilloni, I., Diedhiou, A., Djalante, R., Ebi, K. L., Engelbrecht, F., Hijioka, Y., Mehrotra, S., Payne, A., Seneviratne, S. I., Thomas, A., Warren, R., Zhou, G., Halim, S. A., Achlatis, M., ... Sherstyukov, B. (2022). *Impacts of*

- 1.5°C of Global Warming on Natural and Human Systems. In Global Warming of 1.5°C: IPCC Special Report on Impacts of Global Warming of 1.5°C above Pre-industrial Levels in Context of Strengthening Response to Climate Change, Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty (pp. 175-312). <https://doi.org/doi:10.1017/9781009157940.005>*
21. Høie, M. H., Kiehl, E. N., Petersen, B., Nielsen, M., Winther, O., Nielsen, H., Hallgren, J., & Marcatili, P. (2022). NetSurfP-3.0: Accurate and fast prediction of protein structural features by protein language models and deep learning. *Nucleic Acids Research*, *50*(W1), W510-W515. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac439>
 22. Holehouse, A. S., & Kragelund, B. B. (2024). The molecular basis for cellular function of intrinsically disordered protein regions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *25*(3), 187-211. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00673-0>
 23. Ichikawa, N., Chisuwa, N., Tanase, M., & Nakamura, M. (2005). Mitochondrial ATP synthase residue betaarginine-408, which interacts with the inhibitory site of regulatory protein IF1, is essential for the function of the enzyme. *Journal of Biochemistry*, *138*(2), 201-207. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi116>
 24. Inoue, K., Araki, T., & Endo, M. (2018). Circadian clock during plant development. *Journal of Plant Research*, *131*(1), 59-66. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0991-8>
 25. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
 26. Junge, W., & Nelson, N. (2015). ATP Synthase. *Annual Review of Biochemistry*, *84*(Volume 84, 2015), 631-657. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034124>
 27. Karypis, G. (2006). YASSPP: Better kernels and coding schemes lead to improvements in protein secondary structure prediction. *Proteins*, *64*(3), 575-586. <https://doi.org/10.1002/prot.21036>
 28. Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M., JÄnsch, L., & Braun, H.-P. (2010). Internal Architecture of Mitochondrial Complex I from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *22*(3), 797-810. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073726>
 29. Krippahl, L. (2006). Integrating Web Resources to Model Protein Structure and Function. En P. Barahona, F. Bry, E. Franconi, N. Henze, & U. Sattler (Eds.), *Reasoning Web: Second International Summer School 2006, Lisbon, Portugal, September 4-8, 2006, Tutorial Lectures* (pp. 184-196). Springer. https://doi.org/10.1007/11837787_8

30. Kühlbrandt, W. (2019). Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 88(Volume 88, 2019), 515-549. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903>
31. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
32. Kumar, V., Sharma, A., Kaur, R., Thukral, A. K., Bhardwaj, R., & Ahmad, P. (2017). Differential distribution of amino acids in plants. *Amino Acids*, 49(5), 821-869. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2401-x>
33. Kuroha, T., Nagai, K., Gamuyao, R., Wang, D. R., Furuta, T., Nakamori, M., Kitaoka, T., Adachi, K., Minami, A., Mori, Y., Mashiguchi, K., Seto, Y., Yamaguchi, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Wu, J., Ebana, K., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., ... Ashikari, M. (2018). Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding. *Science*, 361(6398), 181-186. <https://doi.org/10.1126/science.aat1577>
34. Lin, K., Simossis, V. A., Taylor, W. R., & Heringa, J. (2005). A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*, 21(2), 152-159. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth487>
35. Lotthammer, J. M., Ginell, G. M., Griffith, D., Emenecker, R. J., & Holehouse, A. S. (2023). *Direct Prediction of Intrinsically Disordered Protein Conformational Properties From Sequence: Version 3 [2023-05-28]* (p. 2023.05.08.539824). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.05.08.539824>
36. Medina-Chávez, L., Camacho, C., Martínez-Rodríguez, J. A., Barrera-Figueroa, B. E., Nagel, D. H., Juntawong, P., & Peña-Castro, J. M. (2023). Submergence Stress Alters the Expression of Clock Genes and Configures New Zeniths and Expression of Outputs in *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijms24108555>
37. Mendoza-Hoffmann, F., Zarco-Zavala, M., Ortega, R., Celis-Sandoval, H., Torres-Larios, A., & García-Trejo, J. J. (2022). Evolution of the Inhibitory and Non-Inhibitory ϵ , ζ , and IF1 Subunits of the F1FO-ATPase as Related to the Endosymbiotic Origin of Mitochondria. *Microorganisms*, 10(7), 1372. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071372>
38. Mora, C., Spirandelli, D., Franklin, E. C., Lynham, J., Kantar, M. B., Miles, W., Smith, C. Z., Freel, K., Moy, J., Louis, L. V., Barba, E. W., Bettinger, K., Frazier, A. G., Colburn Ix, J. F., Hanasaki, N., Hawkins, E., Hirabayashi, Y., Knorr, W., Little, C. M., ... Hunter, C. L. (2018). Broad threat to

- humanity from cumulative climate hazards intensified by greenhouse gas emissions. *Nature Climate Change*, 8(12), 1062-1071. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0315-6>
39. Myers, S. S., Smith, M. R., Guth, S., Golden, C. D., Vaitla, B., Mueller, N. D., Dangour, A. D., & Huybers, P. (2017). Climate Change and Global Food Systems: Potential Impacts on Food Security and Undernutrition. *Annual Review of Public Health*, 38, 259-277. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031816-044356>
 40. Nakazono, M., Imamura, T., Tsutsumi, N., Sasaki, T., & Hirai, A. (2000). Characterization of two cDNA clones encoding isozymes of the F(1)F(0)-ATPase inhibitor protein of rice mitochondria. *Planta*, 210(2), 188-194. <https://doi.org/10.1007/pl00008125>
 41. Ngwa, C. J., Farrukh, A., & Pradel, G. (2021). Zinc finger proteins of Plasmodium falciparum. *Cellular Microbiology*, 23(12), e13387. <https://doi.org/10.1111/cmi.13387>
 42. Noji, H., & Ueno, H. (2022). How Does F1-ATPase Generate Torque?: Analysis From Cryo-Electron Microscopy and Rotational Catalysis of Thermophilic F1. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.904084>
 43. Pearson, W. R., & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(8), 2444-2448. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2444>
 44. Peña-Castro, J. M. (2014). Plant molecular response to submergence stress: Lessons from SUB1A gene. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(4), 325-337.
 45. Pucciariello, C., Voeselek, L. A. C. J., Perata, P., & Sasidharan, R. (2014). Plant responses to flooding. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00226>
 46. Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE*, 8(6), e66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>
 47. Rivera-Contreras, K. R. (2017). *Búsqueda y análisis molecular de ecotipos de Brachypodium distachyon tolerantes al estrés por inundación*. Universidad del Papaloapan.
 48. Rose, A. S., Bradley, A. R., Valasatava, Y., Duarte, J. M., Prlić, A., & Rose, P. W. (2018). MolProbity: Más y mejores datos de referencia para una validación mejorada de la estructura de todos los átomos. *Bioinformatics*, 34(21), 3755-3758. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty419>
 49. Sasidharan, R., Bailey-Serres, J., Ashikari, M., Atwell, B. J., Colmer, T. D., Fagerstedt, K., Fukao, T., Geigenberger, P., Hebelstrup, K. H., Hill, R. D., Holdsworth, M. J., Ismail, A. M., Licausi, F., Mustroph, A., Nakazono, M., Pedersen, O., Perata, P., Sauter, M., Shih, M.-C., ... Voeselek, L. A. C. J. (2017). Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and

low oxygen stress research. *New Phytologist*, 214(4), 1403-1407.

<https://doi.org/10.1111/nph.14519>

50. Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2021). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20-D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
51. Schrödinger, L. & DeLano. (2020). *Pymol* [Software]. <http://www.pymol.org/pymol>
52. *Science Breakthroughs to Advance Food and Agricultural Research by 2030*. (2019). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25059>
53. Sievers, F., & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 27(1), 135-145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>
54. Singh, U., Dar, M., Singh, S., Zaidi, N., Bari, M. A., Mackill, D., Collard, B., Singh, V. N., Singh, J. P., Reddy, J. N., & Ismail, R. K. (2013). Field Performance, Dissemination, Impact and Tracking Of Submergence Tolerant (Sub1) Rice Varieties in South Asia. *SABRAO journal of breeding and genetics*, 45, 112-131.
55. Sperschneider, J., Catanzariti, A.-M., DeBoer, K., Petre, B., Gardiner, D. M., Singh, K. B., Dodds, P. N., & Taylor, J. M. (2017). LOCALIZER: Subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. *Scientific Reports*, 7(1), 44598. <https://doi.org/10.1038/srep44598>
56. Tello-Ruiz, M. K., Jaiswal, P., & Ware, D. (2022). Gramene: A Resource for Comparative Analysis of Plants Genomes and Pathways. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2443, 101-131. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2067-0_5
57. Thornton, P., Dinesh, D., Cramer, L., Loboguerrero, A. M., & Campbell, B. (2018). Agriculture in a changing climate: Keeping our cool in the face of the hothouse. *Outlook on Agriculture*, 47(4), 283-290. <https://doi.org/10.1177/0030727018815332>
58. Venard, R., Brèthes, D., Giraud, M.-F., Vaillier, J., Velours, J., & Haraux, F. (2003). Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry*, 42(24), 7626-7636. <https://doi.org/10.1021/bi034394t>
59. Voesenek, L. A. C. J., & Bailey-Serres, J. (2015). Flood adaptive traits and processes: An overview. *New Phytologist*, 206(1), 57-73. <https://doi.org/10.1111/nph.13209>

60. Vogel, J. P., Garvin, D. F., Mockler, T. C., Schmutz, J., Rokhsar, D., Bevan, M. W., Barry, K., Lucas, S., Harmon-Smith, M., Lail, K., Tice, H., Schmutz (Leader), J., Grimwood, J., McKenzie, N., Bevan, M. W., Huo, N., Gu, Y. Q., Lazo, G. R., Anderson, O. D., ... Manual annotation and gene family analysis. (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, *463*(7282), 763-768. <https://doi.org/10.1038/nature08747>
61. Waters, C. N., Zalasiewicz, J., Summerhayes, C., Barnosky, A. D., Poirier, C., Gałuszka, A., Cearreta, A., Edgeworth, M., Ellis, E. C., Ellis, M., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J. R., Richter, D. deB., Steffen, W., Syvitski, J., Vidas, D., Wapre, M., Williams, M., ... Wolfe, A. P. (2016). The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6269), aad2622. <https://doi.org/10.1126/science.aad2622>
62. Xu, G., Shin, S. B. Y., & Jaffrey, S. R. (2009). Global profiling of protease cleavage sites by chemoselective labeling of protein N-termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(46), 19310-19315. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908958106>
63. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, *12*(1), 7-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
64. Zhang, Z., Pearson, W. R., & Miller, W. (1997). Aligning a DNA sequence with a protein sequence. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, *4*(3), 339-349. <https://doi.org/10.1089/cmb.1997.4.339>

11. Material suplementario

Material suplementario 1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de IF1 de *Arabidopsis thaliana* y *Bos taurus*.

```

At5G04750      MSS-----ARSAITK--LKLARSFGERQIGASRSVVSTRGPAIRYFSDDKGRVLSEEER      52
B.taurus      MAATALAARTRQAVWSVWAMQGRGFGSESGDNVRS---SAG-A----VRDAGGAFGKREQ      52
               *: :      :*: *: .      .*.**... . ** : * *      * * .....*:

At5G04750      AKESMYIQKMERERLEKKKKLEQDKLD-----GEKGSANKKPETNKP-      94
B.taurus      AEEERYFRARAQEQLAALKKHHENEISHHAKEIERLQKEIERHKQSIKCLKQSEDD      109
               *:*. *: :      :*: * ** .....      .* * :* : :.
    
```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: At5G04750	100.00	26.74
2: B.taurus	26.74	100.00

```

At5G04750      ----GPAIRY---FSDDKGRVLSEEERAKESMYIQKMERERLEKKKK      40
B.taurus      GSESGDNVRSSAGAVRDAGGAFGKREQAEEERYFRARAQEQLAALK-      46
               * :*      * * .....*:*:*. *: :      :*: * *
    
```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: At5G04750	100.00	28.21
2: B.taurus	28.21	100.00

Material suplementario 2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de IF1 de *Arabidopsis thaliana* y *Brachypodium distachyon*.

```
At5G04750      MSSARS---AITKLLKARSFGERQIGASRSVSTRGPAIRYFSD--DKGRVLSEEERAKE 55
Bd21.3g44950  MATIRSAAAATIARPSWAAVAGTRR-----MEGI--GGRRYFGDSVRTGRVLSEEERAAE 52
*:: **   :*:: . *  * *:      : .   . ***.*  .***** * *
```

```
At5G04750      SMYIQMERERLEKKKKLEQDKLDGE-KGS---ANKKPETNKP- 94
Bd21.3g44950  NVYIQMEREKLEKQRRMADQRKADAACKAAAAEGDKKGEGAHPT 97
.:*****:***::: : : . * :   .:** *  :*
```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

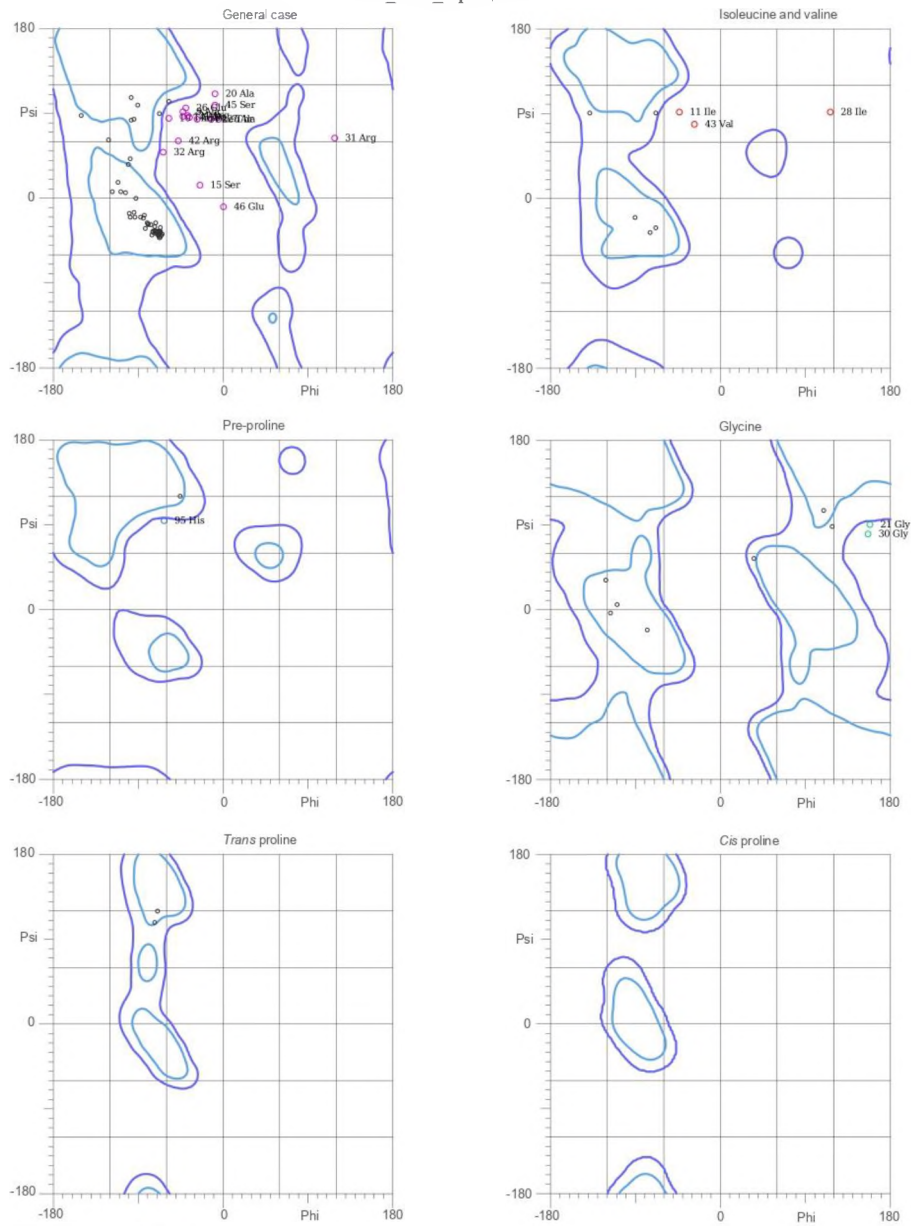
1: At5G04750	100.00	44.19
2: Bd21.3g44950	44.19	100.00

```
At5G04750      GPAIRYFSD--DKGRVLSEEERAKESMYIQMERERLEKKKK 40
Bd21.3g44950  ---RYFGDSVRTGRVLSEEERAAENVYIQMEREKLEKQR- 37
***.*  .***** *.:*****:***:::
```

1: At5G04750	100.00	74.29
2: Bd21.3g44950	74.29	100.00

MolProbity Ramachandran analysis

IF1_rank_3.pdb, model 1



67.4% (64/95) of all residues were in favored (98%) regions
76.8% (73/95) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 22 outliers (phi, psi):

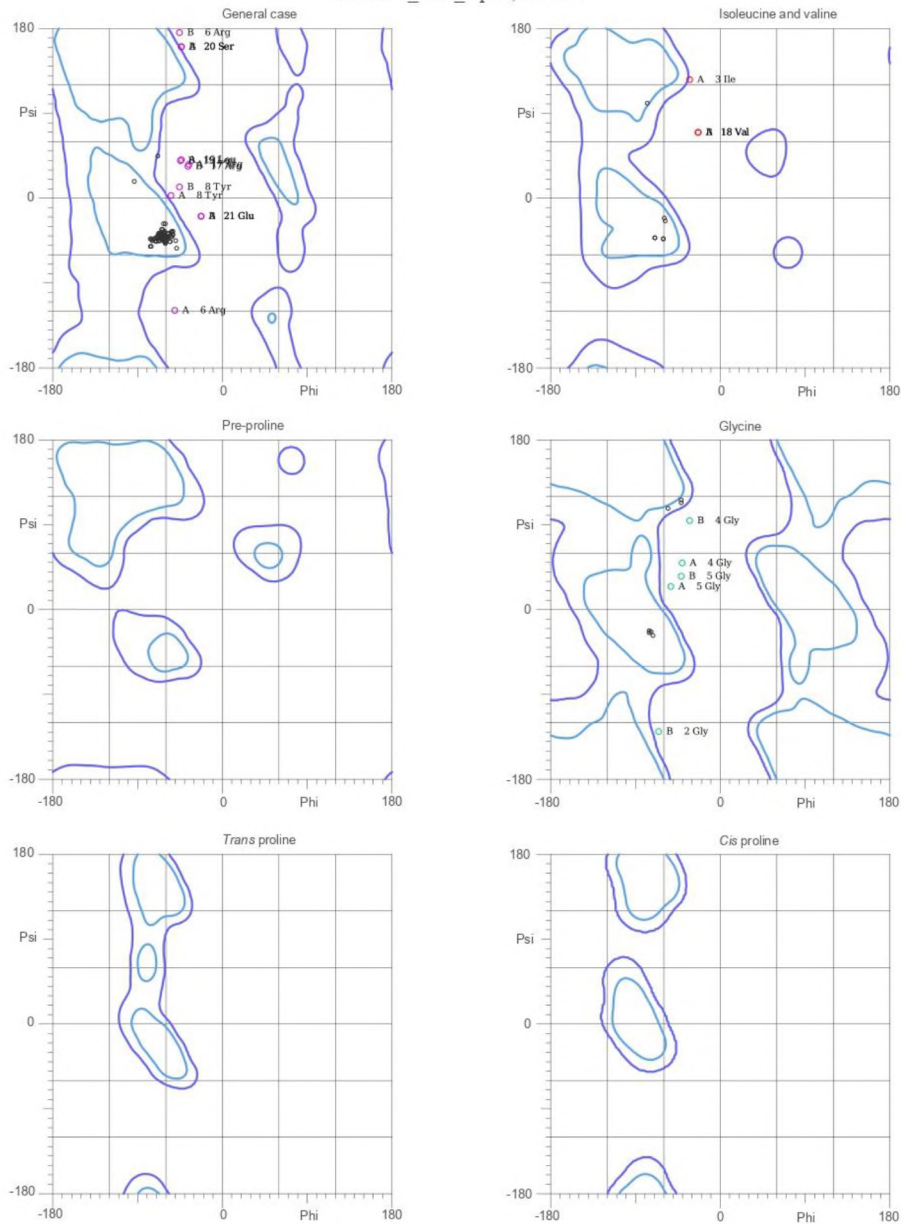
7 Ala (-51, 84.1)	21 Gly (158.4, 91.9)	42 Arg (-48.5, 61.2)
8 Ala (-36.0, 96.9)	22 Thr (-13.3, 84.1)	43 Val (-28.1, 79.5)
9 Ala (-43.9, 92.4)	24 Arg (-38.2, 88.9)	44 Leu (-28.2, 84.8)
10 Thr (-58.9, 85.3)	26 Glu (-40.8, 96.8)	45 Ser (-9.9, 99.2)
11 Ile (-44.2, 92.1)	28 Ile (117.0, 92.4)	46 Glu (1.0, -9.9)
12 Ala (-43.2, 87.5)	30 Gly (156.4, 81.9)	95 His (-63.8, 95.8)
15 Ser (-25.1, 14.6)	31 Arg (118.9, 64.2)	
20 Ala (-9.3, 111.8)	32 Arg (-64.2, 49.2)	

<http://kinemage.biochem.duke.edu>

Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003)

MolProbity Ramachandran analysis

Bd21IF1_rank_1.pdb, model 1



80.3% (98/122) of all residues were in favored (98%) regions.
83.6% (102/122) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 20 outliers (phi, psi):

A 3 Ile (-34.0, 126.3)	A 20 Ser (-44.3, 161.3)	B 18 Val (-24.8, 70.0)
A 4 Gly (-41.5, 50.7)	A 21 Glu (-23.6, -19.5)	B 19 Leu (-45.1, 40.3)
A 5 Gly (-53.3, 25.6)	B 2 Gly (-66.1, -129.8)	B 20 Ser (-44.7, 161.8)
A 6 Arg (-51.4, -119.1)	B 4 Gly (-33.4, 95.5)	B 21 Glu (-23.5, -19.6)
A 8 Tyr (-55.6, 3.7)	B 5 Gly (-42.9, 36.0)	
A 17 Arg (-36.2, 36.7)	B 6 Arg (-46.7, 176.3)	
A 18 Val (-24.1, 70.3)	B 8 Tyr (-46.8, 12.1)	
A 19 Leu (-44.5, 42.0)	B 17 Arg (-37.5, 34.6)	

<http://kinemage.biochem.duke.edu>

Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003)

Material suplementario 5. Secuencias homólogas obtenidas de análisis BLAST de IF1.

Copias	ID Phytozome	ID Ensemble	Versión genoma	Identidad	Long alineamiento
3	Bradi3g44950.1.p	Solo disponible V3.0	<i>B. distachyon</i> v3.2 Bd21	100	83
	Bradi4g38600.3.p	-		72	29
	Bradi3g42871.1.p	-		87	23
4	Bradi3g44950	-	<i>B. distachyon</i> v3.1 Bd21	100	82
	Bradi4g38600	-		72	29
	Bradi3g42869	-		87	23
	Bradi4g38591	-		71	17
5	BdiBd21-3.3G0596600.1.p	-	<i>B. distachyon</i> Bd21-3 v1.2	100	83
	BdiBd21-3.4G0537600.1.p	-		72	29
	BdiBd21-3.2G0008400.1.p	-		69	29
	BdiBd21-3.3G0566200.1.p	-		87	23
	BdiBd21-3.4G0537500.1.p	-		71	17
7	Traes_1AS_85B551D28.1	TraesCS1A02G003700.1	<i>T. aestivum</i> v2.2	73	64
	Traes_1DS_C09B774C7.1	TraesCS1D02G005800.1		73	64
	Traes_7AS_71BE153C7.1	TraesCS7B02G180800.1		71	35
	Traes_7DS_427AD6E51.1	TraesCS7A02G279400.1		71	35
	Traes_4BS_7C5E57EDB.1	TraesCS4B02G009200.1		77	30
	Traes_4DS_3A6A1733C.1	TraesCS4D02G006700		77	30
	Traes_7BS_03ADEA9D6.1	TraesCS4A02G307300.1		60	35
5	Zm00001d016705_P001	Zm00001eb242800_T001	<i>Z. mays</i> RefGen_V4	76	54
	Zm00001d031940_P001	Zm00001eb039390_T001		57	47
	Zm00001d012599_P001	Zm00001eb369670_T001		76	29
	Zm00001d043224_P001	Zm00001eb151060_T001		76	29
	-	Zm00001eb252110_T001		69.7	33
4	LOC_Os02g33070.1	Os02t0533800-01	<i>O. sativa</i> v7.0	73	55
	LOC_Os08g44460.2	Os08t0558900-01		60	40
	LOC_Os09g39550.1	Os09t0568900-01		67	36
	LOC_Os08g44470.1	Os08t0559000-01		69	29
2	AT5G04750.1	AT5G04750.1	<i>A. thaliana</i> TAIR10	67	39
	AT2G27730.4	AT2G27730.4		73	30
2	Al6G14410	fgenes2_kg.6_387_AT5G04750.1	<i>A. lyrata</i> v2.1	48	40
	Al4G022570	scaffold_401255.1		65	17

Secuencias en formato FASTA

>Bd21.3g44950
MATIRSAAATIARPSWAAVAGTRRMEGIGRRYFGDSVRTGRVLSEEERAAENVYIQMEREKLEKQRRMA
DQRKADAACKAAAAEGDKKGEGAHPT

>Bd21-3.3G0596600
MATIRRAAATIARPSWAAVAGTRRMEGIGRRYFGDSVRTGRVLSEEERAAENVYIQMEREKLEKQRRMA
DQRKADAACKAAAAEGDKKGEGAHPT

>TraesCS1A02G003700.1
MPSIRAAAARFSRPAWSAVGVTVMRRMQGIGGGRAPRYFSDSIRSGRVLSEEERAAENVYIQMEREKLEK
LRSKKADQEKADAACKSAKGNNEETIQTNKGEAHPS

>TraesCS1D02G005800.1
MWMPSIRAAAARI TRPAWSAVGVTVPRRMEGIGRNCAPRYFTDRIRSGRVLSEEERAAENVYIQMEREKLE
EKLRRKADQEKADAACKSAKGNNEKGEAHPS

>Zm00001eb242800_T001
MATRRTVAA SVTAQRPAAAVARRMEGVSRYSFSDKASGRLLSEEERAAENVYIQMEREKLEKLRKEDKA
KAEAAKRAAAAARGDTKNGEAAHPS

>Os02t0533800-01
MATRTAVARVVAPHQPAWAAAVLARRMEGGRRVARYFSDGTGRVLSEEERAAESVYIQMEREKLEKERRK
ADKDKADAACKRAAAAAGDKKGGEARPT

>At5G04750
MSSARSAITKLKLARSFGERQIGASRSVVSTRGPAIRYFSDDKGRVLSEEERAKESMYIQMEREKLEKERRK
KLEQDKLDGEKGSANKKPETNKP

>Zm00001eb039390_T001
MAMRTALTS LPARLRAPAPPAATGGRRLSDGKGRVLSEEERAKESIYIQMEREKLEKLRKEDKA
DKAKPADADKVFSDSELWIWSTTRTKAEPDEGRGQPKLYAGKLRRDGTRGNRP

>Os08t0558900-01
MATRTAVARVVAPHQPAWAAAVLARRMEGGRRVARYFSDGTGRVLSEEERAAESVYIQMEREKLEKERRK
ADKDKADAACKRAAAAAGDKKGGEARPT

>TraesCS7B02G180800.1
MAMRCALTS LPARLRSPAVVASGTRRLSDGKGRVLSEEERAKENVYIQMEREKLEKLRKEDKA
KAKSGADGKVYDTAL

>TraesCS7A02G279400.1
MAMRCALTS LPARLRSPAVVASGTRRLSDGKGRVLSEEERAKENVYIQMEREKLEKLRKEDKA
KAKSGADGKVYDTAL

>Bd21.4g38600
MAIAAAAAASRTQARAAARFIQSRLRSSGGKVLSEEEKAAENIYIKKMEQEKIEKLARKGSPGEPAPSTP
SSAASDVKAGGGPAESSAGVSTDKNRNYAVLAGTIAGLSALGWYLLSKPKKVEETVD

>Bd21-3.4G0537600
MAIAAAAAASRTQARAAARFIQSRLRSSGGKVLSEEEKAAENIYIKKMEQEKIEKLARKGPPSPGEQAPSTP
SSAASDVKAGGGPAESSSAGVSTDKNRNYAVLAGTLAGLSALGWYLLSKPKKVEETVD

>Zm00001eb369670_T001
MATRAAARFLQRRFLSSGGKVLSEEEKAAENVIKKVEQEKLEKLARKGPPSSGEQPSSTTGSAAASDVKADA
GPTESASASVSTDKNRNYAVLAGAVAALGGLGWYLLLKPKKSEEVVD

>TraesCS4B02G009200.1
MARSGLLVPTPCSASASSSHFQREGGERGFESLPESGSIQRVLGFSLRAAAMSMAAAAARAAAPGRAAAR
FVQTRLRSSGKVLSEEEERAAENVIKKMEQEKREKLARKGPPSTGEQAPSTPSAGAGDVNTAGAGSTTSASA
AGTSTDKNRNYAVLAGTLAGLSALGWYLLSKPKKTEEVVD

>Zm00001eb151060_T001
MATRAASRFLQRRLLSSGGKVLSEEEKAAEKVYIKKMEQEKLEKLARKGPPSSGEQPSSTTVSAASDVKTGA
GPTESASANVSTDKNRNYAVLAGTIAALSGLGWYLLSKPKKSEEVVD

>Bd21-3.2G0008400
MAEVRFRSSGGKVLAESEEKAAENIYIKKMEQEKIEKLARKGPPSPGEQAPSTPSSAASDVKAGGCPAESSS
AGVSTDKNRNYAVLAGTLAGLSALGWYLLSKPKKVEETVD

>Os09t0568900-01
MEAAARAPSRAAARFVQRRLFSGGKVLGEEEEKAAENVYIKKMEHEKLEKLAHKGNPGEQASTAGAAANA
VKTGSGSTESRSAGVSTDKNRNYAVLAGTVAALSGLGWYLLSKPKKSEDIVD

>TraesCS4D02G006700
MSMAAAAAAATRAPGRAAARFVQTRLRSSGKVLSEEEERAAENVIKKMEQEKREKLARKGPSAGEQAPSTP
SAAAADVSTASASAAAGTSTDKNRNYAVLAGTLAGLSALGWYLLSKPKKTEEVVD

>Bd21-3.3G0566200
MAMRCALTSIPARLRSAAAPAAVRAFSDGKGRVLSEERAKESVYIQKMERERLEKLKKKQEQEKADA EKA
GKKPEEGSK

>At2G27730.4
MATRNALRIVSRFFSSGKVLSEEEERAAENVFIKKMEQEKLQKLARQGPGEQAAGSASEAKVAGATASASAE
SGPKVSEDKNRNYAVVAGVVAIVGSIGWYLKAGGKKQPEVQE

>Bd21.3g42871
MAMRCALTSIPARLRSAAAPAAVRAFSDGKGRVLSEERAKESVYIQKMERERLEKLKKKQEQEKADA EKA
GKPEEGSK

>Os08t0559000-01
MAMAVVAAASRVQARLARLARPRLLSSGGKVLGEEKAAENIYIKKMEQEKLEKLARQGPSPGEQGSSTPA
ADVKAEGGPTAGASTVKNKNYTLIAGAVGVLGASAIAWYRLSKPEKSEEVAN

>TraesCS4A02G307300.1

MSMAAARAATRAPGRAAAARFVQTRLRSGKVLSEEERAAENVYIKKMEQEKREKLARKGPSTGEQAPSTP
SAAAGDVNTGGAASTASASAAGTSTDKNRNYAVLAGTLAGLSALGWYLLSKPKKTEEVD

>Bd21-3.4G0537500.1.p

MAAAAATATASRSVAREAAARFVQRRFWSSGGKVLGEEKAAENIYIKGPPSPGEGASSTPSSTDVKTGRG
PMESTSAGVSTNKNRNYAVLAGTVAAVSALGWYLLSNPKKVEETVD

>Zm00001eb252110_T001

MAMRTALTSLPARLHAPAPPAAMGGRRLSDGKGRVLSEEERAKESVYIQKMERERQEKLLKKRLEQEKADS
EKVKSADADKDVRLQVVRLCAKSREAISSPVQHLTLHYQQLKDEQGELSSSDEKKYKALKRATEREILQSA
DVICCTYVGAGDPRLSNFRFRQVLIDESTQAIEPECLIPVLGVKQVVLAGDHCQLGPIIMCKKAAHAGLA
QSLFECLVILGVKPFRLQIIPAYDYRMHPCLSEFSPNYFYEGTLQNGVTVNERQSSGIDFPWPVNRPMFF
YVQMGQEEIYIIEGCLLKFYTSCRSLV

>A16G14410

MSLARSAITKLRLARSLWETQIGASRSVESTRGSAIRCFSDDKGRVLSEEERAKESMYIKKMEKEILEKKK
KLEKHKPDNEKGSADKKPDASKP

>A1401255

MATRNALRIVSRRFSSGKIFSEEEKAAENVFIKKMEKEKLEKIARQGPGEQAAGTASEAKAAGATASASAE
SGPKVSEDKNRNYAVVAGVVAIFGSIGWYLKAGGKKQPEVQE

>STF1.Sc

MLNRCISRNTLRLPVNLRIASRFYSDGPLGGAGPGNPQDIFIKRERAKEDYYARQQEREQLAHVKEQLKEHK
KKLENLENKINLSK

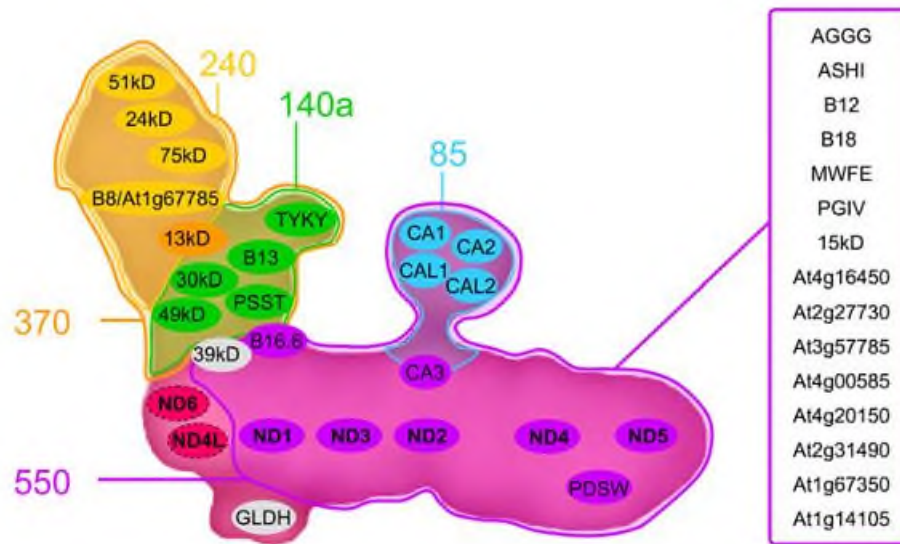
>B.taurus

MAATALAARTRQAVWSVWAMQGRGFGSESGDNVRSSAGAVRDAGGAFGKREQAEEERYFRARAKEQLAALK
KHHENEISHHAKEIERLQKEIERHKQSIKKLKQSEDD

>H.sapiens

MAVTALAARTWLGWGVRTMQARGFGSDQSENVDRGAGSIREAGGAFGKREQAEEERYFRAQSREQLAALK
KHHEEEIVHHKKEIERLQKEIERHKQKIKMLKHDD

Material suplementario 6. Modelo de la arquitectura interna del complejo I mitocondrial. (Klodmann *et al.*, 2010).



Material suplementario 7. Alineamiento de secuencias homólogas de IF1 en *Arabidopsis thaliana*.

```
At5G04750      MSSARSAITKLLKLSRFGERQIGASRSVSTRGPAIRYFSDDKGRVLSEEERAKESMYIQ      60
At2G27730.4    -----MATRNALRIVSRRFSSGKVLSEEERAAENVFIK      33
                ::: .. *      ..*:***** *:::*
```

```
At5G04750      KMERERLEKKKKLEQDKLDGEKGSANKK-----PETNKP-----      94
At2G27730.4    KMEQEKLQKLARQGPGEQAAGSASEAKVAGATASASAESGPKVSEDKNRNYAVVAGVVAI      93
                ***:*:*:* :  .:  . . .* *      . *
```

```
At5G04750      -----      94
At2G27730.4    VGSIGWYLKAGGKKQPEVQE      113
```

1: At5G04750	100.00	31.34
2: At2G27730.4	31.34	100.00

```
At5G04750      VVSTRGPAIRYFSDDKGRVLSEEERAKESMYIQKMERERLEKKKKLEQDKLDGEKGSANK      60
At2G27730.4    MATRNALRIVSRRFSSGKVLSEEERAAENVFIKKMEQEKLQKLARQGPGEQA--GSASE      58
                ::: .. *      ..*:***** *:::***:*:*:* :  .:  . ***:*
```

1: At5G04750	100.00	35.00
2: At2G27730.4	35.00	100.00

Material suplementario 8. Homología de IF1 bovino y STF1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

```

STF1.Sc      MLNRCISRNTRLPVNLRIASRFYSDGPLGGAG-----PGNPQDIFIKRER      45
B.taurus    MAATALAARTR-----QAVWSVWAMQGRGFGESEGDNRSSAGAVRDAGGAFGKREQ  52
          *   .:: .**           . .:*   : * *           : . * ***:

STF1.Sc      AKEDYYARQQEREQLAHVKEQ----LKEHKKKLENLENKINNLSK----- 86
B.taurus    AEEERYFRARAQEQLAALKKHHENEISHHAKEIERLQKEIERHKQSIKCLKQSEDD 109
          *: *: * * : :**** :*::   :..* *::*. *:::*. .: .:
    
```

1: STF1.Sc	100.00	30.77
2: B.taurus	30.77	100.00

Material suplementario 9. Polimorfismos encontrados en los primeros 2,000 nucleótidos de IF1-A en *B. distachyon*. La zona amarilla marca el inicio de la región 5'UTR, la zona morada marca los 2,000 nucleótidos, las letras en rojo indican el sitio del polimorfismo que coincide con la secuencia consenso de un probable sitio de unión de factores de transcripción, en verde las que no.

```

Bd21IF1Promotor      TGAATATTATGATGTTTCGATCAATGCTTATGTGTATGAGTTTGTGATCCCTATCAACA
Bd21-3IF1promotor    TGAATATTATGATGCTTCGATCAATGCTTATGTGTATGAGTTTGTGATCCGTATCAACA
          *****

Bd21IF1Promotor      CACAAGCATGTGCAACTATGTTTAAAAATATAAACCGATGTGTTTTTTC CAAAAAGGAG
Bd21-3IF1promotor    CACAAGCATGTGCAACTATGTTTAAAAATATAAAC GATGTGTTTTTTC CAAAAA GAG
          *****

Bd21IF1Promotor      GATGTTTCTCCGCCTCCGCATCAACCGATGCACACAGCCAGTCGCCTATGGCGATCAGA
Bd21-3IF1promotor    GATGTTTCTCCGCCTC GCATCAACCGATGCACACAGCCAGTCGCCTATGGCGATCAGA
          *****

Bd21IF1Promotor      TTTCAGTTATTACAACACAAAAATGGCAGCAAGTAAGGAAAAAAAAATCCTCCTAGCCGATA
Bd21-3IF1promotor    TTTCAGTTATTACAACACAAAAATGGCAGC AGTAAGGAAAAAAAAATCCTCCTAGCCGATA
          *****

Bd21IF1Promotor      GACCTCGTGTACACCTTAGAACTCACAAAAGAGACACC-AGGAGCAGCTTCAATAGAGAG
Bd21-3IF1promotor    GACCTCGTGTACACCTTAGAACTCACAAA AGACACC AGGAGCAGCTTCAATAGAGAG
          *****

Bd21IF1Promotor      AGCTCTCTTTCCAATCAAAGGAAACGAACCCATCAGAAAAACCAAGAACGGGCTCCCAA
Bd21-3IF1promotor    AGCTCT TTTCCAATCAAAGGAAACGAACCCAT AGAAAAACCAAGAACGGGCTCCCAA
          *****

Bd21IF1Promotor      ACCCAGAAGTCCAAAATCAACAGCCTTCTTGCGTCTCTTGCCCGACCTATCTTCATCTAT
Bd21-3IF1promotor    ACCCAGAAGTCCAAAATCAACAGC TCTTGCGTCTCTTGCCCGACCTATCTTCATCTAT
    
```

```

*****
Bd21IF1Promotor      ATCCTTCACATTAGCATCATTTGGAAGCAGCAACAGATGGTGCCACCATCAAGTGTGTCG
Bd21-3IF1promotor    ATCCTTCACATTAGCATCATTTGGAAGCAGCAACAGATGGTGCCACCATCAGTGTGTCGTA
*****

Bd21IF1Promotor      CATTTGGCAAAGCATCGTCAACGTTGGCTCCACCTCCATAGTTGAGGACCTCCGCATAAG
Bd21-3IF1promotor    CATTTGGCAAAGCATCGTCAACGTTGGCTCCACCTCCATAGTTGAGGACCTCCGCATAAG
*****

Bd21IF1Promotor      CATCGACTTATTCCAAGATGATTTTCATGGGCCGCCACCCTAGCTCAATTAGGACCGCCAC
Bd21-3IF1promotor    CATCGACTTATTCCAAGATGATTTTCATGGGCCGCCACCCTAGCTCAATTAGGACCGCCAC
*****

Bd21IF1Promotor      TGCCAATCTTTCGCCTCCTGTGGTGAACCACCGAGCTGGCCCCAACCATGACCACCGTTG
Bd21-3IF1promotor    TGCCAATCTTTCGCCTCCTGTGGTGAACCACCGAGCTGGCCCCAACCATGACCACCGTTG
*****

Bd21IF1Promotor      CAGCCATTGATGAACAAACCATGACCCGCATATAGAACCAGCCAAAACAGTGCATA
Bd21-3IF1promotor    CAGCCATTGATGAACAAACCATGACCCGCATATAGAACCAGCCAAAACAGTGCATA
***** ** *****

Bd21IF1Promotor      ACCTCCATGTCCAACAGCTGCATCCACACCACCATCTCCATGGGCATCTAGGCCCAAAG
Bd21-3IF1promotor    ACCTCCATGTCCAACAGCTGCATCCACACCACCATCTCCATGGGCATCTAGGCCCAAAG
***** *****

Bd21IF1Promotor      ACGCCCGTATGCTCCAGGCACAGGACACAACAACCGCCACACCGCCATCTCCACCACC
Bd21-3IF1promotor    ACGCCCGTATGCTCCAGGCACAGGACACAACAACCGCCACACCGCCATCTCCACCACC
*****

Bd21IF1Promotor      ATAAAACCGCATCCGCTTGACGAAGACAGCAGCACCCGTGGAGGCGGATGGAATTAAGG
Bd21-3IF1promotor    ATAAAACCGCATCCGCTTGACGAAGACACAGCACCCGTGGAGGCGGATGGAATTAAGG
***** *****

Bd21IF1Promotor      GCTCCCTTTCATGCGTGAGCCGCGGAACAACAACCTCTAGCTCAAAACAGCCCTGCC
Bd21-3IF1promotor    GCTCCCTTTCATGCGTGAGCCGCGGAACAACAACCTCTAGCTCAAAACAGCCCTGCC
*****

Bd21IF1Promotor      CTGACCACCGTCGCGAGTGGCAGCGACCAGCCCTTCTGTCATGAGCCGCCAGAGAACAAC
Bd21-3IF1promotor    CTGACCACCGTCGCGAGTGGCAGCGACCAGCCCTTCTGTCATGAGCCGCCAGAGAACAAC
* *****

Bd21IF1Promotor      AACCTCCTACACAGCTTCCAACGGCGGCGCCAGCCCGACCTCCGTTGGTAGGTGCCGC
Bd21-3IF1promotor    AACCTCCTACACAGCTTCCAACGGCGGCGCCAGCCCGACCTCCGTTGGTAGGTGCCGC
***** **

Bd21IF1Promotor      GACCTGCCCATCCCAGCATGAGTCATCGGAGAAAAGCAACCTCCGGCACAACCTCCAATG
Bd21-3IF1promotor    GACCTGCCCATCCCAGCATGAGTCATCGGAGAAAAGCAACCTCCGGCACAACCTCCAATG
*****

Bd21IF1Promotor      GCGGTTCCGTGCCGACCACCGTCGGCGGCGGCGGACGCGGACACCACGATATCTCC
Bd21-3IF1promotor    GCGGTTCCGTGCCGACCACCGTCGGCGGCGGCGGACGCGGACACCACGATATCTCC
***** *****

Bd21IF1Promotor      CTGGAACAGAGCTCGTCACGCGATCCAGTGGGCTCCTCGCGCGCTAGTCAACCTGTGC

```

Bd21-3IF1promotor CTGAACAGAGCTCGTCACGCGATCCAGTGAGGCTCCTCGCGCGCTAGTCAACCCCTGTGC
 ** *****

Bd21IF1Promotor GATCCTCCAAGGCAGAAGGATCTAGGCCCTGCCGCCACCGACACCAAGCGGGCTTTGCC
 Bd21-3IF1promotor GATCCTCCAAGGCAGAAGGATCTAGGCCCTGCCGCCACCACACCAAGCGGGCTTTGCC

Bd21IF1Promotor GGGCAGCGCGAGGGAGGGAGGCGGCTTAGGGTTTCAGGAGACCTCGTCTTCTTTTCTGT
 Bd21-3IF1promotor GCGACGCGAGGGAGGGAGGCGGCTTAGGGTTTCAGGAGACCTCGTCTTCTTTTCTGT
 * *****

Bd21IF1Promotor ACTTATTTTCTAGTCTCGCTTTTGCATTATTGCCTTCCAAAGAGGGCTCAACTCATGT
 Bd21-3IF1promotor ACTTATTTTCTAGTCTCGCTTTTGCATTATTGCCTTCCAAAGAGGGCTCAACTCATGT

Bd21IF1Promotor GATATATACCGTCATATTCAAAACATTGATTAACAAGGAAATGAAATCATGTACTTTTA
 Bd21-3IF1promotor GATATATACCGTCATATTCAAAACATTGATTAACAAGGAAATGAAATCATGTACTTTTA

Bd21IF1Promotor TTTTAACTCATTGCAGAGCGATGCACTACTGCACACGAGTGAGTTTAAAGTCACCC
 Bd21-3IF1promotor TTTTAACTCATTGCAGAGCGATGCACTACTGCACACGAGTGAGTTTAAAGTCACCC

Bd21IF1Promotor ATGGGCGAAGATCGCCCTAGTTGTCGTTTTTCCTTTTAGAAAATCCAAAGTCCAGCATGA
 Bd21-3IF1promotor ATGGGCGAAGATCGCCCTAGTTGTCGTTTTTCCTTTTAGAAAATCCAAAGTCCAGCATGA

Bd21IF1Promotor AGCCCAATTGGCAGGAGTAGCAGCGTGTAGTACAATTTACTACTCCATACTCGAGACCA
 Bd21-3IF1promotor AGCCCAATTGGCAGGAGTAGCAGCGTGTAGTACAATTTACTACTCCATACTCGAGACCA

Bd21IF1Promotor AGCCCAACGGATTAATATCCAAATCCCAAAGAAAAGACAAGAAAAGGGCTTGCCAAAC
 Bd21-3IF1promotor AGCCCAACGGATTAATATCCAAATCCCAAAGAAAAGACAAGAAAAGGGCTTGCCAAAC

Bd21IF1Promotor TTGTCTTACAAAATTGGCAACCTATGATATTTTGTTTTGGTTGGTGGCCAAA
 Bd21-3IF1promotor TTGTCTTACAAAATTGGCAACCTATGATATTTTGTTTTGGTTGGTGGCCAAA

Bd21IF1Promotor ATTTTGGTTTTCAAATGAATGTTGCTGACTTTCTCACTTCTCCTTCATAAACTTTGTCC
 Bd21-3IF1promotor ATTTTGGTTTTCAAATGAATGTTGCTGACTTTCTCACTTCTCCTTCATAAACTTTGTCC

Bd21IF1Promotor ACTTTTGGTTCGACCTTGGACCAACAAATCCTTAACCAATATTTAGCTAGTAAATTAT
 Bd21-3IF1promotor ACTTTTGGTTCGACCTTGGACCAACAAATCCTTAACCAATATTTAGCTAGTAAATTAT
 ** *****

Bd21IF1Promotor GACAAAATTAATAGGTTAAGAACCAACACACCGGAAGGTCCAAATCCAACACCATTTG
 Bd21-3IF1promotor GACAAAATTAATAGGTTAAGAACCAACACACCGGAAGGTCCAAATCCAACACCATTTG

Bd21IF1Promotor GTCATCTCAAGCCCGGTAATGTGACGTGTCGGCAATATACAAGCGGGAAAAGAGAAGA
 Bd21-3IF1promotor GTCATCTCAAGCCCGGTAATGTGACGTGTCGGCAATATACAAGCGGGAAAAGAGAAGA

Bd21IF1Promotor AGAAGCTTCGCGGGTTCTGGAAACCGCTTACTTTCGCTTTATCCTGTAACCTCGAGCTCA

Bd21-3IF1promotor AGAAGCTTCGCGGGTTCT **GAA**ACCCTTACTTTTCGCTTTATCCTGTAAGTTCGAGCTCA

Bd21IF1Promotor TCCTTATCTCC **ATATCAGGAGC**TTCTGGCTGCGCCCAAGGAAAAGAAGGATCTGGGGAC

Bd21-3IF1promotor TCCTTATCTCC **ATATCAGGAGC**TTCTGGCTGCGCCCAAGGAAAAGAAGGATCTGGGGAA

Material suplementario 10. Polimorfismos que coinciden con la secuencia de un probable sitio de unión de factor de transcripción. En verde la secuencia canónica y en rojo el nucleótido que difiere.

Sec. consenso	CpG Island	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
o		without corresponding Families	-33	-	tctGGAAA	0.75	tctCGAAA
x		NAC; NAM	-89	+	aatgtaACGTG	0.9	aatgtgACGTG
x		AP2; ERF	-89	+	aatgtaacgTGTCGgcaatatac	0.87	aatgtgacgTGTCGgcaatatac
o	*	without corresponding Families	-89	-	aatgtAACGT	0.7	aatgtGACGT
x		bHLH; bZIP	-91	+	gtaatgtaACGTGt	0.89	gtaatgtgACGTGt
o		bZIP	-91	+	gtaatgTAACGt	0.81	gtaatgTGACGt
o	*	without corresponding Families	-197	-	ttaaccAAATA	0.91	ttagccAGATA
o		MADF; Trihelix	-197	-	tTAACCaaat	1	tTAGCCagat
o		MADF	-197	+	tTAACCaaat	1	tTAGCCagat
o		C3HZincfinger	-231	-	tccaCTTTTtg	0.97	tccaCTATTtg
o		Dof	-230	-	ccaCTTTTtg	1	ccaCTATTtg
o		Trihelix	-287	-	ttttGGTTTtcaaa	0.96	ttttG-GTTTtcaaa
x		without corresponding Families	-283	-	ggtTTTCA	0.88	g-gtTTTCA
x	*	C2H2	-379	-	aagaaaaGACAAagaaagggc	0.95	aagaaaaGACAAagaaaggc
x	*	Dof	-377	-	gAAAAGacaaagaaagggctt	0.93	gAAAAGacaaagaaagggactt
x	*	Dof	-384	-	cccaaaagAAAAGacaaagaaagggcctg	0.86	cccaaaagAAAAGacaaagaaagggactg

Sec. consenso	CpG Island	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
o	*	MADF; Trihelix	-435	+	caaTTTACta	0.99	caaTTTAAta tTACTAct TACTAat
x	*	C2H2	-431	-	tTACTAct	0.99	
x	*	without corresponding Families	-430	+	TACTAct	0.86	
o	*	GATA	-523	-	cgaaGATCGc	1	cgaaAATCGc
o	*	without corresponding Families	-521	-	aaGATCG	0.86	aaAATCG
o	*	AP2; ERF	-521	-	AAGAT	0.8	AAAAT
x	*	Others	-680	+	TATTGcctccaaa	0.71	TATTGcgtccaaa
o	*	without corresponding Families	-677	+	TGCCT	0.8	TGCGT
x	*	AT-Hook	-682	-	aTTATTgcct	1	aTTATTgcgt
o	*	HD-ZIP	-685	-	tgcaTTATTgcctt	0.93	tgcaTTATTgcgtt
x	*	Myb/SANT	-799	+	tgccgccaccgacACCAAgcg	0.9	tgccgccaccaacACCAAgcg
x	*	Myb/SANT; MYB	-792	-	accgacACCAAgcgggctttg	0.89	accaacACCAAgcgggctttg
o	*	bHLH	-796	-	cgccaCCGACacc	1	cgccaCCAACacc
x	*	without corresponding Families	-794	+	CCACCgacacca	0.75	CCACCaacacca
o	*	AP2	-794	+	ccaCCGACac	0.99	ccaCCAACac
o	*	AP2; ERF	-794	+	ccaCCGACac	1	ccaCCAACac
o	*	B3; ARF	-792	+	acCGACAcc	0.99	acCAACAcc
o	*	ERF	-799	-	tgccgcCACCGacac	1	tgccgcCACCAacac
o	*	AP2; ERF	-862	-	agtGCGGcTc	0.95	agtGTGGcTc
o	*	C3H	-863	-	cagTGC GGcTcctcg	0.92	cagTGTGGcTcctcg
o	*	Alpha-amylase	-860	-	tgCGGCTcctc	0.71	tgTGGCTcctc
o	*	ERF	-860	-	tgCGGCT	0.86	tgTGGCT
o	*	without corresponding Families	-892	-	ctcCCTGG	0.75	ctcCCTTG
o	*	AP2	-932	-	ccaccgtcggCGGCGgccc ca	0.91	ccaccgtcggC---Agcggca
o	*	AP2; ERF	-928	-	cGTCGGcgg	0.99	cGTC---ag

Sec. consenso	CpG Island	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
o	*	LBD	-922	+	CGGCGgcggcagcg	0.97	C---agcggcagcg
x	*	ERF	-925	-	cGGCGGcgggcgggcg	0.93	cGGCGGcggc---agcggcg
x	*	LOB; LBD	-924	-	ggCGGCGgcggcagcgac	0.95	ggCGGCGgc---agcggcgac
x	*	Sox	-926	+	tcGGCGGcgggcggcagcg	0.97	tcGGCGGcggc---agcggcg
x	*	mTERF	-925	-	cGGCGGcgggcgggcg	0.98	cGGCGGcggc---agcggcg
o	*	MYB	-1023	+	gttggTAGGTgccg	0.9	gttggCAGGTgctg
o	*	Myb/SANT; MYB	-1031	+	cgacctccgttgTAGGTgcc	0.96	cgacctccgttgCAGGTgct
x	*	(Others)	-1027	-	ctccGTTGGtaggtgccg	0.88	ctccGTTGGcaggtgctg
o	*	without corresponding Families	-1021	+	TGGTAgttgccgc	0.69	TGGCAgttgctgc
o	*	without corresponding Families	-1128	+	CTGAC	0.8	CCGAC
x	*	ERF	-1136	+	gccctgcccctgacCACCGtc	0.96	gccctgccccgacCACCGtc
x	*	AP2; ERF	-1130	-	ccctgacCACCGtcg	0.95	ccccgacCACCGtcg
x	*	without corresponding Families	-1134	+	CCTGCcctgaccacc	0.75	CCTGCCCCgaccacc
o	*	TCP, Conserved Region	-1138	+	GCGCC	0.75	GCACC
o	*	bZIP	-1225	+	aGACAGcagc	0.97	aGACAAcagc
x	*	Nin-like	-1223	+	acagCAGCAcccgtg	0.99	acaaCAGCAcccgtg
o	*	C2H2	-1356	+	aaCAGCTgca	0.94	aaTAGCTgca
o	*	bZIP	-1357	+	caaCAGCTgc	0.9	caaTAGCTgc
o	*	Bhlh	-1354	+	CAGCTg	1	TAGCTg
x	*	TCP, Conserved Region	-1361	+	TGTCCaac	0.75	TGTCCaat

Sec. consenso	CpG Island	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
o	*	without corresponding Families	-1422	-	ttGATGA	0.86	tgGAAGA
o	*	AP2; ERF	-1422	-	TTGAT	0.8	TGGAA
o	*	without corresponding Families	-1422	+	TTGAT	0.8	TGGAA
x	*	MYB	-1503	-	aaTTAGGa	0.89	atTTAGGa
o	*	without corresponding Families	-1506	-	CTCAA	0.8	CTCAT
o	*	without corresponding Families	-1504	+	CAATT	1	CATTT
x	*	without corresponding Families	-1525	-	tcatGGGCC	0.96	tcatGGGCC
o	*	B3	-1525	-	TCATG	0.8	TCACG
x	*	C3H	-1525	+	tcatgggCCGCAcca	0.91	tcaagggCCGCAcca
o	*	NF-YB; NF-YA; NF-YC	-1523	-	ATGGG	0.8	ACGGG
o	*	without corresponding Families	-1522	+	TGGGCc	1	CGGGCc
x	*	without corresponding Families	-1555	+	GCATAagc	0.83	GCATAacc
x	*	WRKY	-1598	-	agcatcGTCAAcggt	0.94	accatcGTCAAcggt
x	*	bZIP	-1597	+	gcatCGTCAAcggt	0.89	ccatCGTCAAcggt
x	*	bZIP	-1621	-	tcaAGTGT	0.75	tcgAGTGT
x	*	Others	-1620	-	caAGTGT	1	cgAGTGT
x	*	without corresponding Families	-1628	+	GCCACcatca	0.7	GCCACcatcg
o	*	Dof	-1706	-	GCCTT	1	GCTTT
o	*	without corresponding Families	-1705	+	CCTTCttgctctct	0.75	CTTTCttgctctct
o	*	Dof	-1786	-	ctcTCTTTcc	0.98	ctcTGTTTcc

Sec. consenso	CpG Island	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
o	*	without corresponding Families	-1783	-	TCTTT	1	TGTTT
x	*	without corresponding Families	-1816	+	GACACcc-agg	0.7	GACACccagg
x	*	without corresponding Families, conserved region	-1811	+	CCAGG-agc	0.75	CCAGGgagc
o	*	Dof	-1823	+	caAAAGAgac	0.99	caAAAAAgac
x		AP2; B3; RAV	-1896	-	aCAACAcaaaatggcagcaag	0.92	aCAACAcaaaatggcagcgag
x		without corresponding Families	-1979	+	TCCAAaaagga	0.73	TCCAAaaaaga
o		without corresponding Families	-1974	+	AAAGG	1	AAAAG
o		without corresponding Families	-1974	+	AAAGG	0.8	AAAAG
o		Dof	-1977	+	caAAAAGgagg	0.96	caAAAAAgagg
o		NF-YB; NF-YA; NF-YC	-1993	+	CCGAT	0.8	CTGAT
o		without corresponding Families	-1993	-	CCGAT	0.8	CTGAT



CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenoIF1Bd1F

ID: Ñ5056

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: TTTTGTCTCCAACCTGTCGAA

de bases: 22

Tm: 63.8

Nanomoles finales: 23.79

µg/OD: 33.3

PM: 6666.4

µg de Oligo: 158.58

237.9µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

1



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenolF1Bd1R

ID: Ñ5057

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: TTTTGGCGAGTAAAGATGATGGA

de bases: 22

Tm: 63.7

Nanomoles finales: 23.33

µg/OD: 30.2

PM: 6853.6

µg de Oligo: 159.89

233.3µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

2



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenolF1Bd2F

ID: Ñ5058

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: CGCATTGATCTGTTGTGACC

de bases: 20

Tm: 64.7

Nanomoles finales: 23.67

µg/OD: 33.4

PM: 6099

µg de Oligo: 144.37

236.7µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

3



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenolF1Bd2R

ID: Ñ5059

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: GGGCAAGCAGTGATCCATTA

de bases: 20

Tm: 65.3

Nanomoles finales: 24.28

µg/OD: 30.6

PM: 6166.1

µg de Oligo: 149.7

242.8µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

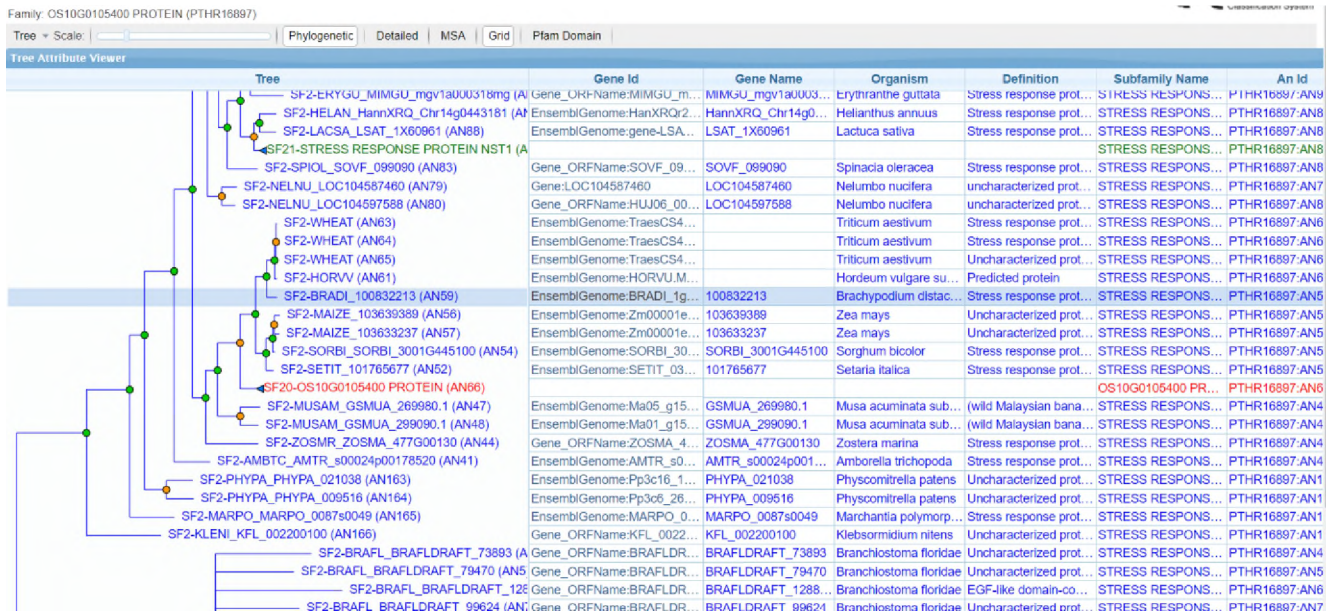
ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

4



www.t4oligo.com

Material suplementario 12. Clasificación de UK7 según sistema PANTHER



Material suplementario 13. Secuencias homólogas de UK7 en especies examinadas.

Número	ID Phytozome	ID Ensemble	Especie	Identidad	Long. Alineamiento
2	Bradi1g68957.1.p	Solo disponible V3.0	<i>B. distachyon</i> v3.2	100	1141
	Bradi3g21440.1.p	-	BD21	76	472
2	BdiBd21-3.1G0929600.1.p	-	<i>B. distachyon</i>	76	472
	BdiBd21-3.3G0298800.1.p	-	Bd21-3 v1.2	76	472
3	Ta4AS_B7069E02A.1	TraesCS4A02G077200.1	<i>T. aestivum</i> v2.2	81	1146
	Ta4BL_98900B7D7.1	TraesCS4B02G233400.1		80	1128
	Ta4DL_0378075D1.1	TraesCS4D02G234500.1		83	449
4	Zm00001d028339_P018	Zm00001eb009880_T002	<i>Z. mays</i>	74	205
	Zm00001d047986_P029	Zm00001eb399270_T006		84	473
	Zm00001d014340_P001	Zm00001eb224410_T003		63	1173
	Zm00001d030217_P004	Zm00001eb025760_T001		40	531
2	Os10g01610.1	Os10t0105400-02	<i>O. sativa</i> v7.0	55	1161
	Os03g12550.1	Os03t0226600-01		64	850
2	At3G58050.1	At3G58050.2	<i>A. thaliana</i> TAIR 10	63	516
	At2G41960.1	At2G41960.2		60	478
2	Al5G39720	Al5G39721	<i>A. lyrata</i> v.2.1	68	487
	Al4G40320	Al4G40321		61	484

Secuencias en formato FASTA

>Bd21.1g68957.1.p

```

MAAEAEAETAVASASGSGIWSRRRDEITFDRLQKFWNDLPLQARQELLKLDKQTLIEQARKNFYCSRCNGLLLENFKS
LQQEVSDIDCLSAVSDSRSRHREQDYSQDPSIHPWGGLATTKDGVLTIGCFVKAKSLRVLQNVFDNARSREREREML
YPDACGGGGRGWISQGMASYSRGYGTRETCALHTAHLSCNTLVNFWFSALCEQTRSSLLRMKEEDFIERLIYRFD SKRF
CRDCRKNVIREFKELKELKRIRREPRCTSWFCIADTAFQCEVFEDAI IIDWHQSLSETNGSYHHFEWAIGTDEGQSDV

```

FGFEDVGMKTQVHRNGIDLQFEDYFITLRAWKLDGRYTELCVKAHALKGQSCVHHRLVVGDGFVTVTKGESIRSLFE
HAEAEEDDEDEAMDRDEHDLGDGSHQPQKHAKSPELAREFLLDAAAVIFKEQVEKAFREGAAQQAQSVFVSLALKL
LEERVHVACKEIITLEKQNKLEEEEEKEKREEQERRMRRRTKEREKKQRRKERLKEKERDKEIKLVEFKSSDNISSST
LSNSSTCTTDEFNGTFGSRDSASEEENNSMVVDMFTADTCTDQSSCREIIGENIVDCCSMVTKRPSVNSSESFTSEHS
KSSRRNLRLRKEVPQDNSSCRYDDDRNEFGSIDNLQAQSTERMRNDARICNSVVFSTNSRTRDRQDYNSCSCNHQEGYR
TEDGCFSPVTVTSGREMKIARKAGVDKLTQYCRVDGTRERNAVQKLVWERTDTPKKTCLHGTNDTSGSVDKADSSKPV
ECDISGCQKLDTGCEPLSQASERPSDVHKSETNQSIEHSEKTSACHDGTMMNKQTCYSRDNGSSSRHDEELTTNSAS
SDGSSSCMTEADRESSSSSMTSLSAHNPESSSSDSEESSERVNNITEAPSTRTASRSLLETGAGNGFREYHPKVRCP
RNDRFGHNVPFQDQLLHHRNMHLPPYSLASVGPVSHSCAAPINGYFQYQPPNFFSSPLGFRVPGNRSDFPFVQYNN
VHRYPAPAFSCIQPEPIHKKSTSFVRMPPPPSYRHGTGQIGSHTHGDLNPDHNSVLKPMGLKDAAQGDSKMQDRSAS
FSLFQFNLPPIAPPAPPLSKDGKSGEIVARTPFAPVQAQPCSRQTDVKEYNLFSTDQTYFHLSR

>Bd21-3.1G0929600.1.p

MAAEAEAEATAVASASGSGIWSRRRDEITFDRLQKFWNDLPLQARQELLKLDKQTLIEQARKNFYCSRCNGLLLENFKS
LQQEVSDIDCLSAVSDSRSRHREQDYSQDPSIHPWGGLATTKDGVLTIGCFVKAKSLRVLQNVFDNARSREREREM
YPDACGGGGRWISQGMASYSRGYGTRETCALHTAHLSCNTLVNFWALCEQTRSLLRMKEEDFIERLIYRFDSKRF
CRDCRKNVIREFKELKELKRIRREPRCTSWFCIADTAFQCEVFEDAIVDWHQSLSETNGSYHHFEWAIGTDEGQSDV
FGFEDVGMKTQVHRNGIDLQFEDYFVTLRAWKLDGRYTELCVKAHALKGQSCVHHRLVVGDGFVTVTKGESIRSLFE
HAEAEEDDEDEAMDRDEHDLGDGSHQPQKHAKSPELAREFLLDAAAVIFKEQVEKAFREGAAQQAQSVFVSLALKL
LEERVHVACKDIITLEKQNKLEEEEEKEKREEQERRMRRRTKEREKKQRRKERLKEKERDKEIKLVEFKSSDNISSST
LSNSSTCTTDEFNGTFGSRDSASEEENNSMVVDMFTADTCTDQSSCREIIGENIVDCCSMVTKRPSVNSSESFTSEHS
KSSRRNLRLRKEVPQDNSSCRDDRNEFGSIDNLQAQSTERMRNDARICNSVVFSTNSRTRDRQDYNSCSCNHQEGYRTE
DGCFSPTVTVTSGREMKIARKAGVDKLTQYCRVDGTRERNAVQKQVWERTDTPKKTCLHGTNDTSGSVDKADSSKPV
ECDISGCQKLDTGCEPLSQASERPSDVHKSETNQSIEHSEKTSACHDGTMMNKQTCYSRDNGSSSRHDEELTTNSASSD
GSSSCMTEADRESSSSSMTSLCAHNPESSSSDSEESSERVNNITEAPSTRTASRSLLETGAGNGFREYHPKVRCP
PRNDRFGHNVPFQDQLLHHRNMHLPPYSLASVGPVSHSCAAPINGYFQYQPPNFFSSPLGFRVPGNRSDFPFVQYNN
VHRYPAPAFSCIQPEPIHKKSTSFVRMPPPPSYRHGTGQIGSHTHGDLNPDHNSVLKPMGLKDAAQGDSKMQDRSAS
FSLFQFNLPPIAPPAPPLSKDGKSGEIVARTPFAPVQAQPCSRQTDVKEYNLFSTDQTYFHLSR*

>TraesCS4A02G077200.1

MAGVAAETAVASASGSGIWSRRRDEITFDRLQKFWNDLPPQARRELLKLDKQTLIEQARKNFYCSRCNGLLLENFKSL
QQEVSDIDCLSSSGESKIRQQNGSQDPSVHPWGGLATTKDGILTIDCFMKANSLRVLQNVFDNARLREREREMLYPD
ACGGGGRWISQGMASYSRGYGTRETCALHTAHLSCNTLVNFWALCEDETRSSLLRMKEDDFIERLMFRFDSKRFCD
CRRNVIREFKELKELKRIRREPRCTSWFCVADYAFQCEVFEDSVIVDWRQSISETDGSYHHFEWAIGTDEGQSDV
FGFEDVGMKTQVHRNGIDLQFEDYFITLRAWKLDGRYTELCVKAHALKGQSCVHHRLVVGDFVTVTKGESIRSLFEHAE
EAEEDDEDDAMERDENDLDGDGSHQPQKHAKSPELAREFLLDAAAVIFKEQVEKAFREGAAQQAQSVFVSLALKLLEE
RVHVACKEIITLEKQNKLEEEEEKEKREEQERRMRRRTKEREKKHRRKERLKEKERDKEKGRDEFKTSDDISSSTLSNS

STCTNDESGNTFGSRAASEEEDNSTAVALCHAEIESSSIEIDGQNNIDCCDTVTKCPPVNSSEPFTSQQSKPSRRNLR
LRKDVPQDHSSCWYDDGRDESRVGNMQWRSMERMRNGDGSCNSVCSTNNRTRYRQDYNSCSCDHQESYKTEDNCFLP
TARAGREMMAKKTGVDKPLVQYRRVGS THERNAIPKQVWERMDTRKKTGLNDTDNMSGSVDNVESPKPVECDTSGCE
KLDGTGREPLDQASERSTDVCKSETDQPYGQREENQSACSDGTPMTNKQKCHSTNNEGSKPDEELMTNSASSDGSSSCM
SEADRESSSSSVTSLSAHTPESSSSDSEESSERVNIITEAPSTRTASRSLFETCAGNGFREYHPKATCPPHNDRFGFS
VLPFQNSHSHQNMHAPPAYSPTTIGPHSHSCAAPTNGYFYQYQPPNFFSGPVGFRVPGNGPADFSVQYNNVHRY PAP
AFSCIHPEQILKTPTSFRVMPPLPPYRHGTAPTGGHPYGGNPNDRLNSMLKPMGPKDAPDGNKLPDKSASFSLFQF
NLPPIAPQGPSPKDGKSGESVARMPPFAPVQAQPCSREQTDVKEYNLFSTDQSGYFPLSR

>TraesCS4B02G233400.1

MAGVAAETAVASASGSGIWSRRRDEITFDRLQKFWNLDLPPQARRELLKLDKQTLIEQARKNFYCSRCNGLLLENFKSL
QQEVSDIDCLSSGESKIRQQNGSQDPSVHPWGGLATTKDGI LTLIDCFMKANSLRVLQNVFDNARLREREREMLYPD
ACGGGGRGWISQGMASYSRGYGTRETCALHTAHLSCNTLVNFWALCDETRSSLLRMKEDDFIERLMFRFDSKRFCRD
CRRNVIREFKELKELKRIRREPRCTSWFCVADYAFQCEVFEDSVIADWRQSISETDGSYHHFEWAIGTDEGQSDVFGF
ENVMKMTQVQRSGIDLQFEDYFITLRAWKLDGRYTEMCVKAHALKGQSCVHHRLVLGDGFVTITKGESIRSLFEHAE
EAEEDDEDAMERDENDFDGDGSHPOKHAKSPELAREFLLDAAAVIFKEQVEKAFREGAAQNAQSVFVSLALKLLEE
RVHVACKEIITLEKQNKLEEEEEKEKREEQERRMRRRTKEREKKHRRKERLKEKERDKGKRDEFKTSDDISSSTLSNS
STCTNDESGNAFGSRAASEEEDNSTAVALCHADIESSCIEIDGQNNIDCCDTVTKCPPVNSSEPFTSQQSKPSRRNLR
LRKDVPQDNSSCWYDDGRDESRVGNLQWRSMERMRNGDGSCNSVCSTNNRTRYRQDYNSCSCDHQENYKTEDNCFLP
TARAGREMMAKKTGVDKPLVQYRRVGS THERNAIPKQVWERMDTRKKTGLNGTDNMSGSVANVESPKPVECDTSGCE
KLDGTGREPLGQASERSTDVCKSETDQPYGQREESQSACSDGTPMTNKQKCHSTNNEGSKPDEELMTNSASSDGSSSCM
SEADRESSSSSVTSLSAHTPESSSSDSEESSERVNIITEAPSTRTASRSLFETCAGNGFREYHPKATCPPQNDRF GFS
VLPFQNSHSHQNMHAPPAYSPTTIGPHSHSCAAPTNGYFYQYQPTNFFSGPVGFRVPGNGPADFSVQYNNVHRY PAP
AFSCIHPEQILKTPASFRVMPPLPPYRHGTAPTGGHPYGGNPNDRLNSMLKPMGPKDAPDGNKLPDKSASFSLFQF
NLPPIAPQGPSPKDGKSGESAARMPPFAPVQVQPCSREQTDVKEYNLFSTDQSGYFPLSR

>Zm00001eb009880_T002

MPGVASAAGSGIWSRRRDEITFDRLQKFWDLDLPPQARQELLKLDKQTLIEQARKNFYCSKCNGLLLESFAKIVIIYGKS
LQQEASDICRLRTAIESRVTQGEQDGAQDPSIHPWGGLSTTKDGFLTLDCFIKAESLCVLQNVFDNARAREREREMY
PDACGAGGRGWISQGMANYRGHGIREMCALHTAHLSCDTLVDFWALGEETRSSLRMKEEDFIEKLMYRFDSKRFCR
ECRRNVIREFKELKELKMRREPHCTSWFCVADTAFAQCEVFEDAVIVDWRQCLSEPDES YDHFWEAIGTDEGESDIFG
FENVGMNAQVHRNGIDLQFEDYFITLRAWRLDGQFTELCVKAHALKGQSCVHHRLVVGDGFVTMTKGESIRSF FEHA
EAEEDDEDDDMDRDGNDFDGDGAHPQKHAKSPELAREFLLDAAAVIFKEQNKLEEEEEKEKREEQERRLKRRTRE
KKNRRKERLKEKENNKGKLVESKSRNDILSSAPSNSTTSINDYSTNTLDSRDSVKEDEDSAEVVNLCSPDSCMNQSS
CTKINGENSVHFNAVTEFSPMDSSDLCTSDQSKSRRRGRPSREDFPDQDQSCWYDDCGDESGRIGELQWKSRRERTRSIN
RSRNAASTSNNRTRERQSYNSCSCGHLEDYGVMDSCFLPTARSGKETKIARKSGVEKPRVQYHRCYTLDSFIVSKGNR
AGSTQKNAIPKQIWEPMDARRKTKLHNTVHDSGSVNDVDSLKHVVFDNMSGSQNFVGCESQPQASESSRDECNSDQPC
ANGGRNQTI SCASSTLMVNQQNCCAGNDEGSRHDEELMNSAGSDSSSSCMSEGDRSSSSSTTSSSAQNPESSSESE
ESPERINSTVGTQSSRAAASRSLLEACAGNGFREYQPKATGLAHNDMFGYNVSPVQDQLLHYQSMYPPQHRPITMGFH

DGSWAAPTNGNFQYARPSHLYSSPLVFGIPGNHFIDYPYMAPAFSHIPPEPIHKAASSFRAMPLSLPFQNGHRQAASL
TQRDMNLERRPAKLTKPTGKDPENKNKSGLKDLPEDKSKSWDADASFSLFQFNLP IASPVTPSSKDKSGELAARTPL
AQVQAQLCSREQADVKEYSLFSSKDNIGIFSFM

>Zm00001eb399270_T006

MPGVASAAGSGIWSRRRDEITFDRLQKFWNDLLPQARQELLKLDKQTLIEQARKNFYCSRCNGLLLESFAQIVIIYGKS
LQQEASDIGHLRTAIELRITHGEQDGAQDPSIHPWGGLSTTKDGFLTLLDCFIKAKSLRVLQNVFDNARAREREREML
YPDACGAGGRGWISQGMANYRGHGIREMCALHTAHLSC TTLVDFWSALGEGTRSSLLRMKEEDFIEKLMYRFDSKRFC
RECRNVIREFKDLKELKRMQREPRCTSWFCVADTAFKCEVFEDAVVIDWHQCLSEPDES YDHFWEAIGTDEGESDIF
GFENVGMNAQVHRNGIDLQFEDYFITLRAWRLDGQCTELCVKAHALKGQSCAHHRLVVGDFVTMTKGESIRNFFE
HEHEHEHEDEDDAMDRDGNDFDGD DAHSQKHAKSPELAREFLLDAAAVIFKEQIEKAFREGTAQQNARSVFTLALKLL
EQRVHVACKEIITLEKQLNLLQNKLEEEEEKEKREEHERGMKRRTREREREKKNRRKERLKEKDHSKGRKLVESKSPDNI
SSSAPSNSTASINDYSTNTLDSRDSGTEEEYS AEGVNLCTPDSCVNQSSCKKINGENSVHCNAVTEFSPMDNSDIST
DQPKSLRRSPRSRDYFPQDQSCWYDDCGDESGRIGELRWKSREKTRGTDRSCNTASTSNNKTRERHSYNFCSCGHPED
YGVMDSCFLPTVRSVREMKIARKSGVEKPKVQYNRCYTLDSFIVPKGNHAGCTQKNAIPKQVWEPMDARRKTNLHNTV
HDSGSINDVDPLKHVFDNSGSHKFSVRCE SQPQASESSRDVCNSDQRCANGGRNQTTSCASTLMVNKQNCYSENDEG
SRHDVELMTNSASSDSTSSCMSQGDRESSSSSTSSSAQNPESSSESEESPERINSTVGT PSSRAASRSLLEACAGNG
FREYQPKTTRPAHNDMFGYNVSPVQDQLLHYQITHPPQQPPI TMGFHDRSWAAPTNGNFHHI PPEPIHKAAGSFRAVP
LSLFPQNGHRQVAEHTQRDMNLERHPSKLTMLTGKDPEDKNKSGLKLYLPEDKNKSWEADASFSLFQFNLP IASPVTP
SSKDKSGKLAARTPLVEVQPQLCLREQADVQYNLFSSKDNIGIFSFM

>Os10t0105400

MPPPMLADAAAAAPCSSSSCSSNSSSSSSSSSAIWSRRRDEITFDRLDKFWSALSPQARHELLRIDKQTLIEHARRNLY
CSRCNGLLLESFTQMVMHGKLLQKQKPGVVQDDSWGGLSTTKDGLLTLDCFIINTNSLHVLQNI FDNARAREREREML
YPDACGGGERGWISPVIANYGRGHGTRDTCALHTARLSCDALVGYWFDLCEETRSSLRMREEDFIERLMHRFDSKRF
CRDCRRNVIREFKELKELKRLRREHHCTSWFCITDTAFRCEVFEDAVLVDCRQSFLDQDKSYNRF EFVAVGTEK GKSDI
LGFEAVGMNGQVHRKGLDLQFEDYFVTLRAHYADNKNTDFYVKAHALKGQSCVHRRLIVGDGFVTITKGESIQSFFE
HAEHEHEHEDEDDAMDRDGNDDVDGVHPQKHAKSPELAREFLLDAAAVIFKEQVEKSLREATAQQNAHSV FVSLALKL
LEERVHVACKEIITLEKQTKLEEEEEKEKREEEERRRRTKEREKLRKERLKEKEKEKEKIPVQLKPYIGTSSSP
LSNSATPINDQSPDIAHSKYSASDDEDKDSIVVTESFSPDTCVDQSLTRES DGQSNEFH CSTTLEFIPSDCNGSFMCE
QSTSSRRKLRFRDSLQEQTTGFWYEDCQDDTG VGNIHWQSRERARNAGRCNSLFSANNRTRERYEYNACSCGQQE
DYGYSPTARSSREMKMSRKT MVEK PWLQYRRCYPLDSFIVSKGSRVGSTPNKNAAPKQVWEPMDARKKASLGSSNGS
SETVSGVDRSNQVGC SKDIVNCSQILGSEHEELAEA

>TraesCS4D02G234500.1

MAGVAAETAVASASGSGIWSRRRDEITFDRLQKFWNDLPPQARRELLKLDKQTLIEQARKNFYCSRCNGLLLENFKSL
QQEVSDIDCLSSSGESKIRQQNGSQDPSVHPWGGLATTKDGILTLIDCFMKANSLRVLQNVFDNARLREREREMLYPD
ACGGGGRGWISQGMASYSRGYGTRETCALHTAHLSCNTLVNFWSALCDETRSSLLRMKEDDFIERLMFRFDSKRFCRD
CRRNVIREFKELKELKRIRREPRCTSWFCVADYAFQCEVFEDSVIVDWRQSISETDGSYHHFEWAIGTDEGQSDVFGF

ENVGMKTQVQRSGIDLQFEDYFITLRAWKLDGRYTEMCVKAHALKGQSCVHRLVLDGDFVTITKGESIRSLFEHAE
EAEEDDEDAMERDENDLDGDGSHQKHAKEPELAREFLLDAAAVIFKEQVEKAFREGAAQQAQSVFVSLALKLLEE
RVHVACKEIITLEKQNKLEEEEEEKREEQERRMRRRTKEREKKHRRKERLKEKERDKGKRDEFKTSDDISSSTLSNS
STCTNDESGNTFGSRAASEEEDNSTAVALCHAEIESSCIEIDGQNNIDCCDVTVKCPPVNSSEPFTSQQSKPSRRNLR
LRKDVDPQDHSSCWYDDGRDESRSVGNLQWRSMERMNRNGDGCNSVCSTNNRTRYRQDYNCSQCDHQESYKTEDNCFLP
TARAGREMMAKKTGVDKPLVQYRRVGSYERNALPKQVWERTDTRKKTGLNDTDNMSGSVDNVESPKPVECDTSGCE
KLDTGCEPLGQASESSTDVCKSETDQSYGQREENQSACSDGTPMTNKQICHSTNNEGSKPDEELMTNSASSDGSSSCM
SEADRESSSSSVTSLSAHTPESSSSDSEESSERVNIITEAPSTRTASRSLFETCAGNGFREYHPKATCPPHKDRFGFS
VLPFQONQSSHQONMHAPPAYSPTTIGPHSHSCGAPTNGYFQYQPPNFFSGPVGFRVPGNGPADFSVQYNNVHRYAP
AFSCIHPEQILKTPASFRVMPPPLPPYRHGTAPTGGHPYGLNPDRLNSMLKLMGPKDAPDGNKLPDKSASFSLFQF
NLPPIAPQGPSPKDGKSGDSVGRMPPPIAPVQAQPCSREQTVDVKEYNLFSTDQSGYFPLSR

>Zm00001eb224410_T003

MVAEAPFSSSAIWSCHRDEITFDRLHKFWSALSPHARHELLRLDKQTLIEHARKNLYCSRCNGLLLESFTQIVMYGK
SLLHEGSCEPRIQEVEAEVQEPSVHPWGGLSTTKDGILTLDDCFINAKSLHVIQNVFDNARAREREREMLYPDACGGG
GRGWISPVIPNYGRGHGTRDTCALHTAHLSCDTLVDFWSALGEETRSSLRMKEEDFIERLMHRFDSKRFCRDCRRNV
IREFKELKELKMRREPRCTSWFCVADTTFKCEVFEDAILVDWHQSLLEQDGIYHHFEWAIGTDEGKSDILNFENVGM
NGQVHRKGLDLDFEDYFVTLRAWRLDGRCTEFCVKAHALKGQSCVHRRLIVGDGDFVTITKGESIRSFEEYAEAEAE
DEDDVDRDSDNDPDGDI AHPQKHAKEPELAREFLLDAAAVIFKEQIEKAFREGTARQNAHSVSVLALKLLEERVHVA
CKEITLEKQTKLLEEEEEEKREEEERRRRTKEREKKNRKERLKGKDRDKEKTLVRSKPKDLSPFSLCSQATPSN
NESQDVLDLRYSDSEEDNVVVGEHYPDSSADQSSSKSDSERSNGHECSVTIEFVPSDCDSSFLCDEPKSSRNLRFR
DFPEEKDASYWHEGCCDDSGDTQWQSRERTRNTRNYSVFNNTNTRDRYNPCSCSHQEDYRYFTTATRSSRET
RKTVAEKPRQLQYRRCPYPPDSFAVSNNGRGGTTPKNKNGPKQVWEPMDARKKTGNNSATGAADGSDQVECSNNI
SECEKLEAVCDSLVEICSEISAETCKSDTDQPWRQGEKNQSACSDSKCVDKPNCSKDTGRTTNLTTSDDSSCL
SEGDRDSSMTSLSVQNVESSSASDSEESSDRNNSSPGDI PAKNVSRTLLEMCAGNGFREYQPKGLNPPNGNQFGFMV
APSQEOMLYQQKVHAPPYSSPFMGFHNHPLAVPTNGYLPYTQPGHFYPASMTFVGYGVAGDQCVDFSMQYRNNI
HPYSGPEFGFLPSQPVHKTSVNFHAVPVTPLTPLCSRGMVATNQERQOSPALFPKPKQAVLVPETVCAGDNTFKQK
GDDVDSTPFSLFQFNLPPIAPPTLATS KERSGELAPAQIARVQPCSREETNVKEYNIFSGCDGVMFQLN

>Bd21.3g21440.2.p

MPGMVADAPPSSCPAPSSSSSAIWSRRRDEITFDRLRKFVNALSPQGRHALLRIDKQTLIEHARKNLYCSRCNGLLLE
SFTQIVIYGKSLHQESSGEPRVLEIEPHDVQDPSVHPWGGLSTTKDGILTLDDCFINAKSLHVLQNVFDNARARERER
EMLYPDACGGEGRGWISPAIANYGRGHGTRDTCALHTARLSCDTLVDFWSALGDEARSSLLRMKEEDFIERLMHRFDS
KRFCRDCRKNVIREFKELKELKRLRREPRCTSWFCVADTAFHCEVFEDAVLVDWHQDFLEQDQAYHHFELGVGTDEGK
ADILEFEDVGMNGQVHKKGLDLQYEDYFVTLRAWRLDGRCTEFCVKAHALKGQSCVHRRLIVGDGDFVTITKGESVRS
FFEYAEAEAEEDDEDAMDRDGNPDSDGAHPQKHAKEPELAREFLLDAAATVIFKEQVEKAFREGTARQNAHSVSVLA
LKLLEERIHVACKEIITLEKQVPIMYCKCRNRMGLFGTIFSYLICIKFELLILQTKLLEEEEEEKREEEERRR
AKEREKKLRRKERLKEKGRDKEEMPVQSKSSGDVTPGHQSPDILDSRYASDEEGNVVAEQFSRDTADQSLSTEA
DEQSNQCSTTAEFVPADCSDFSICEQSKSRRKPRFTRDSPQEKATSCWYEDRRDSEDIGDIHCQSRERTRNTSRGC

NSAFSINSRTRDRYEYNPCSCGHQEDYRYFPSARSSRDVKMPRKTLVEKPRLQYRRCYPVDSFVVPKGSRVGII PNKN
TGPKQVWPEMDARKKASLGNAHDAFETVDNTGRSDQVGC SKDINECEKLG TGGEPLAEVCS DRSEEACKSDTDQPGDR
EDKTQAACNDEPAVVNKPDSCLKKGASQMAKLTTSDSSSCLSEGDRDSSMSSMTSLSAQNAESSSSTS DSEESSERNN
SSPGDPPAKNASRSLLEMCAGNGFREYQPKSMHPPGSNQFGLGMAPFQDHVLHHHKVQTPPYSSSTFVGFHSHHLSVPT
SGYLPYPQPGTFYPSVPGYSVTGNQCVDFPMQYSNNIHPYSGPPEFRYI PAPPINKTMLTFSAMPPTPLCINGRPMVM
NPD MQHHHTL PPESELVVAQNGCHTL PPESELVVVQNGCHTL PPESELVVAQNGCSENNFKPPDDSTPFSLFQFNLP I
APPASAPSKDVQPDGGAMAAMTKPPMAQNQPC SREETDVKEYNLFSGCERTISISSFM

>Bd21-3.3G0298800.1.p

MPGMVADAPPSSCPAPSSSSSAIWSRRRDEITFDRLRKFWNALSPOGRHALLRIDKQTLIEHARKNLYCSRCNGLLLE
SFTQIVIIYGKSLHQESSGEPVLEIEPHDVQDPSVHPWGGLSTTKDGILTLLDCFINAKSLHVLQNVFDNARARERER
EMLYPDACGGEGRGWISPAIANYGRGHGTRDTCALHTARLSCDTLVDFWSALGDEARSLLRMKEEDFIERLMHRFDS
KRFCRDCRKNVIREFKELKELKRLRREPRCTSWFCVADTA FHCEVFEDAVLVDWHQDFLEQDGAYHHFELGVGTDEGK
ADILEFEDVGMNGQVHKKGLDLQYEDYFVTLRAWRLDGRCTEFCVKAHALKGQSCVHRRLIVGDGFVTITKGESVRS
FFEYAEAEAEEDDDAMDRDGNPDSDGAHPQKHAKSPELAREFL LDAATVIFKEQVEKAFREGTARQNAHSV FVSLA
LKLLEERIHVACKEIITLEKQTKLLEEEKEKREEEERRRRRAKEREKLRKERLKEKGRDKEEMPVQSKSSGDVT
PGHCQSPDILDSRYASDEEGNVVVAEQFSRDTSADQSLSTEADQSNQCSTTAEFVPADCSDS FICEQSKSRRKPR
FTRDSPQEKATSCWYEDRRDSEDI GDIHCQSRERTRNTSRGCNSAFSINSRTRDRYEYNPCSCGHQEDYRYFPSARS
SRDVKMPRKTLVEKPRLQYRRCYPVDSFVVPKGSRVGII PNKN TGPKQVWPEMDARKKASLGNAHDAFETVDNTGRSD
QVGC SKDINECEKLG TGGEPLAEVCS DRSEEACKSDTDQPGDREDKTQAACNDEPAVVNKPDSCLKKGASQMAKLTT S
DSSSCLSEGDRDSSMSSMTSLSAQNAESSSSTS DSEESSERNNSSPGDPPAKNASRSLLEMCAGNGFREYQPKSMHPP
GSNQFGLGMAPFQDHVLHHHKVQTPPYSSSTFVGFHSHHLSVPTSGYLPYPQPGTFYPSVPGYSVTGNQCVDFPMQYSN
NIHPYSGPPEFRYI PAPPINKTMLTFSAMPPTPLCINGRPMVMNPD MQHHHTL PPESELVVAQNGCHTL PPESELVVV
QNGCHTL PPESELVVAQNGCSENNFKPPDDSTPFSLFQFNLP IAPPASAPSKDVQPDGGAMAAMTKPPMAQNQPC SRE
ETDVKEYNLFSGCERTISISSFM

>Zm00001eb025760_T001

MVAEAPSSSAAIWSLRRDEITFDRLHKFWSALSSRARYELLRLDKQTLIEHARKNLYCSRCNGLLLESFTQIMMYGK
SLHHEGSCEPRIQEVEAEVQDPSVHPWGGLSTTKDGILTLLDCFINAKSLHEIQNVFDNARAREREREMLYPDACGGG
GRGWISPVMPNYGRGHGTRDTCALHTAHLSCDTLVDFWSALGDETRSSLLRMKEEDFIERLMHRFDSKRFCRDCRRNV
IREFKELKELKRMREPRCTSWFCVADTTFNCEVFEDAILVDWHQSLLEQDGIYHHFEWAIGTDEGKSDILNFENVGM
IGQVHRKGLDLQFEDYFVTLRACRLDGRRTFCVKAHALKGQSCVHRRLIVGDGFVTITKGESIRSF FEHAEAEAEAE
DEDDVVDRDSNDPDGDI AHPQKHAKSPELAREFLDAAAVIFKEQVEKAFREGTARQNAHSV FVSLALKLLEERVHVA
CKEIIITLEKQTKLLEEEKEKREEEERRRRRTKEREKKNRRKERLKGKDKDKEKILVRSKPKPLSTFSPSSQAAPSS
NESQDVLDLRYSDSEEDNVVVREHYPDSSADQSSSKDTER SNEHECSATAEFVPSDCDGSFLCDESNSRNLRFWR
DFPEKDVSYWYEDCRVDSGDTQLQSRERIRNNTRSYNTVFNTNRRTRDKYNPCSCGHQEDFRYFSTATRSSRET KISR
KTVAEKPRLQYRRCYPPE SFAVSNR VGGTPNKNTGPKQVWPEMDARKKIGNGRGSEITPETTGAADGSDQVECSKDI
SECEKLEVVCETLAETCEISAEACKSDQPCRQGEKNQSACSDGSKCVDPNCCLTKD TVRTTNTLSSDSF SCLSEGDR
DSSMSSMTSLSAQNVESSTSDSDEYS DRNDSSPGDPPVKNVSRSLLEMCAGNGFREYQPKGLNPPNGNQFGFMVAP

LQDQMLHQQKIHAPPYSSPFVGFHNHPLAVPTNGYLPYPQPGHFYPGLMTPVGCVAGSQCVDFPMQYSNNIHPYSGP
EFGFLPAKPVHKTPVSVFHAVVPPPLAPLCRSEVPVVINQERQQGSAPPKFKQAVLVPENGCSAEDNTFKQKGDSTDST
PFSLFQFNLP IAPPTLATSKEEQSGAMPSPALPPAQITRAQLCSREETNVKEYNLFSGCNGVMFQLN

>At3G58050.1

MPGLAQRNNDQYSFGFWSKEIDGVSYNQLQKFWSELSPKARQELLKIDKQTLFEQARKNMYCSRCNGLLLEGLQIVM
HGKSLHPEGLNSPCNKSGGSKYQYDCNAVVSNGCADEMQDPSVHPWGGLTTTRDGLTLLDCYLYAKSLKGLQNVF
DSAPARERERELLYPDACGGGGRGWISQGIASFGRGHGTRETCALHTARLSCDTLVDFWSALSEDTRQSLLRMKEEDF
MERLRYRICYHSSYHILNCKMNRHFVVWTIQDVLTKFDSKRFCRDCRRNVIREFKELKELKRMREPRCTTWFCVANT
TFQYEVSIDSVKADWRETFSENAGKYHHFEWAIGSGEGKCDILKFENVGMNGRVQVNGLNLRGLNSCYITL RAYKLDG
RWSEVSAKAHALKGQNCVHGRLVVGDFVSIKRGESIRRFEEHAEAEAEAEDEDMMDKDGNELDGECSRPOKHAKSPE
LAREFLLEDAATVIFKEQVEKAFREGTARQNAHSIFVCLTLKLLLEQHLHVACKEIITLEKQVKLLEEEEEEKEREERK
EKRSKEREKLRKKEKRLKEKDKGKEKKNPECSKDKMLLNSREEEDLPNLYDETNNTINSEESIETGYADLSPPGS
PDVQERQCLDGCPSPRAENHYCDRPRDIKDLEDENVYFTNDHQKPVHQNARYWKEVQSDNALRWSDKRRYSDNASFV
SRSEARYRNRLEVP SRGFNGSNRQLRVNASKTGGLNGIKSHEKFQCCDNRI SERFD FSSCSCKPSCEYRAKVEPKTA
GSRSTREPKTISNSDSALDASKPVFQGNRYTQPDYTRERLRLKSKVGVGNPSTTRDSLHKSQVWEPMEPKKYPRSNSY
SEVTVRCSTFKAEIEIDAIVAENSSDLLSQCKVTEKLDNIKLDENSMESGETKNGWHLKDPMSSTSSSDNCSSCLS
EGESNTVSSNNGNTESSTSDSEDASQQSEGRESIVVGTQNDILIPDTTGKSKI PETPIVVGTGNMNDNNSNNMVHGL
VDVQPQGGMFPHLLTQNLQYPVFQTASPMGYFHQAPPVSWPTGPANGLIPFHPNPYLYTGPLGYSMNGDPPCLQYG
SPLNHAATPFFNPGVPVVFHFPFSKTNTEQQAQNL EPPLELNCLAPPETQTVNEDSFLFHFGSPVGLSTGSKSKPAHS
KDGILRDVVGN IYTKAKESKEVEEYNLFATGNGLRFSLF

>At2G41960.1

MNKYKCKTMPGLTTHMNEHYSSSGFWSEDDGLTYDQLDQFWSELSSKARHELLRIDKQTLFEQARKNMCCSRCLGLL
LEGFAQILSAGRAAYEKMMGPSKDNCKSNNGTRKCTVAYQSPVHRWGGLTTTRSGCITLLDCFLTAKTFKGLQNVFE
SNRARERERELLYPDACGGGGRVWLSQGIAGFGKGHGTRETCNLHTTRLSCDTLVDFWSALEEHSRQSLLRMKEEDFV
ERLTYRFDCKKFCRDCRRNVIREFKELKELKRIQRDPRCTDWFCVADTAFQYEVDIDSVRADWSQYFTENAGYHHFEW
AIGTGEESDILEFKYVGNDRSARVNGLDLRLGHECYITLRAFKKNGRPSSEISVKAHALRGQQCVHSRLVVGDFVSI
KRGECIRMFFEHAEAEAEAEDEVLI DKDGNELDGECLRPQKHAKSPELAREFLLEDAATVIFKEQVEKAFRDGTARQNA
HSIFVCLSELLEQRVHIACKEIVTLEKQNKLLLEEEEEEKEREERKERKRIKEREKLRKERLKEKEREKEQKNPK
FSDKAILPIMSREEEGSRNLDEDTNNTIRCEESGIENGVDLSSPGSPDDQDEECLDGCISPRVETHSCDSTDKEIID
HEDENGCFTRPAHK TARLWKEVQTDHSLRLSEKRRFTEKTSFVSSSEAGYCNDRLMSSGHFNNGSDKNVRVKASKAG
GSPNSSRSHEEFQSDGRGTGERYDYHSCCKPINGYREKVESNTSATRGMREP KSVFKSDSDLVSKLNRRANRYTQSG
YRREIRSKMNSRNACKMDPVNVRKVLDSVEPKHSRNSSTSDVLSLTTYKAEIKDVSPTVKPAGTPSLCKATDKLGN
GSFNNSTEVDKMEVHITLKNDYLYSKDPMMSRSSSSNNGNIESSMSDSEVASQQSEGRENLVDTQNDMPDCHEKMV
EKVTEMSMDERDVLKIKNISNL PADNGESKLSGTPFMVPSQNMENMVPGLNTGSYLSQPQNMILPQMLNQS IPLPVFQ
APSTMGYYHQAPVSWSSASTNGLMQFPHPNHYVYTGPLGYSLNGESPLCMQYGTPLNHSAAFFNSGPVPIFHPFAET
NTMNTVDQAQPLEPLEHSFLKEANERRFNEMPLMETPRKRCPQTDSDENFSLFHFGGPVALSTGSKANPARSKDGILE
DFSLQFSGDHVFGDPTGNSKKEKENTVGE EYNLFATSNSLRFSIF

>A15G39720

MPGLAQRNDQYSFGFWSKEIDGVSYNQLQKFWSELSPKARQELLKIDKQTLFEQARKNMYCSRCNGLLLEGFLQIVMH
GKSLHPEGSIGTSPCNKSGGSKYQNDCNLVVSNCGSDEMOPSVHPWGGLTTTRDGSLLTLLDCYLYAKSLKGLQNVFD
SAPARERERELLYPDACGGGGRGWISQGMASYGRGHGTRETCALHTARLSCDTLVDFWSALSEETRQSLLRMKEEDFM
ERLRYRFDKRFCDRCRRNVIREFKELKELKMRREPRCTTWFCVADTAFQYEVSIDSVKADWRETFSENAGMYHHFE
WAIGTGEGKCDILKFENVGMNGRVQVNGLNLRGLNSCYITLRAYKLDGRWSEVSVKAHALKGQNCVHGRLVVGDFVVS
IKRGENIRRFEEHAEAEAEEDMMDKDGNELDGEC SRPQKHAKSPELAREFL LDAATVIFKEQVEKAFREGTARQN
AHSIFVCLTLKLEQRVHVACKEIITLEKQVKLLEEEKEKREEEERKEKKRSKEREKKLRRKERLKEKEKKEKKNP
ESSDKMMLNLSREEEDLPNLDDETNNTINCEESEIETGDADLSPPGSPDVQERQCLDGCPSPRAENHYCHRPDREFT
NLEDENGYFTNDHQKTVHQNARYWKEVQSDNALRWSDKRRYSDNASFVSRSEARYRNRDRLEVPVSRGFNGSNRQLRVKA
SKTGGLNGIKSHEKFQCCDNRI SERFDNFSCSCKPSGEYQAKLEPNI SATRSMREP KTVSNSDSAPDASKPVFRGNRY
TQTDYNRELRLKSKVGVGNPSTTRDSLHKSQVWEPMEPKKYPRSNSESQVTVRCSTFKAEIEIEDTIVAENSSDLLSQ
CKATEKLDNIKLIDNNSMESGETKNGWHLKDPMMSSTSSSDNCSSCLSEGESNTVSSNNGNTESSSTSDSEDASQQSE
GRESIVVGTQNDILIPDTTGKSEIPETPIVVVTGNNSDNNSNNMAHGVDGQPQGGMFPHLLNQNLOFPVFQ TASPMS
YFHQAPSVSWPMAPANGLIPFAHPNPYLYTGPLGYSMNGDSPLCLQYGNPLNHAATPFFNPGVPVVFHSYSKTNTEDQ
AQNLPPHELNGLAPPETQTVSEDSFSLFHFSGPVGLSTGSKSKPAHSGDGLRDPVGNNDTKAKESKEVEEYNLFAT
SNGLRFSLF

>A14G40320

MPGLTHMNEHYSSSGFWEDEDDGVTYDQLEEFWSELSPKARQELLRIDKQALFEQARKNMCCSRCLGLLLEGFVQIV
STGRAAYEKRFPCNKSGASKDQINGKSVGTRKCTVAYQSPA IHRWGGLTTTRDGCLTLLDCFLNAKTFKGLQTVFESA
RARERERELLYPDACGGGGRVWLSQGIAGFGKGHGTRETCALHTTRLSCDTLVDFWSALEEQSRQSLLRMKEEDFVER
LTYRFDCKKFCRDCRRNVIREFKELKELKMRQREPRCTDWFCVADTAFQYEVDIDSVRADWSQYFTENAGYHQFELAI
GTGEGESDIREFKYVGNDRSAQVNGLDLRLGLHECYITLRAFKKNGRSSEISVKAHALRGQQCVHSRLVVGDFVVS IKR
GECIRMFFEHAEAEAEEDVMIDKDGNELDGEC LRPQKHAKSPELAREFL LDAATVIFKEQVEKAFRDGTARQNAHS
IFVCLSSKLEQRVHIACKEIVTLEKQNKLEEEKEKREEEERKERKRIKEREKKLRRKERLKEKEREKEQKNPKFS
DEAILPNMSRKEECSPNLDEENNTIRCEESEIENGNDLSSPGSPDDQDEECLDGYAS PRAETHSCDSTDREIIDHE
DENGCFTHENPRPAHQ TARLWKEVQTDHALRWSEKRRFTENASSVSSAEAGYCNDRLEMP SRHFNGSEKNLRVKALKT
GGSPDSIRSHEEFQCSDDRTGERYDHHS CSFKPMNGFRENVESNLSATRGMREP KSES DLVSKLNRANRYNQSGYRR
EIRSKMNSRNACKMDPVNARKVLDSVELKHPRNSSNSDVSSLTCTSTYKAEIEEDVSP TVKSACTLSLCKATDKLGNG
NLNNSTEVDKMEVHITLKN DYLYSKDPMMSRTSSSDNCSSCPSEGDSNTASSNNGNIESSSLSDSEDSSQQSEGRENL
VDMPDCHEKMVEKVTEMRMDERDVLRIKNMSNLPADNGESKLSGTFPMVPSQNMENMVPVGVNTGSYLSQPQNMFPQM
LNQSIPLPVFQAPSTMGYHQA PVSWSSAPANGLMQFPHPNHYVYTGPLGYSLNGESPLCVQYGTPLSHSAAPFFNSG
AVPVFHPYAETTTMNTVDQAQALEPLEHSFLKEANERKLNEMPPMETPRRGGLQHDS DENFSLFHFGGPVALSTGSKS
NPARSKDGI LGDFSLQFSGDHVFGDPTGNSKKDKENTVGE EYNLFATSNLSRFSIF

>TRITD_4Av1G028480

MAGVAAETAVASASGSGIWSRRRDEITFDRLQKFWNDLPPQARRELLKLDKQTLIEQARKNFYCSRCNGLLLENFKSL
QQEVSDIDCLSSSGESKIRQQNGSQDPSVHPWGGLATTKDGILTLIDCFMKANSLRVLQNVFDNARLREREREMLYPD
ACGGGGRGWISQGMASYSRGYGTRETCALHTAHLSCNTLVNFWSALCDETRSSLLRMKEDDFIERLMFRFDSKRFRCD
CRRNVIREFKELKELKRIRREPRCTSWFCVADYAFQCEVFEDSVIVDWRQSISETDGSYHHFEWAIGTDEGQSDVFGF
ENVMGKTQVQVRSIDLDQFEDYFITLRAWKLDGRYTEMCVKAHALKGQSCVHHRLVLDGDFVTITKGESIRSLFEHAE
EAEEDDEDAMERDENDLDGDGSHPOKHAKEPELAREFLLDAAAVIFKEQVEKAFREGAAQQAQSVFVSLALKLLEE
RVHVACKEIITLEKQNKLEEEKEKREEQERRMRRRTKEREKHKRRKERLKEKERDKGKRDEFKTSDDISSSTLSNS
STCTNDESGNTFGSRAASEEEDNSTAVALCHAEIESSSIEIDGQNNIDCCDVTVKCPPVNSSEPFTSQQSKPSRRNLR
LRKDVDPQDHSSCWYDDGRDESRSVGNMQWRSMERMNRNGDGCNSVCSTNNRTRYRQDYNCSCDHQESYKTEDNCF
TARAGREMKMAKKTGVDKPLVQYRRVGSSTHERNAIPKQVWERMDTRKKTGLNDTDNMSGSVDNVESPKPVECDTSGCE
KLDGTGREPLDQASERSTDVCKSETDQPYGQREENQSACSDGTPMTNKQKCHSTNNEGSKPDEELMTNSASSDGS
SEADRESSSSSVTSLSAHTPESSSSDSEESSERVNII TEAPSTRTASRSLFETCAGNGFREYHPKATCPPHNDRFGFS
VLPFQNSHQQNMHAPPAYSPTTIGPHSHSCAAPTNGYFYQYQPPNFFSGPVGFRVPGNPADFSVQYNNVHRY
PAPAFSCIHPEQILKTPSFRVMPPLPPYRHGTAPTGGHPYGGNPDRLNSMLKPMGPKDAPDGNKLPDKSASFSLFQ
NLPIAQGPPSPKDGKSGESVARMPPFAPVQAQPCSREQTDVKEYNLFSTDQSGYFPLSR

>TRITD4Bv1G141230.1

MKLCEFQDNFYDYLNLQFQFWNDLPPQARRELLKLDKQTLIEQARKNFYCSRCNGLLLENFKSLQQEVSDIDCLSSSG
ESKIRQQNGSQDPSVHPWGGLATTKDGILTLIDCFMKANSLRVLQNVFDNARLREREREMLYPDACGGGGRGWISQGM
ASYSRGYGTRETCALHTAHLSCNTLVNFWSALCDETRSSLLRMKEDDFIERLMFRFDSKRFRCD
CRRNVIREFKELKELKRIRREPRCTSWFCVADYAFQCEVFEDSVIADWRQSISETDGSYHHFEWAIGTDEGQSDVFGF
ENVMGKTQVQVRSIDLDQFEDYFITLRAWKLDGRYTEMCVKAHALKGQSCVHHRLVLDGDFVTITKGESIRSLFEHAE
EAEEDDEDAMERDENDLDGDGSHPOKHAKEPELAREFLLDAAAVIFKEQVEKAFREGAAQQAQSVFVSLALKLLEE
RVHVACKEIITLEKQNKLEEEKEKREEQERRMRRRTKEREKHKRRKERLKEKERDKGKRDEFKTSDDISSSTLSNS
STCTNDESGNAFGSRAASEEEDNSTAVALCHADIESSCIEIDGQNNIDCCDVTVKCPPVNSSEPFTSQQSKPSRRNLR
LRKDVDPQDHSSCWYDDGRDESRSVGNLQWRSMERMNRNGDGCNSVCSTNNRTRYRQDYNCSCDHQENYKTEDNCF
LPTARAGREMKMAKKTGVDKPLVQYRRVGSSTHERNAIPKQVWERMDTRKKTGLNGTDNMSGSVANVESPKPVECDT
SGCEKLDGTGREPLDQASERSTDVCKSETDQPYGQREESQSACSDGTPMTNKQKCHSTNNEGSKPDEELMTNSASSD
GSSSCMSEADRESSSSSVTSLSAHTPESSSSDSEESSERVNII TEAPSTRTASRSLFETCAGNGFREYHPKATCPPQ
NDRFGFSVLPFQNSHQQNMHAPPAYSPTTIGPHSHSCAAPTNGYFYQYQPTNFFSGPVGFRVPGNPADFSVQYNNV
HRYPAPAFSCIHPEQILKTPSFRVMPPLPPYRHGTAPTGGHPYGGNPDRLNSMLKPMGPKDAPDGNKLPDKSASF
SLFQNLPIAQGPPSPKDGKSGESAARMPPFAPVQVQPCSREQTDVKEYNLFSTDQSGYFPLSR

>Os03t0226600-01

MRRRTKEREKHKRRKERLKEKERDKGKEILGLKSSDDNSCSTLRNSTSTNDESTNTPDSRDSASEEEDNSTVVDL
CSPDTFVDQTACREISVQNNMNYCNTLTFEARTNSSDLFTSGQSKSSRWNLRLRKDFPDQSSCCYDECGDENGSI
GDFQWQSKERTRHSARCSNSVFTTNNRTRDRHNYISFSCDPRDDYVINDSCSSSTGSGRETMMARKTGVERPRV
QYRRCYPLDNFIVSKESTRGNTQQKNGAPKQVWPEMDSQKKNLLDNKNNGSGAVCNVDPTKLVEQDSSECPNFDAG
HEPLSQSSER

SRDICKSETDQPCENNEKNQATSCGGTIMVDKQDCYSTKDEGSGHDEELMMNSTSSDGLSSCTSEADRESSTSSVTSL
SAQHQESSSSDSEESPERVNSIEEAPSTKTVSRSLLEACAGKGFREYQPKAMHRPHNDRLGFNI PPFQDQLLHHQSMH
VPTHSSATMGLHNHPWAA PASGYMQYAQP SHFYSNPLGFGVPGKQSPDFPVQYSNVHHFPAPAFSYAPPEPIRKTTPS
FRVMHTSPPYRNLHQSQTVGHPHGDPTLERHPSQPKPLDLKDAPGENKSSPEGNASFSLFQFNLP IAPPAPSSKDD
TSGESATRTPLAQVQVQPCSREQTDVKEYNLFCSKNGSMFSFISR

Material suplementario 14. Búsqueda BLAST en H.sapiens.

BLAST® » blastp suite » results for RID-109W4NFJ01R Home Recent Results Saved Strategies Help

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

! Your search is limited to records that include: Home sapiens (taxid:9606)

Job Title	At3G58050.1
RID	109W4NFJ01R <small>Search expires on 04-07 00:32 am</small> Download All ▼
Program	Citation ▼
Database	nr See details ▼
Query ID	lcl Query_647549
Description	At3G58050.1
Molecule type	amino acid
Query Length	1210
Other reports	?

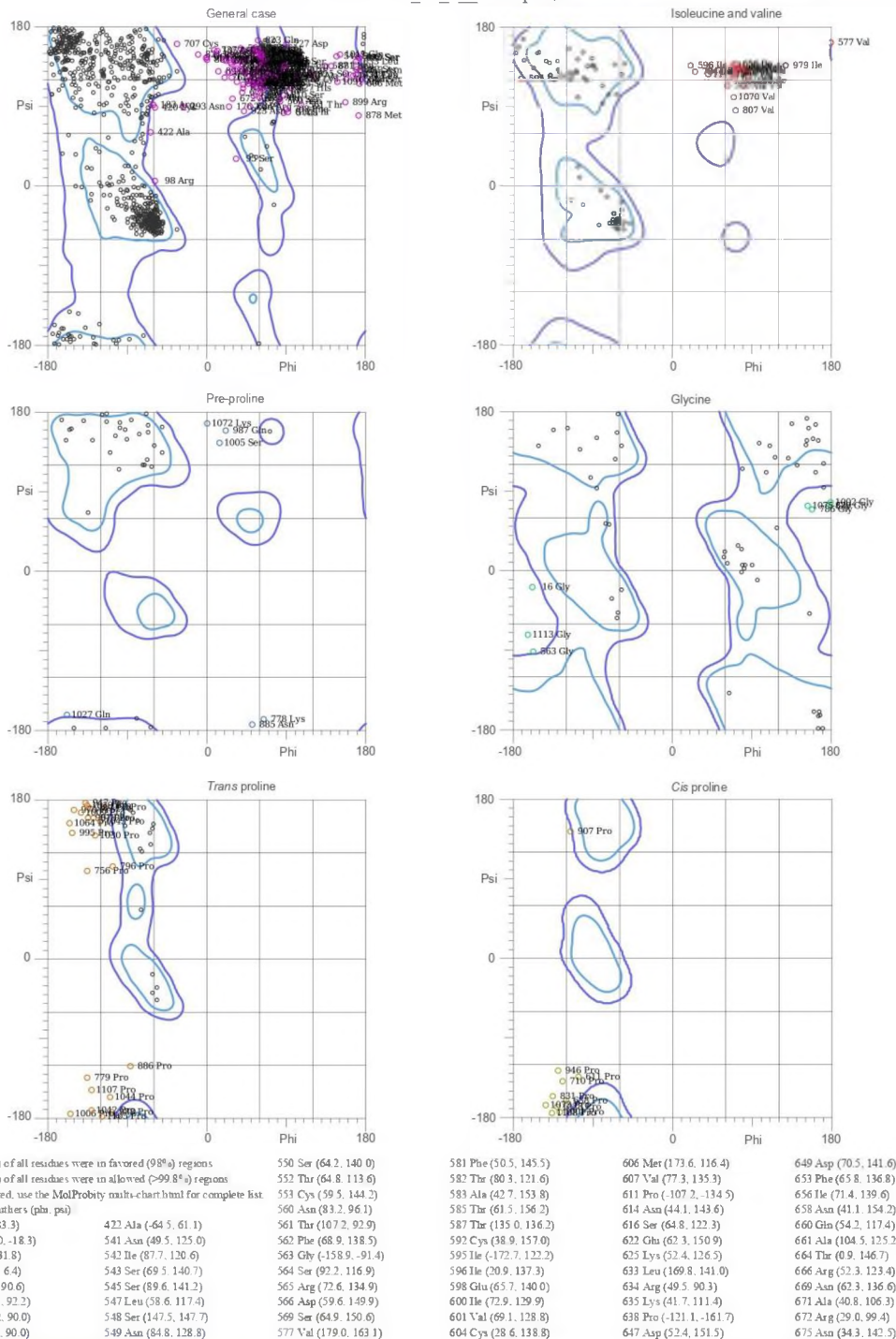
Filter Results

Percent Identity	E value	Query Coverage
<input type="text"/> to <input type="text"/>	<input type="text"/> to <input type="text"/>	<input type="text"/> to <input type="text"/>
		Filter Reset

! No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

MolProbity Ramachandran analysis

AF-11H7R0-F1-model_v4_1_clean.pdb, model 1



<http://kinemage.biochem.duke.edu>

Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003)

Material suplementario 16. Softwares utilizados para predicción estructural de UK7.

I-TASSER
YASSPP
PSIPRED
YASPIN
ASSP2
Uva FASTA Server
NetsurfPC2.0
HMMTOP

Material suplementario 17. Polimorfismos encontrados en los primeros 2,000 nucleótidos río arriba de UK7-A. La zona amarilla marca el inicio de la región 5'UTR, la zona morada marca los 2,000 nucleótidos, las letras en rojo indican el sitio del polimorfismo que coincide con la secuencia consenso de un probable sitio de unión de factores de transcripción.

```

SENUK7AJUSTADA      TGCTTAGATGATATAAAATTAGCAGATAAATGCTAAGAAAAGTGAAATCTAGTACAATA
TOLUK7AJUSTADA      TGCTTAGATGATATAAAATTAGCAGATAAATGCTAAGAAAAGTGAAATCTAGTACAATA
** *****

SENUK7AJUSTADA      GAAAAATTGCTTATTTTGTCTTATCATTCTgtgaagagatcatctcttaattaaag
TOLUK7AJUSTADA      GAAAAATGCTTATCTTCTCTTATCATTCTGTGAAGAGATCATCTCTTAATAAAAG
* *****

SENUK7AJUSTADA      aaggettgctcttttttctctctctctccacatcagatcttatcctatgtggta
TOLUK7AJUSTADA      AAGGCTGTGCTTTTTTTCGTTCTCTCTCACATCAGATTTATCCTATGTGGTA
*****

SENUK7AJUSTADA      ccgttaagaGAAGACTGACGTCACCCCATGTAAACGCCGTAAGCTAGCGATCCAAAAA
TOLUK7AJUSTADA      CCGTAAGAGAAGTGCAGTCACCCCATGTAC-----
**** *****

SENUK7AJUSTADA      GTTTGGCCCTTTCTCTGCCTTCAGTTGCTGCTGATCCGCTGTCTTGTATGCCCTTTG
TOLUK7AJUSTADA      -----GCCTTCAGTTGCTGCTGATCCGTTGTCTTGTATGCCCTTTTG
*****

SENUK7AJUSTADA      AGTTTTGGTGCCTCCTTTTTCTTCAGTACTTCCATCCTCCCCTGCAGCTTTTTTCATA
TOLUK7AJUSTADA      AGTTTTGGTGCCTCCTTTTTCTTCAGTACTTCCATCCTCCCCTGCAGCTTTTTTCATA
*****

SENUK7AJUSTADA      ATTCGCTGAAAATGACATTCGAAGAATTAATTGCTGCCTGAAAATGCTGAAAGCAAAGTT
TOLUK7AJUSTADA      ATTCGCTGAAAATGACATTCGAAGAATTAATTGCTGCCTGAAAATGCTGAAAGCAAAGTT

```

```

*****
SENUK7AJUSTADA      TTCGGAGAAAAGATATATCCTGTGAACGTGGGGTGATCCGTGGTGGTTACTTCCGTTGG
TOLUK7AJUSTADA      TTCGGAGAAAAGATATATCCTGTGAACGTGGGGTGATCCGTGGTGGTTACTTCCGTTGG
*****

SENUK7AJUSTADA      TGTACCACATACGCCCTCTATTTACAAATATATGTTTATGGAACTTTTCCCTAATCAA
TOLUK7AJUSTADA      TGTACCACATACGCCCTCTATTTACAAATATATGTTTATGGAACTTTTCCCTAATCAA
*****

SENUK7AJUSTADA      TTATATTTGAAAGTTTGAACAATTTATAGCAAAAATCATCCATATCTATGACACGAAATC
TOLUK7AJUSTADA      TTATATTTGAAAGTTTGAACAATTTATAGCAAAAATCATCCATATCTATGACACGAAATC
*****

SENUK7AJUSTADA      AATACACTACAAAACATATGATAAGATGGATCTACTCATATTGATTGGTATAGTAGGT
TOLUK7AJUSTADA      AATACACTACAAAACATATGATAAGATGGATCTACTCATATTGATTGGTATAGTAGGT
*****

SENUK7AJUSTADA      GTTGTATTTTCTAGACTTCATCAAACCGTAAGAATTTTGACTTAACGACAAATTGATA
TOLUK7AJUSTADA      GTTGTATTTTCTAGACTTCATCAAACCGTAAGAATTTTGACTTAACGACAAATTGATA
*****

SENUK7AJUSTADA      TGTCCATATATTTTGGATCGAGGAAGGTATCAGTTGCTTAATGTTATTACATTTGCCGAA
TOLUK7AJUSTADA      TGTCCATATATTTTGGATCGAGGAAGGTATCAGTTGCTTAATGTTATTACATTTGCCGAA
*****

SENUK7AJUSTADA      TAAATCTCTACCCATTTGTAATTACAATATGTTTAGAACTGACACGATCTCCAAC
TOLUK7AJUSTADA      TAAATCTCTACCCATTTGTAATTACAATATGTTTAGAACTGACACGATCTCCAAC
*****

SENUK7AJUSTADA      TGAACTTAAAACtctcctcctcctcctcctcaatatcctcCAAACCTATTGTATTATT
TOLUK7AJUSTADA      TGAACTTAAAACtctcctcctcctcctcctcaatatcctcCAAACCTATTGTATTATT
*****

SENUK7AJUSTADA      TCATATGAACCACCCAAATCGGACTTGTCATTTCCAAGTTTCTGAGCTCCTATAAGGA
TOLUK7AJUSTADA      TCATATGAACCACCCAAATCGGACTTGTCATTTCCAAGTTTCTGAGCTCCTATAAGGA
*****

SENUK7AJUSTADA      CCCATGCTCTGTGAGATCCCATTTTTGTGTTTTTTATTTCGCAAGTCCAAATAAGACCTA
TOLUK7AJUSTADA      CCCATGCTCTGTGAGATCCCATTTTTGTGTTTTTTATTTCGCAAGTCCAAATAAGACCTA
*****

SENUK7AJUSTADA      GTTTCACGGGCAACTTAATTACACAATAAGAAAGTGAAGCTACATACTTGGCTGGAGGAG
TOLUK7AJUSTADA      GTTTCACGGGCAACTTAATTACACAATAAGAAAGTGAAGCTACATACTTGGCTGGAGGAG
** *****

SENUK7AJUSTADA      TGGATGTACAACCCCAACACAGCGGTTTCATGTTCTCAAGGATGCAATTTTAGGTATCTAT
TOLUK7AJUSTADA      TGGATGTACAACCCCAACACAGCGGTTTCATGTTCTCAAGGATGCAATTTTAGGTATCTAT
*****

SENUK7AJUSTADA      TTATACTGTTGGTGTCTCTCTTACAGTTTCTTACAAAAGAAAGTTACTTACATAATGATCT
TOLUK7AJUSTADA      TTATACTGTTGGTGTCTCTCTTACAGTTTCTTACAAAAGAAAGTTACTTACATAATGATCT
*****

SENUK7AJUSTADA      AATATATGCTCTAGTTGGCTACCCGGGAAAAAATGTCTCATGTACCGTTCCTTTAAAA
TOLUK7AJUSTADA      AATATATGCTCTAGTTGGCTACCCGGGAAAAAATGTCTCATGTACCGTTCCTTTAAAA

```

```

*****
SENUK7AJUSTADA AGAGTAATTTGTTCTTGCAAAATGTCTATATCCATTTATATACCCCGGCATTCTTCTG
TOLUK7AJUSTADA AGAGTAATTTGTTCTTGCAAAATGTCTATATCCATTTATATACCCCGGCATTCTTCTG
*****

SENUK7AJUSTADA CCATATGACCTCCACTTTGTTAAGGCAATCAACAATACTACGCAAAGACCTTTTGTGGT
TOLUK7AJUSTADA CCATATGACCTCCACTTTGTTAAGGCAATCAACAATACTACGCAAAGACCTTTTGTGGT
*****

SENUK7AJUSTADA GCTTCATACATCCTTTCCCCACGGCCACCAAGCAACATGAAAAAATTTCTTAAGACTC
TOLUK7AJUSTADA GCTTCATACATCCTTTCCCCACGGCCACCAAGCAACATGAAAAAATTTCTTAAGACTC
*****

SENUK7AJUSTADA TAGCTAGTGGCACCTATCAATTTAATATTCAGAACAACGTATCACATATCTATTATGTT
TOLUK7AJUSTADA TAGCTAGTGGCACCTATCAATTTAATATTCAGAACAACGTATCACATATCTATTATGTT
*****

SENUK7AJUSTADA TCTTTTGGGACATCTTTAAAGGACTTTAGTCACTATATGAAGTCTACTTGTGAATATCT
TOLUK7AJUSTADA TCTTTTGGGACATCTTTAAAGGACTTTAGTCACTATATGAAGTCTACTTGTGAATATCT
*****

SENUK7AJUSTADA TTAGGACTTTTCATGTTAGTTTGGTGCTCACAAAAATATCAACATTTACTAAAAGAGCA
TOLUK7AJUSTADA TTAGGACTTTTCATGTTAGTTTGGTGCTCACAAAAATATCAACATTTACTAAAAGAGCA
*****

SENUK7AJUSTADA CGCCAGAATTAATTCAGGAAAATGTTGTAATATCAATACAAATGATTTTTTTTCATC
TOLUK7AJUSTADA CGCCAGAATTAATTCAGGAAAATGTTGTAATATCAATACAAATGATTTTTTTTCATC
*****

SENUK7AJUSTADA AAAATCGAGCAAAGATCGACATTAACCTTGGAACCTAAAGGAAATCAAGCTGTATGATA
TOLUK7AJUSTADA AAAATCGAGCAAAGATCGACATTAACCTTGGAACCTAAAGGAAATCAAGCTGTATGATA
*****

SENUK7AJUSTADA TTCGTGTATTTTGGTAAAACGGAGTATCATGCACTGTAAAGTTTAGTTATTATGTACTC
TOLUK7AJUSTADA TTCGTGTATTTTGGTAAAACGGAGTATCATGCACTGTAAAGTTTAGTTATTATGTACTC
*****

SENUK7AJUSTADA ATGATGGCACATCATGTGTTGCCTTACAAAAATGACAACATGTGGCACCCATGGACTAAT
TOLUK7AJUSTADA ATGATGGCACATCATGTGTTGCCTTACAAAAATGACAACATGTGGCACCCATGGACTGCT
*****

SENUK7AJUSTADA AAAACAAGAATTAAGCATTCCACAAGGACCCAGACAAAAGAAAAACGTCGCACCGGATT
TOLUK7AJUSTADA AAAACAAGAATTAAGCATTCCACAAGGACCCAGACAAAAGAAAAACGTCGCACCGGATT
*****

SENUK7AJUSTADA TCGAACGCCAGCAAACCACCGCCGTTGTTTAAAGCCAAATTTGTAACAAACACCCCTCTA
TOLUK7AJUSTADA TCGAACGCCAGCAAACCACCGCCGTTGTTTAAAGCCAAATTTGTAACAAACACCCCTCTA
*****

SENUK7AJUSTADA AAATTTCCGAAACCACTAGAACCCAACAGAAATCGCACCGCGGCTAACCGTGGCGGTTA
TOLUK7AJUSTADA AAATTTCCGAAACCACTAGAACCCAACAGAAATCGCACCGCGGCTAACCGTGGCGGTTA

```

Material suplementario 18. Polimorfismos que coinciden con la secuencia de un probable sitio de unión de factor de transcripción. En verde la secuencia canónica y en rojo el nucleótido que difiere.

Sec. consenso	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
o	Myb/SANT; MYB	-98	+	aatttGTAACaaaca	0.87	aatttGCAACaaaca
x	Others	-95	+	ttgtaaCAAACacc	0.97	ttgcaaCAAACacc
o	without	-92	+	TAACAaa	1	CAACAaa
o	Alpha-amylase	-92	+	TAACAaa	1	CAACAaa
o	without	-214	-	tgtggcaccatggactaA TAAA	0.57	tgtggcaccatggactgC TAAA
o	Homeodomain	-202	-	gGACTAataa	1	gGACTGctaa
o	AT-Hook	-201	+	gactAATAAa	1	gactAATGCa
o	without	-197	+	AATAAa	0.83	AATGCa
o	Alpha-amylase	-197	+	AATAAa	1	AATGCa
o	CSD	-197	+	aATAAAa	1	aATGCaa
o	Myb/SANT	-358	+	cgacatTAAACcttggaa actaa	0.68	cgacatTAAA- cttggaaactaa
o	AP2	-351	+	aAACCTtgg	0.89	aAA-CTtgg
x	AP2; ERF	-367	-	agcaaagatCGACAtta aacct	0.86	agcaaagatCGACAtta aa-ct
x	(Others)	-458	+	ATATCaacatttactaaa	0.67	ATATCaacatttaca
o	NAC; NAM	-449	+	tTACTaaa	0.78	tTTACAaaa
o	Dof	-446	+	actTAAAGagc	0.98	actAAAAGagc
x	MADF; Trihelix, Conserved region	-452	+	acaTTTACtt	0.98	acaTTTACta
o	Dof	-534	-	ggaCTTTAgtc	0.98	ggaCGTTAgtc
x	without	-530	-	tttAGTCA	0.75	gttAGTCA
o	without	-707	-	atcaacAAATA	0.73	atcaacATATA
o	without	-704	+	AACAAaactac	0.75	AACATaactac
x	AP2; B3; RAV	-706	-	tCAACAaataactacgca	0.92	tCAACAtataactacgca
o	MYB	-706	-	tcAACAAaatac	0.99	tcAACATatac
x	C3H	-706	-	tCAACAa	1	tCAACAt
o	without	-704	+	AACAAaactac	0.75	AACATaactac

Sec. consenso	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
x	without	-874	+	AGTTActtacataa	0.71	AGTTAattacataa
o	NAC; NAM	-873	+	gTTACTtac	0.79	gTTAATtac
x	without	-873	-	gttactTACAT	0.73	gttaatTACAT
x	without, conserved region	-874	+	AGTTActtacataa	0.71	AGTTAattacataa
x	without	-878	-	aagaagtacttaCATAA	0.61	aagaagttaattaCATAA
x	without	-1042	+	AAGACctag	0.89	AAGACc---
o	Myb/SANT; MYB	-1042	-	aagACCTAgttcac	0.88	aagACC---ttcac
x	without, conserved region	-1042	+	AAGACctag	0.89	AAGACc---
x	BBR-BPC	-1195	+	ctctcTCTCTctcaa	0.91	ctctcTCTCTctcaa
x	Myb/SANT; MYB-related	-1187	-	ctctcaATATCt	0.88	ctgtcaATATCt
x	(Others)	-1203	+	ctctcatcctCTCTCtctc _c	0.88	ctctcatcctCTCTCtctg _c
o	without	-1198	-	atcctctctctCTCTC	0.81	atcctctctctCTGTC
o	without	-1200	-	tcatcctctctctCTCTC	0.83	tcatcctctctctCTGTC
x	GRF	-1240	-	ttagaaaCTGACac	0.93	ttagagaCTGACac
o	HSF	-1242	-	gtttTAGAAactg	0.89	gtttTAGAGactg
x	Myb/SANT	-1581	-	ccgTTGGTgtaccacat acgc	0.92	ccgTTGGTgtaccacgt acgc
x	VOZ, conserved region	-1575	-	gtgtaccacaTACGC	0.88	gtgtaccacgTACGC
x	Myb/SANT; MYB	-1584	-	cttccgTTGGTgtaccac ata	0.86	cttccgTTGGTgtaccac gta
x	SBP	-1579	-	gttggTGTAccacata	0.95	gttggTGTAccacgta
x	C2H2	-1582	-	tccgTTGGTgtaccacat a	0.92	tccgTTGGTgtaccacgt a
o	bZIP	-1779	-	tccgCTGTcc	0.97	tccgTTGTcc

Sec. consenso	Sitio de unión de factor de transcripción	Posición	Hebra	Secuencia Bd21	Puntuación	Secuencia Bd21-3
x	GATA, conserved region	-1781	-	GATCCgct	0.89	GATCCggt
o	without	-1807	+	CCTTTtctctg	0.82	Sin sec
o	Dof, Conserved region	-1809	-	gccCTTTTctc	0.98	Sin sec
o	without	-1806	+	CTTTTctctgccttc	0.73	Sin sec
o	AT-Hook	-1825	+	gatccAAAAA	0.98	Sin sec
o	Dof	-1828	-	agcgatccaaAAAAGttg	0.92	Sin sec
o	C3HZincfinger	-1820	+	aaAAAAGtttg	0.95	Sin sec
o	MADSbox; MIKC; M-type	-1822	+	cCAAAAaagtt	0.94	Sin sec
o	without	-1818	+	AAAAG	0.8	Sin sec
o	NAC	-1841	+	aacGCCGT	1	cAC-----
x	bZIP	-1869	-	aagagaagactgaCGTC Acc	0.96	aagagaagattgaCGTC Acc
x	Homeodomain; TALE	-1861	+	acTGACGtca	1	atTGACGtca
x	bZIP; B3	-1861	-	actGACGTca	1	attGACGTca
x	without	-1871	-	ttaagagaagactgaCGT CA	0.71	ttaagagaagattgaCGT CA
x	without	-1913	-	tttctctcttccaCATCA	0.6	tttttctcttccaCATCA
o	(Others)	-1918	+	ttcgtttctCTCTctccac	0.8	ttcgttttTTCTctccac



CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023
Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenoUK7Bd1F

ID: Ñ5060

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: TGACGTCACCCCATTGTAAA

de bases: 20

Tm: 64.2

Nanomoles finales: 23.01

µg/OD: 31.4

PM: 6061

µg de Oligo: 139.47

230.1µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

5



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenoUK7Bd1R

ID: Ñ5061

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: CCGAAAACCTTGCTTTCAGC

de bases: 20

Tm: 64

Nanomoles finales: 24.84

µg/OD: 33.2

PM: 6052

µg de Oligo: 150.34

248.4µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

6



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenoUK7Bd2F

ID: Ñ5062

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: TTA~~CTT~~CGAATCGGCCTGAC

de bases: 20

Tm: 64.4

Nanomoles finales: 24.89

µg/OD: 33.1

PM: 6068

µg de Oligo: 151.02

248.9µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

7



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenoUK7Bd2R

ID: Ñ5063

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: CCCGAAATACCATGTTT

de bases: 20

Tm: 63.7

Nanomoles finales: 22.69

µg/OD: 31.7

PM: 6061

µg de Oligo: 137.55

226.9µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

8



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenoUK7Bd3F

ID: Ñ5064

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: TCCGGAGATTGAGAGTAAGCA

de bases: 21

Tm: 64.2

Nanomoles finales: 23.55

µg/OD: 29.9

PM: 6519.3

µg de Oligo: 153.53

235.5µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

9



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenoUK7Bd3R

ID: Ñ5065

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: GGTGGAGGAACGACCAACT

de bases: 19

Tm: 64.5

Nanomoles finales: 22.68

µg/OD: 30.6

PM: 5886.9

µg de Oligo: 133.53

226.8µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

10



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenoUK7Bd4F

ID: Ñ5066

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: TTTTACATATGGCAGCAGAA

de bases: 21

Tm: 63.3

Nanomoles finales: 24.9

µg/OD: 30.8

PM: 6429.3

µg de Oligo: 160.08

249µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

11



www.t4oligo.com



T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 147_UNIPA_JMP_25596

Fecha de síntesis: 24/07/2023

Fecha de caducidad: 24/07/2024

La fecha de caducidad es aplicable en el producto seco (sin resuspender).

Usuario: Julián Mario Peña Castro
Institución: Universidad del Papaloapan
Nombre del oligo: GenoUK7Bd4R

ID: Ñ5067

Modificaciones:

Escala: 25 nmol

Purificación: DST

Secuencia: CCATGTCAATTAACGTACTGTGG

de bases: 23

Tm: 63.3

Nanomoles finales: 24.98

µg/OD: 31.6

PM: 7038.6

µg de Oligo: 175.82

249.8µl de agua para una concentración de 100µM

La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

Karla Montserrat

RECOMENDACIONES DE USO: LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers

- Preferentemente TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
- Agua libre de Nucleasas.

Mantener almacenado previo y posterior a su uso a 4°C o -20°C según corresponda.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

Para asegurar el funcionamiento de sondas y oligos marcados se recomienda protegerlos de la luz y el aire para evitar el fotobleaching, almacenarlos en tubos ámbar o tubos claros en un contenedor opaco.

Para uso exclusivo en investigación científica.

De presentar algún detalle con el desempeño del producto contacte por favor a soporte técnico al teléfono 462-624-0364 o al correo electrónico Soporte@t4oligo.com.

Nota: Este producto cuenta con 1 año de garantía a partir de su compra

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV.
Euquerio Guerrero #278, Col.
Tabachines, 36615 Irapuato, Gto.

12



www.t4oligo.com