

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Edición del genoma de *Citrus sinensis* con potencial para generar  
variedades resistentes a infección por bacterias del tejido vascular”**

**TESIS**

Que presenta:

**M. EN C. DOMINGO JIMÉNEZ LÓPEZ**

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis:

**DR. ROBERTO RUIZ MEDRANO**



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Genética de Plantas (L12) y Biotecnología Agropecuaria (L24) del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (DByB) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Roberto Ruiz Medrano y la Dra. Guadalupe Beatriz Xoconostle Cázares.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)**, por haberme otorgado la beca CONAHCYT Nacionales 2020-2024 para realizar el Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Biotecnología en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Zacatenco.

Al **Dr. Roberto Ruiz Medrano**, por haberme aceptado en su grupo de investigación “Ingeniería Genética de Plantas”. Por su enseñanza, por su paciencia, por sus consejos de presentar los avances en los seminarios departamentales y por la retroalimentación recibida en los seminarios tutoriales.

A la **Dra. Guadalupe Beatriz Xoconostle Cázares**, por abrirme las puertas de su laboratorio “Biotecnología Agropecuaria”. Por su enseñanza, por su retroalimentación en los seminarios tutoriales y por el todo apoyo recibido en cuánto a recursos del laboratorio para realizar este trabajo doctoral.

Al **Dr. Friedrich Kragler**, por la enseñanza, discusión y retroalimentación en los experimentos de agroinfiltración e injerto en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. Por darme la oportunidad de conocer un poco sobre la investigación que se realiza en el Instituto de Max Planck (MPI) de Fisiología Molecular de Plantas. Y por darme la oportunidad de recorrer y conocer un poco sobre la cultura de Alemania y República Checa al haberme aceptado en su grupo de investigación “Transporte Macromolecular Intercelular”.

A la **M. en C. Brenda Jazmín Vargas Hernández**, por la planeación, enseñanza, discusión y retroalimentación en experimentos de RT-qPCR, cortes histológicos, procesamiento de imágenes de microscopía confocal, tinción GUS, por sus preguntas constructivas en los seminarios del L12/L24, etc. Por los momentos de café con pan en la cafetería de física y de las

pláticas sobre aspectos de la vida ordinaria y pasional. Por su “philia” y por su disposición en los momentos de desasosiego y serenidad.

A la **M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz**, por la planeación, enseñanza, discusión y retroalimentación del ensamblaje de vectores, cultivo *in vitro* de explantes de naranja dulce, análisis bioinformático de PP16, por sus preguntas constructivas en los seminarios del L12/L24, etc.

A los integrantes de mi comité tutorial, la **Dra. María Eugenia Hidalgo Lara**, el **Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz**, la **Dra. María del Carmen Montes Horcasitas** y la **Dra. Berenice Calderón Pérez**, por sus enseñanzas, por la retroalimentación en los seminarios tutoriales-departamentales y por la revisión de esta tesis doctoral.

Al **Dr. José Abrahán Ramírez Pool**, por su apoyo en la realización de actividades bioinformáticas y por la retroalimentación en los seminarios del L12/L24.

A **Lourdes López García**, por su enseñanza del cultivo *in vitro* de explantes e microinjertos en naranja dulce y naranja agria, y por su disponibilidad en facilitarme materiales básicos para el L12/L24.

A la Ing. **Selene Yazbeth Acosta García**, por darme la oportunidad de transmitir mis conocimientos hacia su formación académica como Ingeniera Biotecnológica y ayudarme en la transformación de explantes y plántulas por el método de biolística.

A la **Lic. Vania Yamile Muñoz Macias**, por su disponibilidad y apoyo a los trámites académicos.

A los **Doctorantes Edgar Jesús Macias Ortiz** y **David Guzmán Hernández**, a los **Maestros en Ciencias Helio Pablo Laurian Mendoza**, **Josué Montiel Cruz**, **Carlos Gadiel González Jacob**, **Ismael Benítez López**, **Octavio Oropeza Mariano**, a los **Doctores**

**Víctor Hugo Ramos García, Edgar Yabrán Villegas Vázquez, Elohim Bello Bello, José Fabricio López Hernández, a la Biol. Laura Aguilar Henonin, a la Ing. Martha Isela Marín Torres, a los Ingenieros Ramón Erubiel Ríos Paredes y Luis Eduardo Medina Fernández y a Laura Patricia Bencomo Meza,** por su camaradería, por los odiseas, por los momentos de charla acerca de tópicos académicos y de la vida habitual.

A los **Doctorantes Sezgin Mengi, Biego Pinhero Brito, Shijun Zhang, Yuan Zhou y Yağmur Hasbioğlu,** a la **M. en C. Antonia Schmitt,** a la **Dra. Eleftheria Erietta Saploura** y al **Dr. Gerardo del Toro de León,** por su apoyo en la realización de experimentos de agroinfiltración e injerto en *N. benthamiana* y *A. thaliana*, por los seminarios de retroalimentación y ocasiones de convivencia en el grupo de investigación “Transporte Macromolecular Intercelular” del MPI.

A los integrantes del **equipo de futbol “ALMACÉN” y “ELÉCTRICA”,** por sus invitaciones (lo siento por no ir muchas veces) y por los momentos de alegría (cuando ganábamos) y de coraje (cuando perdíamos).

A **Lidia Esmeralda Trujillo Rangel,** por su filoxenia durante casi 4 años y por su disponibilidad en momentos de emergencia en cuestiones de salud.

A **Rodrigo Iván Martínez Rocha, Edgar Medina García, David Emilio Ramos Ruiz, Brandon Uriel Ramírez Cabrera, Pedro Enrique Coño Preciado** alias “EL PANTERA”, a todos del gimnasio **DONATTELO,** por su amistad, por sus consejos en las rutinas y por las pláticas coloquiales acerca de la vida común.

A mi **padre Salvador Jiménez Zenteno** y a mi **madre Juana López Panela,** por darme la vida, por su amor condicional y por seguir sus consejos de que “la educación académica es la mejor herencia hacia un hijo”.

A mis **hermanos Juan y Cecilio**, por su amistad incondicional, por las odiseas en Chihuahua e Hidalgo del Parral y por las pláticas sobre la vida académica, laboral y pasional.

En fin, a **todos** los que efímeramente me acompañaron en esta etapa de mi vida académica (**Gabriel Marcelino Pérez, Oscar Ulises García Flores, Gustavo Jesús Guzmán Melgarejo, Laura Estefanía Guerrero Martínez, José Luis Sánchez Figueroa, Micaela Pucheta Díaz, Carlos Sánchez González, Jessica Eva Monroy Gutiérrez...**).

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN .....	XII
ABSTRACT .....	XIII
<b>I. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
1.1. Producción de naranja a nivel mundial y en México.....	14
1.2. Enfermedades que merman la producción de naranja.....	14
1.3. El HLB o dragón amarillo.....	15
1.4. Métodos de control y prevención de HLB o dragón amarillo.....	16
1.5. Floema, vía para movilizar antimicrobianos peptídicos.....	17
1.6. CsPP16-1, transporte para la movilización de antimicrobianos peptídicos.....	18
1.7. Slp322, antimicrobiano peptídico con capacidad para mitigar al dragón amarillo.....	19
1.8. Sistema de CRISPR/Cas9, herramienta para la creación de plantas de naranja dulce resistentes al dragón amarillo.....	21
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1. Objetivo general.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
5.1. Análisis estructural y evolutivo de PP16 en especies de Viridiplantae.....	27
5.1.1. Identificación y recuperación de secuencias de proteínas PP16 en especies Viridiplantae.....	27
5.1.2. Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético.....	27
5.1.3. Reconstrucción del estado ancestral de ortólogos PP16.....	28
5.1.4. Determinación de motivos y generación de logos.....	28
5.1.5. Análisis de la estructura tridimensional de las proteínas PP16 mediante modelado por homología.....	29
5.1.6. Análisis de presión selectiva de genes PP16.....	29
5.2. Caracterización de la expresión de genes <i>CsPP16</i> en tejidos de la planta de naranja dulce.....	30
5.2.1. Extracción de muestras de RNA de tejidos de la planta de naranja dulce.....	30
5.2.2. Análisis de la acumulación del mRNA de genes <i>CsPP16</i> mediante RT-PCR de punto final y RT-qPCR.....	30
5.3. Obtención de plantas de naranja dulce que expresen la fusión de <i>CsPP16</i> - <i>l::BM::ScpPP36::Slp322</i> en el tejido vascular.....	33
5.3.1. Vectores de expresión pCR8 y pBUN4U6SM.....	33
5.3.2. Comprobación de pCR8/DNA molde y pBUN4U6SM/sgRNA mediante enzimas de restricción y secuenciación Sanger.....	35
5.3.3. Preparación de medios para el cultivo <i>in vitro</i> de naranja dulce.....	36

5.3.4. Transformación de explantes de naranja dulce mediante el método de biolística y microinjertaciones en <i>Citrus aurantium</i> .....	37
5.3.5. Análisis de explantes transformadas y microinjertos mediante técnica moleculares.	39
5.4. Análisis del transporte de <i>CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322</i> con y sin TLS mediante agroinfiltraciones en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	42
5.4.1. Construcciones para el análisis de movilidad de <i>CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322</i> con y sin TLS.....	42
5.4.2. Crecimiento de plantas de <i>N. benthamiana</i> e agroinfiltraciones .....	46
5.4.3. Extracción de RNA y análisis de movilidad de <i>CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322</i> con y sin TLS mediante RT-PCR de punto final .....	47
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
6.1. Análisis estructural y evolutivo de PP16 en especies de Viridiplantae.....	51
6.1.1. Identificación de proteínas PP16 en Viridiplantae.....	51
6.1.2. Distribución filogenético de proteínas PP16 en la familia de Viridiplantae.....	52
6.1.3. Reconstrucción de estado ancestral de ortólogos PP16 .....	55
6.1.4. Arquitectura de dominio general de las proteínas PP16.....	57
6.1.5. Análisis estructural de las proteínas PP16 mediante modelado basado en plantillas.	58
6.1.6. Las proteínas PP16 están relacionadas con la familia de proteínas sinaptotagmina extendida (E-SYT).....	60
6.1.7. Análisis de presión selectiva de genes PP16.....	63
6.2. Caracterización de la expresión de genes PP16 en tejidos de la planta de naranja dulce.. .....	65
6.3. Obtención de plantas de naranja dulce que expresen la fusión <i>CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322</i> en el tejido vascular.....	67
6.4. Análisis del transporte de <i>CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322</i> con y sin TLS mediante agroinfiltraciones en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	71
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>73</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>81</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>82</b>
<b>X. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>83</b>
<b>XI. ANEXOS .....</b>	<b>90</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Sintomatología de la enfermedad de HLB en cítricos .....	16
Figura 2.	Los cuatro mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos (AMPs) .....	20
Figura 3.	Descripción general del proceso de edición genética a través del sistema de CRISPR-Cas9.....	22
Figura 4.	Esquema general de la estrategia de edición de <i>CsPP16-1</i> a través del sistema de CRISPR/Cas9.....	23
Figura 5.	Perfil electroforético de RNA de diferentes tejidos de naranja dulce en gel de agarosa al 1% .....	31
Figura 6.	Vector pCR8/DNA molde .....	34
Figura 7.	Vector pBUN4U6SM/sgRNA .....	34
Figura 8.	Perfil electroforético de pCR8/DNA molde y pBUN4U6SM/sgRNA digeridos con EcoRI-HF y HindIII-HF, respectivamente .....	36
Figura 9.	Filogenia de Viridiplantae concerniente a la presencia de homólogos PP16 .....	52
Figura 10.	Análisis filogenético de la familia de proteínas PP16 en Viridiplantae .....	54
Figura 11.	Alineamiento múltiple de secuencias de 104 proteínas PP16 de diversos taxones de embriofitas .....	55
Figura 12.	Reconstrucción de ortólogos ancestrales de PP16 en especies de Viridiplantae .....	56
Figura 13.	Análisis de MEME y logos que muestran residuos y motivos comunes de los miembros del grupo A y B .....	58
Figura 14.	Predicción de estructuras tridimensionales de PP16.....	59
Figura 15.	Representación esquemática de la estructura de E-SYT y CmPP16 .....	62
Figura 16.	Análisis de presión selectiva de genes PP16 mediante los métodos MEME y FUBAR. ....	64
Figura 17.	RT-PCR de punto final de genes PP16 en diferentes tejidos de la planta de naranja dulce .....	66
Figura 18.	RT-PCR en tiempo real de los genes de PP16 en diferentes tejidos de la planta de naranja dulce .....	66
Figura 19.	Dos microinjertos de naranja dulce (provenientes de explantes transformados por biolística) en el portainjerto <i>C. aurantium</i> .....	68
Figura 20.	Perfil electroforético de la PCR de explantes transformados mediante el método de biolística.....	68
Figura 21.	Perfil electroforético de la T7EI para el análisis de edición de la región 5' de <i>CsPP16-1</i> en explantes .....	69

Figura 22. Perfil electroforético de la PCR múltiple para el análisis de edición de locus <i>CsPP16-1</i> en dos microinjertos .....	69
Figura 23. Análisis de la edición de la región 5' de <i>CsPP16-1</i> en dos microinjertos mediante secuenciación Sanger .....	70
Figura 24. Perfil electroforético de la RT-PCR de punto final en dos microinjertos .....	70
Figura 25. Perfil electroforético de la RT-PCR de punto final del análisis de <i>CsPP16::BM::ScpPP36::Slp322::TLS-1</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i> .....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Mezcla de reacción para RT-PCR de punto final.....	31
Tabla 2.	Condiciones de amplificación para RT-PCR de punto final.....	32
Tabla 3.	Oligonucleótidos para RT-PCR de punto final y en tiempo real.....	32
Tabla 4.	Mezcla de reacción para RT-PCR en tiempo real.....	32
Tabla 5.	Condiciones de amplificación para RT-PCR en tiempo real.....	33
Tabla 6.	Reacción de digestión para pCR8/DNA molde y pBUN4U6SM/sgRNA.....	35
Tabla 7.	Medios MS para cultivo <i>in vitro</i> de semillas y explantes.....	37
Tabla 8.	Mezcla de reacción para PCR en explantes.....	40
Tabla 9.	Mezcla de reacción para PCR múltiple en microinjertos.....	40
Tabla 10.	Condiciones de amplificación para PCR y PCR múltiple.....	41
Tabla 11.	Oligonucleótidos para PCR y PCR múltiple.....	41
Tabla 12.	Construcciones para el análisis de movilidad de <i>CsPP16::Slp322</i> con y sin TLS.....	43
Tabla 13.	Oligonucleótidos para PCR.....	44
Tabla 14.	Mezcla de reacción para PCR.....	44
Tabla 15.	Condiciones de amplificación para PCR.....	45
Tabla 16.	Mezcla de reacción LR.....	45
Tabla 17.	PCR de colonias.....	45
Tabla 18.	Condiciones de amplificación para PCR.....	46
Tabla 19.	Medio de agroinfiltración.....	47
Tabla 20.	Mezcla de reacción para síntesis de cDNA.....	48
Tabla 21.	Mezcla de reacción para PCR de las 6 construcciones utilizadas.....	49
Tabla 22.	Condiciones de amplificación para PCR.....	49
Tabla 23.	Oligonucleótidos para PCR del análisis de movilidad de <i>CsPP16::Slp322</i> con/sin TLS.....	50

## RESUMEN

México es el cuarto productor de naranja a nivel mundial con aproximadamente 5 millones de toneladas, según FAOSTAT. No obstante, la producción de naranja es severamente afectado por el dragón amarillo (HLB), una enfermedad provocada por bacterias restringidas al floema, *Candidatus Liberibacter* spp. Pese a que existe una variedad de métodos de control y prevención disponibles, estos no son del todo exitosos. En consecuencia, en este proyecto doctoral se tuvo el objetivo general de integrar al genoma de naranja dulce el transgén *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322* a través del sistema de CRISPR/Cas9. A partir de esta estrategia, el antimicrobiano Slp322 permitirá combatir CL spp. restringida al floema mediante la capacidad de movilidad de CsPP16-1.

En primera instancia, las 28 especies analizadas (excluyendo algas verdes) presentan de dos a tres ortólogos PP16 de acuerdo con la herramienta BlastP en la base de datos de Phytozome v13. Asimismo, el análisis de arquitectura con MEME Suite revela un dominio C2 en la parte carboxi-terminal y dos motivos en el amino-terminal. El análisis de estructura con AlphaFold2 indica que las proteínas PP16 están compuestas mayormente por láminas- $\beta$ . De igual manera, el análisis evolutivo revela que las PP16 pudieron haber surgido de la familia extendida de sinaptotagmina (E-SYT). Finalmente, el análisis de presión selectiva indica que los genes PP16 están bajo selección generalizada negativa/purificadora.

Por otra parte, el resultado de la RT-qPCR de los tres genes *CsPP16* demuestra que *CsPP16-1* presenta una mayor acumulación de mRNA en la muestra de savia de floema y es la más adecuada para el objetivo general. Finalmente, a través de método de biolística se logró obtener explantes y dos microinjertos de naranja dulce con presencia y expresión del DNA molde (*5'UTR::CsPP16-1-ORF::BM::ScpPP36::Slp322::3'UTR*).

## ABSTRACT

Mexico is the fourth largest orange producer in the world with approximately 5 million tons, according to FAOSTAT. However, orange production is severely affected by yellow dragon disease (HLB), a disease caused by phloem-restricted bacteria, *Candidatus Liberibacter* spp. Although there are a variety of control and prevention methods available, they are not entirely successful. Consequently, in this doctoral project, the general objective was to integrate the *CsPP16-1-ORF::BM::ScpPP36::Slp322* transgene into the sweet orange genome through the CRISPR/Cas9 system. Based on this strategy, the antimicrobial Slp322 will allow combating phloem-restricted CL spp. through the mobility capacity of CsPP16-1.

Firstly, the 28 species analyzed (excluding green algae) present two to three PP16 orthologs according to the BlastP tool in the Phytozome v13 database. Likewise, the architectural analysis with MEME Suite reveals a C2 domain at the carboxy-terminal part and two motifs at the amino-terminal. The structural analysis with AlphaFold2 indicates that PP16 proteins are mostly composed of  $\beta$ -sheets. Likewise, the evolutionary analysis reveals that PP16 could have arisen from the extended synaptotagmin (E-SYT) family. Finally, the selective pressure analysis indicates that PP16 genes are under generalized negative/purifying selection.

On the other hand, the result of the RT-qPCR of the three *CsPP16* genes shows that *CsPP16-1* presents a higher accumulation of mRNA in the phloem sap sample and is the most suitable for the general objective. Finally, through a biolistic method, it was possible to obtain explants and two grafts of sweet orange with the presence and expression of the template DNA (*5'UTR::CsPP16-1-ORF::BM::ScpPP36::Slp322::3'UTR*).

# I. REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1. Producción de naranja a nivel mundial y en México

A nivel mundial, en el año de 2022 se reportó aproximadamente 4 millones de hectáreas de área cosechada de naranja, de las cuales se produjo aproximadamente 76 millones de toneladas. A nivel regional, el continente americano fue el principal productor de naranja con aproximadamente 30 millones de toneladas, seguido del continente asiático con 29 millones de toneladas. De los 10 principales países productores de naranja a nivel mundial, Brasil y México produjeron aproximadamente 17 y 5 millones de toneladas de naranja, respectivamente, convirtiéndolos en el primer y cuarto productor, respectivamente (FAOSTAT, 2024).

En México, los estados de Veracruz, Tamaulipas y Puebla se reportaron como los principales productores de naranja dulce con aproximadamente 146 mil, 13 mil y 12 mil hectáreas de área cosechada, respectivamente; de las cuales produjeron aproximadamente 1.8 millones, 230 mil y 140 mil toneladas, respectivamente (SIAP, 2024).

## 1.2. Enfermedades que merman la producción de naranja

Dentro de los problemas fitosanitarios que afectan al cultivo de naranja, y en general los cultivos cítricos, se encuentra la mancha negra de los cítricos, la tristeza de los cítricos, la leprosis de los cítricos, el cancro de los cítricos, la clorosis variegada de los cítricos y el huanglongbing (HLB). La mancha negra de los cítricos es una enfermedad fúngica causada por *Guignardia citricarpa*. La tristeza de los cítricos y la leprosis de los cítricos son enfermedades virales causadas por el Virus tristeza de los cítricos y Citrus leprosis virus, respectivamente. El cancro de los cítricos, la clorosis variegada de los cítricos y el HLB o dragón amarillo son enfermedades

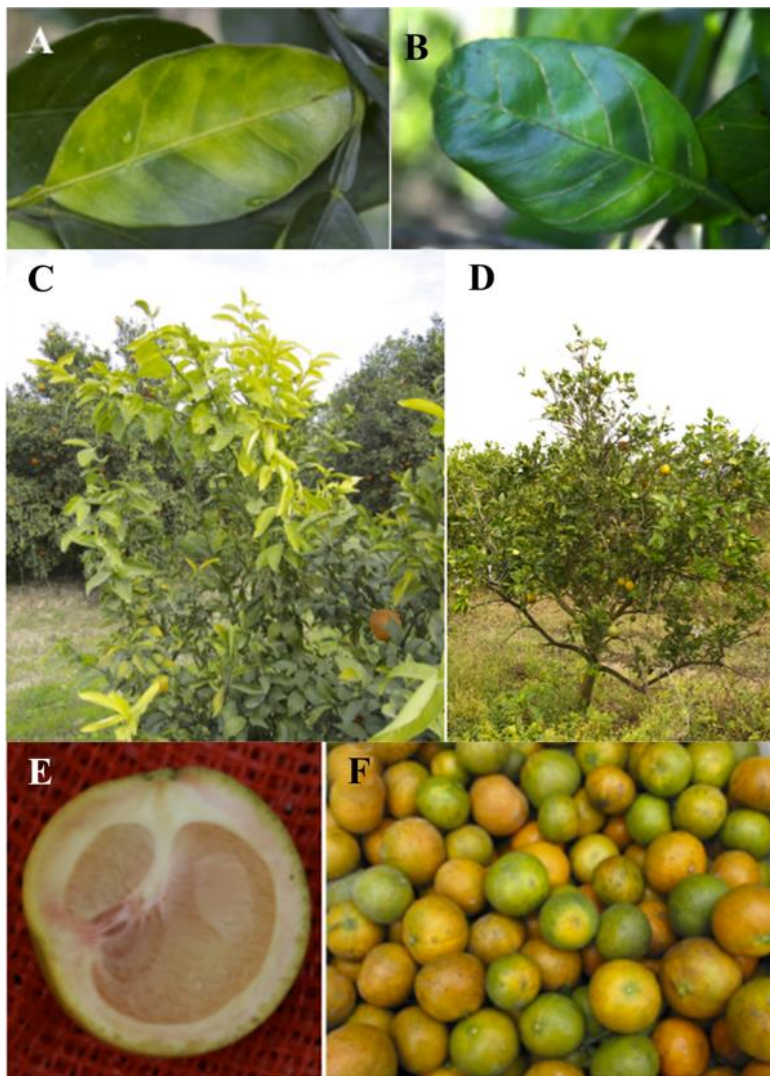
bacterianas causadas por *Xanthomonas citri*, *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* y *Candidatus Liberibacter* (CL) spp., respectivamente (Fernández, 2002; SENASICA, 2016, 2024).

### 1.3.El HLB o dragón amarillo

La enfermedad de HLB en naranja, y en general en los cítricos, es causada por especies de la bacteria CL spp. La especie *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) se encuentra ampliamente distribuido en África. Por su parte, la especie *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) se encuentra parcialmente distribuido en Brasil. En tanto que, la especie *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) se encuentra ampliamente distribuido en Asia, Norte América y parcialmente en África y Sudamérica (CABI, 2019; Ghosh et al., 2022; J. Zhang et al., 2023).

La bacteria CLaf se transmite mediante el vector *Trioza erytreae* (Del Guercio), mientras que las bacterias CLam y CLas se transmiten mediante el vector *Diaphorina citri* (Kuwayama) (SENASICA, 2016). La transmisión de CL spp., restringida a los tubos cribosos del floema, comienza con la inducción de la liberación de metil salicilato (MeSA) en plantas de cítricos para atraer el vector *Diaphorina citri* o *Trioza erytreae* para alimentarse del floema. Eventualmente, la bacteria CL spp. se dispersa en plantas sanas de cítricos mediante el vector *Diaphorina citri* o *Trioza erytreae* infectado (George et al., 2020; B. Hu et al., 2021; Martini et al., 2018). De igual manera, CL spp. puede ser transmitido larga distancia a través de material propagativo contaminado (SENASICA, 2016).

La sintomatología característica de la enfermedad de HLB son moteado en hojas, venas taponadas y manchas verdes aisladas, brotes y ramas amarillos, declive del árbol con dosel adelgazado y muerte regresiva de las ramas, semillas atrofiadas, frutos deformes y de coloración desigual (**Figura 1**) (Dzung & Rolshausen, 2019; Nehela & Killiny, 2020)



**Figura 1.** Sintomatología de la enfermedad de HLB en cítricos. A) Moteado en hojas. B) Venas taponadas y manchas verdes aisladas. C) Brotes y ramas amarillos. D) Declive del árbol con dosel adelgazado y muerte regresiva de las ramas. E y F) Frutos deformes y de coloración desigual (Dzung & Rolshausen, 2019).

#### **1.4. Métodos de control y prevención de HLB o dragón amarillo**

Actualmente, no existen métodos curativos para la enfermedad de HLB. Sin embargo, existen métodos de control y prevención para *CL* spp. causante de la enfermedad de HLB o para el vector *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* que transmiten la bacteria *CL* spp. Dentro de los



métodos de control y prevención enfocados a CL spp. se encuentran el uso de antibióticos (combinación de oxitetraciclina, penicilina y kasugamicina), el uso de termoterapia (someter las plantas de cítricos con HLB a temperaturas superiores a 40 °C durante 10 días), la inducción de genes de defensa de la planta a través del uso de brasinoesteroides (24-eBL), el uso cultivares de citrus resistentes (árboles de citrus modificados genéticamente con el gen AtNPR1), el uso tecnología de nano-emulsión y el uso compuestos orgánicos volátiles, entre otros (Munir et al., 201). Por otra parte, los métodos de control y prevención enfocados al vector son el uso de insecticidas (diflubenzurón, espinetoram, fenpropatrina, malatión, dimetoato, abamectina, imidacloprid, spiromesifen, sivanto prime, entre otros), el uso de control biológico (oviposición de *Tamarixia radiata* sobre las ninfas de *Diaphorina citri*) y el uso de control cultural (fertilización, destrucción de plantas infectadas y uso de material vegetativo certificado) (Munir et al., 2018; SENASICA, 2012, 2016). No obstante, estos métodos de control y prevención enfocados a la bacteria y al vector tienen éxito limitado debido a su poca eficiencia, baja viabilidad económica, fitotoxicidad, son medioambientalmente no adecuados, sociablemente no aceptados o de enfoque no sistémico (Munir et al., 2018; SENASICA, 2012, 2016). Por lo tanto, en este proyecto se tiene interés particular en la edición del gen de la proteína del floema 1 (*CsPPI6-1*) para proveer de movilidad al antimicrobiano Slp322 en el tejido vascular (floema) de la planta de naranja dulce.

### **1.5.Floema, vía para movilizar antimicrobianos peptídicos**

El sistema vascular de las plantas superiores se compone de dos tejidos conductores: xilema y floema. Los vasos del xilema se encarga del transporte y distribución de agua y minerales desde las raíces hasta las partes aéreas de la planta. Por otro lado, el floema tiene como papel en el

transporte y distribución de fotosintatos desde los tejidos fotosintéticos hasta los tejidos no fotosintéticos, así como en moléculas de señalización a larga distancia que coordinan el desarrollo de las plantas y las respuestas a señales externas (Lucas et al., 2013). En las angiospermas, el floema funcional se compone de elementos cribosos enucleados (SE) y células acompañantes nucleadas (CC) interconectadas a través de plasmodesmos ramificados (PD) especializados. Los PD participan en la entrega de nutrientes y moléculas de señalización en la corriente de translocación a larga distancia (Xoconostle-Cázares et al., 2016). Por consiguiente, en esta tesis doctoral es de relevancia la fisiología del tejido vascular (floema) para el aprovechamiento en la movilización del antimicrobiano Slp322 a través del transportador CsPP16-1 en la planta de naranja dulce.

### **1.6. CsPP16-1, transporte para la movilización de antimicrobianos peptídicos**

CmPP16 es una proteína de floema de 16-kDa de calabaza (*Cucurbita maxima*). El gen *CmPP16* se expresa en floema y tanto el mRNA como la proteína se localizan en los elementos cribosos (SE). Asimismo, CmPP16 puede interactuar con RNA independiente de su secuencia y es capaz de translocarlo de célula a célula y a tejidos distantes (Jiménez-López et al., 2024; Xoconostle-Cázares et al., 1999). Además, CmPP16 forma complejos proteína-proteína estables dentro de la savia del floema, probablemente viajando como hetero-complejos (Ham et al., 2009; Taoka et al., 2007). De igual manera, la sobreexpresión de *CmPP16* en calabaza induce tolerancia a la sequía, sugiriendo su papel en las respuestas al estrés a través de señalización a larga distancia (Ramírez-Ortega et al., 2014).

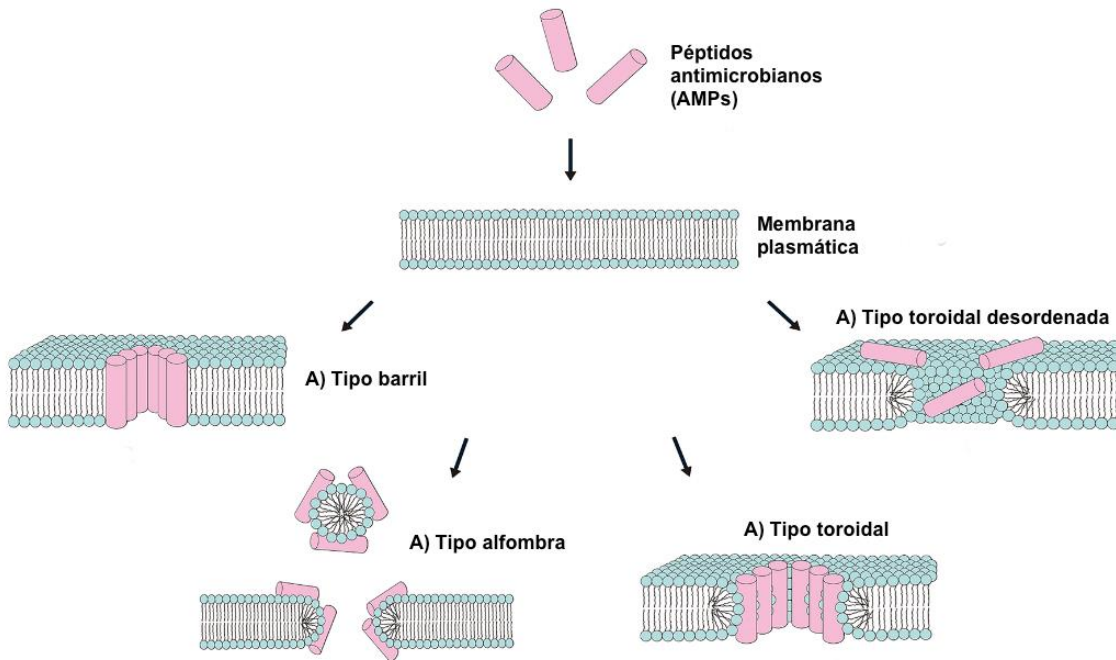
Por otra parte, *CsPP16-1* es un ortólogo de *CmPP16* en naranja dulce (*Citrus sinensis*). *CsPP16-1* puede transportar antimicrobianos peptídicos (magainina, cerocropina, lisozima y  $\beta$ -

defensina) fusionados traduccionalmente a la corriente de translocación del floema (Calderón-Pérez et al., 2022; Jiménez-López et al., 2024). Por lo anterior, en esta tesis doctoral CsPP16-1 es crucial como proteína de transporte para el antimicrobiano Slp322 en el sistema vascular (floema) de naranja dulce.

### **1.7.Slp322, antimicrobiano peptídico con capacidad para mitigar al dragón amarillo**

Las defensinas de las plantas son péptidos antimicrobianos (AMPs) pequeños (~5 kDa, de 45 a 54 aminoácidos), altamente estables y ricos en cisteína que constituyen una parte del sistema inmunológico innato dirigido principalmente contra patógenos fúngicos, pero también incluyen actividades inhibitorias de proteinasa y de amilasa de insectos y actividad antibacteriana (Stotz, Thomson, et al., 2009). El mecanismo de acción exacto de las defensinas como AMPs aún no ha sido dilucidado; sin embargo, se cree que sucede a través de su interacción con las membranas microbianas. Los AMPs cargados positivamente interactúan con las membranas celulares bacterianas cargadas negativamente (presencia de lípidos aniónicos como fosfatidilserina y cardiolipina), lo que lleva a la penetración de la membrana celular. De esta forma, se destruye el potencial de la membrana y el gradiente de pH, lo que afecta la regulación osmótica e inhibe la respiración celular, y causa la muerte celular. La interacción de los AMPs con las membranas microbianas puede ser de 4 maneras: tipo barril, tipo alfombra, tipo toroidal y tipo toroidal desordenada (**Figura 2**). En el mecanismo de tipo barril, los AMPs se insertan verticalmente en la bicapa, se unen y forman un poro, y estos péptidos se disponen en la cavidad del poro paralelos a las cadenas de fosfolípidos, permaneciendo perpendiculares al plano de la bicapa. En el mecanismo de tipo alfombra, los AMPs se adsorben en paralelo a la bicapa lipídica para cubrir la superficie

celular, lo que provoca la ruptura de la membrana. En el mecanismo de tipo toroidal, la molécula de AMP se adsorbe a la superficie de la bicapa y se transforma estructuralmente, la membrana se dobla y la molécula de AMP pasa a través de la bicapa para formar un poro. En el mecanismo de tipo toroidal desordenada, una vez que forma un poro aleatorio en la membrana plasmática, los lípidos se retuercen hacia adentro y las cavidades de los poros se organizan mediante grupos de cabezas de fosfolípidos. Los péptidos profundamente incrustados estabilizan los poros circulares rectos, mientras que los péptidos restantes se organizan en las aberturas de los poros y estabilizan la curvatura de la membrana (Li et al., 2021; Q.-Y. Zhang et al., 2021).



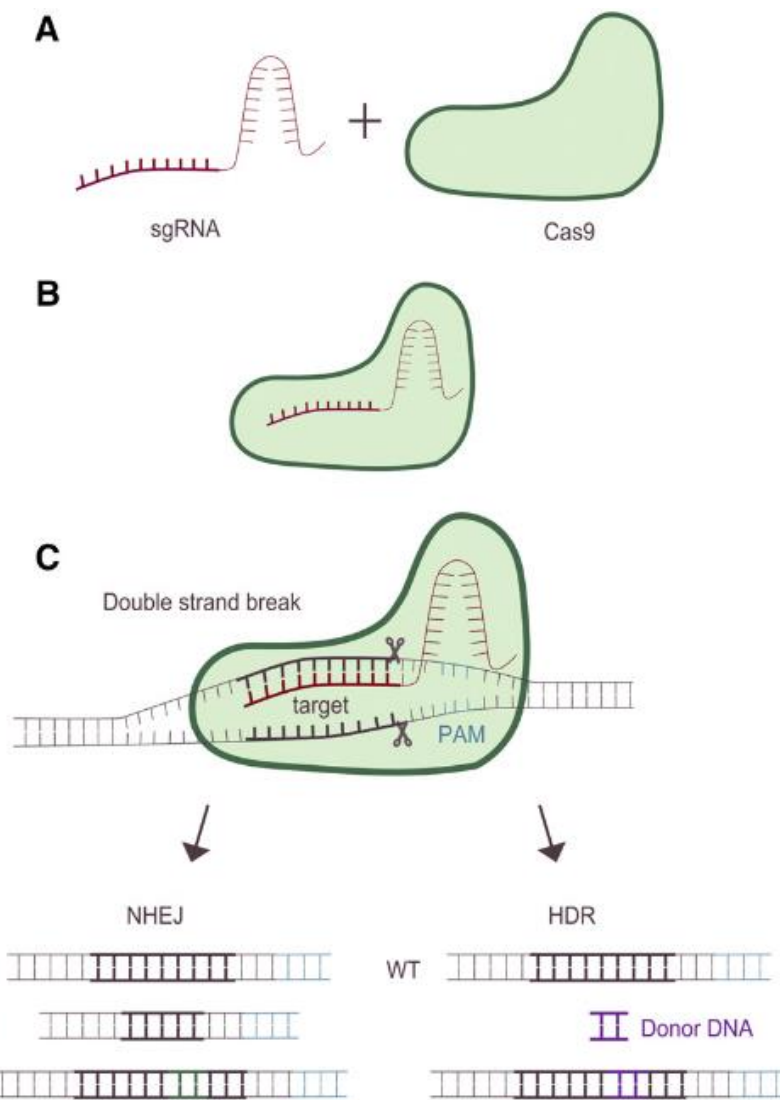
**Figura 2.** Los cuatro mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos (AMPs). A) Tipo barril: los péptidos se insertan verticalmente en la membrana plasmática para formar poros transmembrana. B) Tipo alfombra: los péptidos se adsorben en paralelo a la bicapa lipídica para cubrir la superficie celular, lo que provoca la ruptura de la membrana. C) Tipo toroidal: la molécula de AMP se adsorbe a la superficie de la bicapa y se transforma estructuralmente, la membrana se dobla y la molécula de AMP pasa a través de la bicapa para formar un poro. D) Tipo toroidal desordenado: la formación de poros es más aleatoria e implica menos péptidos, pero se requieren péptidos adicionales para estabilizar la apertura (Li et al., 2021).

Por otra parte, en cítricos transgénicos que expresan constitutivamente los péptidos antimicrobianos de *Spinacea oleracea* (So-D2/So-D7) son resistentes a HLB (*Candidatus Liberibacter* spp.) y al cancro de los cítricos (*Xanthomonas axonopodis* pv. citri) (Sathoff & Samac, 2018). Asimismo, el péptido antimicrobiano de *Solanum lycopersicum* (DEF2) es activo contra *Botrytis cinerea* y *Phytophthora infestans*, dos patógenos de la vid y especies de solanáceas, respectivamente (Stotz, Spence, et al., 2009). De igual manera, cítricos que expresan la fusión *CsPPI6-1* con magainina de *X. laevis*, cecropina de insecto, lisozima de humano,  $\beta$ -defensina de humano y algunas combinaciones de ellos tienen una reducción significativa del contenido vivo de CLas en comparación al grupo control. A pesar de que los péptidos antimicrobianos están presentes de manera natural en semilla, raíz, tallo, hoja y flores, los proteomas de exudados de savia de floema parecen carecer de estas proteínas (Calderón-Pérez et al., 2022). En consecuencia, en este proyecto doctoral se tiene el objetivo de fusionar el gen *Slp322* (péptido antimicrobiano) al gen *CsPPI6-1* (transportador) a través del sistema de CRISPR/Cas9.

## **1.8. Sistema de CRISPR/Cas9, herramienta para la creación de plantas de naranja dulce resistentes al dragón amarillo**

Para fines de edición génica, el sistema de CRISPR/Cas9 se compone de RNA guía única (sgRNA) y la endonucleasa Cas9 proveniente de *Streptococcus pyogenes*. El sgRNA y Cas9 forman un complejo de ribonucleoproteína (RNP) sgRNA-Cas9 que se une a la secuencia objetivo. En la secuencia objetivo es necesario la presencia de un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) de un tamaño de 2 a 6 pares de bases (pb). Si el sgRNA se hibrida con el DNA inmediatamente en 5' con respecto a un dominio PAM adyacente, la endonucleasa Cas9 creará una rotura de doble

cadena (DSB). Este DSB puede repararse mediante el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Esto, a su vez, puede dar lugar a pequeñas deleciones o inserciones (indeles) que alteran el gen objetivo y provocan la pérdida de su función. En su defecto, si hay un molde de ADN donante para la región objetivo, el DSB puede repararse mediante mecanismo de unión de extremos homólogos (HDR), lo que permite el reemplazo preciso de nucleótidos, la introducción de mutaciones o la inserción de secuencias en la región objetivo (**Figura 3**) (Karlgren et al., 2018; X. Liu et al., 2017).

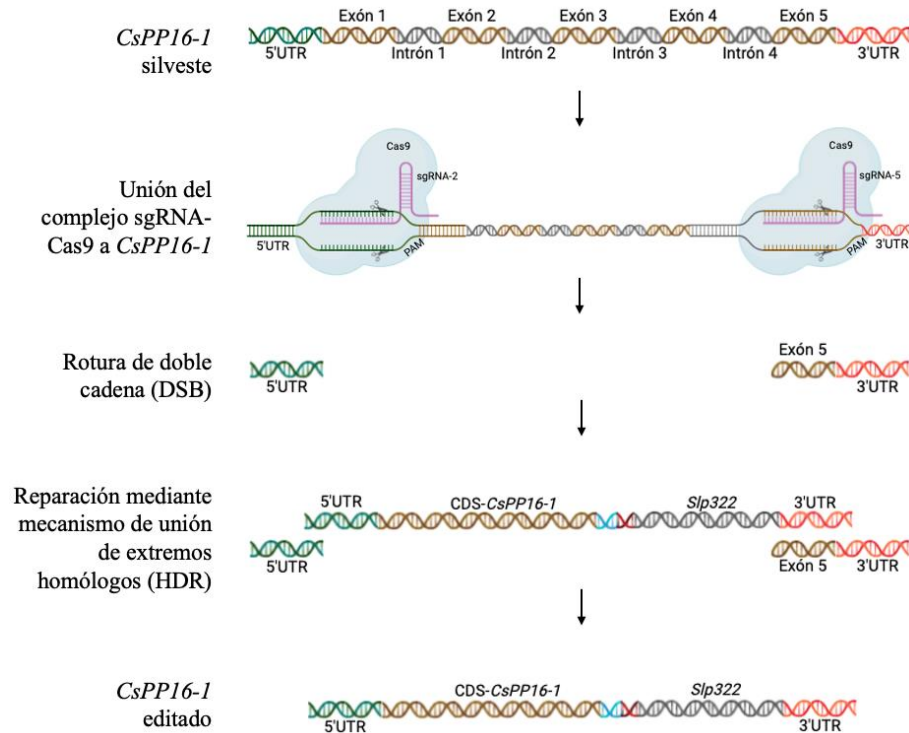


**Figura 3.** Descripción general del proceso de edición genética a través del sistema de CRISPR-Cas9.

A) Diseño de sgRNA. Este sgRNA consta de una parte que es específica para el DNA objetivo y otra que

interactúa con la endonucleasa Cas9. B) Formación del complejo sgRNA y Cas9. C) Unión del complejo sgRNA-Cas9 al DNA objetivo y si hay un PAM adyacente (imprescindible), Cas9 provocará una DSB del DNA tres pares de bases antes de la secuencia del PAM. Posteriormente, el DSB puede repararse mediante dos mecanismos diferentes: NHEJ o HDR. WT indica tipo silvestre (Karlgrén et al., 2018).

Por consiguiente, en este proyecto doctoral se tiene como idea central editar el genoma de la planta de naranja dulce a través del sistema de CRISPR/Cas9. En específico, se tiene como idea central editar el locus *CsPP16-1* de naranja dulce a través de dos sgRNA (un sgRNA dirigido a la región 5'UTR y otra en el exón 5) y la actividad endonucleasa Cas9. En su defecto, se espera que el DNA molde proporcionado (*5'UTR::CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322::3'UTR*) se integre en la doble rotura de doble cadena (DSB) a través del mecanismo de unión de extremos homólogos (HDR) (**Figura 4**). De este modo, *Slp322* permitirá combatir *CL* spp. restringida en el floema mediante la capacidad de movilidad de *CsPP16-1*.



**Figura 4.** Esquema general de la estrategia de edición de *CsPP16-1* a través del sistema de CRISPR/Cas9.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de que se ha demostrado la mitigación de HLB con plantas genéticamente mejoradas, la ley que regula su uso restringe su siembra. Por ello, se propone el uso de otra estrategia de mejoramiento, que consiste en el uso de edición de genes. Se pretende movilizar un péptido antimicrobiano al tejido vascular, mediante su fusión traduccional a una proteína transportada sistémicamente en floema.



### III. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Editar el genoma de naranja dulce (*Citrus sinensis*) para proveer de movilidad sistémica a antimicrobianos peptídicos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- 1) Realizar un análisis evolutivo y estructural de PP16 en especies de Viridiplantae.
- 2) Caracterizar la expresión de genes *CsPP16* en tejidos de la planta de naranja dulce.
- 3) Obtener plantas de naranja dulce que expresen la fusión de *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322* en el tejido vascular.
- 4) Analizar el transporte de *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322* con y sin TLS mediante agro infiltraciones en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La expresión de la proteína de transporte CsPP16-1 fusionada al péptido antimicrobiano Slp322 en el tejido vascular de naranja dulce contribuirá al control o mitigación de HLB.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Análisis estructural y evolutivo de PP16 en especies de Viridiplantae

#### 5.1.1. Identificación y recuperación de secuencias de proteínas PP16 en especies Viridiplantae

Para analizar la filogenia de los miembros de la familia de proteínas PP16 en Viridiplantae, se descargaron secuencias de aminoácidos homólogos de la base de datos Phytozome versión 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>) mediante una búsqueda BLAST usando la secuencia de proteína CmPP16-1 (número de acceso de GenBank: Q9ZT47.3) de *C. maxima* como consulta. Además, para tener una mayor fidelidad y recuperar secuencias que estaban relacionadas más lejanamente con los ortólogos de *CmPP16-1*, también se utilizaron las proteínas CmPP16-2 (AA96411.1) y CmPP16-1-like\_isoform-X1 (XP\_022991040.1) como secuencias de consultas en la base de datos de Phytozome.

#### 5.1.2. Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético

Las secuencias de la proteína PP16 descargadas se alinearon usando Clustal Omega versión 1.2.3 en modo local. El programa Jalview versión 1.0 se usó para analizar y editar el alineamiento de secuencias. Para encontrar el mejor modelo de DNA/Proteína para el árbol filogenético con el método de Máxima de Verosimilitud (ML) se usó el programa MEGAX versión 10.1.8. El análisis filogenético se realizó con 1000 réplicas del valor de bootstrap usando el modelo LG + distribución gamma con sitios invariables (G+I) y el modelo Jones-Taylor-Thornton para el método de Máxima Verosimilitud y Neighbor-Joining, respectivamente, y con 5 categorías gamma y delección completa en ambas filogenias. Las dos filogenias se analizaron y se editaron usando el programa EvolView v3 (<https://www.evolgenius.info/evolview/#login>). Las filogenias para las

clasificaciones taxonómicas convencionales se obtuvieron del servidor de taxonomía del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>)).

### **5.1.3. Reconstrucción del estado ancestral de ortólogos PP16**

Para la reconstrucción ancestral de PP16 se usaron secuencias de aminoácidos de ortólogos PP16 de las especies de Viridiplantae. El árbol filogenético se produjo usando estadística Bayesiana (<https://nbisweden.github.io/MrBayes/download.html>). Para este árbol, se utilizaron 10 millones de generaciones para construir la filogenia, con cadenas de parámetros = 4, printfreq = 1000, samplefreq = 100 y burnin = 200. El árbol se visualizó en el programa Mezquite (<https://www.mesquiteproject.org/>) y la reconstrucción de los caracteres ancestrales se llevó a cabo usando algoritmo de máxima parsimonia.

### **5.1.4. Determinación de motivos y generación de logos**

Para la búsqueda motivos conservados dentro de las secuencias de proteínas PP16 se usó Multiple EM for Motif Elicitation (MEME) implementado en el programa MEME Suite (University of Queensland, St. Lucia, Australia) versión 4.12.0 (<http://meme-suite.org/>) en modo local. Los parámetros de búsqueda para determinar el dominio-C2 fueron: valores de cero o uno por sitio por secuencia con 70 y 110 aminoácidos como tamaño de motivos mínimo y máximo, respectivamente. Para determinar los motivos adyacentes del dominio-C2 se usaron los siguientes parámetros: valores de cero o uno por sitio por secuencia con 6 y 110 aminoácidos como tamaño máximo y mínimo, respectivamente. En ambos casos se usó un valor de  $E < e^{-10}$  como el límite del valor. Para el análisis y búsqueda de dominios/motivos del grupo A y B se usó el programa Jalview versión 1.0.

### **5.1.5. Análisis de la estructura tridimensional de las proteínas PP16 mediante modelado por homología**

Para determinar la estructura tridimensional de las proteínas PP16: CmPP16-1, CmPP16-2, CmPP16-1-like\_isoform-X1, Cm\_XP\_022992698.1\_ERG1-like (XP\_022992698.1) y Cm\_XP\_022996373.1\_ERG3-like (XP\_022996373.1) de *C. maxima*, y CsPP16-1 (XP\_006486477.1), CsPP16-2 (XP\_006477594.2) y CsPP16-3 (XP\_006491029.1) de *C. sinensis* se usó el servidor AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>).

La PP16-1 de *Arabidopsis thaliana* (ID de acceso de Protein Data Bank: 5yq3) se utilizó como templado. El refinamiento de la estructura de los modelos de proteína PP16 se realizó por GalaxyWEB (<https://galaxy.seoklab.org/>). El análisis de las estructuras 3D de los modelos PP16 se realizó con el programa UCSF CHIMERA versión 1.17.3 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). Además, las regiones intrínsecamente desordenadas de los modelos de proteína PP16 se predijeron utilizando el servidor PREDICTER (<http://original.disprot.org/pondr-fit.php>).

### **5.1.6. Análisis de presión selectiva de genes PP16**

Para analizar la presión selectiva de los 104 genes PP16 en Viridiplantae, se descargaron secuencias de nucleótidos de la base de datos Phytozome versión 13 (<https://phytozomenext.jgi.doe.gov/>) mediante una búsqueda BLAST usando la secuencia de proteína CmPP16-1 (número de acceso en GenBank: Q9ZT47.3) de *C. máxima* como consulta. Posteriormente, secuencias de nucleótidos PP16 (codones de paro previamente eliminados) se alinearon usando CLUSTAL del programa MEGA versión 11.0.11. Finalmente, el alineamiento de secuencias de nucleótidos se usó para el análisis de selección positiva mediante los métodos

BUSTED, MEME y FUBAR del servidor Datamonkey (<http://datamonkey.org/>). El método GARD (un algoritmo genético para detección de recombinación) del servidor de Datamonkey (<http://datamonkey.org/>) se usó previamente para analizar la recombinación.

## **5.2. Caracterización de la expresión de genes *CsPP16* en tejidos de la planta de naranja dulce**

### **5.2.1. Extracción de muestras de RNA de tejidos de la planta de naranja dulce**

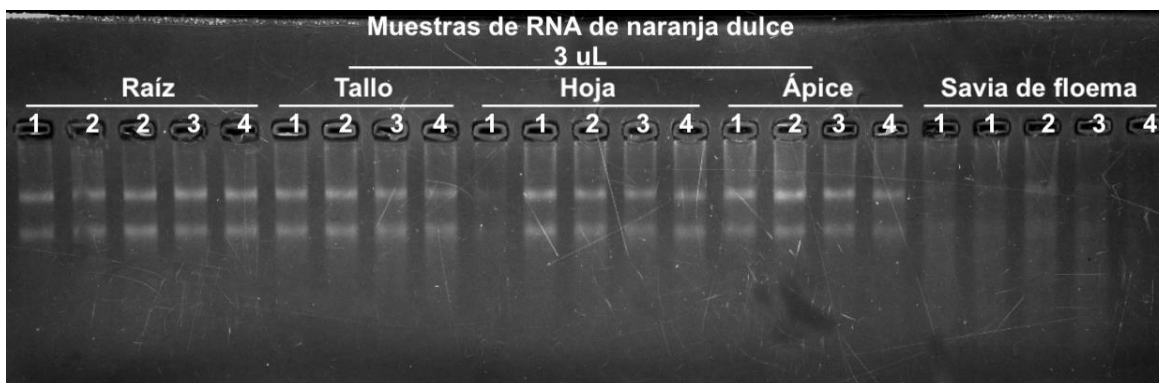
Para el análisis de expresión de genes *PP16* se usaron aproximadamente 50 mg de muestras de raíz, tallo, hoja sin nervadura principal, ápice y aproximadamente 100 µL de savia de floema de plantas de naranja dulce “Valencia” de dos años injertadas en el portainjerto *Citrus volkameriana* y crecidas bajo condiciones de invernadero a 25-30 °C. El RNA total de los cinco tipos de muestras se extrajeron con el Kit Direct-zol™ RNA MiniPrep de acuerdo con las instrucciones del fabricante ([https://files.zymoresearch.com/protocols/r2050\\_r2051\\_r2052\\_r2053\\_direct-zol\\_rna\\_miniprep.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/r2050_r2051_r2052_r2053_direct-zol_rna_miniprep.pdf)). Para las muestras de RNA de savia de floema se extrajeron mediante la técnica de centrifugación (Hijaz & Killiny, 2014; Killiny, 2019). Finalmente, todas las muestras se trataron con DNAsa I de acuerdo con las instrucciones del fabricante ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fbrochures%2Fcoa\\_en0521.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fbrochures%2Fcoa_en0521.pdf)).

### **5.2.2. Análisis de la acumulación del mRNA de genes *CsPP16* mediante RT-PCR de punto final y RT-qPCR**

Una vez extraído las muestras de RNA de los cinco tejidos de naranja dulce con el Kit Direct-zol RNA Miniprep

(<https://files.zymoresearch.com/protocols/ r2050 r2051 r2052 r2053 direct->

[zol\\_rna\\_miniprep.pdf](#)), se procedió a cuantificar mediante el equipo de Nanodrop One (todas las muestras se ajustaron a 50 ng/uL) y la integridad de estas se visualizaron en un gel desnaturalizante (**Figura 5**). Posteriormente, se realizó una PCR con transcripción inversa (RT-PCR) de punto final. En la **Tabla 1, 2 y 3** se muestra la mezcla de reacción para RT-PCR de punto final, las condiciones de amplificación y los oligonucleótidos utilizados, respectivamente. Finalmente, se procedió a llevar a cabo la RT-PCR en tiempo real. La mezcla de reacción para RT-PCR en tiempo real y las condiciones de amplificación se muestran en la **Tabla 4 y 5**.



**Figura 5.** Perfil electroforético de RNA de diferentes tejidos de naranja dulce en gel de agarosa al 1%. Los números del 1 al 4 indican cuatro plantas diferentes.

<b>Tabla 1.</b> Mezcla de reacción para RT-PCR de punto final	
<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (1 rxn)</b>
2X Reaction Mix	6.25 uL
Oligonucleótido Fw(10 uM)	0.5 uL
Oligonucleótido Rv (10 uM)	0.5 uL
Agua destilada estéril	4 uL
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	0.25 uL
RNA templado (50 ng/uL)	1 uL
<b>Total</b>	<b>12.5 uL</b>

**Tabla 2.** Condiciones de amplificación para RT-PCR de punto final

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura/Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Síntesis de cDNA	50 °C/30'	1
Pre-desnaturalización	94 °C/2'	
Desnaturalización	94 °C/20''	40
Alineación	62 °C/30''	
Extensión	72 °C/45''	
Extensión final	72 °C/5'	1

**Tabla 3.** Oligonucleótidos para RT-PCR de punto final y en tiempo real

<b>No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Producto (pb)</b>
1	qPCR-CsPP16-F	TGGTGAAGCCACAATCTATG	55	75
	qPCR-CsPP16-R	CGAGAATGTAGTTCAGCAGTTC	55	
2	qPCR_Cs1g046962_F	TTGCATCAGGACAAGGAACG	58.4	148
	qPCR_Cs1g046962_R	TGCAGCGGAATGATTGCTTC	58.4	
3	E4_Cs1g037768_F	AGCCTTTGTTTCATGGAAGGAAGCC	62	105
	E4_Cs1g037768_R	TCGGGTGTGAAAGTAAGGCCAAC	61	
4	qPCR-CsGADPH-F	TCTTGCCTGCTTTGAATGGA	56	80
	qPCR-CsGADPH-R	TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT	55	

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para RT-PCR en tiempo real

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (1 rxn)</b>
H <sub>2</sub> O Mili-Q estéril	3.2 uL
Kapa SYBR Fast qPCR Master Mix	5 uL
Oligonucleótido Fw (10 uM)	0.2 uL
Oligonucleótido Rv (10 uM)	0.2 uL
Rox High	0.2 uL
Kapa RT Mix	0.2 uL
RNA	1 uL (50 ng/uL)
<b>Total</b>	<b>10 uL</b>



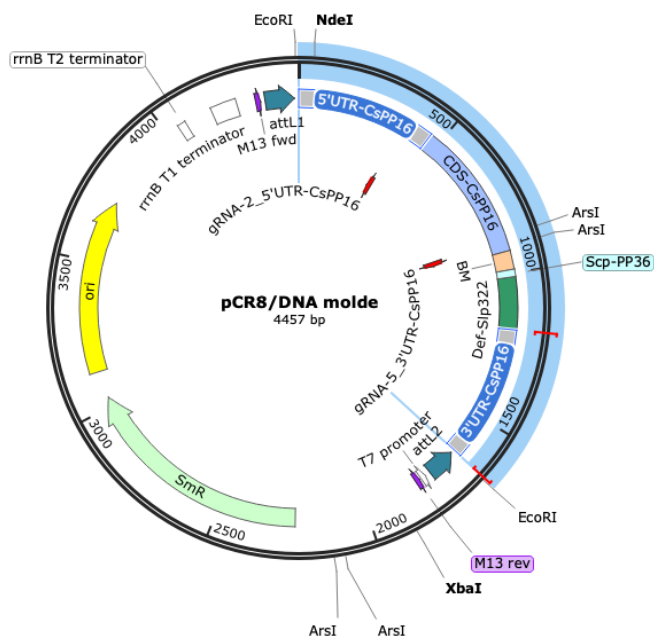
**Tabla 5.** Condiciones de amplificación para RT-PCR en tiempo real

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura/Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Síntesis de cDNA	42 °C/5'	1
Desactivación de RT	95 °C/5'	
Desnaturalización	95 °C/5''	40
Alineación/Alineación	60 °C/20''	
Curva de disociación (melting)	95 °C/15'' 60 °C/1'	1

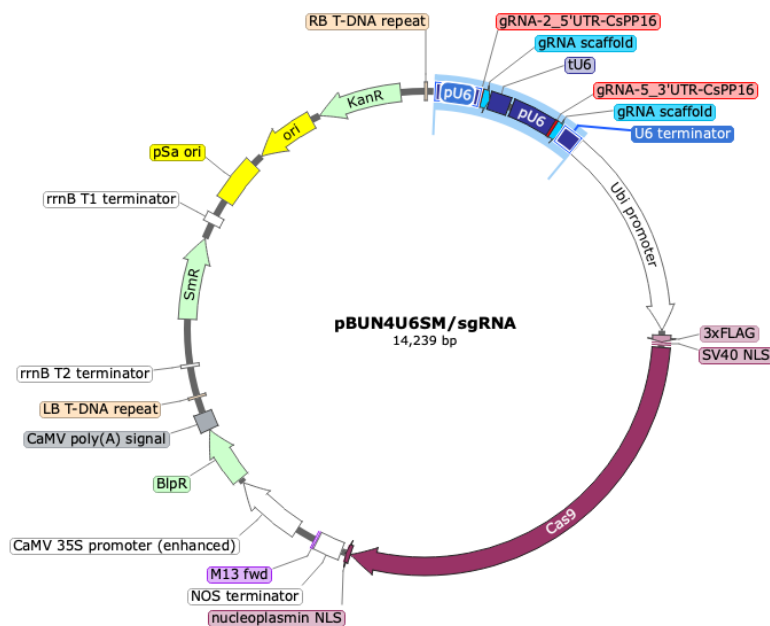
### **5.3. Obtención de plantas de naranja dulce que expresen la fusión de *CsPPI6-1::BM::ScpPP36::Slp322* en el tejido vascular**

#### **5.3.1. Vectores de expresión pCR8/DNA molde y pBUN4U6SM/sgRNA**

En este trabajo doctoral se partió de dos vectores construidos anteriormente por parte del equipo de Laboratorio 24 de Biotecnología Vegetal del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN. En un vector denominado pCR8 contiene el DNA molde (la región 5'UTR del gen *CsPPI6-1* como brazo de recombinación homóloga 5', el marco de lectura abierto del gen *CsPPI6-1*, una bisagra molecular, el sitio de corte de la proteasa PP36, la secuencia de la defensina antimicrobiana *Slp322* y la región 3'UTR del gen *CsPPI6-1* como brazo de recombinación homóloga 3') (**Figura 6**). En un segundo vector denominado pBUN4U6SM contiene dos sgRNA, uno dirigido a la región 5'UTR del gen *CsPPI6-1* y otro dirigido en el exón 5 del gen *CsPPI6-1*. Los sgRNA permiten generar dos roturas y reemplazar el gen *CsPPI6-1* de naranja dulce por el DNA molde (*5'UTR::CsPPI6-1-ORF::BM::ScpPP36::Slp322::3'UTR*) (**Figura 7**).



**Figura 6.** Vector pCR8/DNA molde. La parte sombreada de color azul muestra el DNA molde (*5'UTR::CsPP16-1-ORF::BM::ScpPP36::Slp322::3'UTR*). Los rectángulos de color rojo indican los sitios de los dos sgRNA (*gRNA-2\_5'UTR-CsPP16* y *gRNA-5\_3'UTR-CsPP16*).



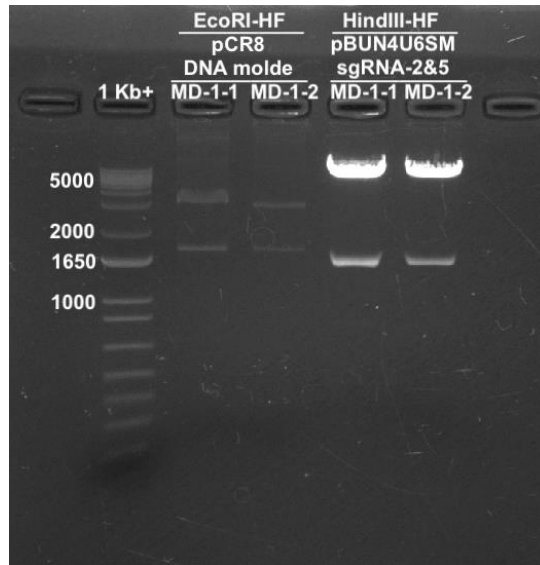
**Figura 7.** Vector pBUN4U6SM/sgRNA. La parte sombreada de color azul muestra los dos sgRNA (*gRNA-2\_5'UTR-CsPP16* y *gRNA-5\_3'UTR-CsPP16*) flanqueadas por el promotor y el terminador U6.

### 5.3.2. Comprobación de pCR8/DNA molde y pBUN4U6SM/sgRNA mediante enzimas de restricción y secuenciación Sanger

Anteriormente, el equipo del Laboratorio 24 de Biotecnología Vegetal del DByB del CINVESTAV-IPN ya había comprobado la presencia del DNA molde y los sgRNA en el vector pCR8 y pBUN4U6SM, respectivamente, mediante enzimas de restricción y secuenciación Sanger. No obstante, nuevamente se extrajeron muestras de DNA plasmídico mediante ZR Plasmid Miniprep-Classic ([https://files.zymoresearch.com/protocols/d4015\\_d4016\\_d4054\\_zr\\_plasmid\\_miniprep.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/d4015_d4016_d4054_zr_plasmid_miniprep.pdf)) y se decidió volver a digerir con enzimas de restricción y secuenciar para tener una mayor certeza de lo que se está trabajando (**Anexo 1 y Anexo 2**). La **Tabla 6** muestra la mezcla de reacción de digestión y el cálculo de tamaño de las bandas esperadas para el vector pCR8 con/sin DNA molde y pBUN4U6SM con/sin sgRNA, respectivamente. En la **Figura 8** se muestra el perfil electroforético de las digestiones para pCR8/DNA molde y pBUN4U6SM/sgRNA, respectivamente.

**Tabla 6.** Reacción de digestión para pCR8/DNA molde y pBUN4U6SM/sgRNA

pCR8/DNA molde		pBUN4U6SM/sgRNA	
Reactivos	Cantidad (1 rxn)	Reactivos	Cantidad (1 rxn)
Agua destilada estéril	2.5 uL	Agua destilada estéril	3.5 uL
Buffer CutSmart	1 uL	Buffer CutSmart	1 uL
EcoRI-HF	0.5 uL	HindIII-HF	0.5 uL
DNA (~100 ng/uL)	6 uL	DNA (~250 ng/uL)	5 uL
<b>Total</b>	<b>10 uL</b>	<b>Total</b>	<b>10 uL</b>
pCR8+DNA molde = 2,799/1,658 pb pCR8–DNA molde = 2,799/0 pb		pBUN411U6.1+sgRNA = 12,773/1,466 pb pBUN411U6.1-sgRNA = 11,448/1,919 pb	



**Figura 8.** Perfil electroforético de pCR8/DNA molde y pBUN4U6SM/sgRNA digeridos con EcoRI-HF y HindIII-HF, respectivamente. Las bandas de 2799/1658 pares de bases (pb) y 12773/1466 pb corresponden a los esperados para el vector pCR8/DNA molde y pBUN4U6SM/sgRNA, respectivamente.

### 5.3.3. Preparación de medios para el cultivo *in vitro* de naranja dulce

En la **Tabla 7** se muestran los diferentes medios utilizados para el cultivo *in vitro* de semillas y explantes posterior a la transformación por el método de biolística. El medio MS se utilizó para la siembra de semillas de naranja dulce. Los medios MS-BAP (MSB) y MS-Manitol (MSM) de pretratamiento osmótico alto se utilizaron como medios de cultivo de explantes previo a la transformación por el método de biolística. Los medios RM, RMG y RMM se utilizaron como medios de regeneración, elongación y enraizamiento, respectivamente, de los explantes una vez que han sido transformados por el método de biolística. Los antibióticos de amplio espectro (cefotaxima y ampicilum/meropenem) se usaron de manera opcional en los diferentes medios de cultivo *in vitro*.

**Tabla 7.** Medios MS para cultivo *in vitro* de semillas y explantes

	MS	MSB	MSBM	RM	RMG	RMM
<b>Reactivos</b>	<b>1 L</b>	<b>1 L</b>	<b>1 L</b>	<b>1 L</b>	<b>1 L</b>	<b>1 L</b>
Solución I 20X	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Solución II 100X	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Solución III 50X	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
Sacarosa	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
Manitol (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> ) 0.4-M	-	-	72.86 g	-	-	-
MES	-	-	-	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Carbón activado	-	-	-	-	-	0.5 g
Agua destilada	920 mL	920 mL	920 mL	920 mL	920 mL	
pH 5.8						
Phytigel	3.5 g	3.5 g	3.5 g	3.5 g	3.5 g	3.5 g
Esterilizar						
Vitaminas	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Myo-Inositol	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Bencilaminopurina (BAP) 22.2 uM (5 mg/L, 1 mg/mL de stock)	-	5 mL	5 mL	3 mL	1 mL	-
Ácido naftalenacético (NAA) 0.1 uM (0.02 mg/L, 1 mg/mL de stock)	-	-	-	500 uL	-	20 uL
Ácido giberélico (GA3) 2.89 uM (1 mg/L, 1 mg/mL de stock)	-	-	-	-	1 mL	1 mL
*Cefotaxima (100 mg/L, 100 mg/mL de stock)	-	-	-	1 mL	1 mL	1 mL
*Amplium/Meropenem (100 mg/L, 100 mg/mL de stock)	-	-	-	1 mL	1 mL	1 mL

#### 5.3.4. Transformación de explantes de naranja dulce mediante el método de biolística y microinjertaciones en *Citrus aurantium*

En primera instancia, los epicótilos de naranja dulce (crecidos en medio MS durante 1 ~mes en obscuridad y 7 días en luz, ambos a 24 °C) se cortan (cortes diagonales en los extremos terminales para un área de superficie mayor) en explantes a 1 cm de longitud (4 días antes de la

transformación) y se colocan en medio MS suplementado con BAP 22.2 uM (5 mg/L) (MSB). Posteriormente, los explantes (4 horas antes de la transformación) se transfieren en medio MSB suplementado con 0.4-M (72.8688 g/L) de manitol para pretratamiento osmótico alto. Seguidamente, los explantes se acomodan en forma de racimos en una tapa de plástico estéril con los extremos terminales expuestos para el bombardeo mediante el equipo biolística.

Por otra parte, en el mismo día o en un día diferente de la transformación de los explantes se preparan partículas de oro. Para esto se colocan 15 mg de partículas de oro de 1 mm en un tubo de 1.5 mL. Seguidamente, se adiciona 500 uL de etanol al 100% frío (en campana), se sonica las partículas de oro hasta que estén completamente dispersas y se precipita levemente. Posteriormente, se centrifuga por 3000 rpm durante 1 minuto y se remueve el sobrenadante (2X lavado). Acto seguido, se adiciona 1 mL de agua MilliQ estéril fría por las paredes del tubo, se resuspende las partículas con el vortex y se precipita levemente. Posteriormente, se centrifuga a 5000 rpm durante 15-30 segundos y se remueve el sobrenadante (3X). Finalmente, se resuspende las partículas en 500 uL de agua MilliQ estéril fría, se sonica para homogenizar completamente la mezcla, se realizan alícuotas de 50 uL (1.5 mg = 1X) y se almacena a -20 °C.

Por otra parte, en el mismo día de la transformación de explantes, se adiciona 5 uL de DNA plasmídicos (pCR8/DNA molde y pBUN411U6.1/sgRNA) a una concentración de 500 ng/uL, 50 uL de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a una concentración de 2.5 M (6.93625 g/0.025L) y 20 uL de espermidina base libre 0.1 M a la alícuota de partículas de oro (homogenizar suavemente) y se sonica para homogenizar completamente la mezcla. Posteriormente, se centrifuga a 5000 rpm durante 15 segundos y se remueve el sobrenadante. Seguidamente, se adiciona 600 uL de etanol absoluto frío y se sonica para homogenizar completamente la mezcla (limpieza). Posteriormente,

se centrifuga a 5000 rpm durante 15 segundos y se remueve el sobrenadante. Finalmente, se adiciona 75 uL de etanol absoluto frío (volumen que servirá para un total de 2 disparos).

Acto seguido, los explantes de naranja dulce (acomodados en forma de racimos en una tapa de plástico estéril con extremos terminales expuestos) se bombardea con las partículas de oro (cubiertas con los plásmidos pCR8/DNA molde y pBUN411U6.1/sgRNA) mediante el equipo de biolística Bio-Rad PDS100/He con discos de ruptura de 1550 psi, a una distancia de 6 cm y en una cámara de vacío de 27.5 Hg). Seguidamente, los explantes bombardeados se acomodan en medio RM durante ~1 mes en oscuridad y ~1 mes en condiciones de luz a ~24 °C (cámara de crecimiento). Posteriormente, los explantes se transfieren en medio RMG, luego en medio RMM, cada tratamiento durante ~1 mes en condiciones de luz a ~24 °C.

Finalmente, dado que los explantes de naranja dulce bombardeados no generaron raíces (en medio RMM), se llevaron a cabo microinjertaciones en *C. aurantium*. La microinjertación consiste en introducir cuidadosamente el meristemo apical o axilar de los brotes de los explantes (como injertos) en la pequeña escisión longitudinal del portainjerto naranja agria (segmento de raíz y de tallo removido previamente). Seguidamente, los microinjertos se dejan crecer en medio MS líquido durante ~1 mes en condiciones de luz a 24 °C (cámara de crecimiento). Posteriormente, los microinjertos (meristemo desarrollado y presencia de hojas) se transfieren a tierra y se dejan en condiciones de luz a 24 °C y finalmente en condiciones de invernadero (~30 °C).

### **5.3.5. Análisis de explantes transformadas y microinjertos mediante técnica moleculares**

En primera instancia, se extrajeron DNA genómico con el método CTAB tomando como muestras dos hojas de los brotes de los explantes transformados o una hoja en el caso de los microinjertos. Seguidamente, se realizaron análisis mediante la técnica de reacción en cadena de

la polimerasa (PCR) para determinar la presencia del DNA molde (*5'UTR::CsPP16-1-ORF::BM::ScpPP36::Slp322::3'UTR*), así como un fragmento del gen que codifica para Cas9 en el genoma de los explantes transformados e microinjertos. En la **Tabla 8, 9, 10 y 11** se muestra la mezcla de reacción para PCR (para análisis de explantes), PCR múltiple (para análisis de microinjertos), las condiciones de amplificación y los oligonucleótidos utilizados, respectivamente. Para el análisis de explantes transformados mediante la T7 Endonucleasa I (T7EI), se siguió las instrucciones del fabricante (<https://www.neb.com/en/protocols/2014/08/11/determining-genome-targeting-efficiency-using-t7-endonuclease-i>). En la **Tabla 11**, el número 5 y 6 se muestran los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región 5' y 3' para su posterior uso con la enzima T7EI. Asimismo, se realizó análisis de la edición del locus *CsPP16-1* (región 5' y 3') de los microinjertos mediante secuenciación Sanger.

**Tabla 8.** Mezcla de reacción para PCR en explantes

Reactivos	Cantidad (1 rxn)
Buffer PCR 10X	1 uL
MgCl <sub>2</sub> 50 uM	0.3 uL
dNTPs 10 uM	0.2 uL
SLP322-ORF-F 10 uM	0.2 uL
Bra3'CsPP16-R 10 uM	0.2 uL
Agua destilada estéril	7 uL
DNA Polimerasa Taq Platinum	0.1 uL
DNA templado <500 ng/rxn	1 uL
<b>Total</b>	<b>10 uL</b>

**Tabla 9.** Mezcla de reacción para PCR múltiple en microinjertos

Reactivos	Cantidad (1 rxn)
Buffer PCR 10X	1 uL
MgCl <sub>2</sub> 50 uM	0.3 uL
dNTPs 10 uM	0.2 uL



PromCsPP16-755pb-F 10 uM	0.2 uL
SLP322-ORF-R 10 uM	0.2 uL
CsPP16-ORF-FOR 10 uM	0.2 uL
SLP322-ORF-R 10 uM	0.2 uL
ZCas9-F Fw 10 uM	0.2 uL
ZCas9-R Rv 10 uM	0.2 uL
Agua destilada estéril	6.2 uL
DNA Polimerasa Taq Platinum	0.1 uL
DNA templado <500 ng/rxn	1 uL
<b>Total</b>	<b>10 uL</b>

**Tabla 10.** Condiciones de amplificación para PCR y PCR múltiple

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura/Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Pre-desnaturalización	94 °C/2'	
Desnaturalización	94 °C/30''	35
Alineación	63 °C/30''	
Extensión	72 °C/2.30'	
Extensión final	72 °C/5'	1

**Tabla 11.** Oligonucleótidos para PCR y PCR múltiple

<b>No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Producto (pb)</b>
1	SLP322-ORF-F	GAGATGGGTCCAAC TAGAATTGTTGAGGC	63	629
	Bra3A'-CsPP16-R	GCAACAGAGCATGAGCAGCGTTTCAGAATC	62	
2	PromCsPP16-755bp-F	GCATTGCACGAACTTGAGGTGAC	62	1452
	SLP322-ORF-R	CTAGCATGGCTTAGTGCAAAGCA	58	
3	CsPP16_ORF_FOR	ATGGCTATTGGGTTGTTGGAAGTACTTC	67.2	723
	SLP322-ORF-R	CTAGCATGGCTTAGTGCAAAGCA	58	
4	ZCas9_F	CGGCCTCGATATGGGACTAACTCT	68	430
	ZCas9_R	CTTATCTGTGGAGTCCACGAGCTTC	68	
5	Prom-CsPP16-F	GCATTGCACGAACTTGAGGTGAC	62	729
	Bra5A'-CsPP16-R	CTTCTTCCTCAGCTAAGCCAAAGCTTTCAC	64	
6	CsPP16-ORF-FOR	ATGGCTATTGGGTTGTTGGAAGTACTTC	61	3291
	CsPP16-3'UTR	GGAAAGGAATGAAAGATCGTGGGTGGT	62	

## **5.4. Análisis del transporte de *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322* con y sin TLS mediante agroinfiltraciones en plantas de *Nicotiana benthamiana***

### **5.4.1. Construcciones para el análisis de movilidad de *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322* con y sin TLS**

Para el análisis de movilidad de *CsPP16-1* se usaron las construcciones (transformadas en la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*) que se muestran en la **Tabla 12**. Las construcciones 1 y 3 se ensamblaron mediante el sistema de clonación *in vivo* (García-Nafría et al., 2016). En primera instancia, se diseñaron oligonucleótidos directo y reverso con modificaciones (secuencia de TLS en color gris) que amplifican el vector pCR8/DNA molde completo con la secuencia de TLS (**Tabla 13**). Seguidamente, se llevó a cabo una PCR con la enzima DNA Polimerasa Phusion (**Tabla 14**) con las condiciones de amplificación que se muestra en la **Tabla 15**. Acto seguido, 5 uL del producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1%, después 15 uL de producto de PCR se digirió con 1 uL de DpnI (<https://www.neb.com/en/products/r0176-dpni>) y seguidamente 5 uL de producto de PCR se transformó en 50 uL de células competentes de *E. coli* TOP10 a través de choque térmico (42 °C durante 42''). Las colonias de *E. coli* transformadas se analizaron con EcoRI/FastDigest EcoRI con bandas esperadas de 1709 y 1735 para la construcción 1 (...TLS-Short) y 3 (...TLS-1), respectivamente. Posteriormente, el vector de entrada pCR8/DNA molde con TLS-Short y TLS-1 se linealizaron con PvuI, después se recombinaron (previamente purificada con el kit de recuperación de DNA en gel Zymoclean; [https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d4001t\\_d4001\\_d4002\\_d4007\\_d4008\\_zymoclean\\_gel\\_dna\\_recovery\\_kit.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4001t_d4001_d4002_d4007_d4008_zymoclean_gel_dna_recovery_kit.pdf)) en el vector de destino pB7FWG,0 (**Tabla 16**) y seguidamente se transformaron en 50 uL de células competentes de *E. coli* TOP10. Las colonias de *E. coli* transformadas se analizaron con EcoRI/FastDigest EcoRI con bandas esperadas de 1709 y 1735

para la construcción 1 y 3, respectivamente. En el **Anexo 3** y **4** muestra el resultado de la secuenciación Sanger para la construcción 1 (en el vector pB7FWG,0) y 3 (en el vector pCR8 previo a la recombinación en el vector pB7FWG,0). Finalmente, 3 uL (162 ng/uL) de la construcción 1 y 3 se transformaron en AGL1, y las colonias se analizaron mediante PCR de colonias (**Tabla 17**). Los oligonucleótidos y condiciones de amplificación utilizados se muestran en la **Tabla 13** y **18**, respectivamente.

La construcción 2 fue proporcionado por parte del Laboratorio 24 de Biotecnología Agropecuaria del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-Zacatenco. La construcción 4, 5 y 6 fue proporcionado por parte del grupo de investigación “Transporte Macromolecular Intercelular de Fisiología Molecular de Plantas del Instituto Max Planck. La expresión de *Cas9::TLS-1* de la construcción pCAMBIA1305.1-CaMV-35S::GUS::TNOS se induce con estradiol a 5 uM o hasta 50 uM. Por ende, se debe agregar 20 uL de estradiol a 50 mM en 20 mL de medio de agroinfiltración para concentración final de 50 uM. La solución stock de estradiol a 50 mM se prepara con 25 mg en 1.83 mL de etanol al 95%.

**Tabla 12.** Construcciones para el análisis de movilidad de *CsPP16::Slp322* con y sin TLS

No.	Construcciones	Selección de antibióticos
1	pB7FWG,0-pCsPP16-463pb::CsPP16-1::BM::Scp326::Slp322::TLS-Short-12-3::3'UTR	Sp/Rf
2	pB7FWG,0-pCsPP16-1000pb::CsPP16-1::BM::Scp326::Slp322::GFP::T35S	Sp/Rf
3	pB7FWG,0-pCsPP16-463pb::CsPP16-1::BM::Scp326::Slp322::TLS-1-OK-12-2::3'UTR	Sp/Rf
4	pMDC-CaMV-35S::Cas9-TLS-1::T35S	Sp/Rf
5	pCAMBIA1305.1- CaMV-35S::GUS::TNOS	Km/Rf
6	pMDC32-CaMV-35S:-mCherry::TNOS	Km/Rf

La abreviación Sp, Rf y Km indica espectinomycin, rifampicina y kanamicina, respectivamente. Los tres antibióticos tienen una concentración de 50 mg/mL.

**Tabla 13.** Oligonucleótidos para PCR

No.	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	Producto (pb)
1	pCR8-DONOR-TLS-F	GGAAGCGTGGTGGGCCATAACCCACA GGTCCCACCTCTCTTAACCTTCTC	74	4524 (construcción 1)
	pCR8-DONOR-TLS-R	GGCCACCACGCTTCCGCTGCGCCACTC TGATACTAGCATGGCTTAGTG	77	
2	TLS-1-Fw	GTGGTGGGCCATAACCCACAGGTCCCA GGATCGAAACCTGGCTCTGATATCGACT CTCTTAACCTTCTCTAC	75	4551 (construcción 3)
	TLS-1-Rv	GGTTATGGGCCACCACGCTTCCGCTGC GCCACTCTGATACTAGCATGGCTTAGTG	77	
3	TLS-F	TATCAGAGTGGCGCAGCGGAAGCGTGG TGGGCCCA	77	1199 (construcción 1)
	GFP-R	CGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAG GG	71	
4	TLS-1-Fw	GTGGTGGGCCATAACCCACAGGTCCCA GGATCGAAACCTGGCTCTGATATCGACT CTCTTAACCTTCTCTAC	75	1273 (construcción 3)
	FK261-EGFP-Rv	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	61	

**Tabla 14.** Mezcla de reacción para PCR

Reactivos	Cantidad (1 rxn) Para construcción 1	Cantidad (1 rxn) Para construcción 3
Buffer HF Phusion Green 5X	1 uL	1 uL
Mezcla de dNTP 2 mM cada uno	0.2 uL	0.2 uL
pCR8-DONOR-TLS-F 10 uM	0.5 uL	
pCR8-DONOR-TLS-R 10 uM	0.5 uL	
TLS-1-Fw 10 uM		0.5 uL
TLS-1-Rv 10 uM		0.5 uL
Agua destilada estéril	4.7 uL	4.7 uL
DNA Polimerasa Phusion	0.1 uL	0.1 uL
DNA templado		
pCR8-DONOR-11 = ~10.3 ng/uL (para construcción 1)	2 uL	
pCR8-DONOR-TLS-6 = ~8.2 ng/uL (para construcción 3)		2 uL
<b>Total</b>	<b>10 uL</b>	<b>10 uL</b>

**Tabla 15.** Condiciones de amplificación para PCR

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura/Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Pre-desnaturalización	98 °C/3'	
Desnaturalización	98 °C/30''	18X
Alineación	49-69* °C/30''	
Extensión	72 °C/2.30'	
Extensión final	72 °C/5'	1

\*45.8 y 67 °C temperaturas óptimas de alineación para la construcción 1 y 3, respectivamente

**Tabla 16.** Mezcla de reacción LR

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad Para construcción 1</b>	<b>Cantidad Para construcción 3</b>
Vector de entrada (50-150 ng) pCR8-DONOR-TLS-Short-12 linealizado pCR8-DONOR-TLS-1-OK-1 linealizado	2 uL (~65.5 ng/uL)	1. 5 uL (~90 ng/uL)
Vector de destino (150 ng/uL) pB7FWG,0	1. 5 uL (~150 ng/uL)	1. 5 uL (~150 ng/uL)
Mezcla de enzimas LR Clonase II	1 uL	1 uL
Agua destilada estéril	-	-
<b>Total</b>	<b>4.5 uL</b>	<b>4 uL</b>

**Tabla 17.** PCR de colonias

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (1 rxn) Para construcción 1</b>	<b>Cantidad (1 rxn) Para construcción 3</b>
Buffer HF Phusion Green 5X	1 uL	1 uL
Mezcla de dNTP 2 mM cada uno	0.2 uL	0.2 uL
TLS-F	0.4 uL	
GFP-R	0.4 uL	
TLS-1-Fw 10 uM		0.4 uL
FK261-EGFP-Rv 10 uM		0.4 uL
Agua destilada estéril	4.7 uL	4.7 uL
DNA Polimerasa DreamTaq	0.1 uL	0.1 uL
DNA templado	1 uL	1 uL
<b>Total</b>	<b>10 uL</b>	<b>10 uL</b>

El DNA templado proviene de colonias que se colocaron en 20 uL de ddH<sub>2</sub>O e incubadas durante 20 minutos a 95 °C.

**Tabla 18.** Condiciones de amplificación para PCR

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura/Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Pre-desnaturalización	95 °C/3'	
Desnaturalización	95 °C/30''	30X
Alineación	*65 y *61 °C/30''	
Extensión	72 °C/1'	
Extensión final	72 °C/5'	1

\*65 y \*61 °C temperaturas de alineación para construcción 1 y 3, respectivamente.

#### 5.4.2. Cultivo de las construcciones en AGL1 y agroinfiltraciones de plantas de *N. benthamiana*

En primera instancia, un pre-cultivo se inocula con una sola colonia de AGL1 en 2-3 mL de medio YEB conteniendo los antibióticos pertinentes según la construcción utilizada de la **Tabla 12**. Seguidamente, se incuba a 28 °C durante la noche a 200 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente, un cultivo principal de 20 mL de medio YEB conteniendo los antibióticos pertinentes según la construcción utilizada de la **Tabla 12**, se inocula con 200 uL del precultivo. Nuevamente, se incuba a 28 °C durante la noche a 200 rpm. Acto seguido, se centrifuga durante 20 minutos a 2000 x g a 24 °C. Seguidamente, se retira el sobrenadante, se suspende en 20 mL de medio de agroinfiltración (**Tabla 19**) y se incuba a temperatura ambiente (RT) al menos 1 hora a bajas rpm (para la construcción pCAMBIA1305.1-CaMV-35S::GUS::TNOS agregar 20 uL de estradiol a 50 mM para una concentración final de 50 uM). Posteriormente, la densidad óptica de 600 nm (OD<sub>600</sub>) del cultivo se ajusta a ~0.35 con el medio de agroinfiltración. A continuación, se llena una jeringa de insulsa (sin aguja) con el cultivo (sin burbujas de aire) y cuidadosamente se

agroinfiltra la superficie abaxial (inferior) de las hojas de *N. benthamiana* (se debe agroinfiltrar una tercera parte y no se debe perforar la hoja). Luego, las hojas agroinfiltradas se marcan colocándoles cuidadosamente una pequeña tira de cinta en el peciolo. Ulteriormente, las plantas agroinfiltradas se incuban a RT en el laboratorio durante 4 días (excepto las plantas agroinfiltradas con la construcción pMDC32-CaMV-35S:-mCherry::TNOS, que se incuban en oscuridad durante 1-2 días). Finalmente, a los 4 días postinfiltración (dpi), se cortan las hojas agroinfiltradas (tejido local) y hojas apicales no agroinfiltradas (tejido sistémico), se congelan con nitrógeno (N<sub>2</sub>) líquido y se almacenan en el congelador a -80°C para su posterior uso de extracción de RNA.

De nota, las plantas de *N. benthamiana* se crecieron en un cuarto de crecimiento con un ciclo de 16 horas de luz a 26 °C y 8 horas de oscuridad a 24 °C. Así mismo, 3 o 4 hojas de *N. benthamiana* de 2 meses de edad aproximadamente se agroinfiltraron con las diferentes construcciones (**Tabla 12**). Las agroinfiltraciones de cada construcción se llevaron a cabo por triplicado.

<b>Tabla 19. Medio de agroinfiltración</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
10 mM (stock de 1 M de sulfato magnésico o MgSO <sub>4</sub> )	1 mL
10 mM (stock de 0.1 M de hidrato de ácido 4-morfolinoetanosulfónico o MES)	10 mL
150 o 500 uM (stock de 100 mM de Acetosiringona)	150 uL o 500 uL
<b>Total</b>	<b>100 mL</b>

#### **5.4.3. Extracción de RNA y análisis de movilidad de *CsPPI6-1::BM::ScpPP36::Slp322* con y sin TLS mediante RT-PCR de punto final**

Para analizar el movimiento de *CsPPI6::Slp322* se evaluó tejido local (infiltrada) y tejido sistémico (no infiltrada) de cada planta de las 6 construcciones más las plantas sin

agroinfiltraciones (21 plantas en total). Las muestras de tejido local y tejido sistémico se tomaron a través de un pool (3 hojas de tejido local o tejido sistémico fueron puestos en un tubo Eppendorf estéril), lo que da un total de 42 muestras. Posteriormente, las muestras se extrajeron mediante el método de Logemann et al. (Logemann et al., 1987) modificado. Seguidamente, todas las muestras se trataron con el sistema comercial TURBO DNA-free de acuerdo con las instrucciones del fabricante ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F1907M\\_turbodnafree\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F1907M_turbodnafree_UG.pdf)). Finalmente, se realizaron análisis mediante la técnica de RT-PCR de punto final para determinar la presencia del transgén de las diferentes construcciones (**Tabla 12**) en tejido local y sistémico. En la **Tabla 20, 21, 22 y 23** se muestra la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA, la mezcla de reacción para PCR, las condiciones de amplificación y los oligonucleótidos utilizados, respectivamente.

**Tabla 20.** Mezcla de reacción para síntesis de cDNA

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (1 rxn)</b>
RNA (~200 ng/uL)	6 uL
FK532-Oligo-dT 10 uM	2 uL
Agua destilada estéril	2 uL
<b>Total</b>	<b>10 uL</b>
5 minutos a 70 °C → 5 minutos en hielo → Spin	
Buffer de reacción de transcriptasa inversa AMV 5X	4 uL
dNTP mix	2 uL
Inhibidor de la ribonucleasa RNasin pirofosfato de sodio, 40 mM (precalentado a 42 °C)	1 uL
AMV RT	1 uL
Agua destilada estéril	2 uL
<b>Total</b>	<b>10 uL</b>
120 minutos a 42 °C → -20 °C para su posterior uso	



**Tabla 21.** Mezcla de reacción para PCR de las 6 construcciones utilizadas

Reactivos	Cantidad (1 rxn)	Cantidad (1 rxn)	Cantidad (1 rxn)	Cantidad (1 rxn)	Cantidad (1 rxn)
Buffer DreamTaq 10X	1 uL	1 uL	1 uL	1 uL	1 uL
dNTP Mix, 2 mM cada uno	0.3 uL	0.3 uL	0.3 uL	0.3 uL	0.3 uL
CsPP16-ORF-FOR 10 uM	0.4 uL				
CsPP16-ORF-REV-nonstop 10 uM	0.4 uL				
FK2053-Cas9-RT-FP		0.4 uL			
FK2054-Cas9-RT-RP		0.4 uL			
FK1091-FKW170-GUS-F			0.4 uL		
FK1092-FKW171-GUS-R			0.4 uL		
FK161-mCherry-F1				0.4 uL	
FK163-mCherry-R1				0.4 uL	
Nb-GAPDH-Fw					0.4 uL
Nb-GAPDH-Rv					0.4 uL
Agua destilada estéril	5.95 uL	5.95 uL	5.95 uL	5.95 uL	5.95 uL
DreamTaq DNA Polymerase	0.05 uL	0.05 uL	0.05 uL	0.05 uL	0.05 uL
DNA templado	2 uL	2 uL	2 uL	2 uL	2 uL
<b>Total</b>	<b>10 uL</b>	<b>10 uL</b>	<b>10 uL</b>	<b>10 uL</b>	<b>10 uL</b>

**Tabla 22.** Condiciones de amplificación para PCR

Etapas	Temperatura/Tiempo	Ciclos
Pre-desnaturalización	93 °C/3'	
Desnaturalización	95 °C/30''	40
Alineación	60 °C/30''	
Extensión	72 °C/2.30'	
Extensión final	72 °C/5'	1

**Tabla 23.** Oligonucleótidos para PCR del análisis de movilidad de *CsPP16::Slp322* con/sin TLS

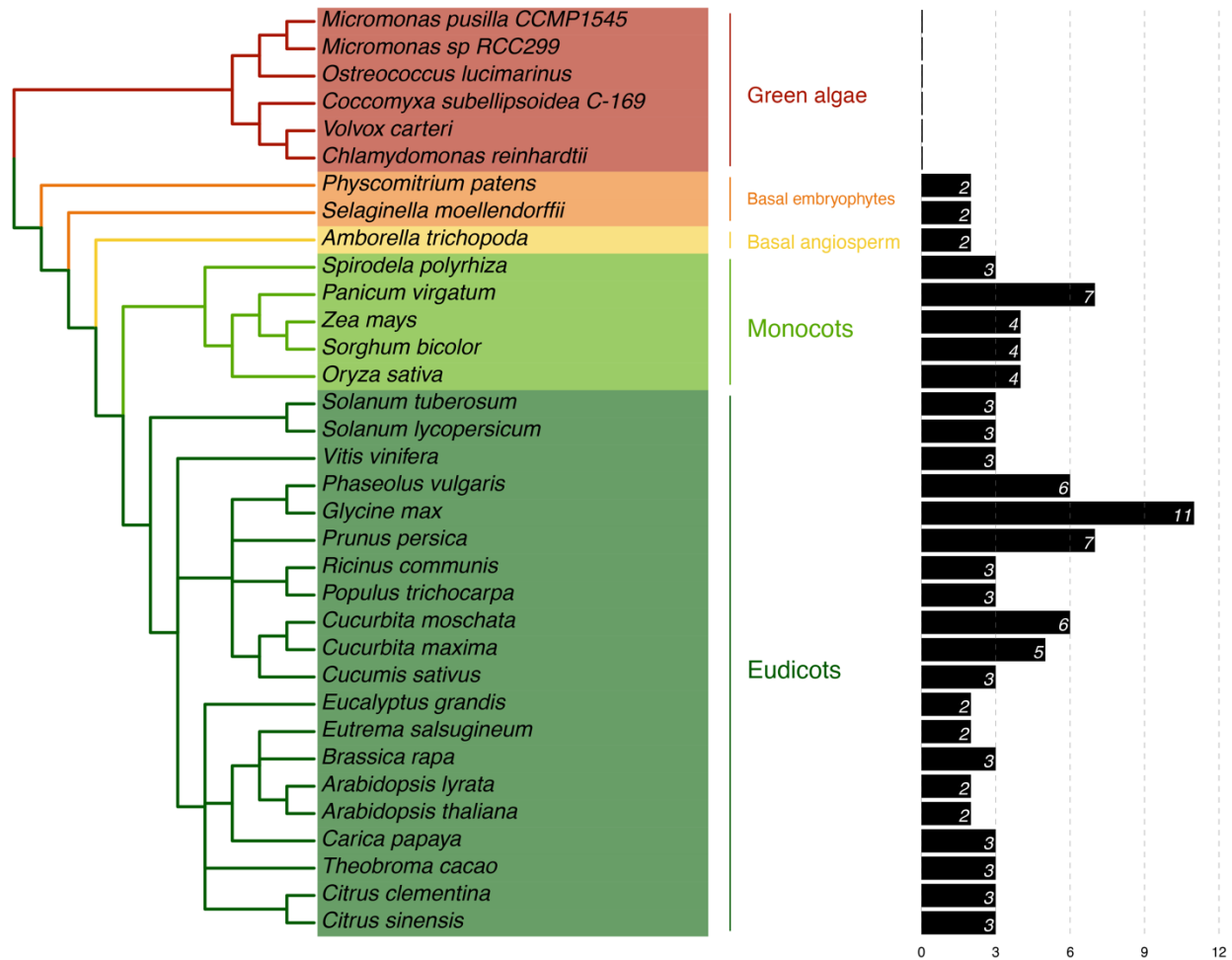
No.	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	Producto (pb)
1	CsPP16-ORF-FOR	ATGGCTATTGGGTTGTTGGAAGTACTTC	61	459
	CsPP16-ORF-REV-nonstop	AAAATCACTTTCCTTCCATCCTCAAAGTC	61	
2	FK2053-Cas9-RT-FP	AAGTCCAAGAAGCTCAAGAGC	56	249
	FK2054-Cas9-RT-RP	GAAGTTCACATACTTGGACGGC	58	
3	FK1091-FKW170-GUS-F	CAACAGCTTCCGGACCGCAC	63	428
	FK1092-FKW171-GUS-R	GATTGAGCGCGATGACGTCA	59	
4	FK161-mCherry-F1	TCCCCTCAGTTCATGTACGG	58	302
	FK163-mCherry-R1	TTGATCTCGCCCTTCAGGGC	61	
5	Nb-GAPDH-Fw	TGACCAAAAATTCGGCATTATCAAG	57	436
	Nb-GAPDH-Rv	AACCTTAACCATGTCATCTCCC	56	

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Análisis estructural y evolutivo de PP16 en especies de Viridiplantae

#### 6.1.1. Identificación de proteínas PP16 en Viridiplantae

Los homólogos de PP16 se identificaron en las bases de datos de genomas de plantas existentes utilizando CmPP16 de *C. maxima* como consulta. Las especies de plantas seleccionadas para el análisis fueron las siguientes: seis algas verdes (clorófitas), dos embriofitas basales, una angiosperma basal, cinco monocotiledóneas y veinte dicotiledóneas (**Anexo 5**). En clorófitas (algas verdes unicelulares) no se encontraron ortólogos claros de PP16, ya que la identidad global fue baja (<32%) con la secuencia de consulta. Si bien el alineamiento local de secuencias de proteínas relacionadas con CmPP16 y PP16 en algas verdes (**Anexo 6**) reveló la presencia de proteínas con baja similaridad, estas secuencias se excluyeron del alineamiento múltiple para el análisis evolutivo. Dos especies de embriofitas basales (*Physcomitrium patens* y *Selaginella moellendorffii*) se encontraron proteínas con  $\approx 33\%$  de identidad con PP16. En la angiosperma basal *Amborella trichopoda* se hallaron dos ortólogos de PP16, mientras que las cinco especies de monocotiledóneas utilizadas en el análisis presentaron de tres a cuatro ortólogos de PP16, excepto *Panicum virgatum*, que presenta siete ortólogos PP16. Las veinte especies de genomas de dicotiledóneas analizadas en este estudio presentan de dos a tres ortólogos de PP16, excepto *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Prunus persica*, *Cucurbita moschata* y *Cucurbita maxima*, que presentan seis, once, siete, seis y cinco ortólogos de PP16, respectivamente (**Figura 9**).



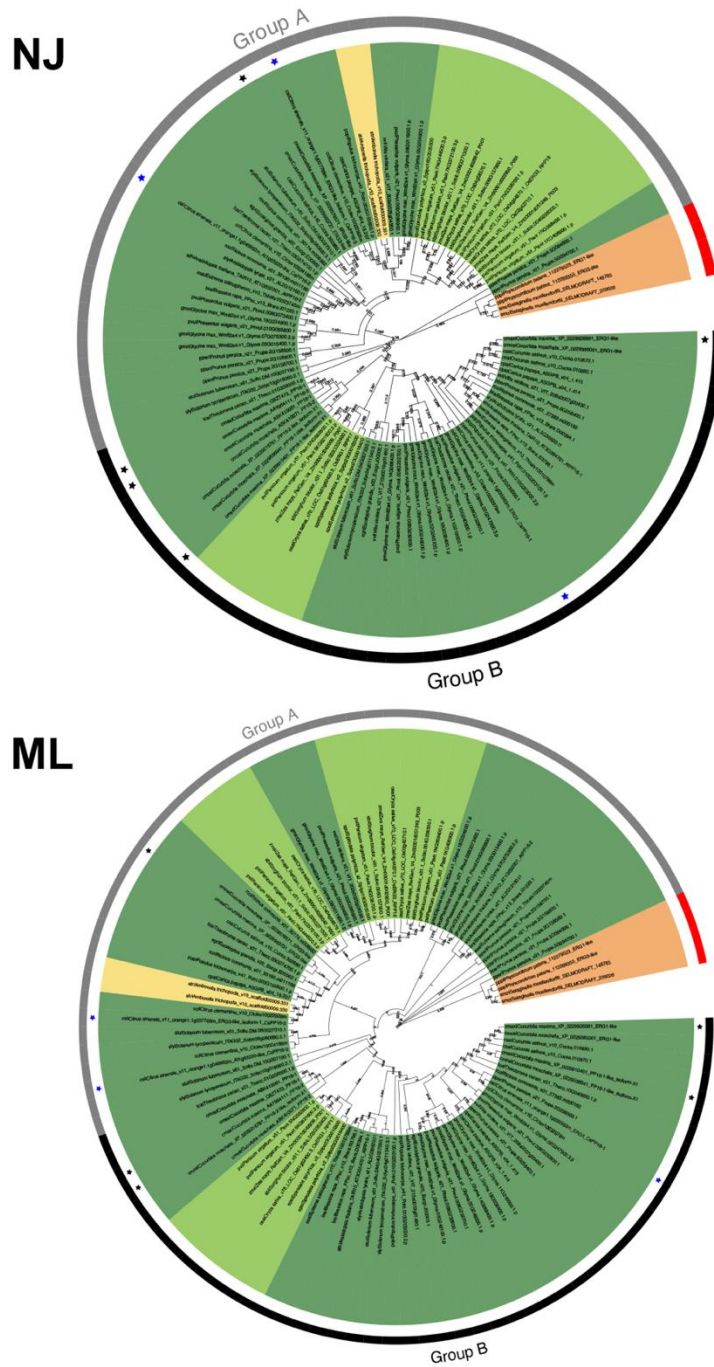
**Figura 9.** Filogenia de Viridiplantae concerniente a la presencia de homólogos PP16. El análisis se llevó a cabo en base a la proteína CmPP16 de *C. máxima*. A la derecha se muestra el número de homólogos PP16 en cada especie de planta.

### 6.1.2. Distribución filogenético de proteínas PP16 en la familia de Viridiplantae

Para determinar la historia evolutiva de los miembros de la familia de proteínas PP16, se analizaron filogenias basadas en las secuencias completas de 104 proteínas PP16 en 28 especies de Viridiplantae. Las filogenias se llevaron a cabo utilizando los métodos NJ y ML. En ambos análisis filogenéticos se obtuvieron dos clados distintos que se denominaron grupo A y grupo B (**Figura 10**). El grupo B está respaldado con un 59% de la prueba de soporte de Bootstrap con el

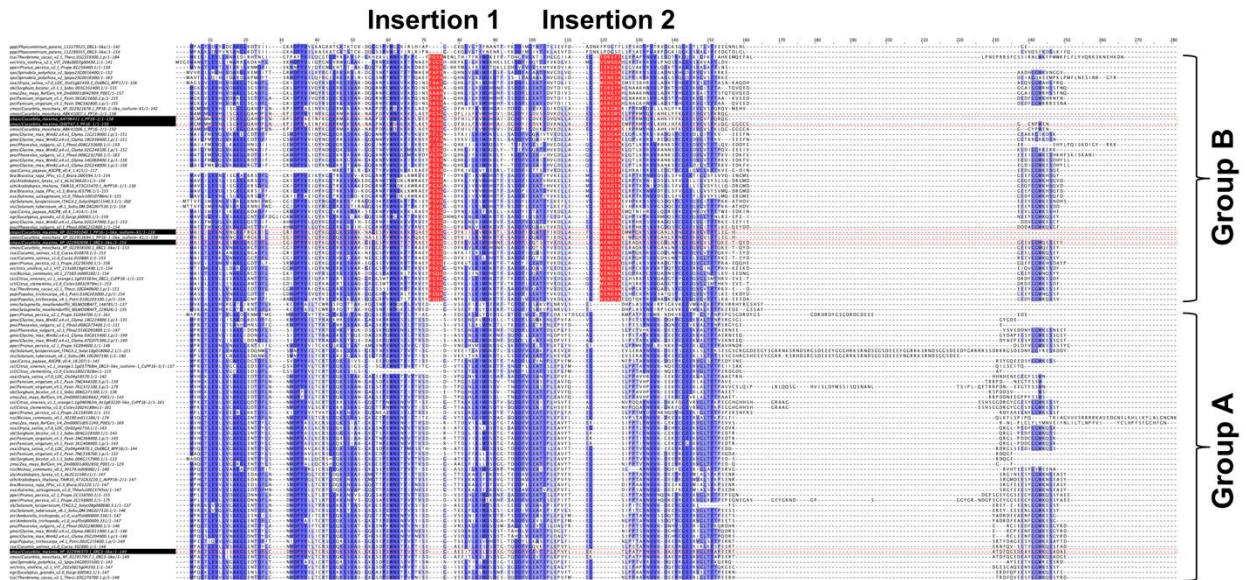
método NJ y un 56% con el método ML. *P. patens* y *S. moellendorffii* se posicionaron como embriofitas basales (rama de color naranja) y se utilizaron como grupos externos. Dos proteínas de *Amborella trichopoda* (atr|Amborella\_trichopoda\_v1.0\_scaffold00009.330 y atr|Amborella\_trichopoda\_v1.0\_scaffold00009.331) se posicionaron en el grupo A en ambos árboles filogenéticos (rama de color amarilla). *C. maxima* presenta 5 parálogos de PP16, cuatro (cmax|Cucurbita\_maxima\_Q9ZT47.3\_PP16-1, cmax|Cucurbita\_maxima\_AAY96411.1\_PP16-2, cmax|Cucurbita\_maxima\_XP\_022991040.1\_PP16-1-like\_isoform-X1, y cmax|Cucurbita\_maxima\_XP\_022992698.1\_ERG1-like) se posicionaron en el grupo B (asteriscos de color negro) y uno (cmax|Cucurbita\_maxima\_XP\_022996373.1\_ERG3-like) en el grupo A (asterisco de color negro, **Figura 10**), independientemente del método empleado. El genoma de *C. sinensis* presenta homólogos de PP16, dos se posicionaron en el grupo A y uno en el grupo B (asterisco color azul, **Figure 10**).

Para determinar las diferencias entre el grupo A y el grupo B, se analizaron el alineamiento de múltiple de secuencias (MSA) de las 104 secuencias de ortólogos PP16. El análisis indica que en el grupo B presenta dos inserciones marcados barras de color rojo (**Figura 11**). La inserción 1 consiste en 4 residuos (secuencia consenso: PGSX) y la inserción 2 de 6 residuos (secuencia consenso: VE(N/K)G(X)(A/S/Y).



**Figura 10.** Análisis filogenético de la familia de proteínas PP16 en Viridiplantae. NJ muestra el resultado del análisis filogenético usando el método de Neighbor-Joining; ML es el resultado del análisis filogenético usando el método de Maxima Verosimilitud. Se utilizó un Bootstrap de 1000 repeticiones. Ambos análisis muestran resultados comparables. Los grupos A y B en ambos árboles se muestran como franjas de color gris y negro, respectivamente. Los asteriscos de color negro y azul indican PP16 de *C. maxima*

(CmPP16) y *C. sinensis* (CsPP16), respectivamente. Las angiospermas basales se muestran en color amarillo, las briofitas en naranja, las monocotiledóneas en verde claro y las eudicotiledóneas en verde oscuro.

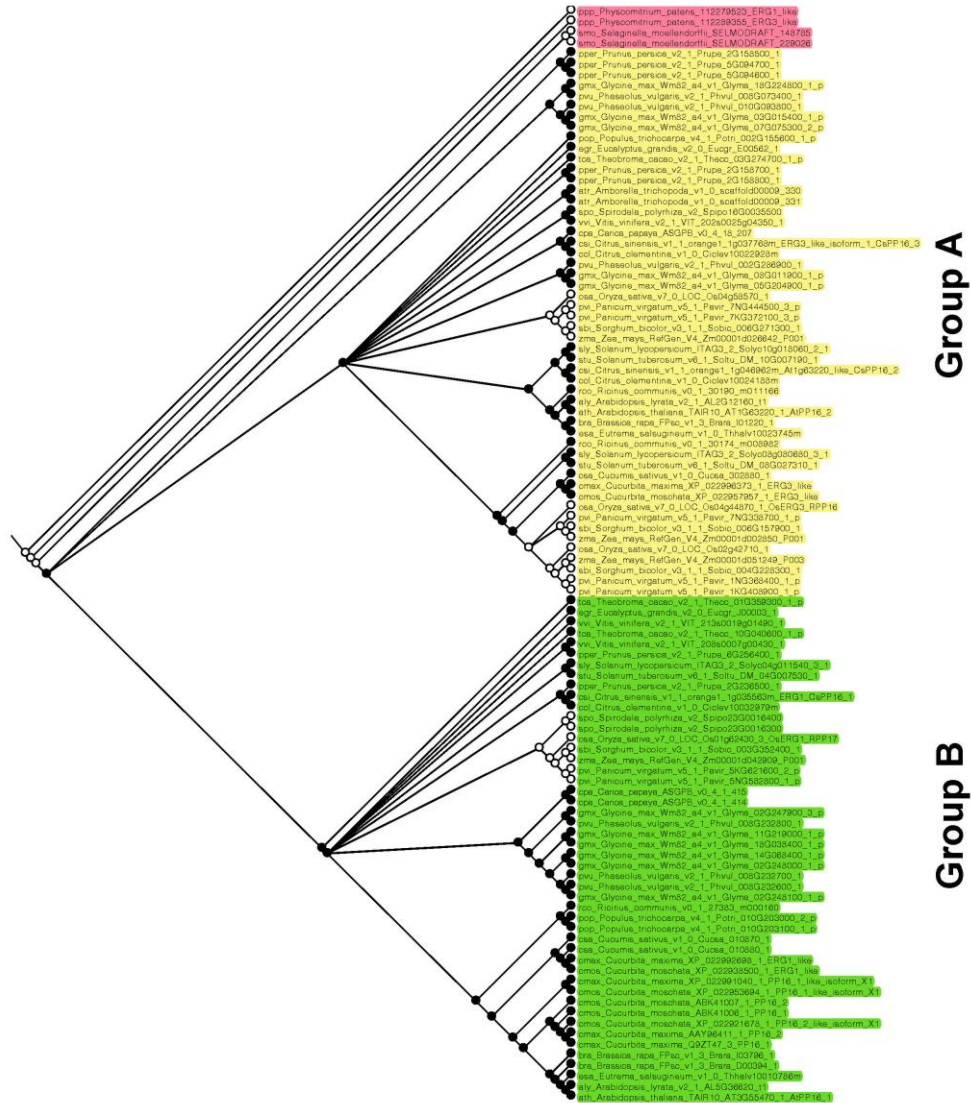


**Figura 11.** Alineamiento múltiple de secuencias de 104 proteínas PP16 de diversos taxones de embriofitas. El color azul oscuro resalta las identidades entre estas proteínas y el azul claro las similitudes. Los grupos A y B se muestran en el alineamiento. Las inserciones 1 y 2 del grupo B están resaltadas en rojo.

### 6.1.3. Reconstrucción de estado ancestral de ortólogos PP16

Por otro lado, para dilucidar si PP16 en Viridiplantae tiene un origen común, se realizó una reconstrucción ancestral. Se obtuvieron tres clados principales: embriofitas basales, grupo A y grupo B (color rojo, amarillo y verde, respectivamente; **Figura 12**), lo cual es consistente con los análisis filogenéticos realizados por los métodos NJ y ML. El clado de embriofitas basales incluye ortólogos de *P. patens* y *S. moellendorffii*. El grupo A está compuesto por cincuenta y dos ortólogos PP16 e incluye uno de los cinco ortólogos *CmPP16* (cmax\_Cucurbita\_maxima\_XP\_022996373\_1\_ERG3\_like). El grupo B está compuesto por cuarenta y nueve ortólogos PP16 e incluye cuatro de los cinco ortólogos *CmPP16* (cmax\_Cucurbita\_maxima\_XP\_022992698\_1\_ERG1\_like,

cmax\_Cucurbita\_maxima\_XP\_022991040\_1\_PP16\_1\_like\_isoform\_X1,  
 cmax\_Cucurbita\_maxima\_AAY96411\_1\_PP16\_2 y  
 cmax\_Cucurbita\_maxima\_Q9ZT47\_3\_PP16\_1). Es posible que uno de los ortólogos del clado  
 embriofita basal (primer nodo ancestral) diera origen al grupo A (segundo nodo ancestral) y  
 eventualmente al grupo B (tercer nodo ancestral).

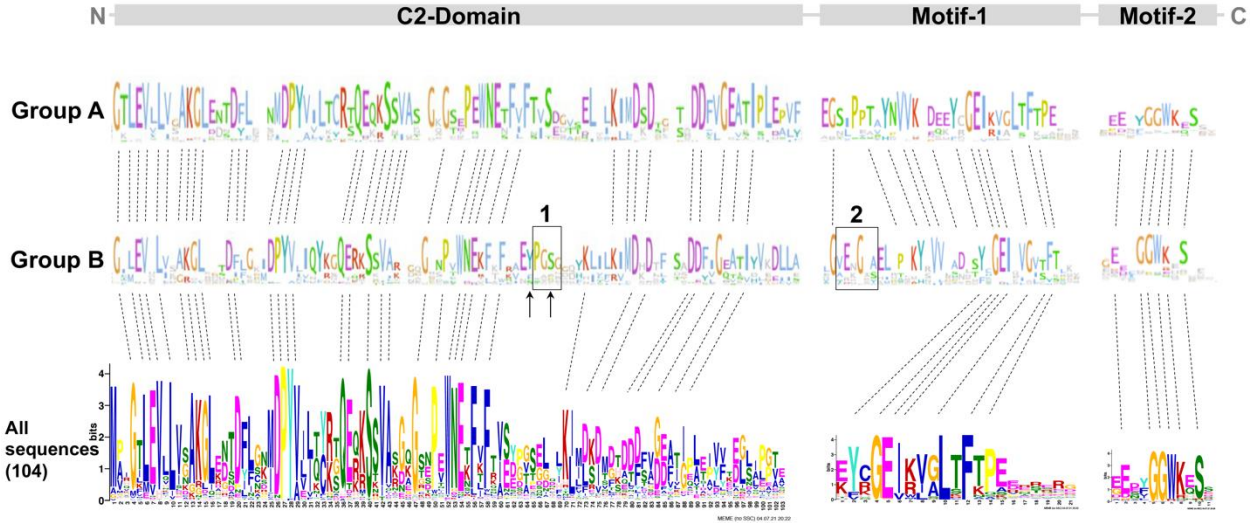


**Figura 12.** Reconstrucción de ortólogos ancestrales de PP16 en especies de Viridiplantae. El árbol ancestral se realizó mediante estadísticas Bayesianas utilizando 104 secuencias ortólogas PP16. El análisis de los ortólogos ancestrales de PP16 se realizó con el software Mesquite versión 3.81.



#### 6.1.4. Arquitectura de dominio general de las proteínas PP16

Para determinar la arquitectura de motivos/dominios de las proteínas PP16, se realizó un análisis de motivos/dominios comunes. En primer lugar, se identificaron posibles motivos comunes en el dominio C2 utilizando las 104 secuencias de las proteínas PP16. En segundo lugar, se buscaron motivos y dominios adyacentes al dominio C2. En la primer análisis, se obtuvo el dominio C2 reportado anteriormente y disponible en la base de datos de la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (<https://www.genome.jp/tools/motif/>; consultado el 22 de noviembre de 2023). En el **Anexo 7** se muestra una lista de los dominios C2 presentes en cada una de las 104 secuencias de proteínas PP16. En el segundo análisis, se obtuvieron dos motivos no redundantes en la región C-terminal de las proteínas (motivo 1 y motivo 2; **Figura 13**). Asimismo, el análisis de la arquitectura de dominio de los grupos A y B dio como resultado un dominio C2 común en el extremo amino C2 y dos motivos comunes en el extremo carboxi-terminal. A pesar de que la arquitectura de dominio de ambos grupos muestra una gran similitud, existen algunas diferencias. En el grupo B presenta dos inserciones (inserción 1 e inserción 2, rectángulo de color negro; **Figura 13**). La inserción 1 se localiza en el dominio C2 y la inserción 2 se localiza adyacente al motivo 1.

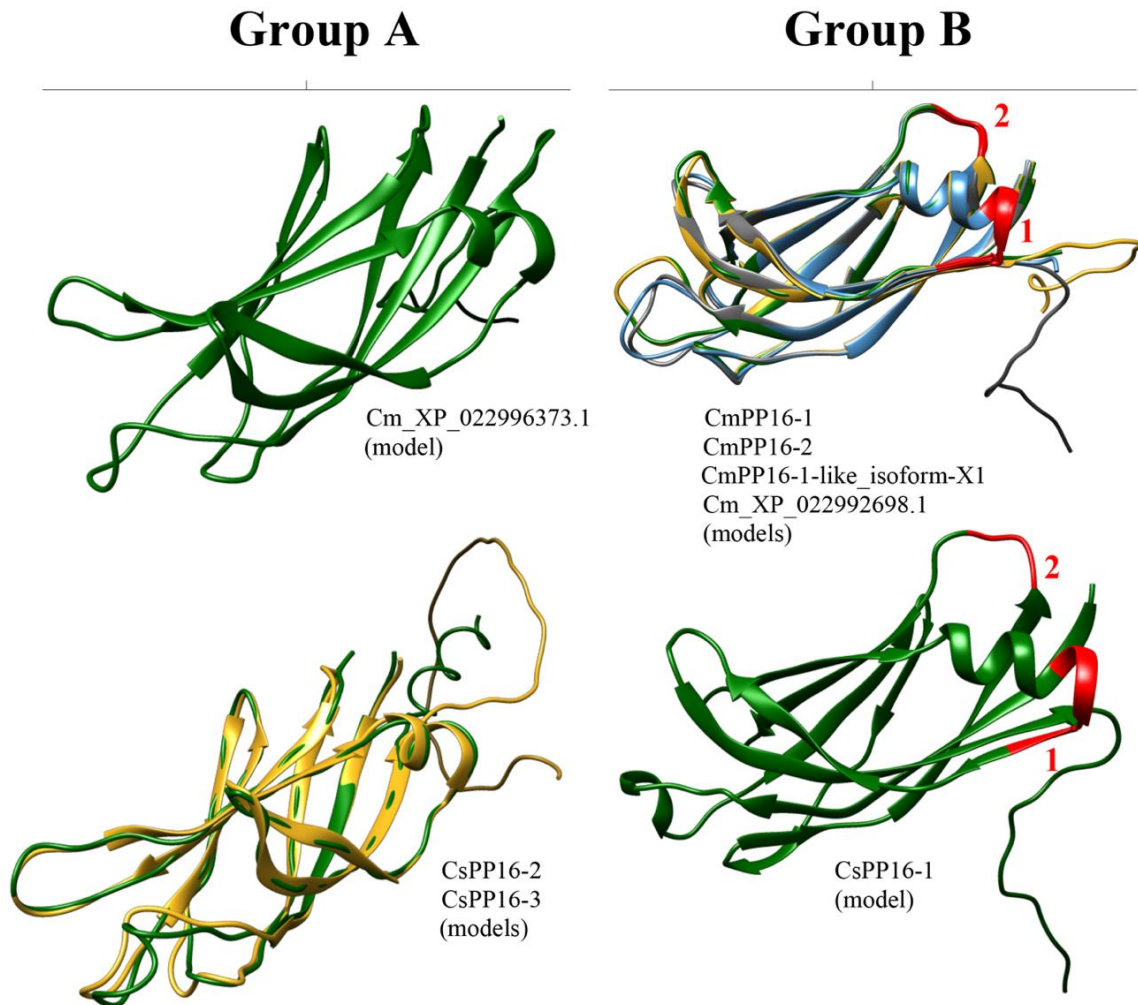


**Figura 13.** Análisis de MEME y logos que muestran residuos y motivos comunes de los miembros del grupo A y B. C2 comprende la mayor parte de la longitud de la proteína. Los motivos 1 y 2 solo se encuentran en PP16, pero no en las proteínas E-SYT de clorófitas y embriofitas. Las líneas de puntos indican residuos de aminoácidos conservados. Los rectángulos de color negro indican inserción 1 e inserción 2, respectivamente. Las flechas de color negro indican residuos de tirosina (Y) y serina (S), respetivamente.

### 6.1.5. Análisis estructural de las proteínas PP16 mediante modelado basado en plantillas

La estructura cristalizada de la mayoría de las proteínas PP16 no se ha dilucidado. Sin embargo, la estructura 3D de la proteína del floema 16-1 de *Arabidopsis thaliana* (AtPP16-1) se ha obtenido mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) (Sashi et al., 2018). Por lo tanto, AtPP16-1 se utilizó como modelo plantilla para predecir la estructura de los homólogos de PP16 con el servidor AlphaFold2. AtPP16-1 consta principalmente de regiones desordenadas en forma de espiral aleatoria y cadenas laterales colgantes, a excepción de tres láminas- $\beta$  y una hélice- $\alpha$ . Además, las regiones desordenadas N-terminales de AtPP16-1 forman un pequeño lóbulo, que se conecta a la región proteica restante a través de una hendidura de forma irregular (Sashi et al., 2018). Los resultados de este análisis mostraron que las estructuras predichas de CmPP16-1, CmPP16-2, CmPP16-1-like\_isoform-X1, Cm\_XP\_022992698.1\_ERG1-like y CsPP16-1 (grupo

B) están compuestas por nueve láminas- $\beta$  y una hélice- $\alpha$  (**Figura 13**). De manera similar, las estructuras predichas de Cm\_XP\_022996373.1, CsPP16-2 y CsPP16-3 (grupo A) están compuestas por ocho láminas- $\beta$  y una hélice- $\alpha$  más corta que las estructuras del grupo B (**Figura 14**).



**Figura 14.** Predicción de estructuras tridimensionales de PP16. Se muestran los modelos de proteínas representativas de los grupos A y B de *C. sinensis* y *C. maxima*. Los números de color rojo 1 y 2 de los modelos de los grupos A y B indican inserción 1 e inserción 2, respectivamente.

### **6.1.6. Las proteínas PP16 están relacionadas con la familia de proteínas sinaptotagmina extendida (E-SYT)**

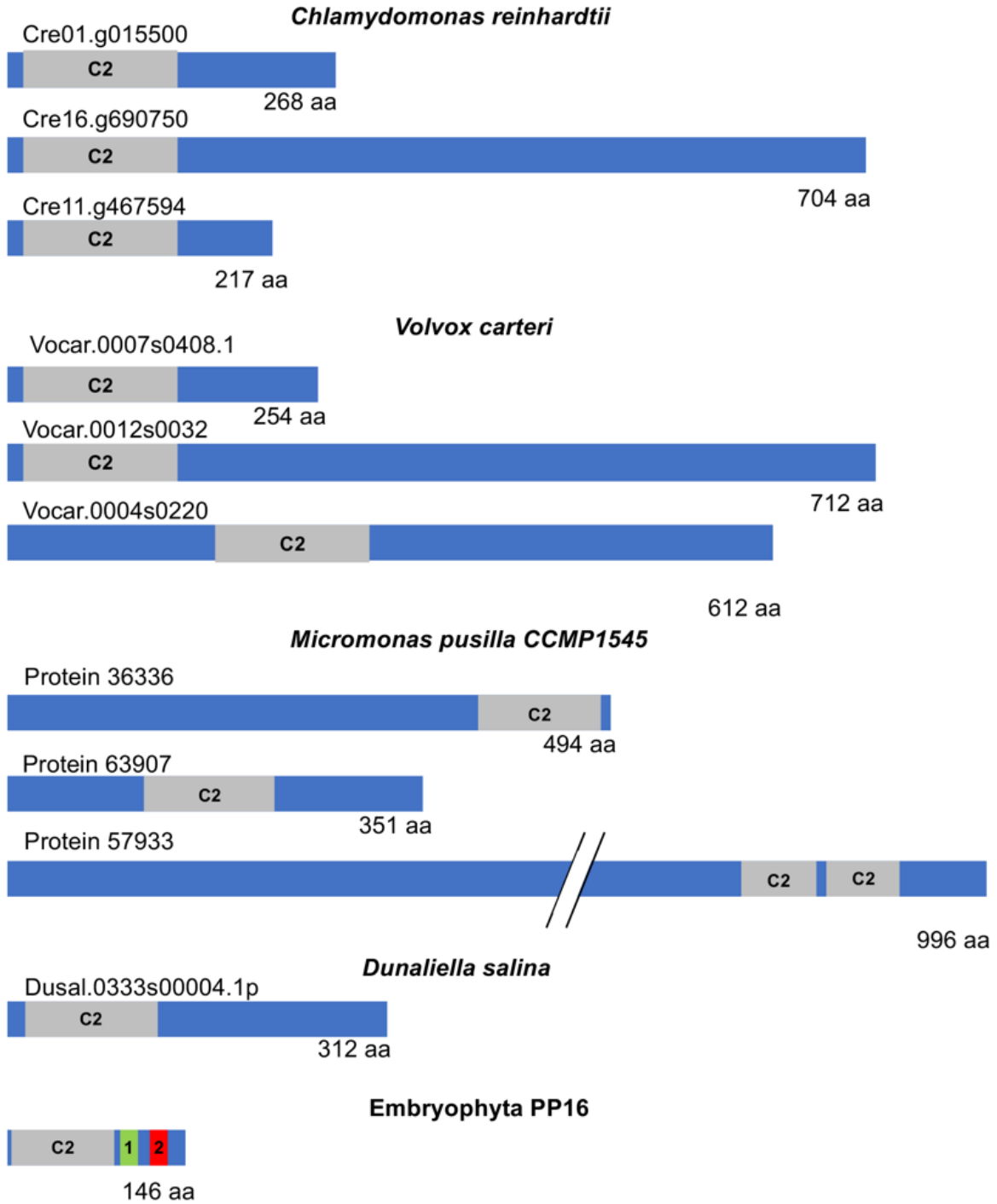
Se realizó un análisis más completo de la secuencia PP16 y su contraparte más cercana en clorófitas. Se realizó un BLASTp utilizando la secuencia de aminoácidos de CmPP16 como consulta respecto a las secuencias de proteínas correspondientes en especies de clorófitas reportadas en la base de datos de Phytozome v13. Si bien todas las proteínas clorófitas muestran similitud con las sinaptotagminas, las cuales participan en la unión de membranas opuestas para la fusión vesicular (Martens & McMahon, 2008), no todas parecen ser homólogas funcionales. Además, la localización del dominio C2 dentro de las secuencias de clorófitas varía ampliamente. En algunos casos se encuentra en el extremo-N, mientras que en otros se ubica en el extremo-C o en la región central (**Figura 15**).

Interesantemente, el valor de e (e-value) más significativo (el más bajo) se observó en *C. reinhardtii* ( $2.58 \times 10^{-9}$ ) después de alinear PP16 con sus contrapartes en clorófitas. Sin embargo, también se encontraron valores similares, generalmente no muy significativos, con otras especies. La similitud se limitó al dominio C2 compartido. Además, el tamaño de las contrapartes de PP16 en clorófitas varía entre 268 y 2253 aminoácidos. En el último caso, en *Botryococcus braunii*, la única similitud fue el dominio C2, y esta proteína está anotada como relacionada con el movimiento del cloroplasto (por homología), por lo que su relación con otras sinaptotagminas no está clara.

Además, aunque los homólogos de PP16 en las clorófitas están pobremente caracterizados, parecen pertenecer a la familia extendida de sinaptotagmina (E-SYT), las cuales son proteínas residentes del retículo endoplásmico. Las E-SYT participan en el contacto de las membranas en lugar de fusión y facilitan el intercambio de lípidos entre membranas (Saheki & De Camilli, 2017).

Las sinaptotagminas de embriofitas más estrechamente relacionadas con PP16 muestran una función similar (Ruiz-Lopez et al., 2021). Por el contrario, las sinaptotagminas de clorofitas (*C. reinhardtii* y *V. carteri*) muestran similitud restringida al dominio C2 de E-SYT de tamaños similares (260–280 aminoácidos) en comparación con secuencias de embriofitas, aunque con mayor frecuencia con homólogos de PP16 en este linaje (no mostrada). De hecho, el transcrito Cre01.g015500\_4532.1, que es el más similar en términos de e-value a CmPP16, codifica una proteína similar a E-SYT (por homología). Su homólogo más cercano de *Lotus japonicum* es también una proteína similar a la sinaptotagmina.

Sin embargo, las proteínas PP16 muestran e-value similares a otros embriofitas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, en las que la similitud también se encuentra restringida al dominio C2. Curiosamente, se encontraron varias secuencias con un e-value similar en briofitas (*Marchantia polymorpha*, *Physcomitrium patens*, *Ceratodon purpureus* y *Sphagnum phallax*), pero corresponden a homólogos de PP16, así como a sinaptotagminas extendidas y proteínas relacionadas con sinaptotagminas que albergan dominios adicionales, como un dominio similar al factor de ribosilación de ADP (ADP-ribosylation factor-like domain). Estos resultados apoyan la idea de que el gen PP16 en embriofitas se originó a partir de un gen ancestral de sinaptotagmina extendida en especies pertenecientes al linaje común de clorófita y embriofita, y este gen se mantuvo en esta última.

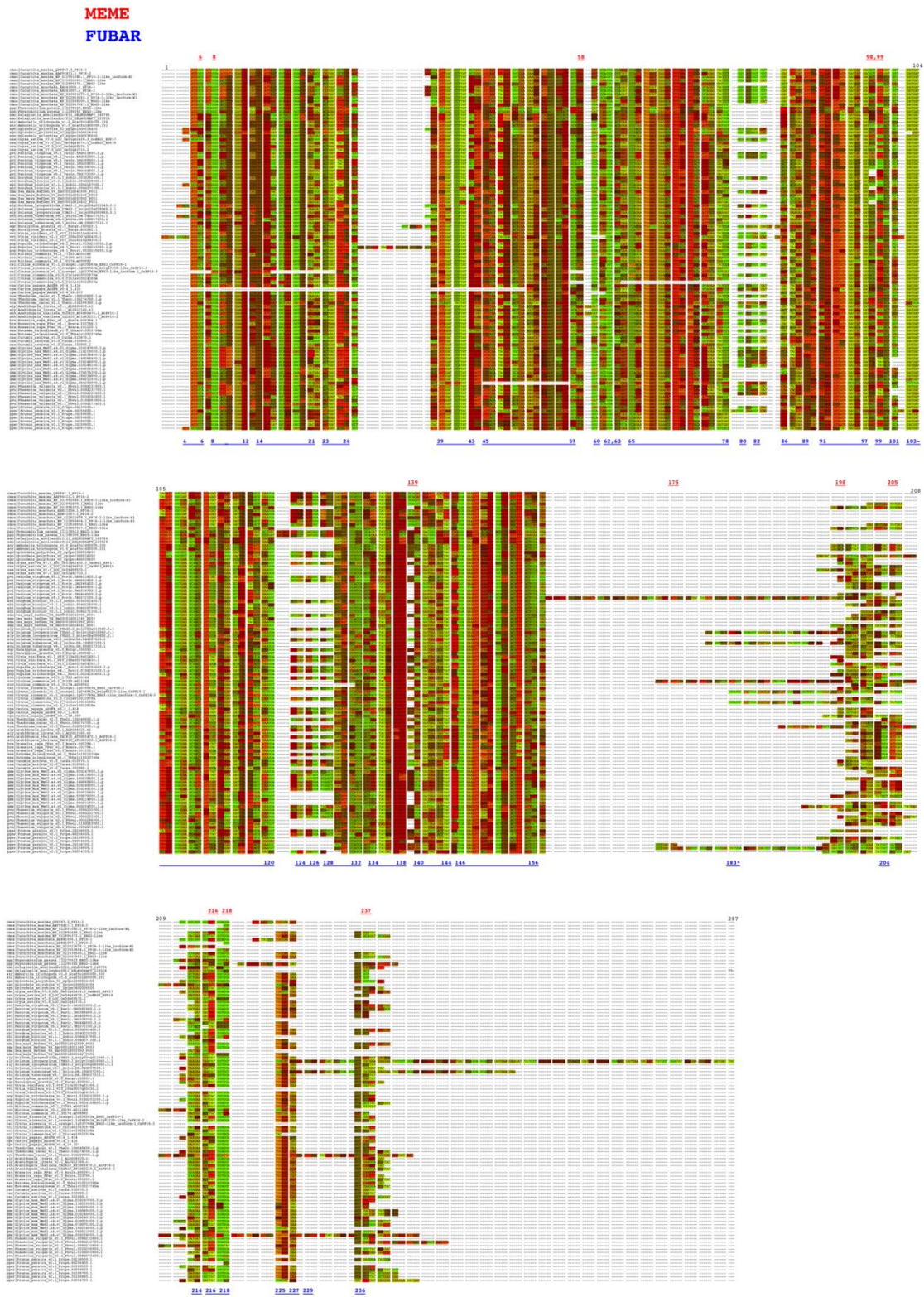


**Figura 15.** Representación esquemática de la estructura de E-SYT y CmPP16. En el diagrama se muestran las sinaptotagminas extendidas (E-SYT), las contrapartes más cercanas de PP16 embriofita de clorófitas representativas, y CmPP16 como miembro de esta familia de proteínas. Los rectángulos de color gris indican la posición y el tamaño del dominio C2 dentro de la proteína. Los dominios 1 y 2 de PP16 están

resultados como cuadros de color verde y rojo, respectivamente. Obsérvese la variación de tamaño de las proteínas E-SYT en las clorófitas.

### 6.1.7. Análisis de presión selectiva de genes PP16

Para detectar si la selección positiva del gen PP16 tuvo un impacto en su evolución, se realizó un análisis de este conjunto de datos utilizando la prueba estadística no restringida de sitio-rama de sucursal para diversificación episódica (BUSTED) en el servidor Datamonkey. El método BUSTED nos permite comprobar si un gen ha experimentado selección positiva en al menos un sitio por rama o en todo el árbol filogenético. Por otro lado, para detectar selección positiva en sitios específicos, se utilizaron los métodos del modelo de evolución de efectos mixtos (MEME) y de aproximación bayesiana rápida y no restringida (FUBAR) del servidor Datamonkey. Los resultados del método BUSTED indican que, según la prueba de rango de verosimilitud, existe evidencia de selección diversificadora episódica o selección diversificadora positiva en el conjunto de datos analizado, con  $p$  igual a 0,000007451 (<http://datamonkey.org/busted/652eac01353125059b663a27>). Por otro lado, el resultado del algoritmo MEME indica que existen doce sitios de selección episódica positiva/diversificadora (6, 8, 58, 98, 99, 139, 175, 198, 205, 216, 218 y 237) con un umbral de valor  $p$  de 0.05 (**Figura 16**, fuente de color rojo, <http://datamonkey.org/meme/652e7173353125059b6635a1>). Además, los resultados del análisis FUBAR indican que solo hay un sitio de selección generalizada positiva/diversificadora (183) y 128 sitios de selección generalizada negativa/purificadora con una probabilidad posterior de 0,9 (**Figura 16**, fuente de color azul, <http://datamonkey.org/fubar/652e9572353125059b663956>).

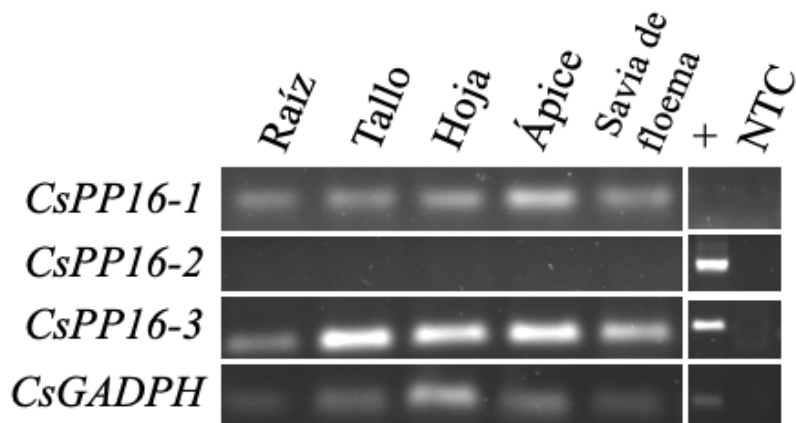


**Figura 16.** Análisis de presión selectiva de genes PP16 mediante los métodos MEME y FUBAR. Las fuentes de color rojo y azul corresponden a los métodos MEME y FUBAR, respectivamente.

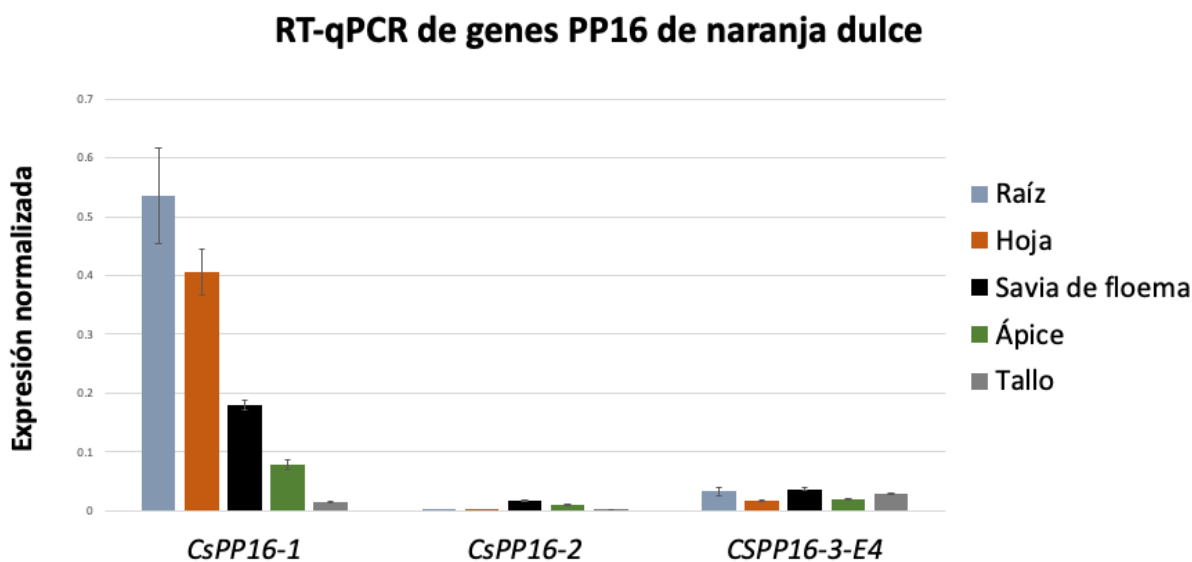


## **6.2. Caracterización de la expresión de genes PP16 en tejidos de la planta de naranja dulce**

Para determinar los niveles de expresión de los genes PP16 (*CsPP16-1*, *CsPP16-2* y *CsPP16-3*) en tejidos de la planta de naranja dulce (raíz, tallo, hoja, ápice y floema), en primera instancia, se realizó una RT-PCR de punto final, finalmente una RT-PCR cuantitativa. El gen Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*) se utilizó como control endógeno constitutivo en ambas técnicas. Los resultados de la RT-PCR de punto final indican presencia de mRNA de *CsPP16-1* y *CsPP16-3* en los cinco tejidos analizados (raíz, tallo, hoja, ápice y savia de floema). Sin embargo, el mRNA de *CsPP16-2* no se detectó en los ninguno de los tejidos analizados (**Figura 17**). De igual manera, el análisis de la acumulación de mRNA mediante RT-qPCR de los tres genes de *CsPP16* en los diferentes tejidos indica que los niveles de expresión de *CsPP16-1* en diferentes tejidos fue mayor en comparación con los niveles de transcripción de *CsPP16-3* (**Figura 18**). Específicamente, los niveles de transcripción de *CsPP16-1* en orden descendente fue raíz, hoja, savia del floema, ápice y tallo. De manera similar, los niveles de expresión de *CsPP16-3* en orden descendente fueron en raíz, floema, tallo, ápice y hoja. Por otro lado, los niveles de expresión de *CsPP16-2* en los cinco tejidos analizados fue cercana a cero, lo cual es congruente con los resultados de la RT-PCR de punto final (**Figura 17**).



**Figura 17.** RT-PCR de punto final de genes PP16 en diferentes tejidos de la planta de naranja dulce. En el lado izquierdo se muestra los 3 genes PP16 de naranja dulce y el gen Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (*GADPH*) como control endógeno constitutivo. En la parte superior se muestra las cinco muestras analizadas en el estudio: raíz, tallo, hoja, ápice y savia de floema. + indica control positivo y NTC como control sin molde.



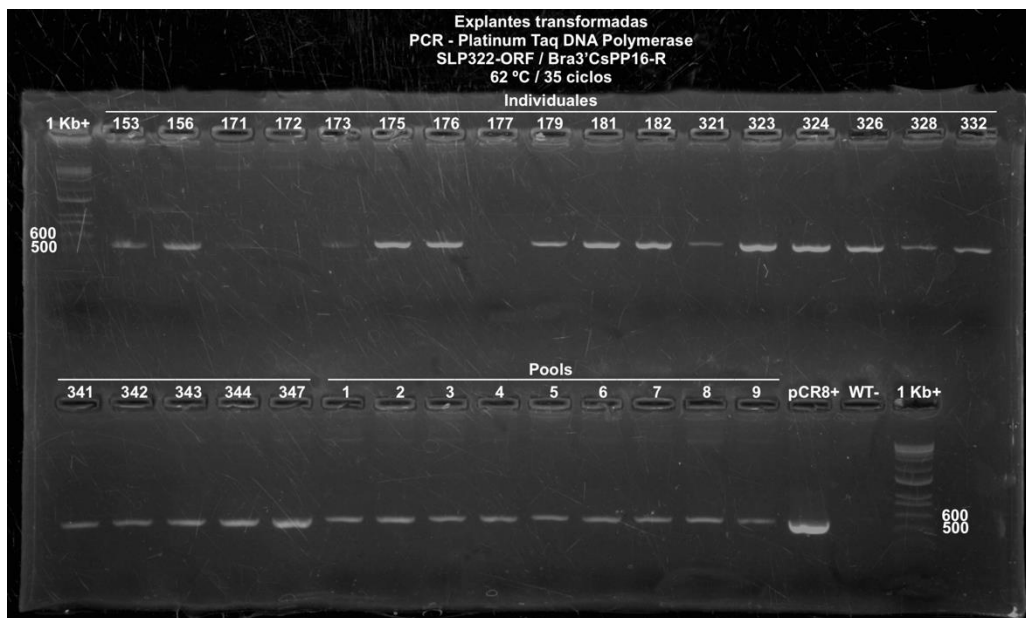
**Figura 18.** RT-PCR en tiempo real de los genes de PP16 en diferentes tejidos de la planta de naranja dulce. En el eje Y se muestra la expresión normalizada de los genes PP16 de naranja dulce. En el eje X se muestra los tres genes PP16 de naranja dulce: *CsPP16-1*, *CsPP16-2* y *CsPP16-3*. En el lado derecho se muestra las cinco muestras analizadas: raíz, tallo, hoja, ápice y savia de floema. En las barras se muestra las barras de error.

### **6.3. Obtención de plantas de naranja dulce que expresen la fusión *CsPP16-1::BM:ScpPP36::Slp322* en el tejido vascular**

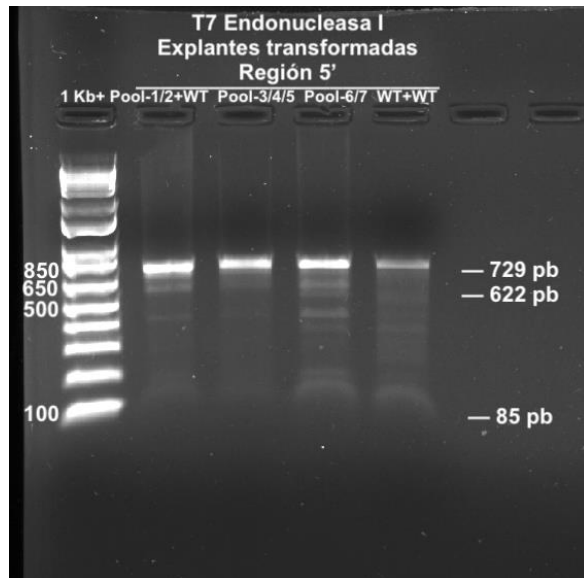
De los ~1000 explantes transformados mediante biolística (6 lotes de ~150 explantes), 150 se analizaron mediante PCR para la determinación del DNA molde. Asimismo, dos microinjertos (naranja dulce) *C. sinensis* en el portainjerto naranja agria (*Citrus aurantium*) (**Figura 19**) se analizaron mediante PCR múltiple y RT-PCR de punto final para la determinación de la presencia y expresión del DNA molde, respectivamente. Los resultados de la PCR indican presencia del transgén en todos los explantes (excepto en uno) y pools analizados (**Figura 20**). Sin embargo, los resultados de las digestiones mediante la enzima T7 endonucleasa I (T7EI) indica ausencia de la edición de *CsPP16-1* tanto en la región 5' como en la 3'. En la **Figura 21** se muestra el resultado de la digestión con T7 endonucleasa I para la región 5' de *CsPP16-1* de explantes transformados y planta silvestre. Así mismo, la PCR múltiple indica la presencia del DNA molde y Cas9 en los dos microinjertos. Sin embargo, no se detectó la presencia del DNA molde en el locus *CsPP16-1* analizado mediante un oligonucleótido río abajo de *CsPP16-1* y un oligonucleótido en el DNA molde (**Figura 22**). Así mismo, el resultado de la secuenciación Sanger indica ausencia de la edición del locus *CsPP16-1* en los dos microinjertos. En la **Figura 23** se muestra el resultado de la secuenciación Sanger para la región 5' de *CsPP16-1* de dos microinjertos y una planta silvestre. Por otra parte, la RT-PCR de punto final indica la expresión del DNA molde y Cas9 en los dos microinjertos (**Figura 24**).



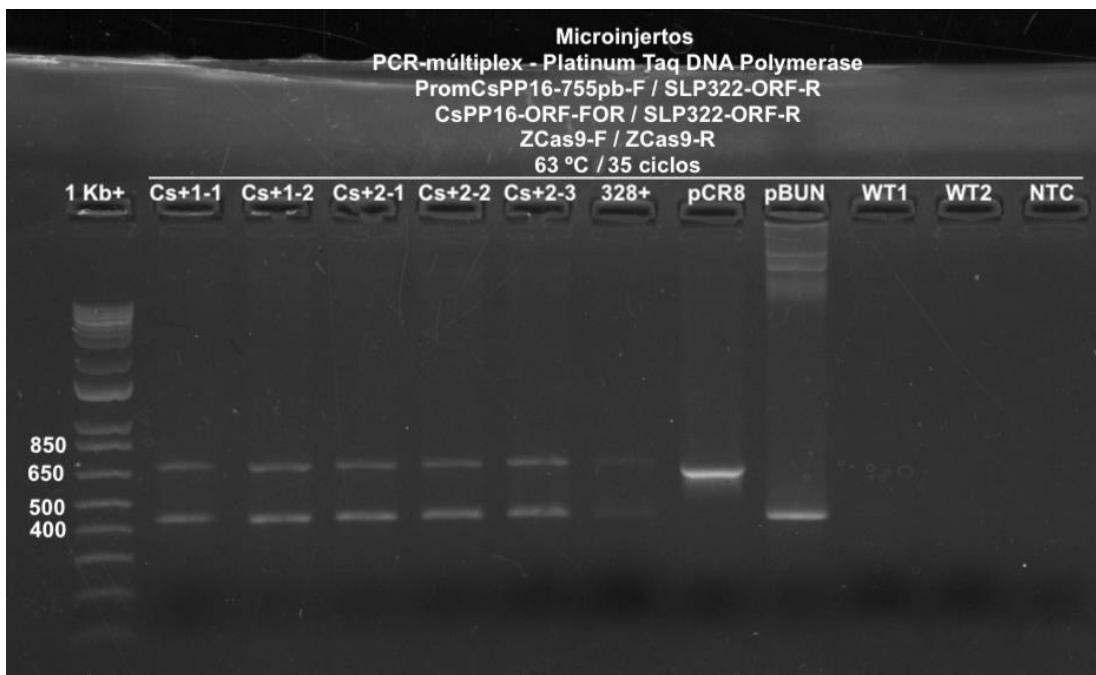
**Figura 19.** Dos microinjertos de naranja dulce (provenientes de explantes transformados por biolística) en el portainjerto *C. aurantium*.



**Figura 20.** Perfil electroforético de la PCR de explantes transformados mediante el método de biolística. 1 Kb+ indica el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen. Los números del 153 al 347 y del 1 al 9 indican individuales y pools (compuesto de ~5 explantes) de explantes transformados mediante el método de biolística. pCR8 indica DNA plasmídico como control positivo. WT indica una planta silvestre como control negativo. Las bandas de 629 pares de bases (pb) corresponde a lo esperado en los individuales y pools de explantes, respectivamente.

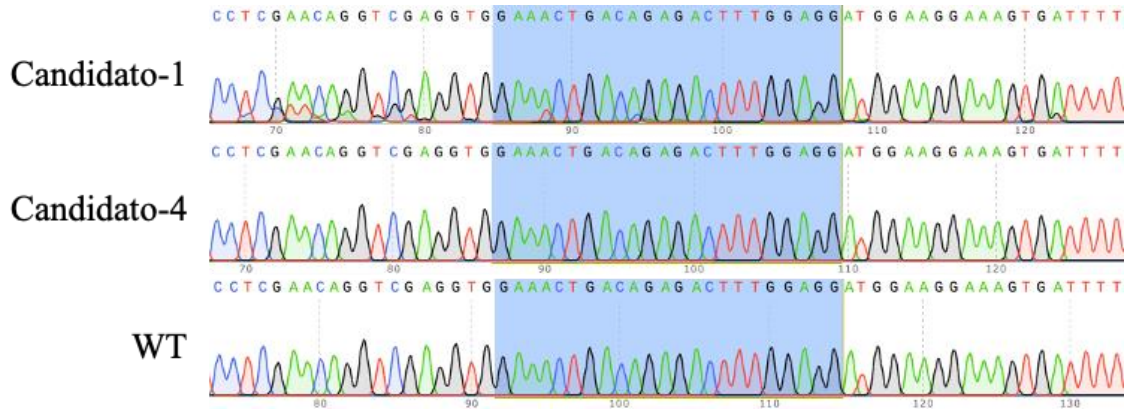


**Figura 21.** Perfil electroforético de la T7EI para el análisis de edición de la región 5' de *CsPPI6-1* en explantes. 1 Kb+ indica el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen. Los nombres Pool-1/2+WT, Pool-3/4/5, Pool-6/7 y WT+WT indican explantes transformadas por biolística y plantas tipo silvestre, respectivamente. No se observaron bandas esperadas de 622 y 85 pares de bases que indiquen la edición en la región 5' del locus *CsPPI6-1*.



**Figura 22.** Perfil electroforético de la PCR múltiple para el análisis de edición de locus *CsPPI6-1* en dos microinjertos. 1 Kb+ indica el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen. Los nombres Cs+1-1,

Cs+1-2 y Cs+2-1, Cs+2-1 y Cs+2-1 indican dos y tres hojas distintos de dos microinjertos. 328+ indica un explante como control positivo. pCR8 y pBUN indica DNA plasmídico como controles positivos. NTC indica control sin templado. Las bandas de 723 y 430 pb corresponden a las amplificaciones esperadas para el DNA molde y Cas9, respectivamente en los dos microinjertos. No se observaron bandas de 2336 pb que corresponde a amplificaciones esperadas del DNA molde integrado en el locus *CsPP16-1*.



**Figura 23.** Análisis de la edición de la región 5' de *CsPP16-1* en dos microinjertos mediante secuenciación Sanger. No se observan cambios (parte sombreada en color azul) en los nucleótidos de la región 5' de *CsPP16-1* del Candidato 1 y 4 en comparación a una planta silvestre (WT).

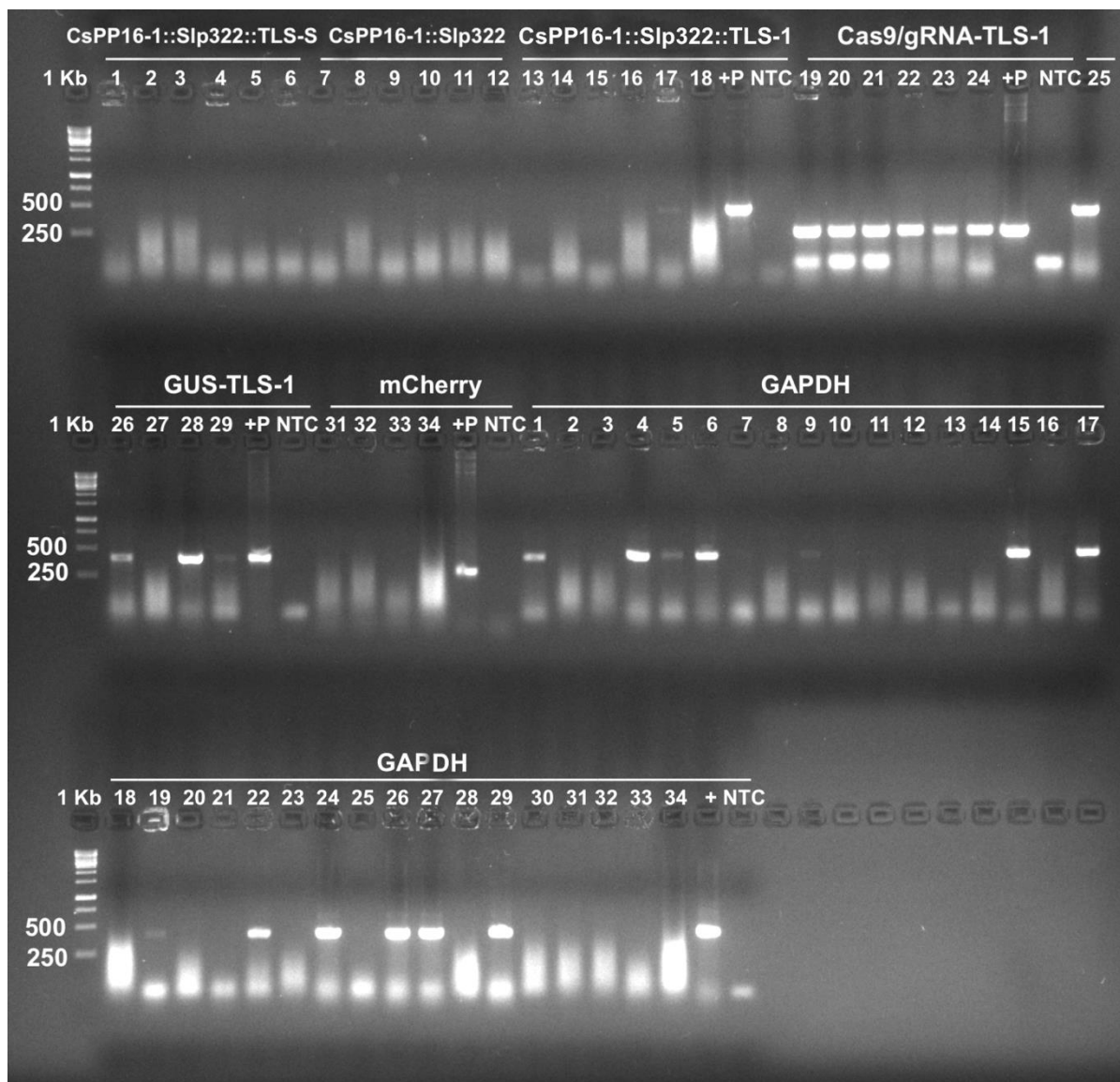


**Figura 24.** Perfil electroforético de la RT-PCR de punto final en dos microinjertos. 1 Kb+ indica el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen. Los nombres Cs+1-1, Cs+1-2 y Cs+2-1, Cs+2-1 y Cs+2-1

indican dos y tres hojas distintos de dos microinjertos. pCR8 y pBUN indica DNA plasmídico como controles positivos. Csi-4-2 indica DNA de una planta no transformada y Cs+2-2 indica RNA de una hoja del microinjerto 2. NTC indica control sin templado. Las bandas de 723 y 430 pb corresponden a las amplificaciones esperadas para el DNA molde y Cas9, respectivamente en los dos microinjertos.

#### **6.4. Análisis del transporte de *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322* con y sin TLS mediante agroinfiltraciones en plantas de *Nicotiana benthamiana***

El análisis de movilidad de *CsPP16-1:Slp322* con y sin TLS mediante agroinfiltraciones en plantas de *N. benthamiana* revela los siguientes resultados. Para la construcción *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322::TLS-S*, *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322* y *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322::TLS-1* no se observó amplificación del gen *CsPP16-1* tanto en tejido local como sistémico de las nueve diferentes plantas analizadas, excepto en la muestra 17 de tejido sistémico de la planta nueve (**Figura 25**). Para la construcción *Cas9/gRNA-TLS-1* se observó amplificación del gen *Cas9* tanto en tejido local como sistémico de las tres plantas analizadas. Para la construcción *GUS-TLS-1* no se observó amplificación tanto en tejido local como sistémico de las dos plantas analizadas. De manera similar, para el control endógeno constitutivo (*GAPDH*) solo se observó amplificación en trece muestras (algunos en tejido local y otras en tejido sistémico) de las 34 muestras analizadas (17 plantas).



**Figura 25.** Perfil electroforético de la RT-PCR de punto final del análisis de *CsPP16::BM::ScpPP36::Slp322::TLS-1* en plantas de *N. benthamiana*. 1 Kb Plus DNA Ladder indica el marcador 1 Kb de Invitrogen. *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322-TLS-S*, *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322* y *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322-TLS-1* indica los construcciones con TLS-Short, sin TLS y con TLS-1 para el análisis de movilidad. *Cas9/gRNA-TLS-1* y *GUS-TLS-1* como controles positivos de movilidad. *mCherry* como control de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana*. *GADPH* indica control endógeno constitutivo.



## VII. DISCUSIÓN

CmPP16 es una RBP de 16 kDa que se acumula en el complejo célula acompañante-elemento criboso (CC-SE) de las angiospermas (Lucas et al., 2013; Xoconostle-Cázares et al., 1999). La evidencia sugiere que se une a ciertos mARN preferentemente en el CC y se mueve hacia el SE a través de los plasmodesmos, interconectando ambos tipos de células, junto con el mARN unido al SE para el transporte por el floema (Ham et al., 2009; Xoconostle-Cázares et al., 1999). La evidencia experimental respalda diversas funciones de PP16 en plantas, incluido el movimiento de célula a célula y la unión de ARN no específica (Xoconostle-Cázares et al., 1999). Algunas de estas funciones han sido corroboradas en *A. thaliana* (Sashi et al., 2018). De igual forma, CmPP16 participa en la interacción con los plasmodesmos aumentando el límite de exclusión por tamaño y facilitar su propio transporte celular, así como dirigir selectivamente los ARN endógenos al brote y/o a la raíz a través de un complejo o interacciones proteína-proteína (Aoki et al., 2005; Ham et al., 2012; Pallas & Gómez, 2013). Agregando a lo anterior, PP16 actúa como un sensor redox en el floema extrafascicular de las cucurbitáceas y un gen que responde a las heridas. Es susceptible a las modificaciones del óxido nítrico (NO) y participa en la señalización redox inducida por el estrés (Gaupels et al., 2016). Estas interacciones con el NO pueden explicar los fenotipos tolerantes a la sequía, como el aumento de las tasas fotosintéticas en plantas que sobreexpresan en condiciones de sequía (Ramírez-Ortega et al., 2014). Además, PP16 se ha descrito recientemente como una herramienta valiosa que puede fusionarse traduccionalmente con péptidos antimicrobianos para dirigirse selectivamente al floema, combatiendo enfermedades dentro del sistema vascular (Calderón-Pérez et al., 2022; Guerra-Lupián et al., 2018).

Los mecanismos moleculares y los factores reguladores que gobiernan la expresión de PP16 siguen siendo poco conocidos. Por tanto, es fundamental investigar la expresión de este gen

en condiciones de estrés y etapas de desarrollo. Comprender la regulación de la expresión de PP16 puede proporcionar información valiosa sobre su papel potencial en diferentes procesos biológicos. Mientras tanto, los ensayos de movilidad de injertos en especies no cucurbitáceas pueden proporcionar información sobre las capacidades de movimiento de larga distancia de PP16 en un contexto evolutivo más amplio, así como la expresión heteróloga de estos genes en clorófitas, que no los albergan.

Sin embargo, existe escasa información sobre el origen evolutivo de PP16, así como sobre sus funciones en otras plantas vasculares (por ejemplo, aquellas en las que la carga del floema es apoplástica más que simplásmica) y no vasculares. Pocos estudios se han centrado en PP16 utilizando herramientas bioinformáticas (Athanasiadou et al., 2005; Martínez-Navarro et al., 2013; Xoconostle-Cázares et al., 1999). En este trabajo doctoral se llevaron a cabo análisis filogenéticos y estructurales de homólogos de PP16 en diferentes linajes de plantas para comprender mejor su evolución y funciones. La identificación de ortólogos de PP16 utilizando BLAST en la base de datos Phytozome v13 indica que existe al menos dos homólogos en diferentes taxones (dos en embriofitas basales, dos en angiospermas basales, de tres a cuatro en monocotiledóneas y de dos a tres en dicotiledóneas) en 28 especies. El elevado número de homólogos de PP16 en ciertas especies como *P. vulgaris*, *G. max*, *P. virgatum* y *P. persica* (**Figura 9**) puede haber sido el resultado de eventos de duplicación del genoma completo, poliploidización o reordenamientos intercromosómicos (Montero-Pau et al., 2018; Schmutz et al., 2014; Stupar & Specht, 2013; Verde et al., 2013). Además, los homólogos de PP16 están presentes sólo en embriofitas (específicamente, aquellos que albergan tejido de floema diferenciado), como *A. trichopoda*, monocotiledóneas y dicotiledóneas.

En particular, una búsqueda BLAST de secuencias de proteínas o ADN similares a PP16 en gimnospermas arrojó resultados solo en *Ginkgo biloba*; sin embargo, se identificaron homólogos de E-SYT en la especie anterior y en *Picea abies*. Esto podría deberse a una cobertura incompleta de estos genomas.

Probablemente se estableció por primera vez un homólogo PP16 en una especie hermana de *A. trichopoda*, que se considera una especie basal de plantas con flores o angiospermas, una vez que el tejido vascular evolucionó y finalmente adquirió la función de transporte de ARN del floema (Xoconostle-Cázares et al., 1999). Sin embargo, el dominio C2 de los ortólogos PP16 está presente en la mayoría de los sistemas vivos, desde eubacterias hasta eucariontes (Farah & Sossin, 2012). Por lo tanto, es posible que los genes PP16 se deriven de un gen más grande en el ancestro común de las clorófitas y las plantas multicelulares que incluye un dominio C2. De hecho, el análisis presentado aquí respalda esta noción. El gen ancestral se duplicó (posiblemente de manera parcial) para dar lugar a PP16 y otro gen, este último con una función similar a la de las clorófitas. Los homólogos más cercanos de estas proteínas en los embriofitas son las proteínas E-SYT de diferentes longitudes, pero suelen ser más pequeñas que las proteínas E-SYT de las clorófitas. Las deleciones/inserciones, reordenamientos de exones/intrones o combinaciones de módulos proteicos podrían explicar el origen de los ortólogos PP16 con el dominio C2 (Rizo & Südhof, 1998). Además, PP16 alberga un dominio de unión a membrana C2 que puede ser importante para su función.

Las 104 secuencias peptídicas PP16 utilizadas en este estudio (excluyendo las secuencias de proteínas de seis especies de algas verdes) se pueden clasificar como A y B en un árbol filogenético creado mediante los métodos NJ y ML (**Figura 10**). Al analizar la alineación de secuencias múltiples, sugerimos que el grupo B se originó a partir del grupo A por un evento de

duplicación. Las inserciones 1 y 2 (**Figura 11**), localizadas entre el dominio C2 y el motivo 1 del grupo B de los ortólogos PP16, respaldan esta noción. Además, los homólogos de PP16 de embriofitas basales (*P. patens*, *S. moellendorffii* y *A. trichopoda*; grupo A) (**Figura 10** y **Figura 11**) carecen de estas inserciones, lo que sugiere además que los ortólogos del grupo B son producto de la duplicación de miembros del grupo A. De manera similar, esta inferencia filogenética puede respaldarse mediante el análisis de ascendencia (**Figura 12**). Uno de los ortólogos del clado embriofita basal (primer nodo ancestral) pudo haber dado origen al grupo A (segundo nodo ancestral) y eventualmente al grupo B (tercer nodo ancestral).

El análisis de la arquitectura del dominio de las proteínas PP16 realizado por MEME y Jalview revela características básicas en ambos grupos (A y B). Ambos contienen un dominio C2 en el extremo C y dos motivos distintivos (motivo 1 y motivo 2) en el extremo N (**Figura 13**). La evidencia sugiere que la inserción 1 del grupo B, específicamente el residuo de serina, y el residuo de tirosina adyacente a la inserción 1 son críticos para modificaciones postraduccionales como la glicosilación y la fosforilación, respectivamente. De hecho, estos residuos son fundamentales para el movimiento célula a célula y su interacción con la proteína 1 de la vía autónoma no celular de *Nicotiana tabacum* (Nt-NCAPP1) (Taoka et al., 2007).

El análisis de la estructura 3D en AlphaFold2 indica que los modelos de *C. maxima* y *C. sinensis* (CmPP16-1, CmPP16-2, CmPP16-1-like\_isoform-X1, Cm\_XP\_022992698.1 y CsPP16-1 del grupo B; y Cm\_XP\_022996373.1, CsPP16-2 y CsPP16-3 del grupo A) difieren de la plantilla AtPP16-1 (Sashi et al., 2018). Los modelos de proteínas de los grupos A (Cm\_XP\_022996373.1, CsPP16-2 y CsPP16-3) y B (CmPP16-1, CmPP16-2, CmPP16-1-like\_isoform-X1, Cm\_XP\_022992698.1\_ERG1-like y CsPP16-) contienen nueve láminas- $\beta$  y ocho láminas- $\beta$  (**Figura 14**), respectivamente, en comparación con la plantilla AtPP16-1, que contiene tres

láminas- $\beta$ . La complejidad estructural de AtPP16-1 y las distorsiones de la señal debido a la alta sensibilidad al movimiento en la técnica de RMN pueden explicar las diferencias observadas entre la plantilla y nuestros modelos (Y. Hu et al., 2021). Considerando que la información estructural disponible de PP16 se determinó con resolución espectral limitada (lo que puede afectar la precisión de la asignación de resonancia y la determinación de estructuras secundarias), es necesario caracterizar PP16 con herramientas adicionales como RMN multidimensional, espectrometría de masas de alta resolución y resonancia paramagnética electrónica. La espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier de alta resolución, la espectroscopia Raman de alta resolución e incluso la microscopía crioelectrónica podrían permitir una estructura más confiable.

Además, el servidor PREDCITER indica que las regiones intrínsecamente desordenadas de la mayoría de los modelos del grupo A y B están contenidas, principalmente, en los extremos amino y carboxi, lo que concuerda con los resultados reportados anteriormente (Sashi et al., 2018).

Por otro lado, las inserciones 1 y 2 afectan el tamaño de la hélice- $\alpha$  en la estructura 3D de los modelos Cm\_XP\_022996373.1\_ERG3, CsPP16-2 y CsPP16-3 (grupo A), respectivamente. Sin embargo, no se ha determinado que estas inserciones, o en cualquier caso las eliminaciones, afecten la función de PP16. Sin embargo, serán necesarios análisis posteriores mediante resonancia magnética nuclear, cristalografía de rayos X y acoplamiento molecular para algunos de los modelos obtenidos de *C. maxima* y *C. sinensis* para dilucidar sus características estructurales y funcionales.

El análisis de presión selectiva de los genes PP16 con MEME indica que dos de los doce sitios de selección episódica positiva/diversificadora (6 y 175) y un sitio de selección generalizada positiva/diversificadora obtenidos con FUBAR (183) son falsos positivos (**Figura 16**). Esta

inferencia errónea de los métodos MEME y FUBAR puede explicarse por un error relacionado con el desalineamiento del alineador CLUSTAL (Markova-Raina & Petrov, 2011). Los sitios restantes revelados por MEME (8, 58, 98, 99, 139, 198, 205, 216, 218 y 237) han experimentado una selección episódica positiva/diversificadora. La duplicación de genes PP16 con mutaciones nocivas acumuladas y residuos con potencial adaptativo evolutivo (específicamente para los sitios 58, 98, 139, 198, 205 y 237) podría explicar la evidencia de selección episódica positiva/diversificadora. Sin embargo, los resultados del análisis FUBAR revelan 128 sitios bajo selección generalizada negativa/purificadora (incluidas las posiciones 6, 8, 58, 99, 216 y 218 del método MEME). El signo de selección generalizada negativa/purificadora sugiere su importancia funcional, así como la conservación del dominio C2, motivo 1 y motivo 2 en los genes PP16 (Couch et al., 2006). La posición 78 corresponde a la tirosina (UAU/UAC), un residuo crítico para la fosforilación, así como para la interacción con la proteína 1 de la vía autónoma no celular de *N. tabacum* (Nt-NCAPP1) (Taoka et al., 2007), que es uno de los 128 sitios bajo selección negativa/purificadora generalizada. De hecho, investigar el origen evolutivo del dominio C2 de PP16, considerando su presencia en otros taxones, sería útil para comprender las funciones del dominio en un contexto taxonómico más amplio.

Por otra parte, el análisis de la acumulación de los mRNAs de genes PP16 en cinco tejidos distintos de naranja dulce a través de la RT-qPCR demostró que *CsPP16-1* se acumula a mayores niveles en el floema en comparación a *CsPP16-2* y *CsPP16-3* (**Figura 18**). En consecuencia, *CsPP16-1* es el gen más adecuado para la edición genómica a través de CRISPR/Cas9, que es el objetivo general de este trabajo. Los niveles de acumulación del mRNA de *CsPP16-1* en orden descendente fueron raíz, seguido de hoja, savia de floema, ápice y tallo, lo cual es inconsistente con un estudio previo del grupo de trabajo (Calderón-Pérez et al., 2022). No obstante, la etapa

(~dos años), las condiciones de crecimiento (~30 °C en invernadero) y los requerimientos fisiológicos de la planta utilizadas en este estudio pueden explicar la diferencia de la acumulación del mRNA de *CsPPI6-1* con respecto al estudio previo (Calderón-Pérez et al., 2022). Para los genes *CsPPI6-2* y *CsPPI6-3* es el primer estudio realizado en relación con la acumulación de sus mRNAs. De manera que los bajos niveles de acumulación de los transcritos *CsPPI6-2* y *CsPPI6-3* pueden ser contrastados con experimentos utilizando diferentes etapas de la planta de naranja dulce.

Con respecto a la obtención de plantas de naranja dulce que expresen la fusión de *CsPPI6-1::BM::ScpPP36::Slp322* (DNA molde) en el tejido vascular, los resultados de la PCR y PCR múltiple indica que el DNA molde está presente explantes y en los dos microinjertos obtenidos (**Figura 20 y 22**). Así mismo, los resultados de la RT-PCR de punto final indica que el DNA molde tiene expresión en los dos microinjertos (**Figura 24**). No obstante, el DNA molde no está presente en el locus *CsPPI6-1* de acuerdo con los resultados de T7 endonucleasa I, PCR múltiple y secuenciación Sanger (**Figura 21, 22 y 23**). La inserción aleatoria del DNA molde de múltiples roturas producto de bombardeo de partículas de oro o tungsteno del método de biolística (W. Guo et al., 2023; J. Liu et al., 2019), el efecto de off-target o ruptura del DNA fuera del objetivo (C. Guo et al., 2023; Mengstie et al., 2024), la eficiencia y especificidad de los sgRNAs (Konstantakos et al., 2022; Wang et al., 2023), la baja frecuencia de recombinación homóloga nativa (HR) en plantas pueden explicar la ausencia de la inserción del DNA molde en el locus específico de *CsPPI6-1*.

Finalmente, el análisis del movilidad de *CsPPI6-1::BM::ScpPP36::Slp322* con y sin TLS mediante agro infiltraciones en plantas de *N. benthamiana* arrojó resultados inconsistentes. En primera instancia, no se obtuvieron bandas en el perfil electroforético del control endógeno

constitutivo *GAPDH* en 20 de las 34 muestras (17 muestras de tejido local y 17 muestra tejido sistémico) de las 17 plantas de *N. benthamiana* analizadas (**Figura 25**). Por consiguiente, este experimento debe ser repetido para tener un resultado consistente y discutible con trabajos relacionados (Thieme et al., 2015; J. Zhang et al., 2024).



## VIII. CONCLUSIONES

En relación con el objetivo 1, mediante la herramienta de BLAST de la base de datos de Phytozome v13 se recuperaron 107 secuencias ortólogos de la proteína CmPP16. El análisis de los árboles filogenéticos creados mediante el método de Neighbor-Joining (NJ) y Máxima Verosimilitud (ML) revela que hay grupos de genes PP16 (A y B). Así mismo, el análisis de la arquitectura de dominios/motivos mediante el programa MEME Suite revela un dominio C2 en la parte carboxi-terminal y dos motivos (1 y 2) en el amino-terminal. El análisis de la estructura tridimensional con el servidor AlphaFold2 indica que las proteínas PP16 están compuestas mayormente por láminas- $\beta$ . De igual manera, el análisis evolutivo indica que las PP16 pudieron haber surgido de la familia extendida de sinaptotagmina (E-SYT). Finalmente, el análisis de presión selectiva revela que los genes PP16 están bajo selección generalizada negativa/purificadora.

Con respecto al objetivo 2, el resultado de la RT-qPCR de los tres genes *CsPP16* indica que *CsPP16-1* presenta una mayor acumulación de mRNA en la muestra de savia de floema, seguido de *CsPP16-3*. *CsPP16-2* presenta una acumulación de mRNA con valores cercanos a cero.

En lo concerniente al objetivo 3, a través de método de biolística y el sistema de CRISPR/Cas9 no se logró obtener una planta editada de naranja dulce con el DNA molde (*5'UTR::CsPP16-1-ORF::BM::Slp322::3'UTR*) en el locus *CsPP16-1*. No obstante, se logró obtener explantes y dos microinjertos (no lograron sobrevivir en condiciones de invernadero) con el DNA molde.

Finalmente, en cuánto al objetivo específico 4, el resultado de la RT-PCR de punto final del análisis de movilidad de *CsPP16-1::Slp322* con y sin TLS en plantas de *N. benthamiana* fueron inconsistentes, por lo que es necesario repetir el experimento.

## IX. PERSPECTIVAS

Dado que los dos microinjertos con DNA molde no lograron sobrevivir en condiciones de invernadero, es necesario transformar más explantes de naranja dulce mediante el bombardeo de partículas cubiertas con DNA molde linealizado (puede ser obtenido mediante PCR o con enzimas de restricción).

Por otra parte, sería interesante analizar los requerimientos estructurales involucrados en la movilidad a corta o larga distancia de RNAs y proteínas de CsPP16-1, CmPP16-1 o AtPP16-1. Estos análisis pueden ser llevado a cabo en plantas de *N. benthamiana*, injertos en *Arabidopsis thaliana* o heteroinjertos entre calabaza y pepino.

Similarmente, dado que los resultados del análisis de movilidad de *CsPP16-1::BM::ScpPP36::Slp322* con y sin la secuencia similar a la tRNA (TLS) fueron inconsistentes, es necesario repetir agregando algunas modificaciones en las construcciones, por ejemplo utilizando un promotor de 1000 pares de bases (pCsi-1000-pb) en vez de 463 pb para el gen *CsPP16* y/o utilizar el p35S constitutivo.

Finalmente, sería fascinante analizar los residuos de aminoácidos del dominio-C2 de CmPP16-1 y E-SYT con participación intrínseca en la unión a RNA (en marcha).

## X. LITERATURA CITADA

- Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2005). Destination-Selective Long-Distance Movement of Phloem Proteins. *The Plant Cell*, 17(6), 1801–1814. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031419>
- Athanasiadou, R., Polidoros, A. N., Mermigka, G., Nianiou-Obeidat, I., & Tsaftaris, A. S. (2005). Differential expression of *CmPP16* homologues in pumpkin (*Curcubita maxima*), winter squash (*C. moschata*) and their interspecific hybrid. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80(5), 643–649. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511992>
- CABI. (2019). Citrus huanglongbing (greening) disease (citrus greening). *CABI Compendium*, *CABI Compendium*, 16567. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.16567>
- Calderón-Pérez, B., Ramírez-Pool, J. A., Núñez-Muñoz, L. A., Vargas-Hernández, B. Y., Camacho-Romero, A., Lara-Villamar, M., Jiménez-López, D., Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Medrano, R. (2022). Engineering Macromolecular Trafficking Into the Citrus Vasculature. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2022.818046>
- Couch, B. C., Spangler, R., Ramos, C., & May, G. (2006). Pervasive purifying selection characterizes the evolution of I2 homologs. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 19(3), 288–303. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0288>
- Dzung, N., & Rolshausen, P. (2019). *A Taste of Coffee*.
- FAOSTAT. (2024). *FAOSTAT - Crops and livestock products*. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Farah, C. A., & Sossin, W. S. (2012). The Role of C2 Domains in PKC Signaling. En Md. S. Islam (Ed.), *Calcium Signaling* (pp. 663–683). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2\\_29](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_29)
- Fernández, M. C. (2002). *EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CITRICOS (VTC) EN LA HUASTECA POTOSINA*.
- García-Nafría, J., Watson, J. F., & Greger, I. H. (2016). IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Scientific Reports*, 6(1), 27459. <https://doi.org/10.1038/srep27459>

- Gaupels, F., Furch, A. C. U., Zimmermann, M. R., Chen, F., Kaefer, V., Buhtz, A., Kehr, J., Sarioglu, H., Kogel, K.-H., & Durner, J. (2016). Systemic Induction of NO-, Redox-, and cGMP Signaling in the Pumpkin Extrafascicular Phloem upon Local Leaf Wounding. *Frontiers in Plant Science*, 7, 154. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00154>
- George, J., Kaniserry, R., Ammar, E.-D., Cabral, I., Markle, L. T., Patt, J. M., & Stelinski, L. L. (2020). Feeding Behavior of Asian Citrus Psyllid [*Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae)] Nymphs and Adults on Common Weeds Occurring in Cultivated Citrus Described Using Electrical Penetration Graph Recordings. *Insects*, 11(1), 48. <https://doi.org/10.3390/insects11010048>
- Ghosh, D., Kokane, S., Savita, B. K., Kumar, P., Sharma, A. K., Ozcan, A., Kokane, A., & Santra, S. (2022). Huanglongbing Pandemic: Current Challenges and Emerging Management Strategies. *Plants*, 12(1), 160. <https://doi.org/10.3390/plants12010160>
- Guerra-Lupián, M.-A., Ruiz-Medrano, R., Ramírez-Pool, J.-A., Ramírez-Ortega, F.-A., López-Buenfil, J.-A., Loeza-Kuk, E., Morales-Galván, O., Chavarin-Palacio, C., Hinojosa-Moya, J., & Xoconostle-Cázares, B. (2018). Localized expression of antimicrobial proteins mitigates huanglongbing symptoms in Mexican lime. *Journal of Biotechnology*, 285, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.012>
- Guo, C., Ma, X., Gao, F., & Guo, Y. (2023). Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1143157. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1143157>
- Guo, W., Comai, L., & Henry, I. M. (2023). *Biolistic Transformation—An overview*. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/biolistic-transformation#recommended-publications>
- Ham, B.-K., Bandom, J. L., Xoconostle-Cázares, B., Ringgold, V., Lough, T. J., & Lucas, W. J. (2009). A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. *The Plant Cell*, 21(1), 197–215. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061317>
- Ham, B.-K., Li, G., Kang, B.-H., Zeng, F., & Lucas, W. J. (2012). Overexpression of Arabidopsis plasmodesmata germin-like proteins disrupts root growth and development. *The Plant Cell*, 24(9), 3630–3648. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.101063>

- Hijaz, F., & Killiny, N. (2014). Collection and chemical composition of phloem sap from *Citrus sinensis* L. Osbeck (sweet orange). *PloS One*, 9(7), e101830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101830>
- Hu, B., Rao, M. J., Deng, X., Pandey, S. S., Hendrich, C., Ding, F., Wang, N., & Xu, Q. (2021). Molecular signatures between citrus and *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *PLOS Pathogens*, 17(12), e1010071. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010071>
- Hu, Y., Cheng, K., He, L., Zhang, X., Jiang, B., Jiang, L., Li, C., Wang, G., Yang, Y., & Liu, M. (2021). NMR-Based Methods for Protein Analysis. *Analytical Chemistry*, 93(4), 1866–1879. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03830>
- Jiménez-López, D., Xoconostle-Cázares, B., Calderón-Pérez, B., Vargas-Hernández, B. Y., Núñez-Muñoz, L. A., Ramírez-Pool, J. A., & Ruiz-Medrano, R. (2024). Evolutionary and Structural Analysis of PP16 in Viridiplantae. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/ijms25052839>
- Karlgren, M., Simoff, I., Keiser, M., Oswald, S., & Artursson, P. (2018). CRISPR-Cas9: A New Addition to the Drug Metabolism and Disposition Tool Box. *Drug Metabolism and Disposition*, 46(11), 1776–1786. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.082842>
- Killiny, N. (2019). Collection of the phloem sap, pros and cons. *Plant Signaling & Behavior*, 14(8), 1618181. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1618181>
- Konstantakos, V., Nentidis, A., Krithara, A., & Paliouras, G. (2022). CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: An overview of predictive tools and the role of deep learning. *Nucleic Acids Research*, 50(7), 3616–3637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac192>
- Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., & Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: Structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, 62, 5. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>
- Liu, J., Nannas, N. J., Fu, F., Shi, J., Aspinwall, B., Parrott, W. A., & Dawe, R. K. (2019). Genome-Scale Sequence Disruption Following Biolistic Transformation in Rice and Maize[OPEN]. *The Plant Cell*, 31(2), 368–383. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00613>
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(3), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.01.002>

- Logemann, J., Schell, J., & Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, *163*(1), 16–20. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90086-8)
- Lucas, W. J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S.-R., Helariutta, Y., He, X.-Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S. M., Patrick, J. W., Sperry, J., Yoshida, A., López-Millán, A.-F., Grusak, M. A., & Kachroo, P. (2013). The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, *55*(4), 294–388. <https://doi.org/10.1111/jipb.12041>
- Markova-Raina, P., & Petrov, D. (2011). High sensitivity to aligner and high rate of false positives in the estimates of positive selection in the 12 *Drosophila* genomes. *Genome Research*, *21*(6), 863–874. <https://doi.org/10.1101/gr.115949.110>
- Martens, S., & McMahon, H. T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: Disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrm2417>
- Martínez-Navarro, A. C., Galván-Gordillo, S. V., Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Medrano, R. (2013). Vascular gene expression: A hypothesis. *Frontiers in Plant Science*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00261>
- Martini, X., Coy, M., Kuhns, E., & Stelinski, L. L. (2018). Temporal Decline in Pathogen-Mediated Release of Methyl Salicylate Associated With Decreasing Vector Preference for Infected Over Uninfected Plants. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *6*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2018.00185>
- Mengstie, M. A., Azezew, M. T., Dejenie, T. A., Teshome, A. A., Admasu, F. T., Teklemariam, A. B., Mulu, A. T., Agidew, M. M., Adugna, D. G., Geremew, H., & Abebe, E. C. (2024). Recent Advancements in Reducing the Off-Target Effect of CRISPR-Cas9 Genome Editing. *Biologics: Targets and Therapy*, *18*, 21–28. <https://doi.org/10.2147/BTT.S429411>
- Montero-Pau, J., Blanca, J., Bombarely, A., Ziarsolo, P., Esteras, C., Martí-Gómez, C., Ferriol, M., Gómez, P., Jamilena, M., Mueller, L., Picó, B., & Cañizares, J. (2018). De novo assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the Cucurbita genus. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(6), 1161–1171. <https://doi.org/10.1111/pbi.12860>

- Munir, S., He, P., Wu, Y., He, P., Khan, S., Huang, M., Cui, W., He, P., & He, Y. (2018). Huanglongbing Control: Perhaps the End of the Beginning. *Microbial Ecology*, 76(1), 192–204. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1123-7>
- Nehela, Y., & Killiny, N. (2020). *Metabolites | Free Full-Text | Revisiting the Complex Pathosystem of Huanglongbing: Deciphering the Role of Citrus Metabolites in Symptom Development*. <https://www.mdpi.com/2218-1989/10/10/409>
- Pallas, V., & Gómez, G. (2013). Phloem RNA-binding proteins as potential components of the long-distance RNA transport system. *Frontiers in Plant Science*, 4, 130. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00130>
- Ramírez-Ortega, F. A., Herrera-Pola, P. S., Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Medrano, R. (2014). Overexpression of the pumpkin (*Cucurbita maxima*) 16 kDa phloem protein CmPP16 increases tolerance to water deficit. *Plant Signaling & Behavior*, 9(11), e973823. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.973823>
- Rizo, J., & Südhof, T. C. (1998). C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca<sup>2+</sup>-binding Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 15879–15882. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.15879>
- Ruiz-Lopez, N., Pérez-Sancho, J., Del Valle, A. E., Haslam, R. P., Vanneste, S., Catalá, R., Perea-Resca, C., Damme, D. V., García-Hernández, S., Albert, A., Vallarino, J., Lin, J., Friml, J., Macho, A. P., Salinas, J., Rosado, A., Napier, J. A., Amorim-Silva, V., & Botella, M. A. (2021). Synaptotagmins at the endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites maintain diacylglycerol homeostasis during abiotic stress. *The Plant Cell*, 33(7), 2431–2453. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab122>
- Saheki, Y., & De Camilli, P. (2017). The Extended-Synaptotagmins. *Biochimica et biophysica acta*, 1864(9), 1490–1493. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.03.013>
- Sashi, P., Singarapu, K. K., & Bhuyan, A. K. (2018). Solution NMR Structure and Backbone Dynamics of Partially Disordered *Arabidopsis thaliana* Phloem Protein 16-1, a Putative mRNA Transporter. *Biochemistry*, 57(6), 912–924. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01071>
- Sathoff, A. E., & Samac, D. A. (2018). Antibacterial Activity of Plant Defensins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 32(5), 507–514. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-18-0229-CR>

- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S. M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M. A., Chovatia, M., ... Jackson, S. A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, *46*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/ng.3008>
- SENASICA. (2012). *Tamarixia radiata* (WATERSTON)—FICHA TÉCNICA CB-26. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172902/Ficha\\_CB\\_26\\_Tamarixia\\_radiata.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172902/Ficha_CB_26_Tamarixia_radiata.pdf)
- SENASICA. (2016). *Ficha técnica de Huanglongbing de los cítricos*. <http://www.gob.mx/senasica/documentos/ficha-tecnica-de-huanglongbing-de-los-citricos>
- SENASICA. (2024). *SENASICA - SIRVEF - Vigilancia epidemiológica fitosanitaria*. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/VefV2.aspx>
- SIAP. (2024). *SIAP - Producción agrícola*. <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Stotz, H. U., Spence, B., & Wang, Y. (2009). A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant Molecular Biology*, *71*(1), 131–143. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9512-z>
- Stotz, H. U., Thomson, J. G., & Wang, Y. (2009). Plant defensins. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(11), 1010–1012.
- Stupar, R. M., & Specht, J. E. (2013). Insights from the Soybean (*Glycine max* and *Glycine soja*) Genome. En *Advances in Agronomy* (Vol. 118, pp. 177–204). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405942-9.00004-9>
- Taoka, K., Ham, B.-K., Xoconostle-Cázares, B., Rojas, M. R., & Lucas, W. J. (2007). Reciprocal Phosphorylation and Glycosylation Recognition Motifs Control NCAPP1 Interaction with Pumpkin Phloem Proteins and Their Cell-to-Cell Movement. *The Plant Cell*, *19*(6), 1866–1884. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052522>
- Thieme, C. J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., Miñambres, M., Walther, D., Schulze, W. X., Paz-Ares, J., Scheible, W.-R., & Kragler, F. (2015). Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nature Plants*, *1*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.25>



- Verde, I., Abbott, A. G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., Zhebentyayeva, T., Dettori, M. T., Grimwood, J., Cattonaro, F., Zuccolo, A., Rossini, L., Jenkins, J., Vendramin, E., Meisel, L. A., Decroocq, V., Sosinski, B., Prochnik, S., Mitros, T., ... Rokhsar, D. S. (2013). The high-quality draft genome of peach ( *Prunus persica* ) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics*, *45*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/ng.2586>
- Wang, Z., Shea, Z., Li, Q., Wang, K., Mills, K., Zhang, B., & Zhao, B. (2023). Evaluate the guide RNA effectiveness via *Agrobacterium*-mediated transient assays in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1111683>
- Xoconostle-Cázares, B., Martínez-Navarro, A. C., & Ruiz-Medrano, R. (2016). Phloem Long-Distance Trafficking of RNAs and Proteins. En John Wiley & Sons Ltd (Ed.), *eLS* (pp. 1–9). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021260.pub2>
- Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H. L., Monzer, J., Yoo, B. C., McFarland, K. C., Franceschi, V. R., & Lucas, W. J. (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science (New York, N.Y.)*, *283*(5398), 94–98. <https://doi.org/10.1126/science.283.5398.94>
- Zhang, J., Li, S., Li, W., Feng, Z., Zhang, S., Zheng, X., Xu, Y., Shen, G., Zhao, M., Cao, G., Wu, X., & Wu, J. (2024). Large-scale interplant exchange of macromolecules between soybean and dodder under nutrient stresses. *Plant Diversity*, *46*(1), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2023.11.005>
- Zhang, J., Liu, Y., Gao, J., Yuan, C., Zhan, X., Cui, X., Zheng, Z., Deng, X., & Xu, M. (2023). Current Epidemic Situation and Control Status of Citrus Huanglongbing in Guangdong China: The Space–Time Pattern Analysis of Specific Orchards. *Life*, *13*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/life13030749>
- Zhang, Q.-Y., Yan, Z.-B., Meng, Y.-M., Hong, X.-Y., Shao, G., Ma, J.-J., Cheng, X.-R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C.-Y. (2021). Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, *8*(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>

## XI. ANEXOS

**Anexo 1.** Resultado de la secuenciación del DNA molde en el vector pCR8. En color azul, verde, naranja, violeta, gris y rojo indica la región 5'UTR de *CsPP16-1*, el marco de abierto de *CsPP16-1*, una bisagra molecular, el sitio de corte de la proteasa PP36, la defensina *Slp322* y la región 3'UTR de *CsPP16-1*, respectivamente.

TGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTAC  
AAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTGAAGCCAATATGGCGTGAAGCCGAATGAGGCCACTATATAT  
ATTACATATGTTACGTTTACGAAAGGTAGAGGGAAGGATTAATGATAATGAGTTTATTGATTATATA  
ATGTAACCACATTTATGTATTTATTTATGTATGAGGAATTAACGCACGAATTGAGTTGGCAAATAAGGT  
GATCTTTCGCTGTTTCATTCGTATTAGTATAATAATTAGTGAATAAAGAACAATAATATTGACTGAGTAG  
AGGTCATTGGTCGTTGCATCATCAGATTCAACCAACCACGGCAGGTAAATGTGAATGTAATACCGTT  
GATTGATTCAAGCCAAGACAGAGAAGAGAGTCGGAAGACTCTTCCTTCCTTTGATTTGAATTTCAAAG  
GCCAAAAGTATCTGTCTGTCTGTCTGTCTCTCTCTCAGTTTGAAGAGTGAAGAGTGAAGAGTGAA  
AGCTTTGGCTTAGCTGAGGAAGAAGATGCTTATTGGGTTGTTGGAAGTACTTCTTGAGAGTGCTAAAG  
GTCTTGCCAACACCGATTTCTTAGGTAATATTGATCCCTATGTTATAATACAATACAAAGCCCAAGAGC  
GCACAAGCAGCGTGGCTCAAGGTCGTGGTGGGAGTTGGACATGGAATGAAAGATTCACCTTCAGGGT  
GGAGTATCCAGGGTCTGGTGGCCAGTACAAGCTCATTCTCAAATCATGGACAAGGATACCTTTACTA  
AGGATGACTTCCTTGGTGAAGCCACAATCTATGTGGAGGATCTTTTGGCACAAGGAATGGAGAATGGA  
ACTGCTGAACTACATTCTCGCAAATATAGTGTAGTTCAAGCTGATGGAACCTTACTTTGGAGAGATTCA  
AGTTGGTCTGAGTATGACCCACAAGGTCGAGGTGGAAGTACAGAGACTTTGGAGGATGGAAGGAA  
AGTGATTTTCTTAGCGGtGGTGGTAGCgCTGCTGCTGAgATGGGTCCAAGTACTAGAAATTGTTGAGGCT  
AGACATTGTGAGTCTTTGAGCCATAGGTTCAAGGGACCATGTGTTAGCGATAAGAATTGTGCTTCTGTT  
TGCGAGACTGAAAGATTTTCTGGTGGTAATTGCAGGGGATTCAGGAGGAGGTGCTTTTGCACCTAAGCC  
ATGCTAGCTCTCTTAACCTTCTCTACAAGTTCAGATGCTTGAATTAGTTGTGAATCTGAAGAATGCTATG  
CAACTCTTCTGTTGTTGATCTAAAATCAATAAAGTTTGCAATTTTGTGCAGAGATCCCTGAATCTCTTA  
CGTGCCTATATCATCTATGATCTATGTCAAGAAAAGTGAAGTGCATTTGCCTGTATAATGTGCAATGAA  
TCTTTTTTGTGATTGCATATATGATGTCCCCCTCCCTGTACAAACTCACCTTACGTTGGGAACTGTTAA  
CCAATGATATAAAATCACCTATGATAATCTTGTTCATCGCCAAGGCTTTTTTATTATCGAAAATGACTAA  
TATATATAATTTTTTTCTCGAGTGTGTGTTTAAATTTTAATTAGAAATGGTCCAAAATGGACATTAG  
GGATTATTAATTTGTCGATTCTGAAACGCTGCACATGCTCTGTTGC AAGGGCGAATTCGACCCAGCTTT  
CTTGACAAAAGTTGGCATTATAAAAAATAATTGCTCATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCA  
GTCAAATAAAATCATTATT

**Anexo 2.** Resultado de la secuenciación de los sgRNA en el vector pBUN4U6SM. En color gris y amarillo indica la secuencia de sgRNA-2 y sgRNA-5, respectivamente. En color verde, azul y rojo indica la secuencia de promotor U6, sgRNA scaffold y terminador U6, respectivamente.

ATAAATATTGCTCCGCCATAGC TATTGGTTTATCTCATCGGAACTGCAAACTCAACTAACTGAAAAGT  
ACAAAACCACTGAATCATATTATTTGAGATTTTTTTTAGGTCAAATTTTAGGTTTCAGTTACAGAAAAC  
GAAGAGAAAACCCCAGAAATTGAACGCCGAAGAACAGAGGAAGAAGAAATCGATCTGGAAAATTTT  
GCAAAAAAAGCACC GACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCT  
ATTTCTAGCTCTAAAAC CCAAAGTCTCTGTCAGTTTC CAAT CACTACTTCGACTCTAGCTGTATATAAA  
CTCAGCTTCGTTTTCTTATCTAAGCGATGTGGGACTTTTGAAGATTGTTTTCAACTTAAATGGGCCTATA  
TAAGAAATACTATTGTTCTTTCCATATAAAATGGGCCTGCTTCTTCTTTTCAGATTCCCAGGGGCTTT  
TGAAGATTATCTTCATATCTTAAGAATGAAGATGTTTTATTCAATCAAATTTCTGAAGGTTTCGATGCCT  
AATCATTCTAATCCTGGGACAACTATGAAACAAGATACAAAACTCCGAATGGAAAGTTAAAAAGA  
AGAAAACGAAAGCTACGGTTCAAGAAAATGTAAGCTGATAAACAAAAAAACTGTATGAACGAAG  
AAGAAGAAAAAAGCTAAGAAGAAATGATGTATTGTGCGGAAGGCAAGTCGAAGCT CCTAGGACCTG  
TAGC TATTGGTTTATCTCATCGGAACTGCAAACTCAACTAACTGAAAAGTACAAAACCACTGAATCA  
TATTATTTGAGATTTTTTTTAGGTCAAATTTTAGGTTTCAGTTACAGAAAACGAAGAGAAAACCCCAGA  
AATTGAACGCCGAAGAACAGAGGAAGAAGAAATCGATCTGGAAAATTTTGCAAAAAA GCACCGAC  
TCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC TT  
GATTTGAATTTCAAAGGC CAAT CACTACTTCGACTCTAGCTGTATATAAACTCAGCTTCGTTTTCTTATC  
TAAGCGATGTGGGACTTTTGAAGATTGTTTTCAACTTAAATGGGGCCTATATAAGAAATACTATTGGTT  
CTTTCCATATAAAAGGGGCCGGCTTTCCTCCTTTCAAATTCAGGGGGCCTTTTGAAAATATCTTCTA  
TTCTTAGAAAAGGAAAAGGTTTTTATTCATCAAATCTTGAGGGTCGAGGCCCAAACCTTGCTAATC  
CGGGGAAAAATTGAAAAA AAAAAA AACTCCAGGGGAAGTTAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA  
AAAAATGGCTGAAAACAAAAATGTTAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA  
ATTTT

**Anexo 3.** Resultado de la secuenciación de la construcción 1 (pB7FWG,0-pCsPP16-463pb::CsPP16-1::BM::Spc326::Slp322::TLS-Short-12-3::3'UTR). En color amarillo indica la secuencia de TLS-1. En color verde, naranja, violeta, gris y rojo indica el marco de abierto de *CsPP16-1*, una bisagra molecular, el sitio de corte de la proteasa PP36, la defensina *Slp322* y la región 3'UTR de *CsPP16-1*, respectivamente

CCCATNGCCTGCACGAAGCATGTGCAGCGTTTCAGAATCGACAATTTAATAATCCCTAATGT  
CCATTTTGGACCATTTCTAATTTAAAATTTAAACACACACTCGAGGAAAAAAATTATATATA  
TTAGTCATTTTCGATAATGAAAAAGCCTTGGCGATGACAAGATTATCATAGGTGATTTTATA  
TCATTGGTTTAAACAGTTCCCAACGTAAGGTGAGTTTGTACAGGGAGGGGGACATCATATATG  
CAATCACAAAAAGATTCATTGCACATTATACAGGCAAATGCATTTTCAGTTTTCTTGACATA  
GATCATAGATGATATAGGCACGTAAGAGATTCAGGGATCTCTGCACAAAATTGCAAACCTTA  
TTGATTTTAGATCAACAACAGAAGAGTTGCATAGCATTCTTCAGATTCACAACCTAATTCAAG  
CATCTGAACTTGTAGAGAAGTTAAGAGAGTGGGACCTGTGGGTTATGGGCCACCACGCTTC  
CGCTGCGCCACTCTGACTAGCATGGCTTAGTGCAAAAGCACCTCCTCCTGAATCCCCTGCAA  
TTACCACCAGAAAATCTTTCAGTCTCGCAAACAGAAGCACAAATTCTTATCGCTAACACATGG  
TCCCTTGAACCTATGGCTCAAAGACTCACAATGTCTAGCCTCAACAATTCTAGTTGGACCCA  
TCTCAGCAGCAGCGTACCACCACCACCGCTAAGAAAATCACTTTCCTTCCATCCTCAAAG  
TCTCTGTCAGTTCCACCTCGACCTTGTGGGTCATACTCAGACCAACTTGAATCTCTCAAAG  
TAAGTTCCATCAGCTTGAACCTACACTATATTTGCGAGAATGTAGTTCAGCAGTTCCATTCTCC  
ATTCCTTGTGCCAAAAGATCCTCCACATAGATTGTGGCTTCACCAAGGAAGTCATCCTTAGT  
AAAGGTATCCTTGTCCATGATTTTGAGAATGAGCTTGTACTGGCCACCAGACCCTGGATACT  
CCACCCTGAAGGTGAATCTTTCATTCCATGTCCAACCTCCACCACGACCTTGAGCCACGCTG  
CTTGTGCGCTCTTGGGCTTTGTATTGTATTATAACATAGGGATCAATATTACCTAAGAAATCG  
GTGTTGGCAAGACCTTTACCACTCNCAAGAANTACTTCC

**Anexo 4.** Resultado de la secuenciación de la construcción 3 (pB7FWG,0-pCsPP16-463pb::CsPP16-1::BM::Scp326::Slp322::TLS-1-OK-1::3'UTR) en el vector pCR8 previo a la recombinación en el vector pB7FWG,0. En color amarillo indica la secuencia de TLS-1. En color verde, naranja, violeta, gris y rojo indica el marco de abierto de *CsPP16-1*, una bisagra molecular, el sitio de corte de la proteasa PP36, la defensina *Slp322* y la región 3'UTR de *CsPP16-1*, respectivamente.

CCCTTTGCCTTGCAAGGAGCATGTGCAGCGTTTCAGAATCGACAATTTAATAATCCCTAATG  
TCCATTTTGGACCATTTCTAATTAATAATTTAAACACACACTCGAGGAAAAAAAAATTATATAT  
ATTAGTCATTTTCGATAATGAAAAAGCCTTGGCGATGACAAGATTATCATAGGTGATTTTAT  
ATCATTGGTTTAAACAGTTCCCAACGTAAGGTGAGTTTGTACAGGGAGGGGGACATCATATAT  
GCAATCACAAAAAAGATTTCATTGCACATTATACAGGCAAATGCATTTTCAGTTTTCTTGACAT  
AGATCATAGATGATATAGGCACGTAAGAGATTCAGGGATCTCTGCACAAAATTGCAAACCTT  
ATTGATTTTAGATCAACAACAGAAGAGTTGCATAGCATTCTTCAGATTCACAACATAATTCAA  
GCATCTGAACCTGTAGAGAAGTTAAGAGAGTTCGATATCAGAGCCAGGTTTCGATCCTGGGAC  
CTGTGGGTTATGGGCCACCACGCTTCCGCTGCGCCACTCTGATACTAGCATGGCTTAGTGC  
AAAAGCACCTCCTCCTGAATCCCCTGCAATTACCACCAGAAAATCTTTCAGTCTCGAAACA  
GAAGCACAATTCTTATCGCTAACACATGGTCCCTTGAACCTATGGCTCAAAGACTCACAATG  
TCTAGCCTCAACAATTCTAGTTGGACCCATCTCAGCAGCAGCGCTACCACCACCACCGCTAA  
GAAAATCACTTTCCTTCCATCCTCCAAAGTCTCTGTGAGTTTCCACCTCGACCTTGTGGGTCA  
TACTCAGACCAACTTGAATCTCTCAAAGTAAGTTCCATCAGCTTGAACACTACTATATTTGC  
GAGAATGTAGTTCAGCAGTTCCATTCTCATTCTTGTGCCAAAAGATCCTCCACATAGATTG  
TGGCTTACCAAGGAAGTCATCCTTAGTAAAGGTATCCTTGTCCATGATTTTGAGAATGAGC  
TTGTACTGGCCACCAGACCCTGGATACTCCACCCTGAAGGTGAATCTTTCATTCCATGTCCAA  
CTCCCACCACGACCTTGAGCCACGCTGCTTGTGCCCTCTGGGCTTTGTATTGTATTATAACA  
TAGGGATCAATATTACCTAAAGAAATCGGGNNTGGCAAGACC

**Anexo 5.** Especies de plantas seleccionadas y sus homólogos PP16 recuperados de la base de datos Phytozome v13. También se enumeran las proteínas relacionadas con PP16 de las clorófitas (algas verdes).

No.	Category	Abbreviation Species	PP16 homologs	
1	Basal embryophytes	ppp Physcomitrella patens	112279523_ERG1-like 112289355_ERG3-like	
2		smo Selaginella moellendorffii	SELMODRAFT_148785 SELMODRAFT_229026	
3	Basal angiosperm	atr Amborella trichopoda (v1.0)	scaffold00009.330 scaffold00009.331	
4	Monocots	spo Spirodela polyrhiza (v2.0)	Spipo23G0016400 Spipo23G0016300 Spipo16G0035500	
5		osa Oryza sativa (v7.0)	LOC_Os01g62430.3_OsERG1_RPP17 LOC_Os04g44870.1_OsERG3_RPP16 LOC_Os04g58570.1 LOC_Os02g42710.1	
6		pvi Panicum virgatum (v5.1)	Pavir.5KG621600.2.p Pavir.5NG582800.1.p Pavir.1NG368400.1.p Pavir.1KG408900.1.p Pavir.7NG338700.1.p Pavir.7NG444500.3.p Pavir.7KG372100.3.p	
7		sbi Sorghum bicolor (v3.1.1)	Sobic.003G352400.1 Sobic.004G228300.1 Sobic.006G157900.1 Sobic.006G271300.1	
8		zma Zea mays (v4.0)	Zm00001d042909_P001 Zm00001d051249_P003 Zm00001d002850_P001 Zm00001d026642_P001	
9		Eudicots	sly Solanum lycopersicum (ITAG3.2)	Solyc04g011540.3.1 Solyc10g018060.2.1 Solyc08g080680.3.1
10			stu Solanum tuberosum (v6.1)	Soltu.DM.04G007530.1 Soltu.DM.10G007190.1 Soltu.DM.08G027310.1
11			egr Eucalyptus grandis (v2.0)	Eucgr.J00003.1 Eucgr.E00562.1
12	vvi Vitis vinifera (v2.1)		VIT_213s0019g01490.1 VIT_208s0007g00430.1 VIT_202s0025g04350.1	
13	pop Populus trichocarpa (v4.1)		Potri.010G203000.2.p Potri.010G203100.1.p Potri.002G155600.1.p	

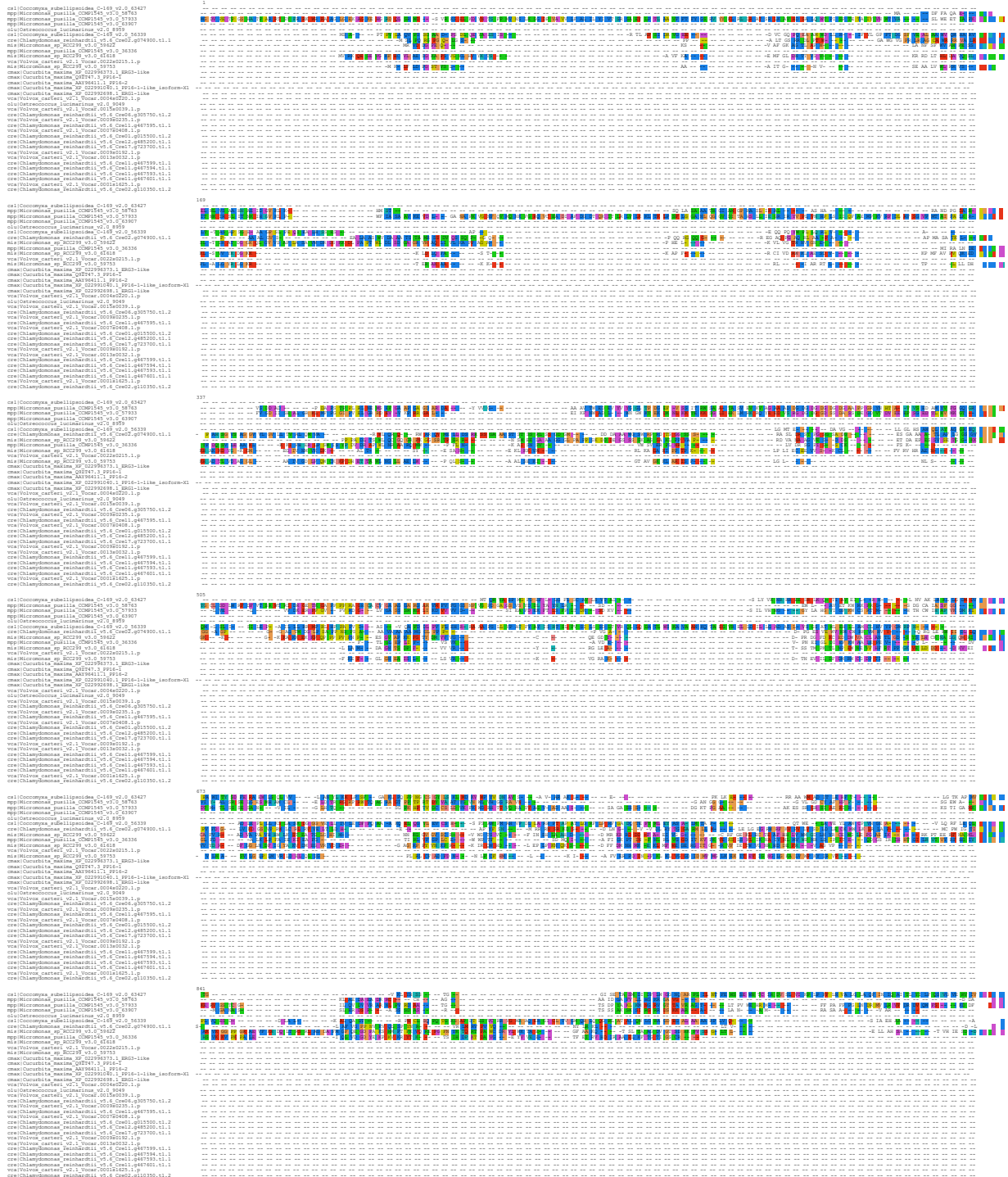
14	rco Ricinus communis (v0.1)	27383.m000160 30190.m011166 30174.m008982
15	csi Citrus sinensis (v1.1)	g035563m_ERG1_CsPP16-1_XP_006486477.1 g046962m_At1g63220-like_CsPP16-2_XP_006477594.2 g037768m_ERG3-like_isoform-1_CsPP16-3_XP_006491029.1
16	ccl Citrus clementina (v1.0)	Ciclev10032979m Ciclev10024188m Ciclev10022928m
17	cpa Carica papaya (ASGPB v0.4)	1.414 1.415 18.207
18	tca Theobroma cacao (v2.1)	Thecc.10G040600.1.p Thecc.03G274700.1.p Thecc.01G359300.1.p
19	aly Arabidopsis lyrata (v2.1)	AL5G36620.t1 AL2G12160.t1
20	ath Arabidopsis thaliana (TAIR10)	AT3G55470.1_AtPP16-1 AT1G63220.1_AtPP16-2
21	bra Brassica rapa (FPsc v1.3)	Brara.D00394.1 Brara.I03796.1 Brara.I01220.1
22	esa Eutrema salsugineum (v1.0)	Thhalv10010786m Thhalv10023745m
23	csa Cucumis sativus (v1.0)	Cucsa.010870.1 Cucsa.010880.1 Cucsa.302880.1
24	cmax Cucurbita maxima	Q9ZT47.3_PP16-1* AAAY96411.1_PP16-2* XP_022991040.1_PP16-1-like_isoform-X1* XP_022992698.1_ERG1-like XP_022996373.1_ERG3-like
25	emos Cucurbita moschata	ABK41006.1_PP16-1 ABK41007.1_PP16-2 XP_022921678.1_PP16-2-like_isoform-X1 XP_022953694.1_PP16-1-like_isoform-X1 XP_022938500.1_ERG1-like XP_022957957.1_ERG3-like
26	gmx Glycine max (Wm82.a4.v1)	Glyma.02G247900.3.p Glyma.11G219000.1.p Glyma.18G038400.1.p Glyma.14G068400.1.p Glyma.02G248000.1.p Glyma.02G248100.1.p Glyma.03G015400.1.p Glyma.07G075300.2.p

			Glyma.18G224800.1.p Glyma.08G011900.1.p Glyma.05G204900.1.p
27		pvu Phaseolus vulgaris (v2.1)	Phvul.008G232800.1 Phvul.008G232700.1 Phvul.008G232600.1 Phvul.002G286900.1 Phvul.010G093800.1 Phvul.008G073400.1
28		pper Prunus persica (v2.1)	Prupe.2G236500.1 Prupe.6G256400.1 Prupe.2G158500.1 Prupe.5G094600.1 Prupe.2G158700.1 Prupe.2G158800.1 Prupe.5G094700.1
29	Green algae	cre Chlamydomonas reinhardtii (v5.5)	Cre01.g015500.t1.2 Cre02.g110350.t1.2 Cre17.g723700.t1.1 Cre12.g485200.t1.1 Cre11.g467599.t1.1 Cre11.g467594.t1.1 Cre11.g467593.t1.1 Cre11.g467601.t1.1 Cre11.g467595.t1.1 Cre06.g305750.t1.2 Cre02.g074900.t1.1
30		vca Volvox carteri (v2.1)	Vocar.0007s0408.1.p Vocar.0013s0032.1.p Vocar.0009s0235.1.p Vocar.0001s1625.1.p Vocar.0015s0039.1.p Vocar.0009s0192.1.p Vocar.0004s0220.1.p
31		cs Coccomyxa subellipsoidea (C-169 v2.0)	63427 56339
32		mpp Micromonas pusilla (CCMP1545 v3.0)	36336 57933 63907 58763
33		mis Micromonas sp. (RCC299 v3.0)	59753 61618 59622
34		olu Ostreococcus lucimarinus (v2.0)	8959 9049

\* Estas secuencias se utilizaron como consulta para la identificación y recuperación de homólogos de PP16 o proteínas relacionadas.



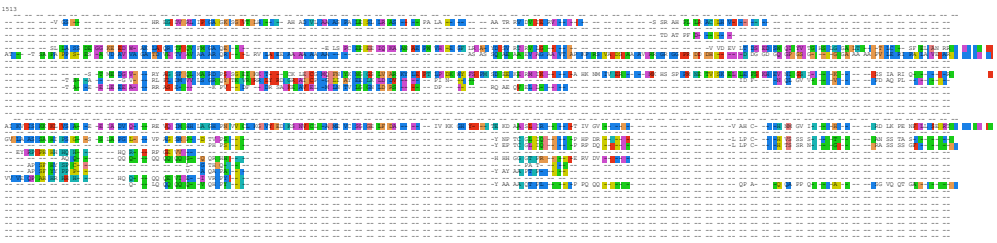
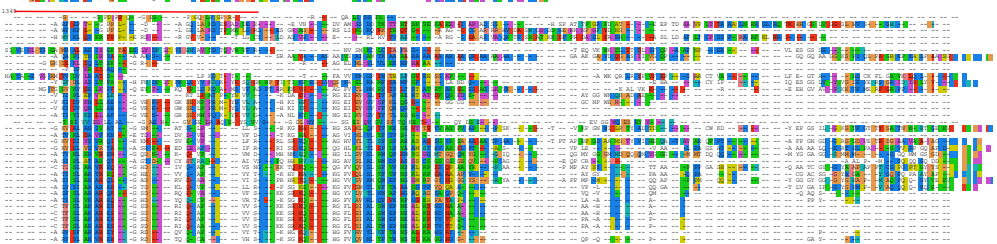
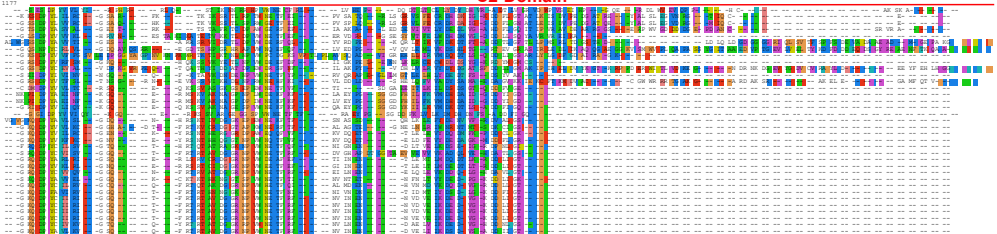
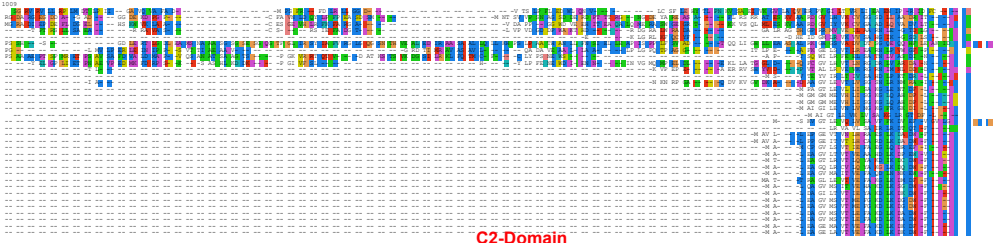
**Anexo 6.** Alineamiento de CmPP16 de calabaza y proteínas relacionadas con PP16 en especies de algas verdes. Se utilizó Clustal Omega versión 1.2.3 en modo local para el alineamiento de secuencias y el código de color se aplicó con el software Jalview versión 1.0. El dominio C2 se indica en rojo en el alineamiento.

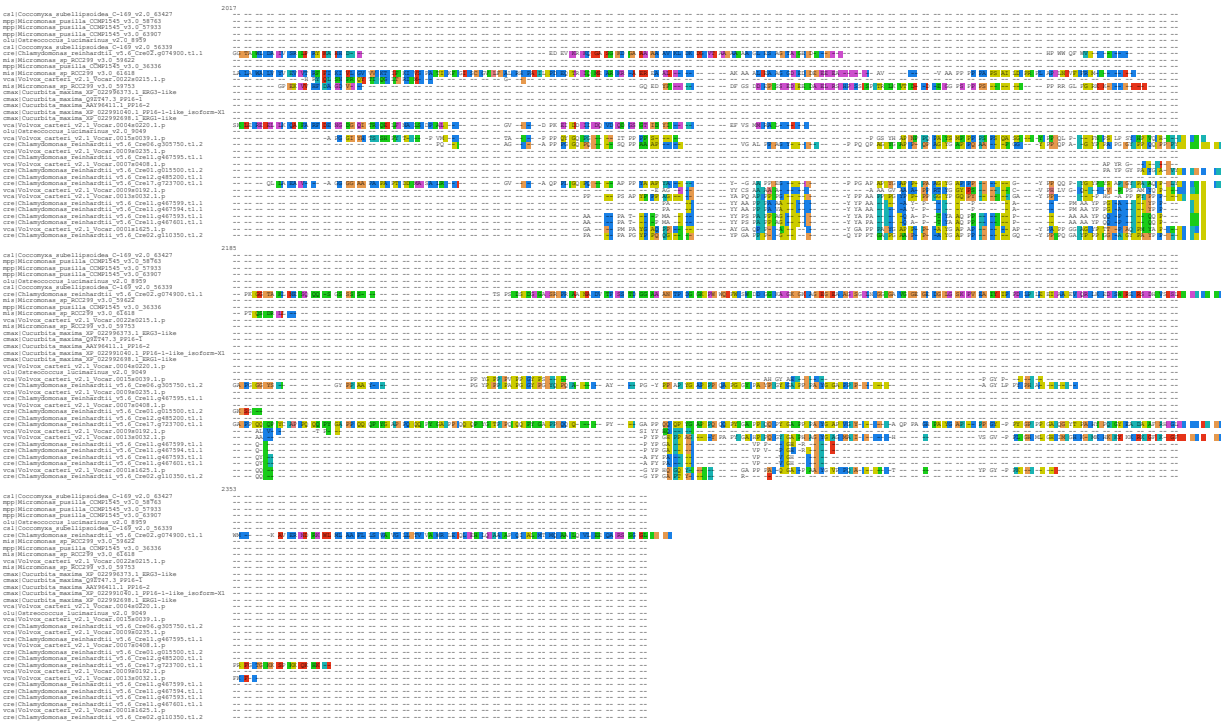


```

#1|Coccidioides immitis|C-185-V2-0_41427
#2|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_3781
#3|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_3782
#4|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_3783
#5|Chlamydomonas_reinhardtii|v8-Cm01-078740.t1.1
#6|Coccidioides immitis|C-185-V2-0_36339
#7|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37836
#8|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37837
#9|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37838
#10|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37839
#11|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37840
#12|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37841
#13|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37842
#14|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37843
#15|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37844
#16|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37845
#17|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37846
#18|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37847
#19|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37848
#20|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37849
#21|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37850
#22|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37851
#23|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37852
#24|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37853
#25|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37854
#26|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37855
#27|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37856
#28|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37857
#29|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37858
#30|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37859
#31|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37860
#32|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37861
#33|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37862
#34|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37863
#35|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37864
#36|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37865
#37|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37866
#38|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37867
#39|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37868
#40|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37869
#41|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37870
#42|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37871
#43|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37872
#44|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37873
#45|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37874
#46|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37875
#47|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37876
#48|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37877
#49|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37878
#50|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37879
#51|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37880
#52|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37881
#53|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37882
#54|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37883
#55|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37884
#56|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37885
#57|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37886
#58|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37887
#59|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37888
#60|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37889
#61|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37890
#62|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37891
#63|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37892
#64|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37893
#65|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37894
#66|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37895
#67|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37896
#68|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37897
#69|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37898
#70|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37899
#71|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37900
#72|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37901
#73|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37902
#74|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37903
#75|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37904
#76|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37905
#77|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37906
#78|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37907
#79|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37908
#80|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37909
#81|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37910
#82|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37911
#83|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37912
#84|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37913
#85|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37914
#86|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37915
#87|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37916
#88|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37917
#89|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37918
#90|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37919
#91|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37920
#92|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37921
#93|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37922
#94|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37923
#95|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37924
#96|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37925
#97|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37926
#98|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37927
#99|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37928
#100|Micrococcus_puella|CM0164-V2-0_37929

```





**Anexo 7.** Dominio C2 de las proteínas PP16 en especies de Viridiplantae. Se incluyen los dominios C2 de las proteínas relacionadas con PP16 en especies de algas verdes. Los datos se obtuvieron de la base de datos de la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas. (<https://www.genome.jp/tools/motif/>).

Query	Pfam	Position (E-value)	Description
cmax Cucurbita_maxima_Q9ZT47.3_PP16-1	<a href="#">C2</a>	5..104(1.4e-15)	PF00168, C2 domain
cmax Cucurbita_maxima_AAY96411.1_PP16-2	<a href="#">C2</a>	5..110(6.3e-18)	PF00168, C2 domain
cmax Cucurbita_maxima_XP_022991040.1_PP16-1-like_isoform-X1	<a href="#">C2</a>	4..98(5e-19)	PF00168, C2 domain
cmax Cucurbita_maxima_XP_022991040.1_PP16-1-like_isoform-X1	<a href="#">B9-C2</a>	34..95(0.096)	PF07162, Ciliary basal body-associated, B9 protein
cmax Cucurbita_maxima_XP_022992698.1_ERG1-like	<a href="#">C2</a>	4..100(7e-20)	PF00168, C2 domain
cmax Cucurbita_maxima_XP_022996373.1_ERG3-like	<a href="#">C2</a>	4..94(3.4e-20)	PF00168, C2 domain
cmos Cucurbita_moschata_ABK41006.1_PP16-1	<a href="#">C2</a>	4..109(2e-17)	PF00168, C2 domain
cmos Cucurbita_moschata_ABK41007.1_PP16-2	<a href="#">C2</a>	4..110(2.4e-18)	PF00168, C2 domain
cmos Cucurbita_moschata_ABK41007.1_PP16-2	<a href="#">DUF6402</a>	37..75(0.076)	PF19940, Family of unknown function (DUF6402)
cmos Cucurbita_moschata_XP_022921678.1_PP16-2-like_isoform-X1	<a href="#">C2</a>	4..109(1e-16)	PF00168, C2 domain
cmos Cucurbita_moschata_XP_022953694.1_PP16-1-like_isoform-X1	<a href="#">C2</a>	4..98(2.4e-19)	PF00168, C2 domain
cmos Cucurbita_moschata_XP_022953694.1_PP16-1-like_isoform-X1	<a href="#">B9-C2</a>	33..94(0.046)	PF07162, Ciliary basal body-associated, B9 protein
cmos Cucurbita_moschata_XP_022938500.1_ERG1-like	<a href="#">C2</a>	4..100(3.9e-19)	PF00168, C2 domain
cmos Cucurbita_moschata_XP_022938500.1_ERG1-like	<a href="#">NT-C2</a>	37..127(0.11)	PF10358, N-terminal C2 in EEIG1 and EHBPI proteins
cmos Cucurbita_moschata_XP_022957957.1_ERG3-like	<a href="#">C2</a>	4..94(3.4e-20)	PF00168, C2 domain
ppp Physcomitrium_patens_112279523_ERG1-like	<a href="#">C2</a>	4..94(4.4e-17)	PF00168, C2 domain
ppp Physcomitrium_patens_112289355_ERG3-like	<a href="#">C2</a>	4..95(1.4e-15)	PF00168, C2 domain
smo Selaginella_moellendorffii_SELMODRAFT_148785	<a href="#">C2</a>	4..95(2e-19)	PF00168, C2 domain
smo Selaginella_moellendorffii_SELMODRAFT_229026	<a href="#">C2</a>	4..95(1.2e-19)	PF00168, C2 domain
atr Amborella_trichopoda_v1.0_scaffold00009.330	<a href="#">C2</a>	4..96(7.5e-22)	PF00168, C2 domain
atr Amborella_trichopoda_v1.0_scaffold00009.331	<a href="#">C2</a>	4..95(8.2e-20)	PF00168, C2 domain
spo Spirodela_polyrhiza_v2_Spipo23G0016400	<a href="#">C2</a>	6..105(1.3e-20)	PF00168, C2 domain
spo Spirodela_polyrhiza_v2_Spipo23G0016300	<a href="#">C2</a>	6..102(4e-19)	PF00168, C2 domain
spo Spirodela_polyrhiza_v2_Spipo16G0035500	<a href="#">C2</a>	4..93(2.9e-18)	PF00168, C2 domain
osa Oryza_sativa_v7.0_LOC_Os01g62430.3_OsERG1_RPP17	<a href="#">C2</a>	5..108(7.5e-22)	PF00168, C2 domain
osa Oryza_sativa_v7.0_LOC_Os01g62430.3_OsERG1_RPP17	<a href="#">B9-C2</a>	40..96(0.017)	PF07162, Ciliary basal body-associated, B9 protein
osa Oryza_sativa_v7.0_LOC_Os01g62430.3_OsERG1_RPP17	<a href="#">DOCK-C2</a>	40..81(0.14)	PF14429, C2 domain in Dock180 and Zizimin proteins
osa Oryza_sativa_v7.0_LOC_Os04g44870.1_OsERG3_RPP16	<a href="#">C2</a>	4..97(3.3e-20)	PF00168, C2 domain
osa Oryza_sativa_v7.0_LOC_Os04g58570.1	<a href="#">C2</a>	4..93(1.3e-20)	PF00168, C2 domain
osa Oryza_sativa_v7.0_LOC_Os02g42710.1	<a href="#">C2</a>	4..96(4.8e-19)	PF00168, C2 domain
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.5KG621600.2.p	<a href="#">C2</a>	4..109(4.7e-21)	PF00168, C2 domain
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.5KG621600.2.p	<a href="#">PI3K_C2</a>	41..97(0.17)	PF00792, Phosphoinositide 3-kinase C2
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.5NG582800.1.p	<a href="#">C2</a>	4..109(2.4e-22)	PF00168, C2 domain
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.5NG582800.1.p	<a href="#">Sec39</a>	15..91(0.018)	PF08314, Secretory pathway protein Sec39
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.5NG582800.1.p	<a href="#">PI3K_C2</a>	42..96(0.18)	PF00792, Phosphoinositide 3-kinase C2
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.1NG368400.1.p	<a href="#">C2</a>	4..98(1.4e-19)	PF00168, C2 domain
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.1KG408900.1.p	<a href="#">C2</a>	4..98(1.4e-19)	PF00168, C2 domain

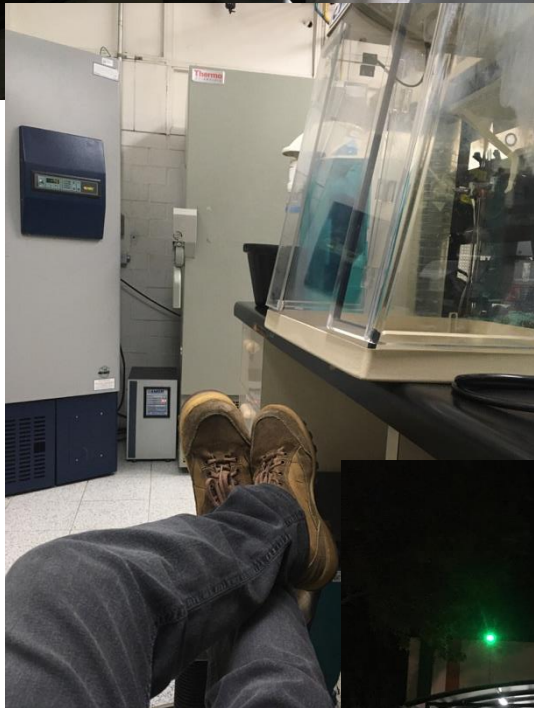
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.7NG338700.1.p	<a href="#">C2</a>	4..96(1.1e-19)	PF00168, C2 domain
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.7NG444500.3.p	<a href="#">C2</a>	4..95(3.1e-20)	PF00168, C2 domain
pvi Panicum_virgatum_v5.1_Pavir.7KG372100.3.p	<a href="#">C2</a>	4..95(3.7e-20)	PF00168, C2 domain
sbi Sorghum_bicolor_v3.1.1_Sobic.003G352400.1	<a href="#">C2</a>	4..108(5.9e-22)	PF00168, C2 domain
sbi Sorghum_bicolor_v3.1.1_Sobic.003G352400.1	<a href="#">DOCK-C2</a>	39..80(0.19)	PF14429, C2 domain in Dock180 and Zizimin proteins
sbi Sorghum_bicolor_v3.1.1_Sobic.004G228300.1	<a href="#">C2</a>	4..97(3.2e-18)	PF00168, C2 domain
sbi Sorghum_bicolor_v3.1.1_Sobic.006G157900.1	<a href="#">C2</a>	5..97(4.2e-18)	PF00168, C2 domain
sbi Sorghum_bicolor_v3.1.1_Sobic.006G271300.1	<a href="#">C2</a>	4..93(3.4e-20)	PF00168, C2 domain
zma Zea_mays_RefGen_V4_Zm00001d042909_P001	<a href="#">C2</a>	4..109(5.9e-22)	PF00168, C2 domain
zma Zea_mays_RefGen_V4_Zm00001d042909_P001	<a href="#">Sec39</a>	14..91(0.006)	PF08314, Secretory pathway protein Sec39
zma Zea_mays_RefGen_V4_Zm00001d042909_P001	<a href="#">DOCK-C2</a>	39..80(0.56)	PF14429, C2 domain in Dock180 and Zizimin proteins
zma Zea_mays_RefGen_V4_Zm00001d051249_P003	<a href="#">C2</a>	4..97(3.5e-18)	PF00168, C2 domain
zma Zea_mays_RefGen_V4_Zm00001d002850_P001	<a href="#">C2</a>	4..96(4.5e-18)	PF00168, C2 domain
zma Zea_mays_RefGen_V4_Zm00001d026642_P001	<a href="#">C2</a>	4..95(3.6e-20)	PF00168, C2 domain
sly Solanum_lycopersicum_ITAG3.2_Solyc04g011540.3.1	<a href="#">C2</a>	6..102(5.6e-18)	PF00168, C2 domain
sly Solanum_lycopersicum_ITAG3.2_Solyc04g011540.3.1	<a href="#">Big_3</a>	105..147(0.017)	PF07523, Bacterial Ig-like domain (group 3)
sly Solanum_lycopersicum_ITAG3.2_Solyc10g018060.2.1	<a href="#">C2</a>	4..105(1.5e-19)	PF00168, C2 domain
sly Solanum_lycopersicum_ITAG3.2_Solyc08g080680.3.1	<a href="#">C2</a>	4..96(4.8e-21)	PF00168, C2 domain
stu Solanum_tuberosum_v6.1_Soltu.DM.04G007530.1	<a href="#">C2</a>	6..102(5.5e-18)	PF00168, C2 domain
stu Solanum_tuberosum_v6.1_Soltu.DM.04G007530.1	<a href="#">Big_3</a>	105..147(0.25)	PF07523, Bacterial Ig-like domain (group 3)
stu Solanum_tuberosum_v6.1_Soltu.DM.10G007190.1	<a href="#">C2</a>	4..105(4.6e-18)	PF00168, C2 domain
stu Solanum_tuberosum_v6.1_Soltu.DM.08G027310.1	<a href="#">C2</a>	4..97(8.5e-21)	PF00168, C2 domain
egr Eucalyptus_grandis_v2.0_Eucgr.J00003.1	<a href="#">C2</a>	5..108(1.9e-16)	PF00168, C2 domain
egr Eucalyptus_grandis_v2.0_Eucgr.E00562.1	<a href="#">C2</a>	4..95(5.1e-20)	PF00168, C2 domain
vvi Vitis_vinifera_v2.1_VIT_213s0019g01490.1	<a href="#">C2</a>	5..102(6.8e-20)	PF00168, C2 domain
vvi Vitis_vinifera_v2.1_VIT_208s0007g00430.1	<a href="#">C2</a>	8..106(3.6e-16)	PF00168, C2 domain
vvi Vitis_vinifera_v2.1_VIT_202s0025g04350.1	<a href="#">C2</a>	4..96(8.4e-21)	PF00168, C2 domain
pop Populus_trichocarpa_v4.1_Potri.010G203000.2.p	<a href="#">C2</a>	4..107(5.6e-20)	PF00168, C2 domain
pop Populus_trichocarpa_v4.1_Potri.010G203100.1.p	<a href="#">C2</a>	4..103(8.8e-20)	PF00168, C2 domain
pop Populus_trichocarpa_v4.1_Potri.002G155600.1.p	<a href="#">C2</a>	4..94(2.4e-19)	PF00168, C2 domain
rco Ricinus_communis_v0.1_27383.m000160	<a href="#">C2</a>	4..104(4.1e-20)	PF00168, C2 domain
rco Ricinus_communis_v0.1_30190.m011166	<a href="#">C2</a>	4..101(3.3e-19)	PF00168, C2 domain
rco Ricinus_communis_v0.1_30174.m008982	<a href="#">C2</a>	4..94(1.2e-19)	PF00168, C2 domain
csi Citrus_sinensis_v1.1_orange1.1g035563m_ERG1_CsPP16-1	<a href="#">C2</a>	5..106(6.7e-17)	PF00168, C2 domain
csi Citrus_sinensis_v1.1_orange1.1g046962m_At1g63220-like_CsPP16-2	<a href="#">C2</a>	4..104(6.6e-21)	PF00168, C2 domain
csi Citrus_sinensis_v1.1_orange1.1g037768m_ERG3-like_isoform-1_CsPP16-3	<a href="#">C2</a>	4..94(6e-19)	PF00168, C2 domain
ccl Citrus_clementina_v1.0_Ciclev10032979m	<a href="#">C2</a>	5..106(6.4e-17)	PF00168, C2 domain
ccl Citrus_clementina_v1.0_Ciclev10024188m	<a href="#">C2</a>	4..104(6.6e-21)	PF00168, C2 domain
ccl Citrus_clementina_v1.0_Ciclev10022928m	<a href="#">C2</a>	4..41(0.0022) 48..78(0.00034)	PF00168, C2 domain
ccl Citrus_clementina_v1.0_Ciclev10022928m	<a href="#">Npun_R1517</a>	29..67(0.098)	PF18068, Npun R1517
cpa Carica_papaya_ASGPB_v0.4_1.414	<a href="#">C2</a>	5..102(7.2e-19)	PF00168, C2 domain
cpa Carica_papaya_ASGPB_v0.4_1.415	<a href="#">C2</a>	3..73(9.5e-11)	PF00168, C2 domain
cpa Carica_papaya_ASGPB_v0.4_18.207	<a href="#">C2</a>	4..92(7.1e-21)	PF00168, C2 domain
tca Theobroma_cacao_v2.1_Thecc.10G040600.1.p	<a href="#">C2</a>	4..102(5e-18)	PF00168, C2 domain
tca Theobroma_cacao_v2.1_Thecc.03G274700.1.p	<a href="#">C2</a>	4..94(2.3e-20)	PF00168, C2 domain
tca Theobroma_cacao_v2.1_Thecc.01G359300.1.p	<a href="#">C2</a>	4..97(2.1e-12)	PF00168, C2 domain
aly Arabidopsis_lyrata_v2.1_AL5G36620.t1	<a href="#">C2</a>	4..107(2.9e-21)	PF00168, C2 domain
aly Arabidopsis_lyrata_v2.1_AL2G12160.t1	<a href="#">C2</a>	4..94(8.6e-19)	PF00168, C2 domain
ath Arabidopsis_thaliana_TAIR10_AT3G55470.1_AtPP16-1	<a href="#">C2</a>	4..107(2.9e-21)	PF00168, C2 domain
ath Arabidopsis_thaliana_TAIR10_AT1G63220.1_AtPP16-2	<a href="#">C2</a>	4..94(8.3e-19)	PF00168, C2 domain

bra Brassica_rapa_FPsc_v1.3_Brara.D00394.1	<a href="#">C2</a>	4..108(1.1e-22)	PF00168, C2 domain
bra Brassica_rapa_FPsc_v1.3_Brara.I03796.1	<a href="#">C2</a>	4..105(9.3e-20)	PF00168, C2 domain
bra Brassica_rapa_FPsc_v1.3_Brara.I01220.1	<a href="#">C2</a>	4..94(1.1e-18)	PF00168, C2 domain
esa Eutrema_salsugineum_v1.0_Thhalv10010786m	<a href="#">C2</a>	4..105(1.4e-19)	PF00168, C2 domain
esa Eutrema_salsugineum_v1.0_Thhalv10023745m	<a href="#">C2</a>	4..94(2.4e-18)	PF00168, C2 domain
csa Cucumis_sativus_v1.0_Cucsa.010870.1	<a href="#">C2</a>	4..99(1.7e-19)	PF00168, C2 domain
csa Cucumis_sativus_v1.0_Cucsa.010880.1	<a href="#">C2</a>	4..100(4.5e-18)	PF00168, C2 domain
csa Cucumis_sativus_v1.0_Cucsa.302880.1	<a href="#">C2</a>	4..98(2.8e-19)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.02G247900.3.p	<a href="#">C2</a>	6..105(2e-21)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.11G219000.1.p	<a href="#">C2</a>	6..102(2.2e-20)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.11G219000.1.p	<a href="#">PI3K_C2</a>	38..77(0.12)	PF00792, Phosphoinositide 3-kinase C2
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.18G038400.1.p	<a href="#">C2</a>	6..101(6.7e-21)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.18G038400.1.p	<a href="#">B9-C2</a>	34..93(0.13)	PF07162, Ciliary basal body-associated, B9 protein
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.14G068400.1.p	<a href="#">C2</a>	6..103(2.2e-20)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.02G248000.1.p	<a href="#">C2</a>	6..103(2.4e-20)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.02G248100.1.p	<a href="#">C2</a>	6..101(3.3e-21)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.03G015400.1.p	<a href="#">C2</a>	4..97(2.7e-20)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.07G075300.2.p	<a href="#">C2</a>	4..97(5.2e-20)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.18G224800.1.p	<a href="#">C2</a>	4..94(2.1e-21)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.08G011900.1.p	<a href="#">C2</a>	4..93(4.1e-18)	PF00168, C2 domain
gmx Glycine_max_Wm82.a4.v1_Glyma.05G204900.1.p	<a href="#">C2</a>	4..93(3.2e-18)	PF00168, C2 domain
pvu Phaseolus_vulgaris_v2.1_Phvu1.008G232800.1	<a href="#">C2</a>	6..103(2.5e-20)	PF00168, C2 domain
pvu Phaseolus_vulgaris_v2.1_Phvu1.008G232700.1	<a href="#">C2</a>	6..103(1.2e-21)	PF00168, C2 domain
pvu Phaseolus_vulgaris_v2.1_Phvu1.008G232600.1	<a href="#">C2</a>	7..103(5.4e-19)	PF00168, C2 domain
pvu Phaseolus_vulgaris_v2.1_Phvu1.002G286900.1	<a href="#">C2</a>	4..96(5.8e-21)	PF00168, C2 domain
pvu Phaseolus_vulgaris_v2.1_Phvu1.002G286900.1	<a href="#">BCL9</a>	119..130(0.21)	PF11502, B-cell lymphoma 9 protein
pvu Phaseolus_vulgaris_v2.1_Phvu1.010G093800.1	<a href="#">C2</a>	4..96(2.5e-21)	PF00168, C2 domain
pvu Phaseolus_vulgaris_v2.1_Phvu1.008G073400.1	<a href="#">C2</a>	4..96(1.5e-21)	PF00168, C2 domain
pper Prunus_persica_v2.1_Prupe.2G236500.1	<a href="#">C2</a>	4..103(2.8e-19)	PF00168, C2 domain
pper Prunus_persica_v2.1_Prupe.2G236500.1	<a href="#">Mago-bind</a>	117..129(0.18)	PF09282, Mago binding
pper Prunus_persica_v2.1_Prupe.6G256400.1	<a href="#">C2</a>	4..101(1.4e-17)	PF00168, C2 domain
pper Prunus_persica_v2.1_Prupe.6G256400.1	<a href="#">Ribos_L4_asso_C</a>	15..38(0.32)	PF14374, 60S ribosomal protein L4 C-terminal domain
pper Prunus_persica_v2.1_Prupe.2G158500.1	<a href="#">C2</a>	4..95(3.4e-21)	PF00168, C2 domain
pper Prunus_persica_v2.1_Prupe.5G094600.1	<a href="#">C2</a>	4..96(2.4e-24)	PF00168, C2 domain
pper Prunus_persica_v2.1_Prupe.2G158700.1	<a href="#">C2</a>	4..96(1.4e-21)	PF00168, C2 domain
pper Prunus_persica_v2.1_Prupe.2G158800.1	<a href="#">C2</a>	4..97(1e-20)	PF00168, C2 domain
pper Prunus_persica_v2.1_Prupe.5G094700.1	<a href="#">C2</a>	5..104(2.3e-21)	PF00168, C2 domain
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_36336	<a href="#">C2</a>	400..490(3e-15)	PF00168, C2 domain
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_36336	<a href="#">SMP_LBD</a>	36..220(8.4e-13)	PF17047, Synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding domain
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_57933	<a href="#">C2</a>	629..734(1.6e-18) 803..896(6.1e-16)	PF00168, C2 domain
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_57933	<a href="#">MMM1</a>	148..228(0.28)	PF10296, Maintenance of mitochondrial morphology protein 1
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_63907	<a href="#">C2</a>	122..214(3.6e-19)	PF00168, C2 domain
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_58763	<a href="#">Kelch_4</a>	108..141(0.024) 171..223(7e-09) 224..276(0.0016) 356..389(0.012)	PF13418, Galactose oxidase, central domain
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_58763	<a href="#">Kelch_3</a>	116..178(0.073) 182..232(2.3e-11) 243..279(0.071) 356..405(0.12)	PF13415, Galactose oxidase, central domain

mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_58763	<a href="#">Kelch_5</a>	107..138(0.0021) 169..203(1.4e-05) 222..273(5.5e-06)	PF13854, Kelch motif
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_58763	<a href="#">C2</a>	517..611(1e-16)	PF00168, C2 domain
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_58763	<a href="#">Kelch_1</a>	108..134(0.73) 172..212(1.1e-09) 244..276(0.032)	PF01344, Kelch motif
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_58763	<a href="#">Kelch_6</a>	109..145(0.01) 172..212(0.00061)	PF13964, Kelch motif
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_58763	<a href="#">BTB</a>	853..904(0.11)	PF00651, BTB/POZ domain
mpp Micromonas_pusilla_CCMP1545_v3.0_58763	<a href="#">Kelch_2</a>	171..212(0.21)	PF07646, Kelch motif
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_59753	<a href="#">C2</a>	298..378(1.5e-15) 585..679(2.3e-13)	PF00168, C2 domain
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_59753	<a href="#">SMP_LBD</a>	95..276(0.00015)	PF17047, Synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding domain
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_59753	<a href="#">DOCK-C2</a>	330..385(0.049)	PF14429, C2 domain in Dock180 and Zizimin proteins
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_61618	<a href="#">C2</a>	179..273(1.8e-18) 373..470(1.6e-14) 527..621(9.3e-07)	PF00168, C2 domain
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_61618	<a href="#">PRT_C</a>	896..971(1.2e-05)	PF08372, Plant phosphoribosyltransferase C-terminal
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_61618	<a href="#">AAA_11</a>	818..929(0.0012)	PF13086, AAA domain
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_61618	<a href="#">DDHD</a>	815..894(0.0095)	PF02862, DDHD domain
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_61618	<a href="#">Reticulon</a>	931..981(0.044)	PF02453, Reticulon
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_61618	<a href="#">CAF1</a>	793..880(0.23)	PF04857, CAF1 family ribonuclease
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_61618	<a href="#">Pex24p</a>	928..987(0.058)	PF06398, Integral peroxisomal membrane peroxin
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_61618	<a href="#">DUF5427</a>	809..934(0.83)	PF10310, Family of unknown function (DUF5427)
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_59622	<a href="#">C2</a>	625..736(1.7e-10)	PF00168, C2 domain
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_59622	<a href="#">Exo_endo_phos</a>	109..511(3e-06)	PF03372, Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family
mis Micromonas_sp_RCC299_v3.0_59622	<a href="#">AvrPto</a>	523..606(0.33)	PF11592, Central core of the bacterial effector protein AvrPto
olu Ostreococcus_lucimarinus_v2.0_8959	<a href="#">C2</a>	18..114(1.4e-21)	PF00168, C2 domain
olu Ostreococcus_lucimarinus_v2.0_9049	<a href="#">C2</a>	1..95(2.4e-16)	PF00168, C2 domain
cs Coccomyxa_subellipsoidea_C-169_v2.0_63427	<a href="#">C2</a>	346..447(7.8e-19)	PF00168, C2 domain
cs Coccomyxa_subellipsoidea_C-169_v2.0_63427	<a href="#">SMP_LBD</a>	114..177(0.64) 249..332(0.00032)	PF17047, Synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding domain
cs Coccomyxa_subellipsoidea_C-169_v2.0_56339	<a href="#">Nucleopor_Nup85</a>	53..181(6.5e-11) 235..437(2.3e-21) 460..636(3.6e-13)	PF07575, Nup85 Nucleoporin
cs Coccomyxa_subellipsoidea_C-169_v2.0_56339	<a href="#">Lipase_3</a>	845..1037(3e-27)	PF01764, Lipase (class 3)
cs Coccomyxa_subellipsoidea_C-169_v2.0_56339	<a href="#">C2</a>	672..750(2.1e-18)	PF00168, C2 domain
cs Coccomyxa_subellipsoidea_C-169_v2.0_56339	<a href="#">DUF2428</a>	1073..1132(0.33)	PF10350, THADA/TRM732, DUF2428
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0007s0408.1.p	<a href="#">C2</a>	6..97(6.5e-16)	PF00168, C2 domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0013s0032.1.p	<a href="#">C2</a>	6..95(1.5e-20)	PF00168, C2 domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0009s0235.1.p	<a href="#">C2</a>	6..102(1.3e-14)	PF00168, C2 domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0001s1625.1.p	<a href="#">C2</a>	7..92(9.4e-18)	PF00168, C2 domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0015s0039.1.p	<a href="#">C2</a>	9..102(1.3e-16)	PF00168, C2 domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0009s0192.1.p	<a href="#">C2</a>	8..96(1.6e-17)	PF00168, C2 domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0022s0215.1.p	<a href="#">C2</a>	8..98(7.7e-16)	PF00168, C2 domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">Pkinase</a>	170..428(4.4e-77)	PF00069, Protein kinase domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">PK_Tyr_Ser-Thr</a>	174..424(6.5e-34)	PF07714, Protein tyrosine and serine/threonine kinase
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">EF-hand_1</a>	476..502(7e-07) 513..536(4e-06) 549..574(6.3e-06) 584..612(1.2e-06)	PF00036, EF hand

vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">EF-hand 7</a>	476..537(6.4e-10) 547..610(2.1e-11)	PF13499, EF-hand domain pair
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">EF-hand 6</a>	476..502(6.2e-06) 520..536(0.27) 549..575(6.5e-06) 585..610(0.022)	PF13405, EF-hand domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">EF-hand 5</a>	477..497(0.00043) 517..533(0.00033) 549..569(3.8e-05) 585..609(0.015)	PF13202, EF hand
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">EF-hand 8</a>	476..502(0.0052) 488..535(1.3e-10) 561..610(4e-08)	PF13833, EF-hand domain pair
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">C2</a>	6..105(3.6e-11)	PF00168, C2 domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">Kinase-like</a>	263..380(0.00014)	PF14531, Kinase-like
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">EF-hand 11</a>	480..536(0.00018)	PF08976, EF-hand domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">EF-hand 4</a>	472..535(0.012)	PF12763, Cytoskeletal-regulatory complex EF hand
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">EF-hand 9</a>	483..535(0.0077)	PF14658, EF-hand domain
vca Volvox_carteri_v2.1_Vocar.0004s0220.1.p	<a href="#">Kdo</a>	261..306(0.025)	PF06293, Lipopolysaccharide kinase (Kdo/WaaP) family
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre01.g015500.t1.2	<a href="#">C2</a>	6..97(4.3e-20)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre02.g110350.t1.2	<a href="#">C2</a>	6..100(2.1e-20)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre17.g723700.t1.1	<a href="#">C2</a>	7..93(2.5e-20)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre12.g485200.t1.1	<a href="#">C2</a>	8..92(2.6e-20)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre11.g467599.t1.1	<a href="#">C2</a>	8..95(3.9e-19)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre11.g467594.t1.1	<a href="#">C2</a>	8..95(3.9e-19)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre11.g467593.t1.1	<a href="#">C2</a>	8..95(8.6e-20)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre11.g467601.t1.1	<a href="#">C2</a>	8..94(2.2e-19)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre11.g467595.t1.1	<a href="#">C2</a>	6..104(6.7e-18)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre11.g467595.t1.1	<a href="#">TFIIA</a>	129..191(0.0015)	PF03153, Transcription factor IIA, alpha/beta subunit
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre11.g467595.t1.1	<a href="#">baeRF family7</a>	167..208(0.08)	PF18849, Bacterial archaeo-eukaryotic release factor family 7
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre11.g467595.t1.1	<a href="#">Glypican</a>	137..189(0.067)	PF01153, Glypican
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre06.g305750.t1.2	<a href="#">C2</a>	8..93(5.2e-19)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre02.g074900.t1.1	<a href="#">C2</a>	530..629(2.6e-13)	PF00168, C2 domain
cre Chlamydomonas_reinhardtii_v5.6_Cre02.g074900.t1.1	<a href="#">MMM1</a>	282..358(0.49)	PF10296, Maintenance of mitochondrial morphology protein 1





*¡Hasta pronto!*

**Domingo Jiménez López**

[jlsunday@live.com.mx](mailto:jlsunday@live.com.mx)

[domingo\\_jimenez@cinvestav.mx](mailto:domingo_jimenez@cinvestav.mx)

<https://www.youtube.com/@Domingo-Jim%C3%A9nez-L%C3%B3pez>