

TESIS DOCTORAL

# PAPEL DEL GLUTATIÓN EN LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL OLIVO

Role of glutathione in reproductive biology of olive tree

Estefanía García Quirós

Granada, 2019



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Estefanía García Quirós  
ISBN: 978-84-1117-823-5  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/81472>



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

## **TESIS DOCTORAL**

Programa de Doctorado en Biología Fundamental  
y de Sistemas

# Papel del glutatión en la biología reproductiva del olivo

**Estefanía García Quirós**

**Granada, 2019**

# **Universidad de Granada**

Facultad de Ciencias

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

## **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**

Estación Experimental del Zaidín (EEZ)

Departamento Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas

Memoria presentada por Dña. Estefanía García Quirós, licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada con mención internacional.

*Memory presented to aspire to Doctor in Biology  
(with the mention of "International Doctor").*

**Fdo.: Estefanía García Quirós**

Vº Bº del director de la Tesis Doctoral / *Thesis Supervisor*

**Fdo.: Dr. Juan de Dios Alché Ramírez**  
Ph.D. en Biología  
Investigador Científico del CSIC

Granada, 2019

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Granada, dentro del grupo de investigación de Biología Reproductiva y Microscopía Avanzada de Plantas.

El trabajo ha sido financiado a través de una beca de Formación de Personal Investigador (Ref. Subvención FPI: BES-2012-053324), concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad de España y por los proyectos BFU2011-22779 y BFU2016-77243-P (Plan Nacional de I+D), ambos parcialmente subvencionados por fondos FEDER.

Parte de los resultados expuestos en la tesis han sido logrados durante unas Estancias Breves cuya ayuda fue concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (Ref. subvención: EEBB-I-2015-09662) en el Departamento de Redox Homeostasis, Signalling and Responses to Stress del Centre for Plant Science de la School of Biology de la University of Leeds, en Leeds (Reino Unido), bajo la supervisión de la Prof. Christine Helen Foyer.

/

*This Doctoral Thesis has been performed at the Department of Biochemistry, Cellular and Molecular Biology of Plants of the Estación Experimental del Zaidín (EEZ) from the Spanish National Research Council (CSIC) of Granada, within the research group: Plant Reproductive Biology and Advanced Microscopy Laboratory .*

*This work has been funded through a training research fellowship (Ref. FPI: BES-2012-053324) granted by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and by the projects BFU2011-22779 and BFU2016-77243-P (National Plan of R+D), both co-funded by ERDF.*

*Part of the results included in the present thesis report have been achieved during a short stay granted by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Ref. grant: EEBB-I-2015-09662) and carried out at the Department of Redox Homeostasis, Signalling and Responses to Stress from the Centre for Plant Science of the School of Biology of Leeds University (United Kingdom), under the supervision of Prof. Christine Helen Foyer.*

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en lassiguientes revistas internacionales o están en vías de publicación:

/

*The results presented in this Doctoral Thesis have been published in the following international journals or are in the process of being published:*

**Autores/Authors:** **Estefanía García-Quirós**, Rosario Carmona, Adoración Zafra, M. Gonzalo Claros, Juan de Dios Alché.  
**Título/Title:** Identification and *in silico* Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil. In: Rojas I., Ortuño F. (eds) Bioinformatics and Biomedical Engineering. IWBBIO 2017.  
**Fecha/Date:** 2017  
**Revista/Journal:** Lecture Notes in Computer Science, vol 10209. Springer, Cham.  
**DOI:** 10.1007/978-3-319-56154-7\_18

**Autores/Authors:** **Estefanía García-Quirós**, Juan de Dios Alché, Barbara Karpinska, Christine H Foyer.  
**Título/Title:** Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour.  
**Fecha/Date:** 2019  
**Revista/Journal:** Journal of Experimental Botany.  
**DOI:** 10.1093/jxb/erz376

**Autores/Authors:** **Estefanía García-Quirós**, Elena Lima, Juan de Dios Alché.  
**Título/Title:** Involvement of glutathione and glutathione reductase in the development of the microsporocyte and during the germination of the olive pollen.  
**Fecha/Date:** En preparación/In process

Así mismo, parte de los resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral han sidopresentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

/

*Also, part of the results obtained during this Doctoral Thesis have been presented at the following congresses and scientific meetings:*

E. Lima-Cabello, E. **García-Quirós**, I.M. Martínez-Beas, J.C. Jimenez-Lopez, J.D. Alché. ***Developmental monitoring of glutathione reductase activity, expression, cell localization and molecular variability reveals its relevance in the maintenance of redox homeostasis in male gametophyte of the olive tree (*Olea europaea* L.)***. 14th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, Munich, Germany, July 10 - 12, 2019. (Comunicación Póster).

E. Lima-Cabello, I.M. Martínez-Beas, E. **García-Quirós**, R. Carmona, M. G. Claros, J.C. Jimenez-Lopez, J.D. Alché. ***Structural and functional features of glutathione reductase transcripts from olive (*Olea europaea* L.) seeds***.IWBBIO 2019 (7th International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering), en Granada, 8-10 Mayo de 2019.

E. **García-Quirós**, E. Lima-Cabello, J.C. Jimenez-Lopez, J.D. Alché. ***FM and CLSM localization of glutathione synthesis and metabolism along pollen development in the olive tree***. Focus on Microscopy FOM 2019. London, UK, 14-17 April 2019. (Comunicación póster).

E. **García Quirós**, C.H. Foyer, J.D. Alché. ***CLSM imaging of redox potential in plant reproductive tissues with redox-sensitive GFP (roGFP)***. (SPAOM2018) Spanish Portuguese Meeting for Advanced Optical Microscopy, 4th REMOA Conference, 24-26 de Octubre de 2018, Granada. (Comunicación póster).

J.C. Jimenez-Lopez, E. Lima-Cabello, E. **García-Quirós**, R. Carmona, A. Zafra, A.J. Castro, J.D. Alché. ***Characterization and funcional analysis of enzymes involved in glutathione metabolism in olive reproductive biology***.Olivebioteq 2018.Sevilla. 15-19 de Octubre. (Comunicación oral).

E. **García-Quirós**, C.H. Foyer, J.D. Alché. ***The use of roGFP to investigate Redox Potential in Reproductive Tissues of *Arabidopsis thaliana****.mfs 2017, en Zaragoza (España), 5-8 Septiembre de 2017.(Comunicación oral).

E. **García-Quirós**, R. Carmona, A. Zafra, M.G. Claros, J.D. Alché. ***Identification and in silico Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.)Pollen and Pistil***.IWBBIO 2017 (5th International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering), en Granada, 26-28 Abril de 2017.(Comunicación oral).

E. **García-Quirós**, C.H. Foyer, J.D. Alché. ***Investigating redox potential with redox-sensitive GFP in reproductive tissues of *A. thaliana****.Focus on Microscopy 2017 Bordeaux, France, April 9-12, 2017.(Comunicación póster).

E. **García-Quirós**,I.M. Martínez-Beas, R. Carmona , M.G. Claros, J.D. Alché. ***An overview of genes and transcripts corresponding to enzymes regulating glutathione metabolism in the olive (*Olea europaea*L.) reproductive tissues***.Plant Genomics and Gene Editing Congress - Europe, 16-17 March 2017, Amsterdam, Netherlands. (Comunicación póster).

**E. García-Quirós, J.D. Alché. 'Glutathione peroxidase in reproductive tissues of olive tree' .XI Reunión del Grupo Español de Radicales Libres (GEIRLI) (En Granada, 13-14 Septiembre de 2016). (Comunicación póster, **premiada como una de las mejores comunicaciones al congreso**).**

**E. García-Quirós, J.D. Alché. 'Role of glutathione in reproductive tissues of olive tree'** [Jornadas de Investigadores en Formación](#): fomentando la interdisciplinaridad. (En Granada, 18-20 de Mayo de 2016).(Comunicación oral).

**E. García-Quirós, J.D. Alché. 'Glutathione reductase in olive (*Olea europaea L.*) pollen during pollen development and germination'**.Encuentro Internacional de Medio Ambiente "Reactive oxygen and nitrogen species and environment:a new visión for 2020" (15-17 Octubre de 2014, Baeza).(Comunicación poster y oral).

J.C. Jimenez-Lopez, M.J. Jiménez-Quesada, **E. García-Quirós, A.J. Castro, J.D. Alché. 'Improving penetration of reagents for microscopy imaging of plant reproductive samples'**.II REMOA Congress.Madrid. 13-15 Octubre 2014.(Comunicación poster).

**E. García-Quirós, S.Ch. Brandt, A.J. Castro, J.D. Alché. 'Cellular localization and quantitation of glutathione during olive (*Olea europaea L.*) pollen development and germination'**. XXIII International Congress on Sexual Plant Reproduction "Seeds for the Future" (14-18 Julio de 2014, Oporto).(Comunicación poster).

R. Carmona, A. Zafra, M.J. Jiménez-Quesada, **E. García-Quirós, J.A. Traverso, A.J. Castro, R. Bautista, M.G. Claros, J.D. Alché. ' Identification of transcripts corresponding to enzyme activities regulating ROS metabolism in the olive (*Olea europaea L.*) reproductive tissues trough NGS approaches'**.Plant Genomics Congress, London UK, May 2014. (Comunicación poster).

J.D. Alché, M.L. Fernández-Sierra, A. Rodríguez-Sánchez, **E. García-Quirós, M. Campos. 'Pollen diversity associated to olive orchards-visiting bees'**.Pollen 2013 Madrid. Pollen Biotechnology, Diversity and Function in a Changing Environment. 2<sup>nd</sup> International APLE-APLF Congress (17-20 Septiembre de 2013).(Comunicación oral).

**E. García-Quirós, S.Ch. Brandt, M.I. Rodríguez-García, A.J. Castro, J.D. Alché. 'LM/TEM immunolocalization of low molecular weight antioxidants in olive pollen during pollen development and germination'**.Microscopy at the Frontiers of Science. Tarragona, Spain, 17-20 Septiembre de 2013. 3<sup>rd</sup> Joint Congress of the Portuguese and Spanish Microscopy Societies and Israel Society for Microscopy as invited guest. (Comunicación póster).

M.J. Jiménez-Quesada, A. Zafra, **E. García-Quirós, J.A. Traverso, J.D. Alché. 'Localization of NOX and SOD transcripts in olive reproductive tissues by using double-labelled oligonucleotides probes'**.Microscopy at the Frontiers of Science. Tarragona, Spain, 17-20 Septiembre de 2013. 3<sup>rd</sup> Joint Congress of the Portuguese and Spanish Microscopy Societies and Israel Society for Microscopy as invited guest. (Comunicación póster).



La doctoranda/*The doctoral candidate* Estefanía García Quirós y el director de tesis/*and the thesis supervisors* Juan de Dios Alché Ramírez

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección del director de tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la relación del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

*We declare guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor and, as far as our knowledge reaches, the rights of other authors to be cited (wherein their results or publications have been used) have been respected, in the performance of the work.*

Granada, 30 de octubre de 2019

Juan de Dios Alché Ramírez  
Director de la Tesis / *Thesis Supervisor*

Estefanía García Quirós  
Doctoranda/*PhD candidate*

## Agradecimientos

Durante mis años de tesis, y desde muy al principio del viaje, sufrí el que espero sea el peor revés que me deparaba el destino. Un bache personal que ha sido muy difícil de sobrellevar, y que dificultó bastante la elaboración de mi tesis doctoral. Sin embargo, por fin, aquí está, la que tantas risas y lágrimas me ha brindado, y que jamás hubiera sido posible sin todo este equipo humano que se merece mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director de Tesis, Juan de Dios Alché por su confianza desde el principio, por su infinita paciencia y por todos los valores que me ha transmitido a lo largo de estos años, tanto a nivel científico como humano... por esas clases particulares de microscopía...

A Maribel, “la jefa” original del fantástico grupo que encontré a mi llegada al realizar mi TFM, gracias por esa cálida bienvenida y por tu enorme cariño.

A Antonio, gracias por brindarme esa primera oportunidad y en especial por tu ayuda incondicional, tu tiempo y tu disposición a resolver mis dudas cuando los he necesitado.

Al fantástico equipo de trabajo que encontré desde el principio hasta el final. He aprendido mucho de todos vosotros, compañeros. María José, prácticamente mi hermana, gracias por todo tu apoyo, tu consuelo, tus consejos y los buenos momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio. Como no a Elena, “the best scientist in the world”, por tu ayuda en el labo y las risas y canciones compartidas entre PCRs, Western blot y actividades. Y por supuesto a Dori, mi compañera de viajes y de “despachillo”, siempre que escuche el croar de una rana me acordaré de ti. No me olvido de José Carlos, mi “asesor” con la estadística, bioinformática... e informática en general. Con él he descubierto numerosos programillas muy útiles, gracias por todos tus consejos, por compartir conmigo tu saber y por estar dispuesto a ayudarme con mis dudas y mis problemas. A mis polacos, Agnieszka y Krzysztof, a Jose Ángel y a Conchita, por enseñarme desde el principio el “bienhacer” y los truquillos con la proteómica, la genética y la microtomía, respectivamente. A Diana, por tener siempre todos nuestros bufferes y reactivos listos, por su ayuda con las “planticas”, la recogida de muestras y la preparación de las mismas. A Rosario, la reina de la bioinformática, así como a Gonzalo y el resto de su grupo, gracias a los cuales hemos podido acceder a nuestra herramienta transcriptómica. A Eli, que aunque llegó al final de éste, mi viaje, también fue de gran ayuda con los cortes para microscopía. Gracias a todos por todo vuestro cariño, incluso por las riñas y las diferencias de opinión, me han hecho crecer en todos los sentidos.

También quiero acordarme de todos aquellos que habéis pasado por el laboratorio, Paula, Jose; Sahar... y haciendo una especial mención para Sophie, mi primera niña máster, ambas íbamos aprendiendo a la vez, a la que “enseñé” tanto como ella a mí.

A las chicas del Servicio de Microscopía, Alicia y M<sup>a</sup> Carmen, sobretodo Alicia, que ha estado desde el principio hasta el final ayudándome con la ultramicrotomía y con los microscopios. Gracias también a Lourdes, del Servicio de Instrumentación, por su ayuda con las muestras para el LC-MS; así como a los compañeros del servicio de secuenciación por su ayuda y consejo.

*I would also like to thank the members of Christine H. Foyer Group, specially Barbara, Silvana, Daria, Ambra, James, Danny... for accepting me as one more in the group. There, I was fortunate to find great people, who made me think of science in a very particular way, with whom I discovered the beautiful Leeds, and with whom I will always have memorable memories... Thanks for everything, it was nice to share this experience with you.*

Por supuesto quiero dar las gracias a mis amigos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada, Carmen, Arantxa, Sonia, Fadwa, Marga, Iván, Chato... con quienes he tenido la suerte de compartir multitud de buenos momentos, y como científicos me han brindado muy buenos consejos. A los "Armilleros", Manolo, Jorge, Sergio, por sacarme siempre una sonrisa y compartir tantas cosas.

A mis niños pineros, que llevan toda mi vida a mi lado, apoyándome y alegrándome la vida... A mi "más antiguo amigo" Pablo por los ratos de risas y los de no tan risas. A Luis y Alex, mis primos, qué os digo si sois mis mejores amigos. A mi Martiña, mi compi de biblioteca y de otras cosas... A mi prima Lorena, que hace que me despeje con todas sus locuras, y además de ser una excelente persona, siempre me ha apoyado y animado. A Cristina y a Raquel, que siempre están ahí cuando necesito consuelito.

A mis compis de Máster, Javi, Tania, Hilario, Lidia, Martín... algunos también compañeros de la EEZ, que se han portado como una familia.

No por ser de los últimos son menos importantes, todo lo contrario, son mi orgullo y mi ejemplo... A mis padres, por luchar sin descanso para que tuviese la oportunidad que ellos notuvieron, y que siempre han confiado en mí. Por todo su amor y eterna comprensión. Han sido sin duda, el mayor de mis pilares todo este tiempo. Os quiero infinito, aunque a veces os gruña...

Y a Miguel, el promotor de toda esta historia, mi tesoro... siempre te llevo conmigo y tú me guías y proteges desde el cielo.

A Juanjo, mi amor, gracias por estar ahí siempre, en los momentos buenos y en los no tanto, yalegrarme la vida con tu sonrisa sin proponértelo. Y mil gracias por tu ayuda en las revisiones los últimos y estresantes días, tu generosidad y enorme corazón no tienen límite. Sin tí no habría llegado hasta aquí.

A todos aquellos que merecéis aparecer aquí y no lo estáis. Creedme que no ha sido a propósito ni por falta de cariño, sino por culpa de que la tesis me ha idiotizado y me ha dejado desmemoriada.

A todos vosotros, mi más sincero agradecimiento.

A mis dos estrellas,  
Pepe y Mercedes...

A Miguel,  
mi ángel en el cielo...

...y a mi Juanjo,  
mi ilusión.

# ÍNDICE

<b>Resumen/Summary</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<b>1. Las especies de oxígeno reactivo (ROS)</b>	<b>7</b>
1.1. Concepto y funciones de las ROS	7
1.2. Biología Redox Celular	9
1.3. Biología Redox en Plantas	11
<b>2. El glutatión</b>	<b>14</b>
2.1. Propiedades y funciones del GSH	14
2.2. Metabolismo del GSH y principales enzimas implicados	17
2.3. Glutatión en plantas	18
2.4. Metabolismo del GSH y principales enzimas implicados en plantas	25
2.5. Biosíntesis del GSH	26
2.5.1. $\gamma$ -ECS en plantas: Estructura, función y regulación	- 27
2.5.2. GS en plantas: Estructura, función y regulación	- 29
2.6. Reciclado de GSH	30
2.6.1. GR en plantas: Estructura, función y regulación	- 31
2.7. Detoxificación por GSH	32
2.7.1. GPX en plantas: Estructura, función y regulación	- 33
2.7.2. GST en plantas: Estructura, función y regulación	- 35
<b>3. La reproducción sexual en las Angiospermas</b>	<b>38</b>
<b>4. El GSH en la reproducción sexual de Angiospermas</b>	<b>41</b>
<b>5. El olivo como especie de estudio</b>	<b>43</b>
<b>Objetivos</b>	<b>49</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>51</b>
<b>1. Material vegetal</b>	<b>53</b>
1.1. Polen maduro de olivo	53
1.2. Anteras de olivo	53
1.3. Material vegetal de <i>A. thaliana</i> y condiciones de crecimiento	54
<b>2. Métodos de laboratorio</b>	<b>55</b>
2.1. Germinación in vitro del polen y medidas de germinabilidad	55
2.1.1. Germinación in vitro del polen	55
A. Polen de olivo	55
B. Polen de <i>Arabidopsis</i>	55
2.1.2. Medida de la germinabilidad del polen y de la longitud del tubo polínico	55
2.2. Selección e identificación de transcritos de $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST en el transcriptoma reproductivo del olivo (polen y pistilo)	56
2.3. Extracción de ARN y síntesis de ADNc	57
2.4. Amplificación del ADNc mediante PCR	58

2.4.1. Amplificación por PCR semicuantitativa _____	58
2.4.2. Electroforesis de ADN y tinción _____	58
2.4.3. Secuenciación de los fragmentos amplificados _____	59
2.5. Amplificación de los extremos 3' y 5' mediante RACE _____	59
2.6. Clonación y secuenciación de los genes $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST de polen de olivo _____	60
2.6.1. Clonación _____	60
A. Ligación _____	60
B. Transformación _____	60
C. PCR sobre colonias _____	61
2.6.2. Separación y purificación de los fragmentos amplificados _____	61
2.6.3. Purificación del ADN plasmídico _____	61
2.6.4. Secuenciación del ADN _____	62
2.7. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias _____	62
2.8. PCR cuantitativa en tiempo real _____	63
2.8.1. qPCR durante la ontogenia y la germinación in vitro del polen de olivo _____	63
2.8.2. qPCR durante el desarrollo floral de Arabidopsis _____	64
2.8.3. Cálculo de la expresión génica a partir de los datos qPCR _____	65
2.9. Análisis bioquímico mediante LC-MS del contenido de glutatión y medida del potencial redox dependiente del tampón de glutatión celular _____	65
2.10. Extracción de proteínas totales _____	67
2.10.1. Extracción de proteínas totales en anteras, polen maduro y polen germinado de olivo _____	67
A. ETAPA 1: homogeneización _____	67
B. ETAPA 2: filtración por gravedad _____	67
C. ETAPA 3: concentración y precipitación de las proteínas _____	68
2.10.2. Extracción de proteínas totales en flores de Arabidopsis _____	69
2.11. Extracción de proteínas totales en condiciones nativas para determinar actividades enzimáticas _____	70
2.12. Cuantificación de proteínas _____	70
2.12.1. Método de Bradford _____	70
2.12.2. Sistema comercial 2D-Quant kit. _____	71
2.12.3. Kit comercial DC Protein Assay _____	71
2.13. Electroforesis desnaturante en gel (SDS-PAGE) _____	71
2.14. Inmunodetección de las enzimas mediante Western blotting _____	72
2.15. Ensayos in vitro de la actividad glutatión reductasa _____	73
2.15.1. Preparación de muestras _____	73
2.15.2. Preparación de la curva patrón _____	74
2.15.3. Análisis de la actividad glutatión reductasa _____	75
2.16. Preparación de las muestras para inmunocitoquímica _____	75
2.16.1. Fijación de muestras e inclusión en resina _____	75
A. Fijación _____	75
B. Deshidratación _____	76
C. Inclusión _____	77
D. Polimerización _____	77
2.16.2. Microtomía _____	77
2.16.3. Contrastado de cortes ultrafinos _____	78
2.17. Inmunolocalización de GSH, $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST _____	78

2.17.1. Inmunolocalización a microscopía de fluorescencia (MF)	78
2.17.2. Inmunolocalización a microscopía electrónica de transmisión (TEM)	80
2.18. Medida y cálculo del potencial redox <i>in vivo</i> mediante GFP sensible a redox (roGFP2) en tejidos reproductivos de <i>A. thaliana</i>	81
2.18.1. Microscopía de barrido láser confocal (CLSM)	81
2.18.2. Análisis radiométrico de imágenes	82
2.18.3. Cálculo del potencial redox	82
2.19. Análisis densitométricos y de intensidad de fluorescencia	83
2.19.1. Análisis densitométricos	83
2.19.2. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia por área	83
2.20. Análisis estadísticos	84

## Resultados 85

### Capítulo 1: Identificación, caracterización y análisis *in silico* de los principales genes involucrados en el metabolismo del GSH en los tejidos reproductivos del olivo 87

1.1. Identificación, caracterización y análisis <i>in silico</i> de los principales genes involucrados en la síntesis de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo	89
1.1.1. Recuperación, clonación y análisis filogenético de las secuencias de las enzimas $\gamma$ -ECS y GS de los tejidos reproductivos del olivo	89
1.1.2. Predicción <i>in silico</i> de la localización celular, características bioquímicas y modificaciones post-traduccionales de la $\gamma$ -ECS y la GS	97
1.1.3. Predicción de la estructura secundaria y modelado 3D de las enzimas $\gamma$ -ECS y GS de polen de olivo	101
1.2. Identification and <i>in silico</i> Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive ( <i>Olea europaea</i> L.) Pollen and Pistil	104
1.2.1. Abstract	106
1.2.2. Introduction	106
1.2.3. Materials and Methods	107
1.2.4. Results	108
1.2.5. Discussion	113
1.2.6. Acknowledgement	114
1.2.7. References	114
1.3. Identificación, caracterización y análisis <i>in silico</i> de los enzimas principales implicados en la detoxificación dependiente de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo	117
1.3.1. Recuperación, clonación y análisis filogenético de las secuencias de GPX y GST del transcriptoma reproductivo de olivo	119
1.3.2. Predicción <i>in silico</i> de la localización celular, características bioquímicas y modificaciones post-traduccionales de las enzimas GPX y GST en tejidos reproductivos de olivo	129
1.3.3. Predicción de la estructura secundaria y modelado 3D de la GPX y la GST del polen de olivo	132

### Capítulo 2: Análisis bioquímico, molecular y celular del GSH y de los enzimas que controlan su metabolismo en los tejidos reproductivos del olivo 135

2.1. Análisis bioquímico y molecular de los enzimas implicados en la síntesis de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo	135
2.1.1. Análisis de expresión génica de las enzimas $\gamma$ -ECS y GS	137
2.1.2. Análisis de expresión proteica de las enzimas $\gamma$ -ECS y GS	138

2.1.3. Localización celular de las enzimas $\gamma$ -ECS y GS	139
2.2. Involvement of glutathione and glutathione reductase in the development of the microsporocyte and during the germination of the olive pollen	143
2.2.1. Abstract	145
2.2.2. Introduction	145
2.2.3. Materials and Methods	148
2.2.4. Results	150
2.2.5. Discussion	159
2.2.6. Conclusions	164
2.2.7. Acknowledgement	164
2.2.8. References	164
2.3. Determinación de la localización y la expresión génica y proteínica de las enzimas responsables de la detoxificación mediada por GSH durante la ontogenia y la germinación del polen de olivo	175
2.3.1. Análisis de expresión génica de las enzimas GPX y GST	177
2.1.2. Análisis de expresión proteica de las enzimas GPX y GST	178
2.1.3. Localización celular de las enzimas GPX y GST	179

### **Chapter 3: Análisis comparativo y complementario en mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en el metabolismo del glutatión -----183**

3.1. Análisis bioquímico y molecular de los diferentes enzimas implicados en el metabolismo del GSH durante el desarrollo floral de <i>Arabidopsis thaliana</i>	183
3.1.1. Análisis molecular de las enzimas involucradas en la síntesis de glutatión ( $\gamma$ -ECS y GS)	185
3.1.2. Análisis molecular de la enzima implicada en el reciclado del glutatión (GR)	187
3.1.3. Análisis molecular de las enzimas encargadas de la detoxificación celular mediada por GSH (GPX y GST)	190
3.2. Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour	197
3.2.1. Abstract	198
3.2.2. Introduction	198
3.2.3. Materials and Methods	201
3.2.4. Results	204
3.2.5. Discussion	211
3.2.6. Acknowledgement	218
3.2.7. References	218

## **Discussion \_\_\_\_\_ 227**

1. Los tejidos reproductivos del olivo contienen numerosos transcritos implicados en el metabolismo del GSH	229
1.1. Transcritos de polen y pistilo relacionados con la síntesis de GSH en el olivo	230
1.2. GR en el transcriptoma de polen y pistilo de olivo	232
1.3. Transcritos de polen y pistilo relacionados con la desintoxicación dependiente de GSH en el olivo	233



<b>2. Implicación del glutatión en el desarrollo del microsporocito y durante la germinación del polen</b>	<b>234</b>
2.1. El glutatión durante el desarrollo del polen de olivo	235
2.2. Papel de GSH en la germinación y el crecimiento del tubo polínico del olivo	237
2.3. Papel del estado redox dependiente de glutatión en la reproducción	239
<b>3. Metabolismo del glutatión durante el desarrollo y la germinación del polen</b>	<b>243</b>
3.1. Enzimas implicadas en la biosíntesis de GSH	243
3.2. Enzimas implicadas en el reciclado de GSH	244
3.3. Enzimas implicadas en la detoxificación mediante GSH	246
<b>Conclusiones</b>	<b>251</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>257</b>
<b>Anexos</b>	<b>277</b>
<b>1. Anexo 1: Alineamientos de secuencias nucleotídicas de los genes de interés (sólo presente en la versión PDF, no presente en la impresa)</b>	<b>279</b>
1.1. Alineamiento de las secuencia nucleotídicas de la $\gamma$ -ECS de polen y pistilo de olivo junto con otras especies	281
1.2. Alineamiento de las secuencia nucleotídicas de la GS de polen y pistilo de olivo junto con otras especies	303
1.3. Alineamiento de las secuencia nucleotídicas de la GR de polen y pistilo de olivo junto con otras especies	316
1.4. Alineamiento de las secuencia nucleotídicas de la GPX de polen y pistilo de olivo junto con otras especies	338
1.5. Alineamiento de las secuencia nucleotídicas de la GST de polen y pistilo de olivo junto con otras especies	354
<b>2. Anexo 2: Secuencias completas (nucleotídicas y aminoacídicas) de los genes de interés</b>	<b>417</b>
2.1. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la $\gamma$ -ECS del polen de olivo	419
2.2. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la GS del polen de olivo	420
2.3. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la GR1 y de la GR2 del polen de olivo	421
2.4. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la GPX del polen de olivo	423
2.5. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la GST del polen de olivo	423
<b>3. Anexo 3: Árbol filogenético de secuencias aminoacídicas de GR</b>	<b>427</b>
<b>4. Anexo 4: Análisis LC-MS del contenido en glutatión y análisis ratiométrico de GSH/GSSG durante el desarrollo floral en mutantes <i>pad2</i> y <i>clt</i>.</b>	<b>431</b>
<b>5. Lista de abreviaturas</b>	<b>433</b>



## Resumen

Las especies de oxígeno reactivo (ROS) desempeñan importantes misiones en la fisiología vegetal. Históricamente, han sido conocidas por acumularse como consecuencia de diversos estreses, llegando a generar daño celular. Sin embargo, en la actualidad se conocen además numerosas funciones beneficiosas y necesarias (i.e señalización) que están empezando a ser descritas en los procesos reproductivos. Las células poseen una compleja red antioxidante compuesta tanto por enzimas como por moléculas no enzimáticas, que evitan que las ROS se acumulen en exceso, ocasionando daño a diversas biomoléculas. El glutatión es un metabolito multifuncional de bajo peso molecular, que juega un papel crucial como antioxidante, contribuyendo a la señalización redox, la modulación de la expresión génica y la regulación de diversas actividades enzimáticas. Sin embargo, se conoce poco sobre su papel regulador en los procesos reproductivos de las plantas. El glutatión se sintetiza mediante la acción secuencial de la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS), y la glutatión sintetasa (GS). Existe una amplia red metabólica responsable del mantenimiento de la homeostasis redox y del nivel de glutatión en su estado reducido (GSH), que es la forma principal presente dentro de la célula. La enzima glutatión reductasa (GR) es responsable de la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a GSH, que será utilizada por las enzimas glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión S-transferasa (GST) para la detoxificación de ROS y la conjugación con xenobióticos, respectivamente. El objetivo general de la presente tesis se centra en el análisis del papel fisiológico del glutatión y de las enzimas de su metabolismo en las diferentes etapas del proceso reproductivo del olivo, uno de los cultivos más importantes en España. Con este propósito, se han utilizado nuevas herramientas genómicas y proteómicas disponibles y se ha analizado la expresión de los productos génicos más relevantes, su actividad, características moleculares y localización celular mediante un amplio panel de métodos moleculares, bioquímicos y celulares disponibles. Los análisis se han llevado a cabo en las anteras de olivo en distintos estadios de desarrollo, así como en polen maduro (dehiscente) y polen al que se ha inducido su germinación *in vitro*, a distintos tiempos desde su inicio. Además, como comparación se han realizado estudios funcionales en *Arabidopsis*. La finalidad última de la propuesta es la generación de modelos funcionales que determinen las relaciones básicas entre los diferentes agentes implicados en el metabolismo y la señalización mediada por glutatión durante la microsporogénesis, la emergencia, el crecimiento y la orientación del tubo polínico.

En primer lugar, se realizó una aproximación bioinformática para identificar los genes de interés ( $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST) a partir de diferentes bases de datos, incluido el transcriptoma reproductivo del olivo (reprOlive), y de una validación experimental realizada mediante PCR con oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias parciales y 3'/5'-RACE. El análisis bioinformático consistió en la elaboración de alineamientos de las secuencias obtenidas entre sí y con heterólogos de interés, la

generación de árboles filogenéticos, y la predicción de las estructuras secundarias y 3-D de las proteínas codificadas, de su localización celular y de sus posibles modificaciones postraduccionales incluyendo la fosforilación, S-nitrosilación potencial, acetilación, miristilación o palmitoilación, así como posibles escisiones. Para ello se utilizó un amplio panel de herramientas bioinformáticas on-line. Estos análisis permitieron identificar tanto la presencia de isoformas conservadas como específicas en el polen del olivo respecto a tejidos somáticos o de algunas descripciones presentes en la literatura. En segundo lugar, se determinaron los perfiles de expresión de los genes de interés  $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST mediante experimentos de Q-PCR tras diseñar cebadores específicos. La determinación de los niveles de transcritos se realizó a partir de cDNA de anteras en diversos estadios de desarrollo del polen (células madres del polen durante la meiosis, tétradas, microsporas), en polen maduro, y en polen a distintos tiempos a lo largo de la germinación *in vitro*. A lo largo de estos estadios se determinó y cuantificó igualmente la presencia de los enzimas mediante Western blotting, utilizando para ello anticuerpos heterólogos desarrollados frente a formas conservadas de los enzimas de *Arabidopsis*. Además de los enzimas indicados, se determinó la presencia y los niveles de GSH y GSSG, en este caso mediante el uso de LC-MS. La información bioquímica obtenida fue complementada con la realización de estudios inmunocitoquímicos para determinar la localización celular tanto de los enzimas como del GSH, que está presente en los microsporocitos y otros tejidos de la antera (incluyendo el tapetum) a lo largo de todo el desarrollo, así como en el grano de polen y el tubo polínico, con una amplia distribución que incluye el citosol, las aperturas del polen y los núcleos con una notable intensidad. La localización nuclear del GSH parece sugerir la participación del GSH en el control del ciclo celular. Por último, se realizó un estudio comparativo del metabolismo del GSH en tres genotipos de *Arabidopsis thaliana*: un genotipo silvestre (WT), un mutante que expresa una proteína verde fluorescente sensible al estado redox (roGFP2), y un doble mutante deficiente en glutatión *cad2-1* expresando simultáneamente el marcador redox (*cad-1/roGFP2*), cuyas flores tenían significativamente menos GSH y más GSSG que las flores WT o roGFP. El estigma, estilo, antera, los granos de polen germinados y los tubos polínicos de las flores roGFP2 mostraron bajo nivel de oxidación, que sin embargo sí fue más alto en los mutantes *cad-1/roGFP2*. Los granos de polen sin germinar aparecieron más oxidados que los germinados, lo que indica que las células del polen incrementan su estado de reducción a lo largo de su activación metabólica. El porcentaje de germinación fue menor y el crecimiento del tubo polínico se detuvo antes en los mutantes *cad-1/roGFP2* que en las plantas roGFP2, lo que demuestra que el crecimiento del tubo polínico precisa un estado esencialmente reducido. Los resultados obtenidos muestran que los granos de polen sin germinar presentan un estado relativamente oxidado comparado con los granos de polen germinados. Además, se demuestra que la no acumulación de GSH y el mantenimiento de una tasa GSH/GSSG alta tienen efectos negativos sobre la germinación del polen.

## Summary

Reactive oxygen species (ROS) play important roles in plant physiology. Historically, they have been known because of their accumulation as a consequence of different stresses, even triggering cell damage. However, they are also presently known because of their beneficial and necessary functions (i.e. signaling), which are beginning to be described in plant reproductive processes. Cells display a complex network of antioxidants, composed by both enzymes and non-enzymatic molecules preventing excessive accumulation of ROS which may cause damage to biomolecules. Glutathione is a low molecular multifunction metabolite playing a critical antioxidant function, contributing to redox signaling, modulation of gene expression and the regulation of different enzyme activities. However, little is known regarding its regulative role in the plant reproductive processes. Glutathione is synthesized through the sequential action of  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS) and glutathione synthetase (GS). A broad metabolic network is responsible of maintaining redox homeostasis as well as of keeping a high level of glutathione at the reduced state (GSH), which is the main form within the cell. The glutathione reductase enzyme (GR) is responsible of reducing oxidized glutathione (GSSG) to GSH, which will be used by glutathione peroxidase (GPX) and glutathione S-transferase (GST) enzymes to detoxify ROS and conjugate to xenobiotics, respectively. The main objective of the present thesis is focused into the analysis of the physiological role of glutathione and the enzymes involved in its metabolism into the different stages of the reproductive process of the olive tree, one of the most important crops in Spain. With this aim, new genomic and proteomic approaches have been used and the expression of the most relevant gene products has analyzed, as well as their activity, molecular characteristics and cell localization by using a broad panel of molecular, biochemical and cell methods available. Analyses have been performed using olive anthers at different developmental stages, as well as mature olive pollen (dehiscent) and olive pollen induced to germinate *in vitro*, at different times after germination onset. Moreover, functional studies have been performed in *Arabidopsis* as a comparison. Final purpose of these studies is the generation of functional models determining basic relationships between the different agents involved in the metabolism and signaling mediated by glutathione during microsporogenesis and pollen tube emergence, growth and orientation.

First, a bioinformatic approach was performed to identify genes of interest ( $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX and GST) from different databases, including the reproductive transcriptome of the olive tree (reprOlive), and after using an experimental validation carried out by PCR using oligonucleotides designed on the basis of partial sequences and 3'/5'-RACE. Bioinformatic analysis consisted in the generation of alignments with the retrieved sequences among themselves and also using heterologous sequences of interest, the generation of phylogenetic trees, the prediction of secondary and 3-D structures of the

encoded proteins, their cell localization and their potential posttranslational modifications including phosphorylation, potential S-nitrosylation, acetylation, miristoylation or palmitoylation, as well as potential excisions. For this purpose, a broad panel of bioinformatic tools on-line was used. These analyses allowed identifying the presence of both conserved and specific sequences in the olive pollen, compared with somatic tissues or several descriptions present in the literature. In a second place, expression profiles of the genes of interest  $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX and GST were determined by means of Q-PCR experiments after designing specific primers. Determination of the transcripts levels was performed using cDNA generated from anthers at different stages of pollen development (pollen mother cells, tetrads, microspores), mature olive pollen and pollen at different times along *in vitro* pollen germination. Through these stages, the presence of the mentioned enzymes was also determined and quantified by Western blotting, using heterologous antibodies raised to conserved forms of the enzymes in *Arabidopsis*. In addition to the mentioned enzymes, we also determined the presence and levels of GSH and GSSG, now by using LC-MS. Biochemical information retrieved was also complemented by performing immunocytochemical analyses to determine cell localization of both the enzymes and GSH, which is present in microsporocytes and other anther tissues (including the tapetum) all through its development, as well as at the olive pollen grain and the pollen tube, with a broad distribution comprising the cytosol, pollen apertures and nuclei with a noticeable intensity. Nuclear localization of GSH suggests the involvement of this molecule in the control of the cell cycle. Finally, a comparative assessment of GSH metabolism was performed in three *Arabidopsis thaliana* genotypes: a wild genotype (WT), a mutant expressing a Green fluorescent protein sensitive to the redox state (roGFP2), and a double-mutant deficient in glutathione *cad2-1*, also simultaneously expressing the redox reporter (*cad-1/roGFP2*), whose flowers harbored less GSH and more GSSG than WT or roGFP flowers. Stigmas, styles, anthers, germinated pollen grains and pollen tubes of roGFP2 flowers showed a lower level of oxidation, which was higher at the *cad-1/roGFP2* instead. The ungerminated pollen grains were significantly more oxidized than the germinated pollen grains, indicating that the pollen cells become reduced upon the transition from the quiescent to the metabolically active state during germination. The germination percentage was lower in *cad2-1/roGFP2* pollen and pollen tube growth arrested earlier than in roGFP2 pollen, demonstrating that increased cellular reduction is essential for pollen tube growth. These findings establish that ungerminated pollen grains exist in a relatively oxidized state compared with germinating pollen grains. Moreover, failure to accumulate glutathione and maintain a high GSH/GSSG ratio has a strong negative effect on pollen germination.

# **I**NTRODUCCIÓN





## 1. Las especies de oxígeno reactivo (ROS).

### 1.1. Concepto y funciones de las ROS.

Las **especies reactivas de oxígeno reactivo (ROS)** comprenden un grupo de moléculas de pequeño tamaño, altamente reactivas y de naturaleza tanto orgánica como inorgánica. Corresponden a formas parcialmente reducidas de oxígeno atmosférico como iones de oxígeno, radicales libres o peróxidos (por ejemplo,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $O_2$ ), que poseen una capa de electrones de valencia libre, lo que las hace altamente reactivas (Halliwell y Gutteridge 2007). La formación de las ROS ocurre de manera natural en todas las células vivas como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y regulan casi todos los aspectos de la vida en plantas, animales y la mayoría de los organismos eucariotas y procariotas. Se generan principalmente en mitocondrias y peroxisomas, y en plantas además, en los cloroplastos. También pueden formarse en cualquier otro compartimento celular que contenga proteínas o moléculas con un potencial redox suficientemente alto para excitarse o donar un electrón al oxígeno atmosférico (Mittler 2017).

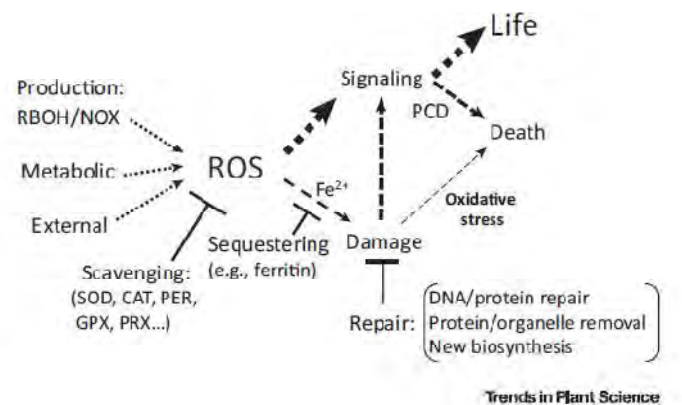
Se piensa que las ROS desempeñan un doble papel en las células. Por un lado, son necesarias para la progresión de varios procesos biológicos, ya que tienen un importante papel en la señalización celular. Por ejemplo, se ha visto que las ROS regulan el desarrollo, la proliferación celular, la diferenciación, el potencial redox, la señalización frente al estrés, las interacciones con otros organismos, las respuestas sistémicas y la muerte celular programada (Weydert y Cullen 2010, König *et al.* 2012, Foyer y Noctor 2013, Vaahtera *et al.* 2014, Mignolet-Spruyt *et al.* 2016, Noctor *et al.* 2016, Mittler 2017). Sin embargo, las ROS también actúan como subproductos tóxicos consecuencia del metabolismo aeróbico celular. En situaciones de estrés biótico o abiótico, los niveles de ROS pueden aumentar enormemente pudiendo dañar de modo significativo las estructuras celulares. Una elevada concentración de ROS genera la oxidación de moléculas biológicas (como proteínas, hidratos de carbono, ADN, lípidos), enzimas de transporte celular y factores de transcripción (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006, Weydert and Cullen 2010), que puede ocasionar mutaciones, cromosomas aberrantes, carcinogénesis e incluso la muerte celular (no apoptótica). Esta situación es conocida como **estrés oxidativo** (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006, König *et al.* 2012, Foyer y Noctor 2013, Vaahtera *et al.* 2014, Mignolet-Spruyt *et al.* 2016), en la que se produce un desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras.

Las células poseen mecanismos antioxidantes complejos, que incluyen tanto enzimas como moléculas no enzimáticas, para desintoxicar a la célula y eliminar las ROS que puedan ocasionar daño u oxidación (Mittler *et al.* 2004, Martínez-Sarrasague *et al.* 2006, Weydert y Cullen 2010).

Defensas antioxidantes	
Compuestos antioxidantes no enzimáticos	GSH, ubiquinol, flavonoides, ácido úrico, vitaminas A, C y E
Enzimas antioxidantes	SOD, GPX, GR
Secuestradores de iones metálicos	Transferrina, ferritina, lactoferrina, NO

**Tabla 1. Principales defensas antioxidantes.** Abreviaturas: GSH, glutatión; SOD, superóxido dismutasa; GPX, glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; NO, óxido nítrico.

En la Tabla 1 se puede ver una clasificación de las principales defensas antioxidantes de las células, que mantienen los niveles basales de ROS alejados de la toxicidad.



**Figura 1. Prevención de la muerte celular por estrés oxidativo (Mittler 2017).**

Para prevenir la toxicidad ocasionada por el aumento de ROS en las células, éstas deben equilibrar la producción de ROS eliminándolas (Mittler *et al.* 2004). En esto radica la importancia de los mecanismos para la reparación y la eliminación de ADN dañado y proteínas (Figura 1). Así, la producción de ROS que podría ser mediada por señalización interna (por ejemplo, activación de RBOH (respiratory burst oxidase homologs) / NOX (NADPH oxidasa)), o externa (por ejemplo, ROS producidas por una célula vecina o un patógeno), se equilibra por mecanismos de eliminación de ROS (superóxido dismutasa, SOD; catalasa, CAT y peroxidasa, PER). De este modo, los niveles de ROS celulares disminuyen hasta valores no tóxicos, utilizándose entonces para señalización. Si se acumulan demasiados componentes celulares dañados, se produce estrés oxidativo que puede ocasionar la muerte (Figura 1). Por el contrario, los componentes celulares dañados, o las propias ROS, pueden actuar como señales para

desencadenar la muerte a través de la muerte celular programada (PCD) o fisiológica (Figura 1).

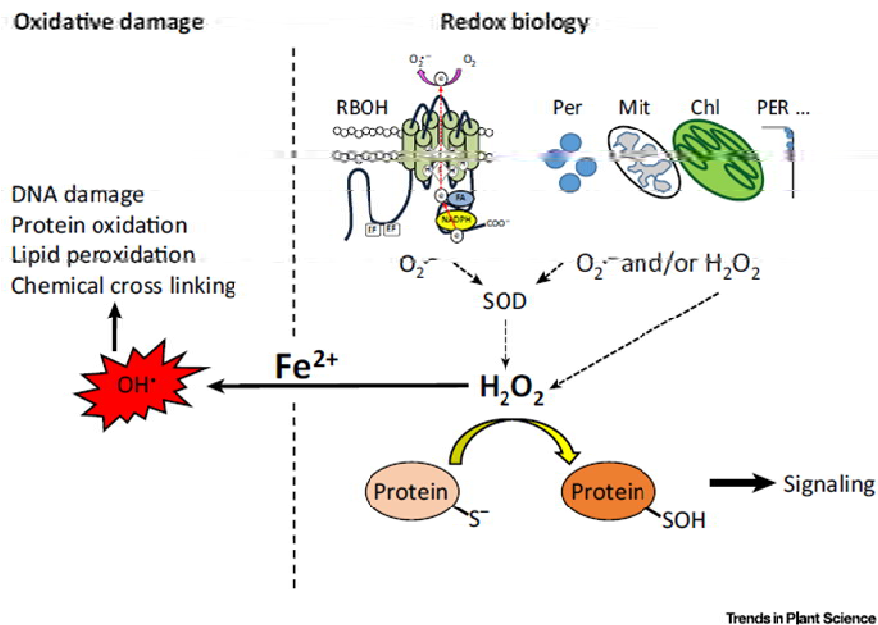
Lo realmente interesante sería conocer las razones por las que muere la célula, ya que podría distinguirse entre la muerte por estrés oxidativo (lo que podría evitarse manteniendo unos niveles normales de ROS y mediante los mecanismos de reparación celular) y la muerte celular programada (PCD). Las células en general, vegetales y animales, tienen una alta capacidad de acumular ROS. Varios estudios en *D. radiodurans* demuestran que, incluso altos niveles de ROS, difícilmente pueden matar a la célula. La PCD está regulada por la concentración y el tipo de ROS presentes en la célula, y todo este proceso está mediado por una red génica programada. No se trata de la mera rendición de la célula ante el daño oxidativo (ferroptosis o necrosis regulada) si no que es un concepto más amplio y complejo, denominado biología redox, respaldado por una gran cantidad de trabajos (Vanden Berghe et al. 2014, Conrad *et al.* 2016, Xie et al. 2016).

### 1.2. Biología Redox Celular.

Las ROS, como ya se ha indicado, no sólo son biometabolitos tóxicos, también tienen efectos beneficiosos para la célula. El término de “Biología Redox” se refiere a la función de las ROS actuando como moléculas de señalización para regular y mantener las funciones fisiológicas normales, que se lleva a cabo principalmente a través de la interacción con residuos de cisteína (Cys) de las proteínas (Truong y Carroll 2013, Schieber y Chandel 2014, Reczek y Chandel 2015, Noctor *et al.* 2016), causando cambios estructurales dentro de la proteína diana, alterando con ello su función (Figura 2). De este modo se activan vías que regulan la proliferación de las células y su diferenciación, entre otros muchos aspectos.

La señalización ROS está mediada por un proceso altamente regulado de acumulación de ROS en compartimentos celulares específicos, en el que intervienen enzimas como por ejemplo, las PER o las NADPH oxidasas ligadas a la membrana plasmática (RBOH, denominadas NOX en animales), que son enzimas que producen ROS en el apoplasto. Esta última familia de enzimas también se pueden encontrar en la vacuola, en el retículo endoplasmático, en núcleos o en mitocondrias, y están altamente reguladas mediante reacciones de fosforilación/desfosforilación y calcio (Sumimoto 2008, Suzuki *et al.* 2011, Potocký *et al.* 2012, Laurindo *et al.* 2014, Sirokmany *et al.* 2016, Jiménez-Quesada *et al.* 2016, 2017). Los últimos estudios se centran en la posibilidad de que las ROS sean beneficiosas para las células, ayudando a la proliferación y la diferenciación celular, la respuesta inmune, el desarrollo, los ritmos circadianos, la regulación de la muerte celular y la viabilidad, y que mantener un nivel basal de ROS en las células es esencial para la vida (Mittler 2017). Estudios recientes (Owusu-Ansah y Banerjee 2009, Juntilla *et al.* 2010, Tormos *et al.* 2011, Maryanovich *et al.* 2012, D'Souza *et al.* 2013, Morimoto *et al.* 2013, Sart *et al.* 2015) defienden la acción beneficiosa de las ROS y el

dearrollo de una compleja red homeostática de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Vanden Berghe *et al.* 2014, Conrad *et al.* 2016, Noctor *et al.* 2016, Xie *et al.* 2016).



**Figura 2. Biología ROS y Redox (Mittler 2017).**

La señalización ROS está mediada por un proceso altamente regulado de acumulación de ROS en compartimentos celulares específicos, en el que intervienen enzimas como por ejemplo, las PER o las NADPH oxidasas ligadas a la membrana plasmática (RBOH, denominadas NOX en animales), que son enzimas que producen ROS en el apoplasto. Esta última familia de enzimas también se pueden encontrar en la vacuola, en el retículo endoplasmático, en núcleos o en mitocondrias, y están altamente reguladas mediante reacciones de fosforilación/desfosforilación y calcio (Sumimoto 2008, Suzuki *et al.* 2011, Potocký *et al.* 2012, Laurindo *et al.* 2014, Sirokmany *et al.* 2016, Jiménez-Quesada *et al.* 2016, 2017). Los últimos estudios se centran en la posibilidad de que las ROS sean beneficiosas para las células, ayudando a la proliferación y la diferenciación celular, la respuesta inmune, el desarrollo, los ritmos circadianos, la regulación de la muerte celular y la viabilidad, y que mantener un nivel basal de ROS en las células es esencial para la vida (Mittler 2017). Estudios recientes (Owusu-Ansah y Banerjee 2009, Juntilla *et al.* 2010, Tormos *et al.* 2011, Maryanovich *et al.* 2012, D'Souza *et al.* 2013, Morimoto *et al.* 2013, Sart *et al.* 2015) defienden la acción beneficiosa de las ROS y el desarrollo de una compleja red homeostática de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Vanden Berghe *et al.* 2014, Conrad *et al.* 2016, Noctor *et al.* 2016, Xie *et al.* 2016).

Las ROS como moléculas de señalización son muy versátiles (Tabla 2), ya que cada una posee unas propiedades concretas en cuanto al nivel de reactividad, la localización celular de su síntesis y la habilidad para atravesar las membranas biológicas, entre otras (Halliwell y Gutteridge 2007, König *et al.* 2012, Foyer y Noctor 2013, Vaahtera *et al.* 2014, Mignolet-Spruyt *et al.* 2016, Mittler 2017).

Existen estudios que demuestran que las células tienen una gran resistencia a la acumulación de ROS. Precisamente una señalización mediada por ROS es lo que usan en su favor las células cancerosas para mantener su alta tasa de proliferación (Weinberg *et al.* 2010, Cairns *et al.* 2011, Gorrini *et al.* 2013, Schieber y Chandel 2014, Poillet-Perez *et al.* 2015, Diebold y Chandel 2016). De igual modo, las plantas pueden defenderse de los patógenos necrotrofos aprovechando la función que las ROS ejercen sobre la inducción de la necrosis del tejido, alimentándose así éstos del tejido vegetal muerto (König *et al.* 2012, Foyer y Noctor 2013, Vaahtera *et al.* 2014, Mignolet-Spruyt *et al.* 2016) y permitiendo la supervivencia del resto de la planta. Muchos estudios han puesto de manifiesto la influencia de ROS sobre los canales iónicos y su impacto en el flujo transmembrana de iones, particularmente a través del acoplamiento a mecanismos que elevan la concentración de calcio libre en el citosol, en relación con las respuestas de estrés de la planta y también las respuestas estomáticas al estrés hídrico y ABA.

### **1.3. Biología Redox en Plantas.**

Desde finales de los años setenta, la investigación en torno a las ROS en plantas se ha dividido en dos líneas principales que han establecido sus propios paradigmas y conceptos (Møller *et al.*, 2007, Noctor *et al.* 2016), una referida a la fotosíntesis y a la respiración (“ROS metabólicas”), la otra se ha centrado en la señalización vinculada al estrés biótico. El término “estrés oxidativo” en plantas no fue ampliamente utilizado hasta la década de los 80 (aunque ya por la década de los 70 se relacionaba a las ROS con la fotosíntesis). Debido a que la fotorespiración contribuye de forma importante al metabolismo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es también probable que la vía fotorrespiratoria se interconecte directamente con las vías de señalización que median el crecimiento de las plantas y las respuestas al estrés (Becker *et al.* 2006, Fahnenstich *et al.* 2008, Griebel y Zeier 2008, Shao *et al.* 2008, Foyer *et al.* 2009).

En vegetales, el término estrés oxidativo todavía carece de una definición precisa, pero las características principales son:

- (1) Aumento de la carga oxidativa celular.
- (2) Un potencial redox incontrolado debido a las altas tasas de producción de ROS que exceden las tasas de eliminación.
- (3) Daño oxidativo en componentes celulares, lo que supone que la velocidad de oxidación excede a la de reparación o reemplazo.

- (4) Ese daño causa acumulación de componentes celulares dañados que de alguna manera conducen a la pérdida de la función y a la muerte celular.

ROS	$t_{1/2}$	Distancia de migración	Modo de acción	Lugar de producción	Scavengers
Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	1-4 $\mu$ s	30 nm	Reacciona con proteínas Fe-S Dismuta a $H_2O_2$	Apoplasto (RBOHs), Cloroplasto, Mitochondria, Peroxisoma, Cdna de transferencia de electrones	SOD, flavonoides, ascorbato...
Radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )	1 ns	1 nm	Extremadamente reactivo con todas las biomoléculas, incluyendo ADN, ARN, lípidos y proteínas	Hierro y $H_2O_2$ (Reacción Fenton)	Flavonoides, prolina, azúcares, ascorbato,...
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	> 1 ms	> 1 mm	Reacciona con los residuos de Cys y Met de las proteínas Reacciona con proteínas hemo Reacciona con ADN	Peroxisoma, cloroplasto, mitochondria, citosol y apoplasto	APX, CAT, GPX, PER, PRX, ascorbato, GSH,...
Oxígeno singlete ( $O_2$ )	1-4 $\mu$ s	30 nm	Oxida lípidos, proteínas (residuos Trp, His, Tyr, Met y Cys), y con los residuos de G del ADN	Membranas, cloroplasto y núcleo	Carotenoides y a- tocoferol

**Tabla 2. Adaptación de Mittler 2017. Propiedades de las ROS:** propiedades ( $t_{1/2}$ , distancia de migración), reactividad (modo de acción), sistemas de producción y detoxificación típicos de ROS en células vegetales y animales. Abreviaturas: APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; Cys, cisteína; GPX, glutatión peroxidasa; GSH, glutatión; His, histidina; Met, metionina; PER, peroxidasa; PRX, peroxiredoxina; RBOH, NADPH oxidasa de plantas; SOD, superóxido dismutasa; Trp, triptófano; Tyr, tirosina.

En los últimos años 20 años se ha producido una investigación explosiva sobre las funciones de señalización de las ROS en los tejidos vegetales, así como su relación con el metabolismo del GSH, como se muestra en la figura 3 (Foyer y Noctor 2003, 2005a, 2005b, 2009, 2011, Noctor *et al.* 2016, De Gara y Foyer 2017).

Sin embargo, mientras que el concepto de señalización ROS ha sido más fácilmente aceptado dentro del estudio de la interacción patógeno-planta, muchos investigadores que trabajan con ROS en el metabolismo aún se aferran al término de "daño" indiscriminado como el principal fenómeno a través del cual estos compuestos producen su efecto fisiológico "beneficioso".

En las plantas se encuentran presentes casi todos los componentes que poseen los animales que regulan la homeostasis redox en la célula (Apel and Hirt 2004, König *et al.* 2012, Foyer y Noctor 2013, Vaahtera *et al.* 2014, Akter *et al.* 2015, Passaia y Margis-Pinheiro 2015, Waszczak *et al.* 2015, Delorme-Hinoux *et al.* 2016, Dietz 2016, Mignolet-Spruyt *et al.* 2016, Mittler 2017), tales como RBOH (NOX en animales), SOD, CAT, PRX, GPX, tioredoxinas (TRX) y glutaredoxinas (GRX)... Sin embargo, las perturbaciones en la producción o eliminación de ROS sólo generan alteraciones en

la señalización redox mediada por ROS, que pueden dar lugar a individuos con un crecimiento o reproducción deficientes, pero no producen la muerte celular por estrés oxidativo (Vanderauwera *et al.* 2011).

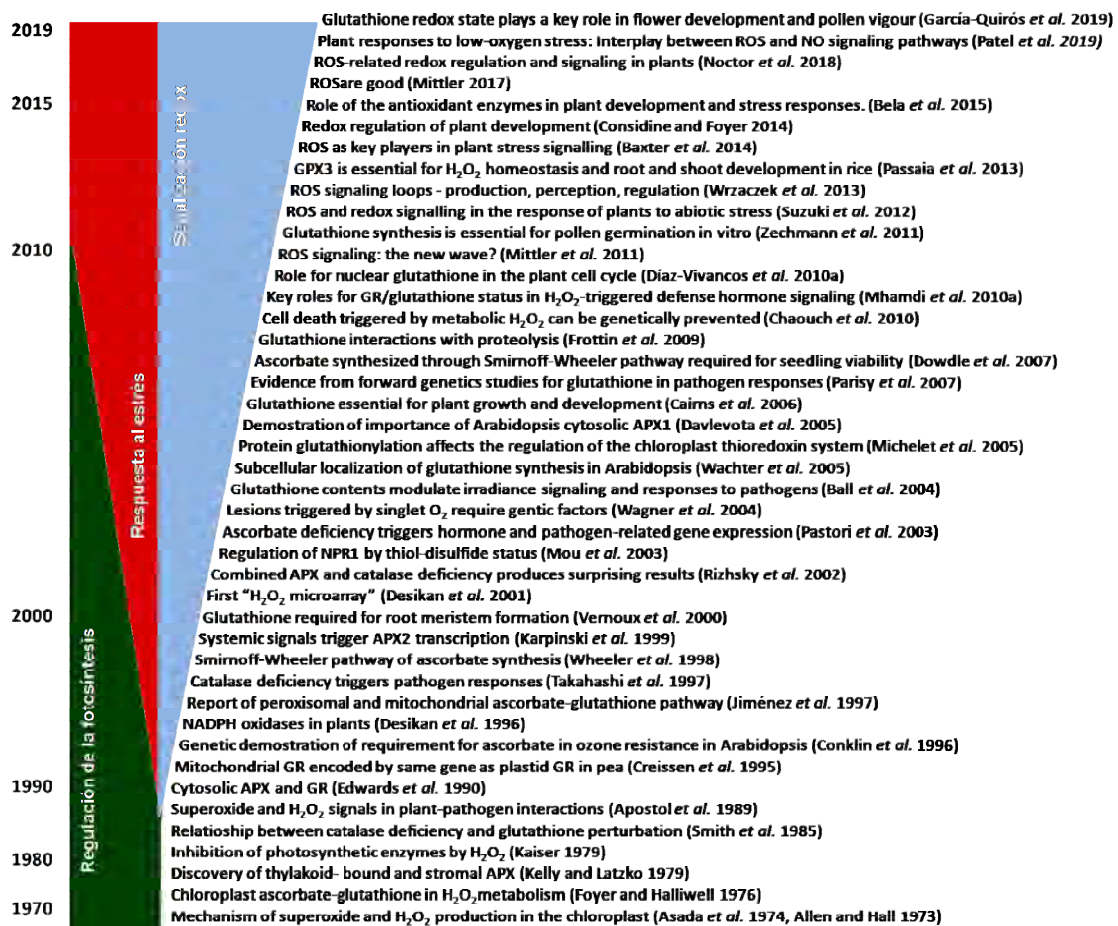
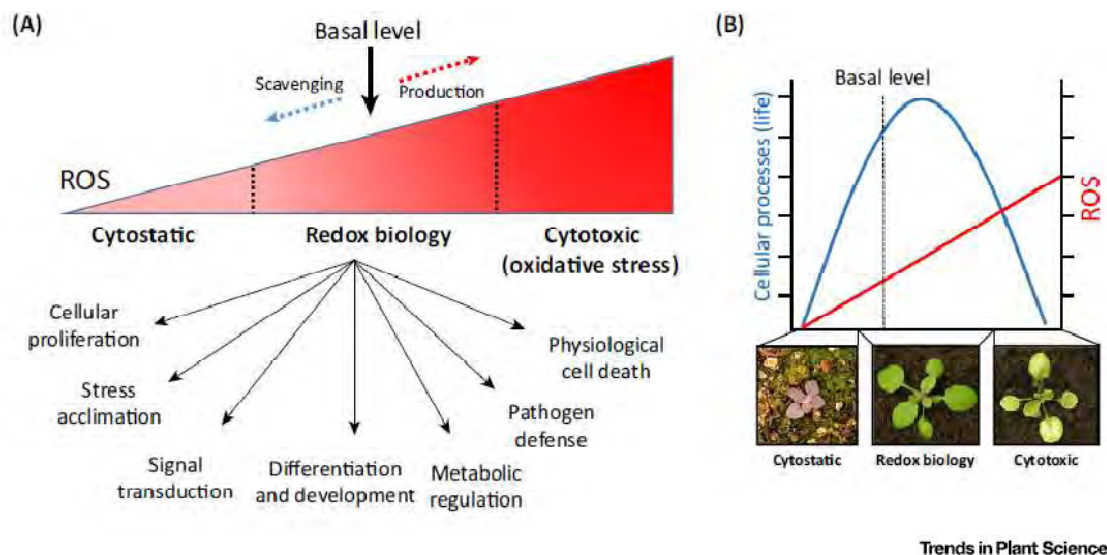


Figura 3. La historia de las ROS en plantas (Adaptación de Foyer y Noctor 2011). Se ilustra la línea de tiempo de algunos avances importantes en relación con el papel de las ROS y los sistemas antioxidantes en las plantas desde 1970.

Durante la fotosíntesis y la fotorrespiración vegetales se producen altas cantidades de ROS en cloroplastos y peroxisomas. Lo mismo ocurre en la vacuola (donde el metabolismo redox mediado por ROS es aún desconocido) y en el apoplasto. Todo esto, unido a que existen antioxidantes (ascorbato peroxidasa, APX; monodehidroascorbato reductasa, MDAR; deshidroascorbato reductasa, DHR; y algunas GPXs) específicos de las células vegetales, indica que existen diferencias entre la biología redox de plantas y la de animales. Esto podría sugerir un papel de las ROS mucho más beneficioso que en animales, y que podrían estar implicadas en multitud de funciones fisiológicas en los tejidos vegetales (Traverso *et al.* 2013, Frederickson y Loake 2014, Noctor *et al.* 2014, Song *et al.* 2014, Wendehenne *et al.* 2014, Hossain *et al.* 2015, Julkowska y Testerink

2015, Laloi y Havaux 2015, Schmidt y Schippers 2015, Xia *et al.* 2015, Del Rio y Lopez-Huertas 2016, Sewelam *et al.* 2016). Por tanto, como ya se ha mencionado para animales, una disminución de los niveles de ROS en las células vegetales podría afectar negativamente a la proliferación y la diferenciación celulares, así como a la inmunidad frente al estrés (Figuras 3 y 4) (Arsenijevic *et al.* 2000, Owusu-Ansah y Banerjee 2009, Juntilla *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010, Weinberg *et al.* 2010, Cairns *et al.* 2011, Tormos *et al.* 2011; West *et al.* 2011a, 2011b; Maryanovich *et al.* 2012, D'Souza *et al.* 2013, Gorrini *et al.* 2013, Morimoto *et al.* 2013, Mittal *et al.* 2014, Schieber y Chandel 2014, Poillet-Perez *et al.* 2015, Sart *et al.* 2015; Diebold y Chandel 2016, Gilroy *et al.* 2016).



Trends in Plant Science

**Figura 4. El mantenimiento de un nivel basal de ROS en las células es esencial para la función celular adecuada (Mittler 2017).** (A) Efecto de diferentes niveles de ROS sobre la regulación de los procesos celulares. Se requiere un nivel basal de ROS para la señalización redox adecuada en las células, y este nivel se mantiene por el equilibrio entre la producción y la eliminación de ROS. (B) Las funciones y la viabilidad celulares dependen de las concentraciones de ROS.

## 2. El glutatión.

### 2.1. Propiedades y funciones del GSH.

El glutatión (GSH) es el metabolito multifuncional de bajo peso molecular con grupo sulfhidrilo (-SH, tiol) más abundante en las células eucariotas (plantas y animales) y en la mayoría de las procariotas (Meister y Anderson 1983). El GSH controla y regula el metabolismo redox celular, permitiendo así las condiciones apropiadas para el buen

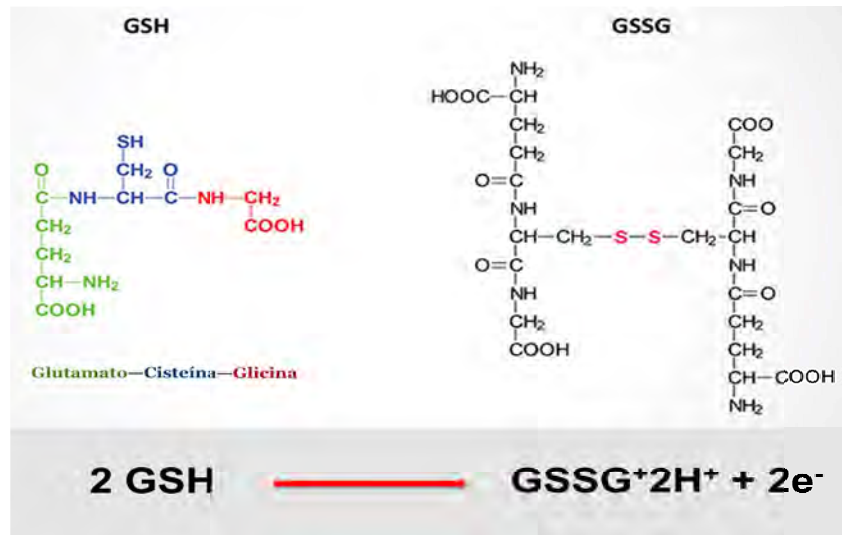


funcionamiento de las proteínas dentro de la célula. En animales, el GSH disminuye con el envejecimiento celular y protege de los efectos negativos del ejercicio intenso y de ciertas patologías como diabetes, fibrosis quística, SIDA, cirrosis, infecciones, malnutrición proteica y tratamientos quimioterapéuticos, entre otros. Las enzimas antioxidantes tienden a aumentar con la edad para compensar la disminución de GSH celular asociada a ella. Sin embargo, este aumento suele no ser suficiente debido a una pérdida de la efectividad de las enzimas antioxidantes. Por lo tanto, frente a la deficiencia de GSH en tejidos de avanzada edad, se observa un aumento de las ROS, con el consecuente daño mitocondrial y celular (Palomero *et al.* 2001). Por lo tanto cambios en la concentración de GSH podrían darnos una medida del estrés oxidativo *in vivo*. El GSH juega un papel fundamental en la protección celular contra el estrés oxidativo y la regulación de los niveles de ROS dentro de la célula, pero sus funciones van más allá de las meramente antioxidantes (Foyer y Noctor 2009). Esta polifacética molécula es clave en la biología vegetal en general.

En primer lugar, el glutatión es una fuente de azufre reducido presente en todas las células, y que puede ser transportado largas distancias entre diferentes compartimentos celulares e intercelulares, por lo que puede ser utilizado en caso de necesidad. Al igual que la cisteína, el GSH actúa como señal en la modulación de la captación y la asimilación de sulfato (Kopriva y Rennenberg 2004, Sabetta *et al.* 2017). En los distintos compartimentos plasmáticos, a concentraciones de bajo mM se utiliza tanto para la detoxificación de ROS como para la transmisión de señales redox (Foyer y Noctor 2000, Martínez-Sarrasague *et al.* 2006, Meyer 2008, Zechmann y Muller 2010, Foyer y Noctor 2011). En comparación con otros metabolitos, el GSH puede considerarse el corazón del eje metabólico redox, debido no sólo a que es muy abundante en las células vivas sino también a que posee una serie de características que lo hacen ideal para este papel. Seis propiedades que lo diferencian del resto de metabolitos señalan al glutatión como un transmisor candidato de señales ROS intracelulares (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006, Foyer y Noctor 2011):

- (1) El glutatión está reducido en condiciones óptimas. Ésta es la forma funcional dentro de la célula (Schwarzländer *et al.* 2008, Marty *et al.* 2009).
- (2) Su forma oxidada es relativamente estable (GSSG).
- (3) Se producen cambios hacia un estado de glutatión más oxidado en respuesta a una mayor disponibilidad de ROS intracelulares.
- (4) Existen mecanismos capaces de vincular tales cambios al estado redox de las proteínas diana, y por lo tanto a su actividad biológica.
- (5) Existen en la célula una red de enzimas específicas que lo acoplan al metabolismo redox.

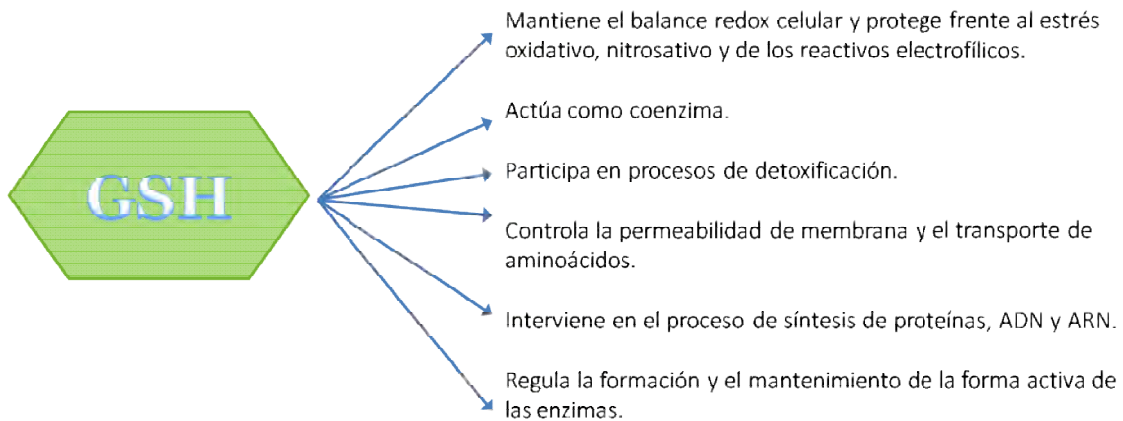
- (6) El reciclado de esta forma oxidada al compuesto reducido se realiza mediante sistemas enzimáticos de alta capacidad que dependen de un transportador clave de electrones, el NADPH.



**Figura 5.** El glutatión reducido se conoce químicamente como N-(N-L-gamma-glutamil-L-cisteinil) glicina, su fórmula molecular es C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S y su peso molecular 307.33 g/mol. El glutatión oxidado es el L-gamma-glutamil-L-cisteinil-glicina disulfuro (GSSG), y su fórmula molecular es C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>.

Desde el punto de vista químico, el glutatión es un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys) (Figura 5).

En la Figura 6 se resumen las principales funciones del GSH en las células, que se llevan a cabo mediante un complejo y regulado mecanismo de acción, en el cual el grupo -SH nucleofílico del GSH se conjuga con el grupo electrofílico de las toxinas (o de las proteínas funcionales del organismo), tanto en forma directa como a través de reacciones catalizadas por las enzimas glutatión *S*-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX).



**Figura 6.** Principales funciones del GSH en la célula.

## **2.2. Metabolismo del GSH y principales enzimas implicados.**

El GSH es un pequeño péptido que se sintetiza enzimáticamente y no a partir de la traducción del ARNm. La síntesis de GSH en plantas se localiza en el citoplasma, y en el cloroplasto (Wachter *et al.* 2005, Yeung *et al.* 2005, Martínez-Sarrasague *et al.* 2006). Se lleva a cabo mediante la acción secuencial de dos enzimas dependientes de ATP:  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS) y glutatión sintetasa (GS) (Cairns *et al.* 2006, Martínez-Sarrasague *et al.* 2006, Pasternak *et al.* 2008, Noctor *et al.* 2012), y su síntesis está regulada por la disponibilidad de sustrato entre otros mecanismos. El paso limitante de la síntesis es el primero donde el GSH ejerce una retroalimentación negativa (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006). En la primera etapa, la cisteína se une al glutamato mediante la acción de la  $\gamma$ -ECS, para formar  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -EC). En el segundo paso, la glicina se une a  $\gamma$ -EC gracias a la GS para formar el producto final, el GSH (Noctor *et al.* 2002, Wachter *et al.* 2005, Martínez-Sarrasague *et al.* 2006). Aunque el GSH se sintetiza en el citoplasma y los cloroplastos, sus numerosas funciones se llevan a cabo con una amplia distribución en otros orgánulos a través de la célula.

El GSH está sujeto a un constante recambio. En humanos, el hígado, riñones, pulmones, corazón, intestinos y músculos son los principales órganos responsables de su homeostasis. La captación de GSH dentro de cada órgano o tejido depende de la actividad de la enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GT o GGT) localizada en la membrana celular (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006). Dentro de las células, el GSH se encuentra principalmente en mitocondrias, retículo endoplásmico y núcleo y es aquí donde se observa un aumento de su concentración en fenómenos como la apoptosis o PCD (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006).

Este tripéptido puede convertirse de forma reversible de la forma oxidada (GSSG) a la forma reducida (GSH), que se considera la forma funcional dentro de la célula, gracias a la intervención de la enzima glutatión reductasa (GR) (Schwarzländer *et al.* 2008, Marty *et al.* 2009, Pandey *et al.* 2015, García-Quirós *et al.* 2017).

En su función detoxificante, el GSH es utilizado como sustrato por las enzimas glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión *S*-transferasa (GST), que lo oxidan a su forma GSSG con la consiguiente reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. La GST cataliza también la conjugación de la forma reducida del GSH con sustratos xenobióticos, contribuyendo de este modo a la acción detoxificante del organismo.

En la Figura 7 se muestran las principales enzimas y rutas implicadas en el metabolismo del GSH. Además de las mencionadas ahí, pueden existir otras rutas metabólicas para el GSH; por ejemplo, para la eliminación de compuestos tóxicos generalmente se forman tioéteres con el GSH y se obtienen productos conjugados con el glutatión a través de la unión con azufre. El derivado azufrado luego pierde el ácido glutámico y la glicina, y conserva la cisteína. Este proceso explica porqué la cisteína es el aminoácido limitante para la síntesis del GSH, ya que a diferencia de lo que ocurre con los otros dos aminoácidos, no se recupera y su concentración intracelular es muy baja (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006).

La perturbación oxidativa del pool de GSH ha sido bien documentada en plantas con actividades catalasa alteradas química o genéticamente (Smith *et al.* 1985, May y Leaver 1993, Willekens *et al.* 1997, Queval *et al.* 2009, Mhamdi *et al.* 2010a, 2010b, Foyer y Noctor 2011) y se ha comprobado que existe una buena correlación entre la disponibilidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular y el estado oxidativo de GSH en la célula. A través de la medida de la concentración de especies antioxidantes, de la actividad enzimática y de la relación entre las concentraciones de las formas oxidada y reducida del GSH (GSSG/GSH) se puede obtener un perfil de comportamiento redox para cada tejido. Por ejemplo, la determinación de la capacidad antioxidante total del plasma puede ser útil para evaluar el estado redox generalizado, mientras que la relación GSH/GSSG en sangre reflejaría los cambios que se verifican en tejidos menos accesibles. Esta relación es mayor de 100 en condiciones normales; sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo, se acumula GSSG dando lugar a una proporción alterada de la tasa GSH/GSSG, lo que indica cambios en el estado redox que afectan el balance de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006). Otra situación en la que se manifiesta la regulación del GSH es en la glicosilación proteica (adición de glucosa a proteínas). Existe una relación inversa entre los niveles de GSH y la glicosilación (Martínez-Sarrasague *et al.* 2006).

Los datos relatados anteriormente nos dan una idea del papel preponderante del GSH, no sólo en la detoxificación de compuestos endógenos y exógenos sino también en los procesos de defensa contra el estrés oxidativo y su influencia en el balance del estado redox celular. Es por ello que resulta de interés el desarrollo de una metodología que permita evaluar el estado de los depósitos tisulares de GSH y la respuesta frente a estímulos depletorios del mismo. Si el método reúne características de especificidad, sensibilidad y cualidades de no invasivo, resultará beneficioso para ser empleado en aquellos casos o situaciones en que otras técnicas no son recomendadas (García-Quirós *et al.* 2019).

### 2.3. Glutación en plantas.

El glutación juega un papel crucial en numerosas fases del ciclo de vida de los vegetales. Pero aún no queda claro cómo las modificaciones en la concentración o en el estado redox del GSH pueden determinar una función fisiológica en la planta o una respuesta frente a estrés biótico o abiótico (Fujita *et al.* 2006).

Las plantas responden a las tensiones ambientales mediante la regulación de las vías metabólicas que funcionan para contrarrestar el daño celular resultante. En las plantas expuestas a temperaturas extremas, suelos contaminados con metales pesados, sequía o contaminantes del aire, la generación de ROS y las alteraciones en el potencial redox intracelular perturban la fisiología celular vegetal (Ogawa 2005, Galant *et al.* 2011). Como parte de su respuesta a estas tensiones ambientales, las plantas producen GSH, que actúa como un antioxidante que elimina las ROS y está implicado en el ciclo ascorbato-glutación que elimina los peróxidos. A través de la acción de la GST, las plantas usan glutación para la desintoxicación metabólica de una amplia gama de xenobióticos, herbicidas, contaminantes atmosféricos (dióxido de azufre y ozono) y metales pesados (Grill *et al.* 1985, Madamanchi y Alscher, 1991, Freeman *et al.* 2004, Cummins *et al.* 2011). El glutación también desempeña papeles críticos en la resistencia a las enfermedades de las plantas y frente al estrés biótico (infección por patógenos), la proliferación celular, el desarrollo de las raíces, la tolerancia a la sal y la protección contra el daño por heladas y frío (Vernoux *et al.* 2000, Mittova *et al.* 2000, Parisy *et al.* 2007, Díaz-Vivancos *et al.* 2010a). Se ha demostrado que es necesario un nivel umbral de glutación es necesario para la producción de la fitoalexina camalexina, determinando la resistencia a patógenos (Parisy *et al.* 2007).

**Figura 7. Esquema del metabolismo del GSH: Bioíntesis, reciclado y detoxificación.** (García-Quirós *et al.* 2017).

Por otro lado, el estudio mediante análisis de los mutantes de *Arabidopsis* de los últimos años ha proporcionado pruebas más que evidentes de que el GSH es necesario para otros aspectos del desarrollo de la planta, como el desarrollo embrionario y meristemático (Vernoux *et al.* 2000, Cairns *et al.* 2006, Dowdle *et al.* 2007), así como en la germinación del polen y en el desarrollo de los primordios florales (Zechmann *et al.* 2011a, Hatano-Iwasaki y Ogawa 2012, Gulyás *et al.* 2014). Un aumento de la carga oxidativa con frecuencia conduce a fenotipos de crecimiento lento, que está vinculado a la acumulación de GSSG (Mhamdi *et al.* 2010c). El GSH es necesario para el desarrollo del meristemo apical de los brotes (Vernoux *et al.* 2000, Reichheld *et al.* 2007), por lo que las plantas deficientes en GSH o en GR crecen mucho más lentamente, debido esto a su incapacidad para mantener el estado redox de GSH en valores suficientes para permitir que las células en división progresen rápidamente tras la división celular. La acumulación leve de GSSG no es suficiente para restringir el crecimiento (Marty *et al.* 2009; Mhamdi *et al.* 2010a) pero la abundancia de GSH en las células proliferantes desempeña un papel crítico en el desarrollo del meristemo de brotes y raíces, ejerciendo

control mediante mecanismos como la regulación del transporte de auxina y la señalización (Bashandy *et al.* 2010).

Aunque en los meristemas de los brotes el GSH solapa las funciones de los sistemas de tiorredoxina (TRX) (Reichheld *et al.* 2007, Bashandy *et al.* 2010), también se han proporcionado evidencias inequívocas de que el glutatión es un metabolito multifuncional importante en la homeostasis y la señalización redox, así como en reacciones de desarrollo (Ball *et al.* 2004, Parisy *et al.* 2007, Foyer *et al.* 2009, Schlaeppli *et al.* 2008, Mhamdi *et al.* 2010a, Mhamdi *et al.* 2013).

Además, también se ha visto que el glutatión media en importantes procesos celulares tales como el control del ciclo celular y la muerte celular programada (Diaz-Vivancos *et al.* 2010a, 2010b, Kranner *et al.* 2006). Se ha sugerido que el potencial redox del GSH regula la cascada de señalización que actúa sobre los eventos fisiológicos, genéticamente controlados, de muerte celular programada (PCD) y latencia (Kranner *et al.* 2006). Por lo tanto, un aumento de éste potencial por encima de un valor umbral podría causar la muerte y/o la detención del crecimiento. Aunque diferentes estudios en plantas que sobreexpresan alguna de las enzimas implicadas en la biosíntesis de GSH (Noctor y Foyer 1998, Liedschulte *et al.* 2010) han demostrado que las plantas pueden tolerar altas concentraciones de GSH sin que se desencadene la muerte celular, existen evidencias de que una perturbación oxidativa de GSH (acumulación de GSSG) precede o acompaña la aparición de lesiones en plantas (Willekens *et al.* 1997; Queval *et al.* 2007, 2009, Mhamdi *et al.* 2010a). Sin embargo, estas lesiones pueden prevenirse tratando las plantas con mioinositol o bloqueando la síntesis de ácido salicílico (Chaouch *et al.* 2010, Chaouch y Noctor, 2010). Esto sugiere que la sobreoxidación del pool de GSH no es suficiente para desencadenar la PCD y las respuestas a patógenos, pero sí está claro que se requieren eventos de reducción-oxidación para que se produzca (Mou *et al.* 2003).

En los animales está claramente demostrado que la oxidación metabólica actúa regulando el ciclo celular y la diferenciación de células madre embrionarias (Menon *et al.* 2003, Yanes *et al.* 2010). Estos mecanismos son probablemente genéricos en los eucariotas, ya que se han observado patrones muy similares de transporte, acumulación y reclutamiento de GSH en el núcleo en células vegetales y animales (Markovic *et al.* 2007, Diaz-Vivancos *et al.* 2010a, 2010b). En ambos casos, el GSH se traslada y acumula en el núcleo en la fase G1 del ciclo celular, y la resultante disminución de la concentración de GSH en el citosol conduce a un reajuste del metabolismo oxidativo intracelular y la señalización redox (Diaz-Vivancos *et al.* 2010b). El reclutamiento de GSH en el núcleo es seguido rápidamente por una acumulación significativa de GSH en toda la célula (Pellny *et al.* 2009), lo que sugiere que el agotamiento de GSH citosólico acoplado a la oxidación del pool causa la activación de la síntesis de glutatión. Se supone que la activación postraduccional de la  $\gamma$ -ECS junto con la expresión de la GS (Diaz-Vivancos *et al.* 2010b), conducen a la producción de GSH y al aumento del pool de GSH total, requerido para la redistribución de compuestos entre las células hijas

originadas de la posterior mitosis (Diaz-Vivancos *et al.* 2010a). La redistribución controlada del pool intracelular de GSH durante el ciclo celular tiene efectos pronunciados sobre la expresión génica y conduce a una disminución de las defensas oxidativas durante la división celular (Diaz-Vivancos *et al.* 2010b). Además, la capacidad de la célula de sintetizar rápidamente GSH después de su secuestro en el núcleo, lo hace un regulador crítico de la progresión del ciclo celular que puede influir en la capacidad de la auxina para promover el crecimiento de las raíces. Puede requerirse una concentración umbral de glutatión para soportar la actividad de la GRX o la GST y para permitir que las células progresen desde G1 a través del ciclo celular. En teoría, el glutatión tiene todos los atributos requeridos de un tampón redox sensible y regulable dentro de la célula. En conjunto, los estudios anteriores demuestran que el control de la redistribución intracelular de antioxidantes, particularmente el GSH, puede actuar como una potente señal en la regulación del ciclo celular (Diaz-Vivancos *et al.* 2010a, 2010b).

El GSH es insustituible en el desarrollo de Arabidopsis. Los mutantes knockout para la  $\gamma$ -ECS son embrionarios letales (Cairns *et al.* 2006). El mutante *rml1* de Arabidopsis, que tiene una concentración de GSH muy baja, muestra una marcada inhibición del desarrollo radicular, en el cual las células del meristemo primario se detienen en G1, mientras que el desarrollo de los brotes se ve relativamente poco afectado (Reichheld *et al.* 2007).

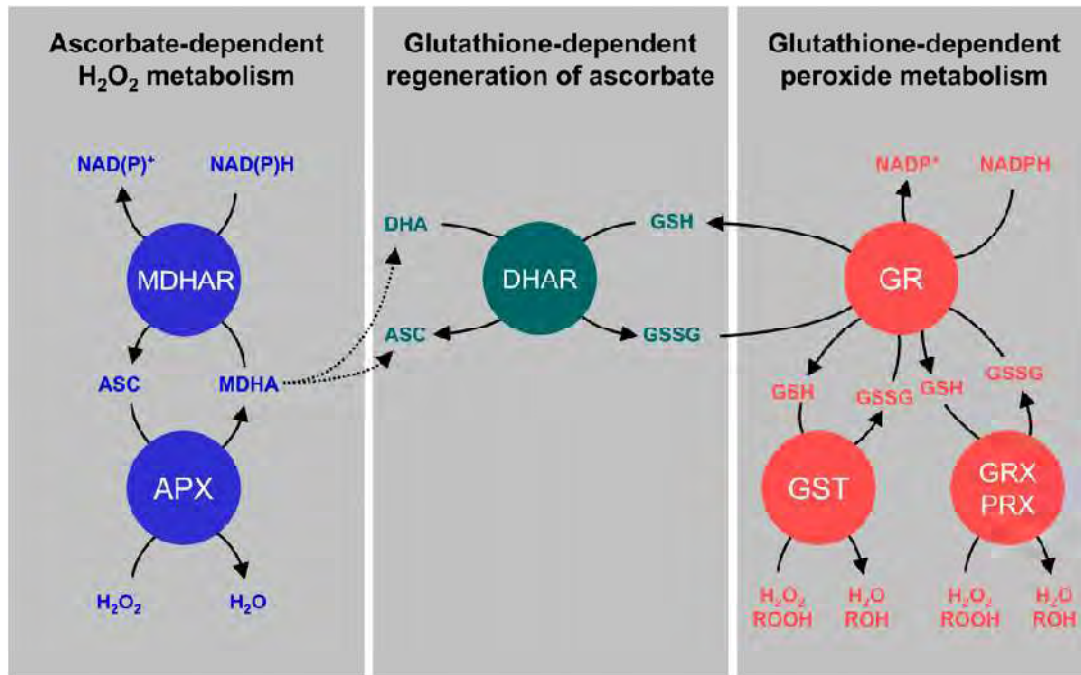
El GSH es un antioxidante abundante y estable en plantas, con un potencial redox adecuado, que interactúa con numerosos componentes en distintas rutas metabólicas, y que se mantiene, generalmente, en un estado reducido. Incluso en ausencia de una enzima, el glutatión es capaz de interactuar rápidamente con radicales libres como el superóxido y el radical hidroxilo (Polle 2001). En los compartimentos celulares donde se alcanza el equilibrio termodinámico (o se acerca bastante), y asumiendo un potencial redox del NADPH de -300 mV o menor, se espera que el glutatión esté casi completamente en su forma reducida, GSH (Foyer y Noctor, 2011).

Dentro de este contexto intracelular altamente reducido, incluso la más estable de las ROS ( $H_2O_2$ ) tiene una vida relativamente corta. La eliminación de ROS por el sistema ascorbato-glutatión dependiente de NADPH puede causar modificaciones, transitorias o no, en todos o algunos de los componentes de este sistema. Estas modificaciones tienen una enorme importancia fisiológica, ya que pueden ser detectadas y transducidas para influir en múltiples vías de señalización, especialmente aquellas que implican fitohormonas (Mhamdi *et al.* 2013). Además, incluso sin cambios inducidos por ROS en el sistema, el GSH puede proporcionar información sobre el estado redox actual a través de proteínas tales como las glutaredoxinas (GRX) y enzimas biosintéticas de fitohormonas. El GSH actúa como fuente de azufre o agente reductor en el metabolismo y también es necesario para la formación de conjugados GS implicados en la biosíntesis, el transporte y la desintoxicación.



El GSH por tanto es parte de un sistema altamente complejo e intrincado de antioxidantes en plantas. Funciona junto al ascorbato y las catalasas en las vías de homeostasis redox de alta capacidad. Pero, si bien se considera que el ciclo ascorbato-glutatión funciona de manera integrada (Noctor *et al.* 2000, 2002, Potters *et al.* 2002, Noctor 2006, Foyer y Noctor 2011), aunque las reservas celulares de ascorbato y glutatión pueden configurarse para responder a una perturbación, está claro (estudios en mutantes de *Arabidopsis* así lo demuestran) que los dos compuestos tienen funciones específicas y no deben considerarse meramente como antioxidantes intercambiables. Las investigaciones con mutantes de *Arabidopsis* deficientes en GSH han demostrado que el glutatión tiene funciones críticas en el desarrollo de embriones y tejidos meristemáticos (Vernoux *et al.* 2000, Cairns *et al.* 2006, Reichheld *et al.* 2007, Frottin *et al.* 2009, Bashandy *et al.* 2010, Foyer y Noctor 2011).

En el ciclo ascorbato-glutatión, el GSH es capaz de regenerar al ascorbato mediante la reducción del dehidroascorbato (DHA), ya sea químicamente o mediante la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR), que puede considerarse una clase de glutatión S-transferasa (Dixon *et al.* 2002). Sin embargo, la regeneración del ascorbato puede ser independiente de GSH, mientras que DHAR es sólo una de las múltiples rutas por las que se oxida el GSH (Figura 8). Las GPXs vegetales, ya anotadas, usan TRXs más eficientemente que GSH (Iqbal *et al.* 2006), pero algunas GSTs muestran actividad peroxidasa dependiente de GSH frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peróxidos orgánicos (Dixon *et al.* 2009), y algunos genes que codifican GST están fuertemente inducidos por el estrés oxidativo (Vanderauwera *et al.* 2005, Queval *et al.* 2007). La oxidación de GSH independiente del DHA o de reacciones químicas con ROS también podría ocurrir a través de la peroxiredoxina dependiente de GRX (PRX) o Metionina sulfóxido reductasa (Rouhier *et al.* 2002; Tarrago *et al.* 2009). En algunos casos, sin embargo, los reductores fisiológicos de estas peroxidases aún deben identificarse inequívocamente. Al igual que la TRX, la GRX y las ciclofilinas, el GSH puede funcionar como donador de electrones en la regeneración de la forma activa de las peroxidases de tiol tales como PRX.



**Figura 8.** Interdependencia e independencia de glutatión y ascorbato en el metabolismo de peróxidos. ASC, ascorbato reducido; MDHA (R), monodehidroascorbato (reductasa); GST, glutatión S-transferasa; ROH y ROOH, compuesto orgánico con alcohol y grupo peróxido, respectivamente. (Foyer y Noctor 2011).

La deficiencia de catalasa en *Arabidopsis* conduce a la oxidación del GSH, mientras que el ascorbato se mantiene altamente reducido (Mhamdi *et al.* 2010a). Esto podría ocurrir debido a la diferencia en el potencial redox de ambos compuestos (Figura 9) o porque la reducción de DHA es sólo una de las muchas rutas de oxidación de GSH (Figura 8). En los mutantes knockouts *cat2* de *Arabidopsis*, las APXs y DHARs citosólicas específicas son inducidas al mismo tiempo, proporcionando pruebas de que el ciclo ascorbato-glutatión participa en la respuesta al aumento de la disponibilidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mhamdi *et al.* 2010a). Sin embargo, también se inducen otros genes que codifican peroxidasa dependientes de GSH. De este modo, la oxidación de glutatión desencadenada por el aumento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría estar vinculada al flujo a través de los remanentes celulares de ascorbato así como a reacciones independientes de ascorbato, proporcionando de este modo un mecanismo por el cual las perturbaciones en el glutatión podrían actuar para transmitir señales peróxido. Una cuestión clave serían los cambios en el estado redox del NADPH y la capacidad relativamente baja de los sistemas reductores de glutatión a disulfuro (GSSG) como la glutatión reductasa (GR) en comparación con los mecanismos de oxidación GSH (Noctor *et al.* 2011).

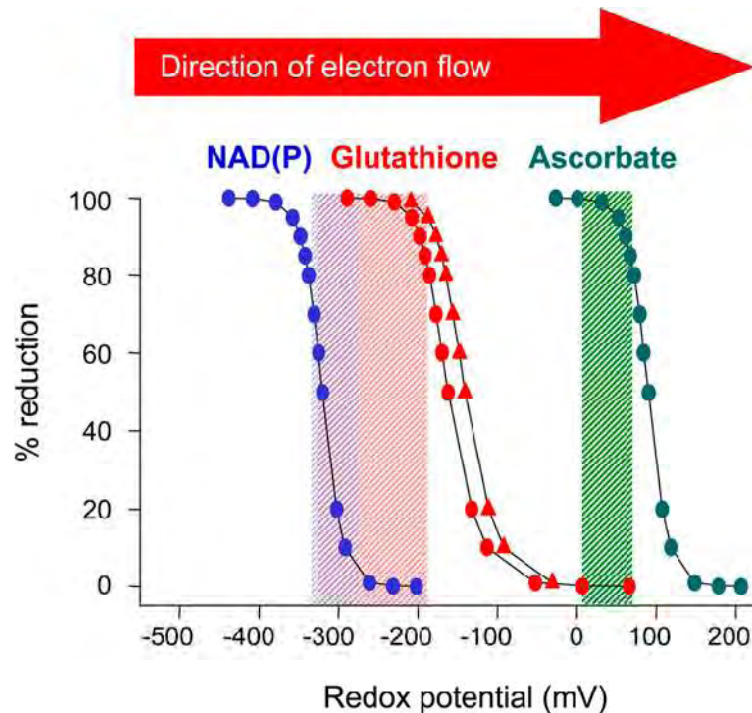
Se ha visto que el GSH está implicado en la expresión génica en plantas. Es un regulador fisiológico de muchas reacciones de intercambio de tiol-disulfuro, incluyendo la transcripción en el cloroplasto (Liere y Link 1997). Se ha visto que el GSH puede inducir la expresión génica de defensa (Wingate *et al.* 1988), en concreto la relacionada con la patogénesis (PR), de una manera similar a como actúa el ácido salicílico (SA) (Mou *et al.* 2003). Durante mucho tiempo se sabe que durante la

resistencia sistémica adquirida (SAR), el SA induce la expresión de los genes PR que codifican pequeñas proteínas que son secretadas desde la célula o dirigidas a la vacuola (Sticher *et al.* 1997). Ha sido ya demostrado que las reacciones de intercambio tiol-disulfuro dependientes de GSH son cruciales para la expresión de genes PR (Mou *et al.* 2003). Por lo tanto, la inducción de la expresión del gen PR puede ser, al menos en parte, debido al pequeño pero significativo aumento de GSH total presente en las hojas (Foyer *et al.* 2009). El intercambio de tiol / disulfuro es crucial en SAR, particularmente debido al mecanismo de activación del gen NPR1. El gen NPR1 codifica una proteína que contiene una secuencia de localización bipartita y se acumula en el núcleo en respuesta a inductores abióticos y bióticos de la SAR (Kinkemal *et al.* 2001). La localización nuclear de la proteína NPR1 es un requisito previo para la expresión del gen PR, y se determina por oligomerización. La proteína NPR1 se localiza en el citosol como un oligómero o en el núcleo como monómero. El equilibrio entre estas dos formas está modulado por las reacciones de intercambio tiol-disulfuro que pueden ser influenciadas por GSH y GSSG (Mou *et al.* 2003). Los inductores de la SAR, como SA, regulan la expresión génica PR a través de cambios redox en la NPR1. Para ser activa, la NPR1 tiene que ser reducida a la forma monomérica que es capaz de moverse al núcleo para inducir la expresión del gen PR. La ruta de transducción de la señal de la NPR1 es altamente conservada entre las especies de plantas. Cualquier estímulo biótico o abiótico que pueda perturbar el estado redox celular puede servir para incrementar la regulación del mismo conjunto de genes de defensa a través de la vía NPR1 (Mou *et al.* 2003). Esto también puede explicar la expresión del gen PR en los mutantes deficientes en catalasa (Willekens *et al.* 1997). La deficiencia de catalasa se asocia con una enorme oxidación del pool de glutatión y una mayor acumulación de glutatión (Smith *et al.* 1984, Willekens *et al.* 1997, Noctor *et al.* 2000), que recuerda a la respuesta observada en las interacciones planta-patógeno (Vanacker *et al.* 2000, Mou *et al.* 2003). En esta situación, la inducción de la SAR implica un rápido aumento de las concentraciones de las ROS y un aumento transitorio o más sostenido en las señales oxidativas seguido de una fuerte disminución del potencial redox celular como resultado de la acumulación de antioxidantes tales como GSH.

El GSH también parece tener un importante papel en la señalización lumínica. Diferentes estudios genéticos han relacionado el contenido de GSH con la señalización de la irradiación y la calidad de la luz (Ball *et al.* 2004). El GSH también parece estar implicado en la señalización electrofisiológica sistémica que permite la aclimatación a luz intensa y en la señalización por fotorreceptores (Szechynska-Hebda *et al.* 2010, Sung *et al.* 2007, 2009, Noctor *et al.* 2010).

Además de los posibles papeles en la regulación del ciclo celular, la PCD, la señalización lumínica..., el estado del glutatión se ve claramente implicado en la señalización a través de las vías SA y del ácido jasmónico (JA) (Vanacker *et al.* 2000, Mateo *et al.* 2006, Koornneef *et al.* 2008, Mou *et al.* 2003, Lindermayr *et al.* 2010, Spoel *et al.* 2003). Parece ser necesario un cierto grado de reducción del GSH tanto para la señalización de SA como para JA (Mhamdi *et al.* 2010a). Además, los mutantes

deficientes en glutatión parecen tener comprometida la resistencia tanto a microorganismos como a insectos (Ball *et al.* 2004, Parisy *et al.* 2007, Schlaeppi *et al.* 2008), por lo que es probable que el estado de GSH también influya en la señalización frente a estrés biótico.



**Figura 9.** Potenciales redox de las parejas NAD (P), glutatión y ascorbato. (Foyer y Noctor 2011). Los fondos sombreados indican estados redox típicos en ausencia de estrés. Para el glutatión, las dos curvas indican la relación entre el estado de reducción y el potencial redox en las concentraciones totales de glutatión de 1 mM (triángulos) y 5 mM (círculos).

Por último, el glutatión es esencial para el establecimiento de nódulos radiculares en la simbiosis leguminosa/rizobio. La falta de glutatión no sólo resulta en una disminución en el número de nódulos, sino también en la expresión de genes nodulínicos tempranos (Frendo *et al.* 2005).

#### **2.4. Metabolismo del GSH y principales enzimas implicados en plantas.**

Es bien sabido que el glutatión es un compuesto omnipresente y multifuncional que es importante para mantener la homeostasis redox celular. El equilibrio entre las formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG) de este tripéptido juega un papel fundamental en los procesos fisiológicos y metabólicos básicos en las plantas. Las investigaciones de las últimas décadas arrojan una notable cantidad de evidencias que sugieren que el papel del glutatión dentro del sistema de la planta se extiende más allá de las funciones

metabólicas básicas y que en última instancia puede actuar como un modulador del desarrollo de la planta y la morfogénesis. Por lo tanto, no es sorprendente que la investigación haya comenzado a centrarse en el uso del sistema de par redox de glutatión para mejorar la regeneración de células cultivadas. Uno de los temas principales que ha surgido de los estudios *in vitro* es que el GSH promueve la proliferación celular, mientras que el GSSG promueve el desarrollo. Así, la manipulación *in vitro* de este compuesto redox dentro del medio de cultivo podría conducir a un aumento de la regeneración de la planta (Yeung *et al.* 2005). Las enzimas implicadas en el metabolismo y la síntesis de GSH se inducen conjuntamente en respuesta al estrés (Mittova *et al.* 2000). Esto sugiere que existe una superposición considerable en las cascadas de transducción de señales que inducen los genes que codifican las enzimas de la síntesis de GSH y los implicados en la inducción de genes homólogos de GPX por el oxígeno singlete (Op den Camp *et al.* 2003) y GST1 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rentel y Knight 2004).

### 2.5. Biosíntesis de GSH.

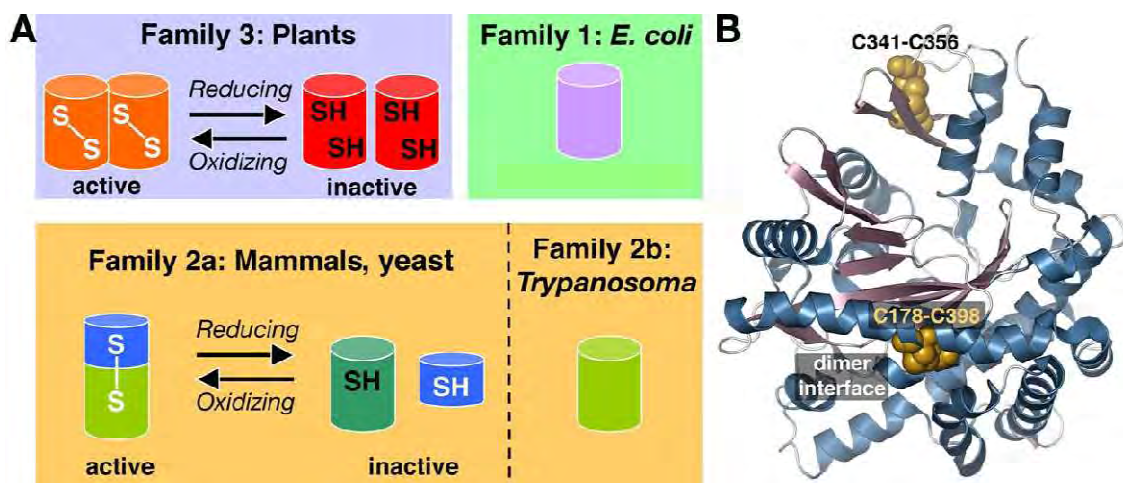
Aunque las plantas producen GSH a través de una ruta biosintética muy conservada en la mayoría de los organismos (Figura 7), las investigaciones de los últimos años sobre la  $\gamma$ -ECS y la GS de las plantas, revelan nuevos conocimientos sobre los mecanismos bioquímicos que regulan y controlan la síntesis de esta molécula crítica en la fisiología vegetal (Galant *et al.* 2011).

Varios estudios sugieren que la  $\gamma$ -ECS se localiza en los cloroplastos mientras que la GS se localiza tanto en cloroplastos como en citosol en células vegetales (Hell y Bergmann 1988, 1990; Galant *et al.* 2011). Las enzimas  $\gamma$ -ECS y GS están codificados por un único gen con sitios de inicio de transcripción alternativos que conducen a la proteína plasmática o citosólica (Wachter *et al.* 2005). La compartimentación de la biosíntesis de glutatión es única en plantas (Noctor *et al.* 2002, Galant *et al.* 2011). Aunque la producción de glutatión está regulada por  $\gamma$ -ECS en el cloroplasto (May *et al.* 1998, Hicks *et al.* 2007), las rutas citosólicas implicadas en la respuesta al estrés biótico y abiótico requieren glutatión, por lo tanto, la síntesis de  $\gamma$ -EC en el cloroplasto (mediante la  $\gamma$ -ECS) apoya directamente la producción de GSH por la GS cloroplastidial, pero se requiere el transporte del dipéptido al citosol para que la GS citosólica cumpla su misión en el citoplasma, así como el transporte de GSH hasta otros compartimentos celulares (Pasternak *et al.* 2008, Maughan *et al.* 2010, Gigolashvili y Kopriva 2014).

#### 2.5.1. $\gamma$ -ECS en plantas: Estructura, función y regulación.

La  $\gamma$ -ECS cataliza la formación dependiente de ATP de un enlace peptídico entre el glutamato y la cisteína en la primera reacción de síntesis de glutatión (Figura 7). Mediante la clonación en diferentes especies de plantas, se ha comprobado que su secuencia no está relacionada con la de la enzima en mamíferos, levaduras o bacterias (May y Leaver 1994, Frendo *et al.* 1999, Hothorn *et al.* 2006, Wu *et al.* 2009). El análisis secuencial de la  $\gamma$ -ECS de múltiples especies indica que estas enzimas se agrupan en tres familias distintas (Figura 10.A). Las comparaciones dentro de cada familia revelan similitud de secuencia, pero las comparaciones por pares entre los grupos no muestran relaciones estadísticamente significativas. Posteriormente estudios cristalográficos revelaron que la  $\gamma$ -ECS de levaduras, *E. coli* y plantas comparten un pliegue tridimensional común (Hibi *et al.* 2004, Biterova y Barycki 2009).

Las  $\gamma$ -ECS mejor estudiadas son las de eucariotas no vegetales y procariotas y consisten en una subunidad catalítica pesada (~ 70 kDa) y una subunidad reguladora ligera (~ 30 kDa), (Seelig *et al.* 1984, Fraser *et al.* 2002). La subunidad pesada cataliza la formación de  $\gamma$ -glutamilcisteína, mientras que la subunidad ligera aumenta la afinidad por el glutamato y disminuye la inhibición por el glutatión (Seelig *et al.* 1984, y Fraser *et al.* 2002). La formación de enlaces disulfuro intermoleculares es lo que mantiene la asociación de las dos subunidades (Seelig *et al.* 1984, Fraser *et al.* 2002, 2003), con lo que la  $\gamma$ -ECS responde a cambios redox celulares para controlar la producción de  $\gamma$ -EC. Sin embargo, este modelo no se extiende a todas las especies. La  $\gamma$ -ECS de *T. brucei* y *E. coli*, por ejemplo, funcionan como un monómero (Lueder y Phillips 1996, Hibi *et al.* 2004).



**Figura 10. Descripción general de la  $\gamma$ -ECS (Galant *et al.* 2011). (A) Organización oligomérica y regulación redox de las tres familias de  $\gamma$ -ECS. (B) Estructura de la  $\gamma$ -ECS de *B. juncea* mostrando las posiciones de los dos enlaces disulfuro (bolas doradas). Los elementos de la estructura secundaria muestran del siguiente modo: hélices- $\alpha$  en azul y láminas- $\beta$  en rosa.**

Los estudios bioquímicos en plantas revelan que la  $\gamma$ -ECS está regulada mediante metabolismo redox, pero a través de un mecanismo que difiere de las enzimas

heterodiméricas (Jez *et al.* 2004, Hothorn *et al.* 2006, Gromes *et al.* 2008). Aunque no se han publicado estudios acerca del mecanismo químico, la similitud estructural entre la  $\gamma$ -ECS de plantas y de levaduras sugiere una reacción similar (Biterova y Barycki, 2009). En ésta última, un sitio activo que contiene  $Mg^{2+}$ , orienta el residuo de  $\gamma$ -glutamato-carboxilato para atacar al  $\gamma$ -fosfato del ATP, que está posicionado en un sitio activo de lisina con  $Mg^{2+}$ . El intermedio acil-fosfato resultante experimenta un ataque nucleofílico por el grupo  $\alpha$ -amino de la cisteína, que puede ser activado por el residuo de glutamato del sitio activo. La estabilidad del estado de transición en cada etapa de reacción la proporciona una arginina (altamente conservada) que facilita la formación del enlace peptídico.

Los estudios de la  $\gamma$ -ECS de las plantas demuestran que la formación reversible de enlaces disulfuro altera la actividad catalítica de la enzima, y que la forma oxidada es más activa que la reducida (Jez *et al.* 2004). La regulación de la actividad  $\gamma$ -ECS ofrece un mecanismo simple de control postraduccional de la biosíntesis de glutatión en plantas. En condiciones oxidantes, la demanda de GSH aumenta y la  $\gamma$ -ECS se activa. A medida que aumenta la concentración de GSH, el potencial redox celular se vuelve cada vez más reducido y la actividad  $\gamma$ -ECS disminuye.

La estructura tridimensional de la  $\gamma$ -ECS de *B. juncea* muestra las ubicaciones de estos dos enlaces disulfuro (Figura 10.B, Galant *et al.* 2011). La  $\gamma$ -ECS activa (oxidada) en plantas funciona como un dímero, pero las condiciones reductoras alteran la interfaz del dímero y desplazan la proteína hacia la forma monomérica que es menos activa (Hothorn *et al.* 2006). La mutagénesis dirigida del primer enlace disulfuro de la  $\gamma$ -ECS en *A. thaliana* y en *B. juncea* suprime la respuesta redox y se favorece la forma monomérica, que bloquea al enzima (Hothorn *et al.* 2006, Hicks *et al.* 2007).

La conservación del enlace disulfuro que media la transformación reversible de monómero a dímero de  $\gamma$ -ECS, es específica de la  $\gamma$ -ECS del reino vegetal (Gromes *et al.* 2008, Galant *et al.* 2011). El estudio de la  $\gamma$ -ECS entre los diferentes organismos sugiere que la dimerización sensible a redox de las plantas surgió más tarde en la evolución y que puede estar relacionada con la compartimentación de la síntesis de GSH, en el cloroplasto (Gromes *et al.* 2008, Galant *et al.* 2011).

Las evidencias basadas en la genética molecular sugieren que la  $\gamma$ -ECS puede cumplir una función de señalización, así como un papel catalítico (Ball *et al.* 2004). Además, se ha cuestionado la distribución intracelular de las enzimas biosintéticas del GSH entre el cloroplasto y el citosol, lo que sugiere que tanto la síntesis como la localización de GSH son más importantes y aparentes en el citosol que en los cloroplastos de células fotosintéticas (Foyer y Noctor 2005a, 2005b). De igual forma, aún quedan muchas dudas sobre el transporte de gamma-glutamilcisteína ( $\gamma$ -EC), GSH y GSSG, pero parece probable que el sistema de transporte del cloroplasto sea bastante diferente del de otros compartimentos (Foyer y Noctor 2005a, 2005b).

### 2.5.2. GS en plantas: Estructura, función y regulación.

En el segundo paso de la síntesis de GSH, la GS cataliza la adición dependiente de ATP de glicina al  $\gamma$ -EC (Figura 7). La caracterización estructural y funcional de la GS en bacterias muestra que esta enzima funciona como un tetrámero (Yamaguchi *et al.* 1993), mientras que la GS de mamíferos, levaduras y plantas son activas como dímeros (Jez y Cahoon 2004, Galant *et al.* 2011). La secuencia de GS de plantas como Arabidopsis, trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*) y varias leguminosas comparten una homología de ~ 40% con las secuencias de humanos y levaduras (Rawlins *et al.* 1995, Ullmann *et al.* 1996, Wang y Oliver 1997a, 1997b, Moran *et al.* 2000, Matamoros *et al.* 2003, Skipsey *et al.* 2005).

Los estudios en Arabidopsis han identificado un bucle putativo rico en glicina como parte del sitio activo de la GS (Wang y Oliver 1997a, 1997b, Galant *et al.* 2009). El mecanismo de reacción de esta enzima en Arabidopsis fue descrito por Herrera *et al.* (2007). En la primera etapa de la reacción, la formación de un intermediario acil-fosfato electrofílico se produce por transferencia del  $\gamma$ -fosfato del ATP al  $\gamma$ -EC. Un grupo de residuos ácidos coordina dos  $Mg^{2+}$  a ATP, orientando el grupo  $\gamma$ -fosfato del sitio activo. El grupo guanidilo del residuo Arg132 ayuda a estabilizar el estado de transición pentavalente que produce el intermediario acil-fosfato. A continuación, el grupo amino de la glicina actúa como un nucleófilo para atacar a este intermediario. El grupo guanidilo de cadena lateral del residuo Arg454 interactúa con el resto carboxílico de la glicina, orientando al sustrato para atacar el intermediario acil-fosfato (Herrera *et al.* 2007). Aunque estos estudios dan luz al papel catalítico de los residuos clave del sitio activo, la base de la especificidad del sustrato para el aminoácido nucleofílico en la GS de plantas aún no está bien definida.

Algunas plantas sintetizan análogos de glutatión en los que se sustituye la glicina por otros compuestos, como es el caso del homoglutión de la mayoría de las leguminosas (Moran *et al.* 2000). Fisiológicamente, el papel exacto de homoglutión no está claro. Una función probable es que sustituya al GSH como tampón redox celular en tejidos asociados con la fijación de nitrógeno, ya que se requiere homoglutión para el desarrollo adecuado de los nódulos (Frendo *et al.* 2005).

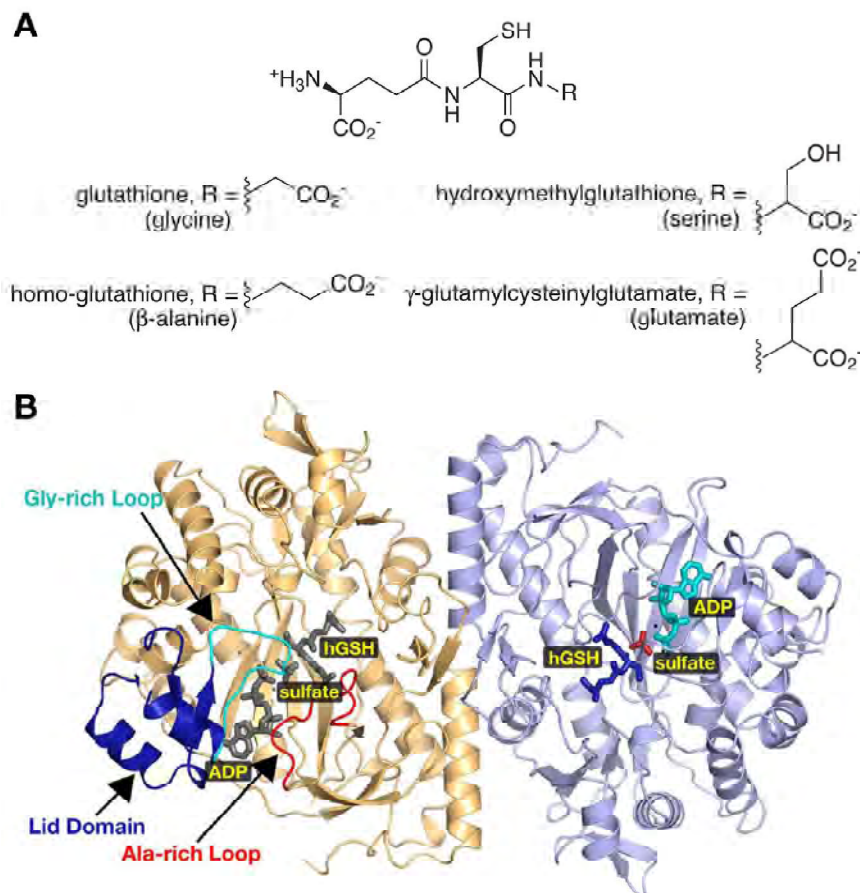
En Arabidopsis, hay un solo gen que codifica la GS, mientras que en el genoma de soja existen dos genes que codifican GSs y dos homoglutión sintetasa (hGS), con un 87 y 93% de identidad, respectivamente.

La comparación de las estructuras de la GS y la hGS reveló diferencias en la secuencia del bucle rico en alanina.

### 2.6. Reciclado de GSH.



El GSH y la GR son dos de los componentes más importantes del ciclo ascorbato-glutatión. Como ya se ha mencionado, mantener unos apropiados niveles de GSH con respecto a GSSG es necesario para el buen funcionamiento de la célula vegetal, y la enzima encargada de este propósito es la glutatión reductasa (GR), uno de los antioxidantes enzimáticos más importantes en todos los organismos. La GR es una flavoproteína oxidoreductasa homodimérica que utiliza FAD (como grupo prostético) y NADPH para reducir una molécula de GSSG a dos moléculas de GSH (García-Quirós *et al.* 2017), manteniendo así los niveles de GSH reducido.



**Figura 11. Diversidad de las GS vegetales (Galant *et al.* 2011).** (A) Se muestran las estructuras químicas de los análogos de glutatión sintetizados por varias plantas. Todos comparten la estructura de  $\gamma$ -glutamilcisteína central con modificaciones a la tercera posición de aminoácidos. (B) Dímero de homoglutathione (hGS) (Galant *et al.* 2009). Los monómeros son de color dorado y azul, respectivamente. En el monómero dorado se destacan el dominio de la tapa (azul oscuro), el lazo rico en glicina (cian) y el bucle rico en alanina (rojo). Las posiciones del ADP, el sulfato y el homoglutathione se resaltan en el monómero azul con los ligandos correspondientes coloreados en gris en el monómero dorado.

2.6.1. GR en plantas: Estructura, función y regulación.

Los estudios clásicos de fraccionamiento en plantas describieron una mayor actividad de GR en los cloroplastos (Foyer y Halliwell 1976), pero también se ha detectado en las mitocondrias, el citosol y los peroxisomas (Edwards *et al.* 1990, Rasmusson y Møller 1990, Jiménez *et al.* 1997, Stevens *et al.* 2000, Romero-Puertas *et al.* 2006). De las cinco enzimas del metabolismo del glutatión analizadas en el presente trabajo, la GR es la mejor caracterizada genéticamente, ya que está muy conservada en todos los reinos. En los genomas de las plantas se han codificado dos genes de GR; GR1 codifica la actividad GR citosólica y peroxisomal, mientras que GR2 codifica la actividad GR plastidial y mitocondrial y es responsable del 70-80% de la actividad GR en la planta (Gill *et al.* 2013, García-Quirós *et al.* 2017). Estas dos isoformas de la enzima sediferencian en función de la extensión del extremo N-terminal, que es más corta en la GR1 (Trivedi *et al.* 2013).

La GR es un homodímero (Figura 12) consistente en monómeros de 54KDa, cada uno de los cuales contiene 3 dominios: un dominio de unión a NADPH, un dominio de unión a FAD y un dominio de dimerización. Cada monómero contiene 478 residuos y una molécula de FAD. La presencia de residuos de cisteína (Cys) en el sitio activo de la GR es lo que realmente cataliza la reducción del GSSG a GSH (Garrett y Grisham 2005, García-Quirós *et al.* 2017).

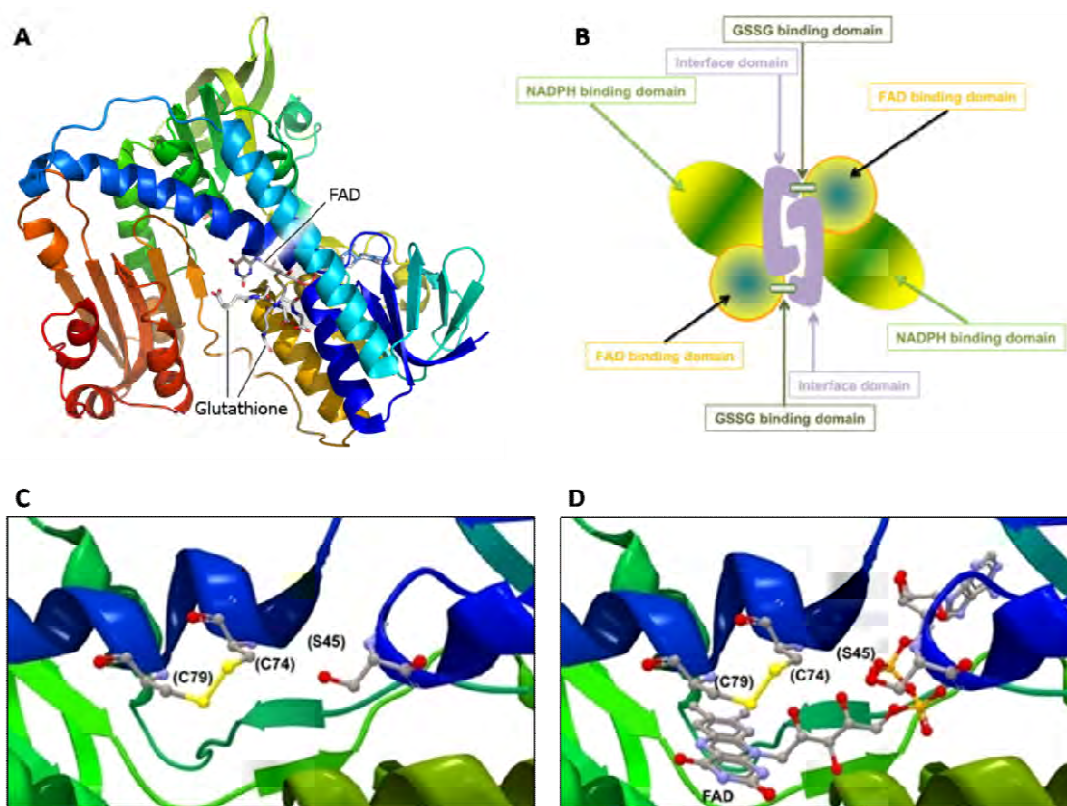
En ausencia de tioles, la GR es propensa a formar tetrámeros y formas más grandes (heterodímeros) que se han encontrado en especies vegetales como *P. sativum* y *Z. mays* (Yousuf *et al.* 2012, Gill. *et al.* 2013) y han demostrado actividad catalítica. Sin embargo, la presencia de GSH, su producto tiol, mantiene a la enzima en su forma dimérica en condiciones celulares normales (Yousuf *et al.* 2012, Gill *et al.* 2013). Se ha visto que la capacidad de transformarse en tetrámeros o heterodímeros, también está influenciada por el pH y la temperatura, y no sólo por los sustratos o productos. Este fenómeno es uno de los mecanismos que regulan la actividad catalítica de la GR (Rao y Reddy 2008, Gill *et al.* 2013).

El mecanismo de acción de la GR (donde se requiere un mol de NADPH por cada mol de GSSG para reducirlo a GSH) está controlado en gran medida por la disponibilidad de sustrato (GSSG) e implica dos etapas: en primer lugar, el resto flavin (FAD) se reduce mediante NADPH, siendo responsable entonces de la reducción del puente disulfuro del sitio activo de la enzima produciendo un anión tiolato y una Cys. En el segundo paso, se reduce el GSSG. En el proceso de reducción de GSSG a GSH, la GR actúa como un mecanismo binario complejo (“ping-pong”) en el que el NADPH se une y transfiere un  $H^+$  al FAD, y después debe desaparecer para que se una el GSSG al sitio activo de la enzima, ya que son incompatibles (Gill *et al.* 2013). Estudios recientes sugieren que la enzima en su forma oxidada es más estable que en su forma reducida (Trivedi *et al.* 2013).

El dominio de unión al NADPH se encuentra en los residuos aminoacídicos 198-238, el dominio de unión a FAD en la región 1-157 y el dominio de dimerización tiene dos

regiones, en el extremo C-terminal 372-482 y en el extremo N-terminal 71-104. Las estructuras cristalinas tridimensionales de las enzimas en diferentes especies muestran similitudes en el dominio catalítico (Pastori y Foyer 2002, Nikiforova *et al.* 2003, Moons 2005, Gill *et al.* 2013), esto se debe a que las GRs poseen en su estructura dos cisteínas altamente conservadas en todas las especies (C61, C65) en el sitio catalítico, que forman un enlace disulfuro.

La GR regula la relación GSH/GSSG dentro de la célula, proporcionando GSH como sustrato para la GPX y la GST, las 2 enzimas del metabolismo del GSH involucradas en la detoxificación (Eliminan  $H_2O_2$  y xenobióticos).



**Figura 12.** A) Estructura 3D de la GR. B) Mecanismo de acción de la GR, detalle del homodímero y de los dominios de GR (Gillet *et al.* 2013). C y D) Sitio activo del enzima GR.

### 2.7. Detoxificación mediada por GSH.

Las enzimas glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión *S*-transferasa (GST) están involucradas en la detoxificación celular mediante GSH. Los genes que codifican las GPX de plantas se han clonado a partir de una amplia variedad de especies vegetales, e

incluyen genes que codifican proteínas dirigidas al cloroplasto (Mullineaux *et al.* 1998, Foyer *et al.* 2009). Junto con ciertas GST, algunas GPX están entre los genes cuya expresión está fuertemente inducida por estrés oxidativo (Levine *et al.* 1994, Willekens *et al.* 1997).

### 2.7.1. GPX en plantas: Estructura, función y regulación.

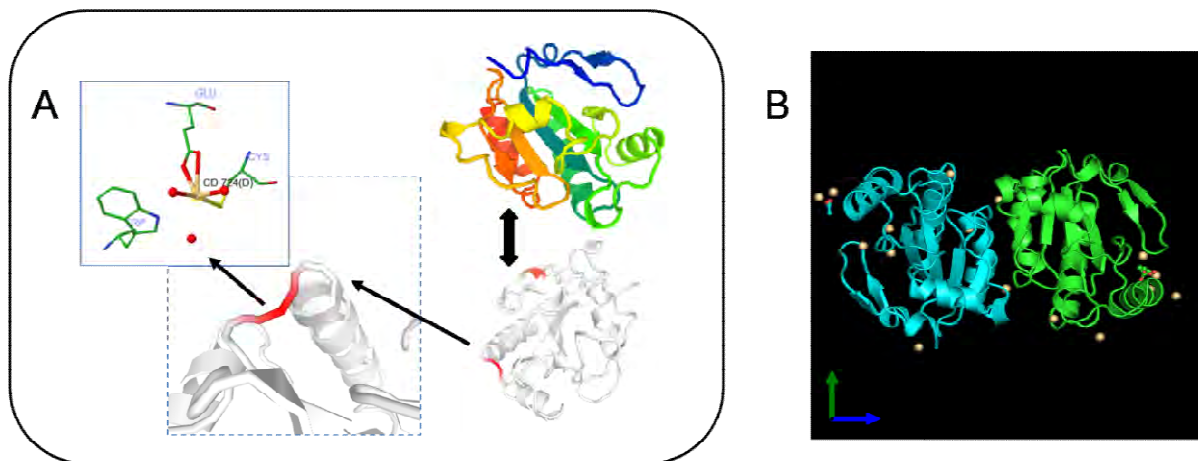
Glutación peroxidasa (GPX) es el nombre genérico que se otorga a una familia de enzimas con actividad peroxidasa y cuyo principal papel biológico es proteger a la célula del daño oxidativo mediante la reducción de los hidroperóxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes y del peróxido de hidrógeno presente en la célula a agua. Están presentes en todos los reinos y en los últimos años están empezando a estudiarse con gran interés en plantas (Passaia y Margis-Pinheiro 2015).

La mayoría de las GPX de las células animales son enzimas bien conocidas que contienen selenio. Debido a la alta reactividad del sitio activo Se-Cys, las enzimas de esta familia están entre los sistemas antioxidantes más eficientes en células animales (Maiorino *et al.* 1990, Navrot 2006). Sin embargo, en plantas superiores, las proteínas identificadas hasta el momento como GPX, poseen un resto Cys en lugar de una Se-Cys en su sitio activo (Koua *et al.* 2009, Ozyigit *et al.* 2016). La Cys es menos reactiva en comparación con la Se-Cys, y es por este motivo que las GPX vegetales son mucho menos activas y eficientes que sus homólogas animales. Además, Avery *et al.* (2004) ya encontraron diferencias significativas en cuanto a la secuencia aminoacídica entre las GPX de levaduras y mamíferos, lo que plantea la posibilidad de que existan algunas diferencias bioquímicas también entre las GPX vegetales y las animales. Las GPX vegetales y de hongos presentan homología con las GPX de tipo 4 de los animales (Bela *et al.* 2015, Passaia y Margis-Pinheiro 2015) sugiriendo un origen evolutivo común, sin embargo, a diferencia de las GPX4 animales, las GPX de plantas no poseen, como ya se ha dicho selenio en su sitio activo, sino que en su lugar poseen una triada catalítica (Figura 13.A) compuesta por cisteína, glutamina y triptófano (Toppo *et al.* 2008, Passaia y Margis-Pinheiro 2015). Todas estas evidencias señalan que las GPX de plantas y levaduras podrían desempeñar una función diferente a la de sus homólogas animales, parte de una ruta alternativa de detoxificación de peróxidos en la célula, especialmente hidroperóxidos de fosfolípidos (Navrot 2006).

Por otro lado, se han encontrado diferencias en cuanto a la regulación de las GPX vegetales en respuesta al estrés, lo que nos indica que estas enzimas pueden entonces tener diferentes funciones en las células vegetales, con una o más isoformas que funcionan en una vía de transducción de señal, mientras que otras isoformas sirven como enzimas implicadas en la catalización de modificación de agentes químicos potencialmente nocivos relacionados con el estrés (Navrot 2006). Se han identificado 8 genes de GPXs diferentes en *A. thaliana* (Milla *et al.* 2003, Koua *et al.* 2009, Ozyigit *et al.* 2016). Los análisis *in silico* predijeron la localización de la GPX vegetal encloroplastos, mitocondrias, citosol y retículo endoplasmático (Rouhier y Jacquot,

2005) y demostraron una alta similitud entre sus secuencias, manteniendo las cisteínas del sitio activo y otros motivos altamente conservadas (Dietz 2011). Estudios de localización subcelular mediante microscopía confocal en *A. thaliana* (Attacha *et al.* 2017) situaron a GPX1 y GPX7 en plastidios, mientras que GPX2 y GPX8 se observaron en los núcleos y el citosol; GPX3, GPX4 y GPX5 en las membranas celulares; y por último GPX6 en las mitocondrias. Aunque en *Arabidopsis* (y algunas otras plantas modelo) sólo se han encontrado 8 GPXs, estudios recientes (Chen *et al.* 2017, Zhou *et al.* 2018) han identificado 13 genes que codifican GPXs a partir del genoma de *Gossypium hirsutum* (algodón), en los que se observó un patrón de secuencia conservado en comparación con otras secuencias de GPX en plantas. Esto nos da una idea del alto polimorfismo que estas proteínas pueden tener en la planta.

Todas las GPX de plantas caracterizadas hasta ahora están en forma monomérica (Navrot 2006, Bela *et al.* 2015), excepto la GPX5, que muestra un patrón de dimerización único (Figura 13.B), debido principalmente a enlaces de tipo hidrofóbico, y es capaz de interactuar con iones  $Cd^{2+}$  (Koh *et al.*, 2007).



**Figura 13.** A) Estructura monomérica de la GPX8 en plantas. Detalle de la triada catalítica. B) Estructura dimérica de la GPX5 de plantas.

El mecanismo catalítico de la GPX se divide en 3 etapas: en un primer paso, la cisteína del sitio catalítico se oxida en presencia de  $H_2O_2$  (o por un hidroperóxido orgánico). En la segunda etapa, la cisteína oxidada reacciona con una segunda cisteína en la misma proteína formando un enlace disulfuro. El puente disulfuro intramolecular resultante se reducirá, en un tercer paso, mediante la acción de la tiorredoxina (TRX), por quien la enzima GPX posee una mayor afinidad en la mayoría de las células vegetales, otra diferencia con las GPX animales que usan GHS como donador de electrones en lugar de TRX (Herbette *et al.* 2002, Jung *et al.* 2002, Navrot 2006, Passaia y Margis-Pinheiro 2015, Attacha *et al.* 2017). Es por eso que a las GPX vegetales se las conoce como Hidroperóxido Fosfolípido GPX, Peroxidasas TRX o Enzimas Tipo GPX (Bela *et*

*al.* 2015, Attacha *et al.* 2017), aunque en esta tesis seguiremos usando la nomenclatura GPX, para evitar confusiones.

Los distintos estudios revelan que las GPXs vegetales están involucradas en la función detoxificante de la célula frente a la sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y que los niveles de esta enzima aumentan siempre bajo condiciones de estrés biótico o abiótico (Ozyigit *et al.* 2016). La regulación de los niveles de ROS en las plantas, sin embargo, es atribuida más a otros enzimas como las catalasas y enzimas del ciclo ascorbato-glutación. Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo, las ascorbato peroxidasas se encuentran inhibidas, por lo que las GPXs pasan a ser los principales enzimas de eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula. Además, las GPXs también son importantes detoxificadores de los hidroperóxidos orgánicos tóxicos originados en la célula mediante peroxidación lipídica, inducida por una situación mantenida de alto estrés. En condiciones de estrés severo, cuando el resto de mecanismos antioxidantes se agota, es lógico que se activen otras respuestas más eficaces mediante GPX y GST. Estas GPXs vegetales tienen por tanto propiedades adicionales que los hacen fuertes candidatos a asumir la función de los sensores durante el estrés oxidativo. Los cambios en el estado redox del apoplasto podrían ser detectados por un sistema que implique intercambios ditioldisulfuro (como es el caso de las GPXs).

### 2.7.2. GST en plantas: Estructura, función y regulación.

Las glutatión *S*-transferasas (GSTs) son enzimas detoxificantes dependientes de GSH que constituyen aproximadamente el 2% de las proteínas solubles en las hojas de las plantas. Pertenecen a una enorme y ancestral familia de proteínas muy divergente (Figura 15) (Rezaei *et al.* 2013, Xu *et al.* 2015). Diferentes análisis genéticos y genómicos han identificado más de 25 genes codificantes para GSTs cuyas proteínas comparten poco más del 10% de identidad de secuencia aminoacídica (Edwards *et al.* 2000). En *Arabidopsis thaliana* por ejemplo, se han identificado 55 genes de GST (Csiszár *et al.* 2014).

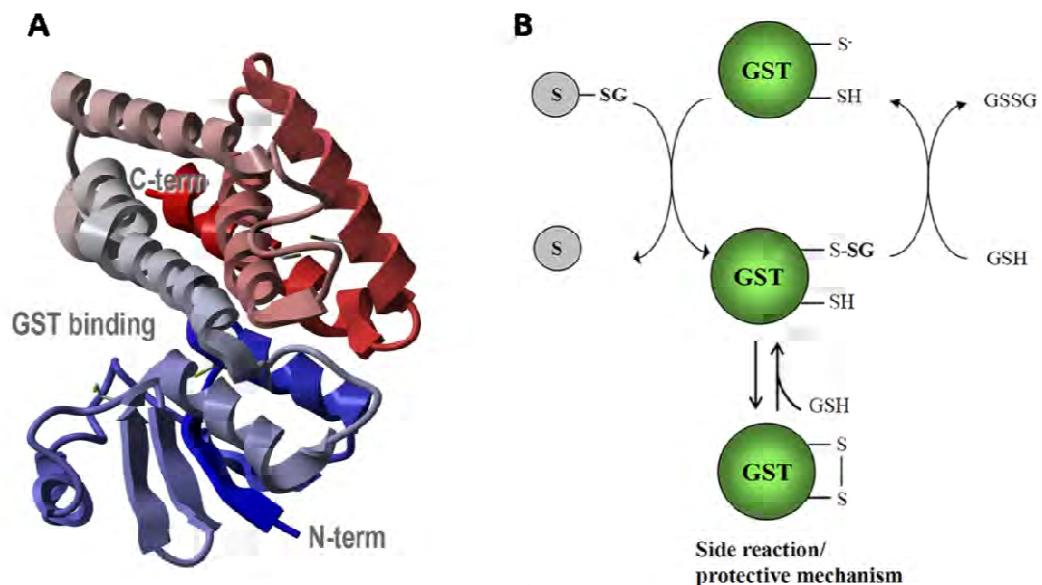
Las GSTs desintoxican a las plantas de diferentes xenobióticos, catalizando la conjugación de éstos con GSH (Cummins *et al.* 2011, Xu *et al.* 2015). Las GSTs están compuestas por dos subunidades de masa molecular 25-27 KDa y pueden ser homodímeros de un solo producto génico o heterodímeros de subunidades codificadas por distintos genes (Figura 14.A). Esta gran diversidad ha presentado históricamente problemas tanto en la clasificación como en la nomenclatura de este grupo de proteínas.

Algunas de las principales funciones de las GST en las plantas son:

1. Catalizan las reacciones de conjugación con xenobióticos (Figura 7).

2. Funcionan como proteínas de unión de diversos fitoquímicos y los transportan entre los distintos compartimentos celulares.
3. Catalizan reacciones alternativas de biotransformación dependiente de GSH.

Cualquiera que sea su sustrato, las GSTs deben unirse a GSH o a cualquier otro homólogo natural (como por ejemplo el homoglutatión de las leguminosas) para llevar a cabo su actividad catalítica. Las GSTs muestran una alta similitud de secuencia en su dominio de unión al GSH, que está constituido por cuatro aminoácidos altamente conservados. Cada subunidad del dímero (ya sea homodímero o heterodímero) posee un sitio activo que incluye el dominio conservado de unión a GSH (sitio G) localizado en el dominio N-terminal, y otro dominio de unión al cosustrato (sitio H) localizado en el dominio C-terminal, que acomodará una amplia gama de compuestos hidrófobos. El sitio G es específico para GSH y facilita la formación del anión tiolato catalíticamente activo de GSH. Está situado a ambos lados de una gran hendidura abierta que se forma entre las dos subunidades, lo que permite el acceso a grandes moléculas planares y esféricas (Reinemer *et al.* 1996, Neufeind *et al.* 1997a, b, Edwards *et al.* 2000).



**Figura 1.14. A) Estructura 3D** de la enzima GST, mostrando los 2 dominios (G en azul y H en rojo) y la hendidura donde se aloja el GSH. **B) Mecanismo de acción** de la GST. (Lallement *et al.* 2014).

Los esquemas de clasificación actuales utilizan una nomenclatura en función de la similitud de su secuencia aminoacídica, ya que aún no se conocen con exactitud las funciones de todas las GSTs diferentes. En mamíferos, mediante un sistema de clasificación por secuencia y de reactividad inmunológica cruzada, se han dividido a las GST en las clases alfa, mu, pi, sigma, teta y zeta (Edwards *et al.* 2000). Inicialmente

se reconocieron tres tipos distintos de GST, el tipo I (Phi, F) incluye a las GST con actividad desintoxicante de herbicidas, las GST de tipo II (Zeta, Z) están cerca de las GST-clase Z de mamíferos, y por último, el otro grupo grande, tipo III (Tau, U), consiste principalmente en GSTs inducidas por auxina. Los tipos I y III muestran una divergencia de secuencia superior al 50% y ahora se han colocado en clases separadas. Posteriormente se propuso un grupo de tipo IV (Theta, T) para varios genes de *Arabidopsis* que son similares a las enzimas teta clásicas de mamíferos (Edwards *et al.* 2000).

Los cuatro tipos de GSTs anteriores son los más conocidos porque se descubrieron primero, pero hasta la fecha se han indicado ocho clases diferentes de GSTs en plantas (Figura 15, Rezaei *et al.* 2013): phi, tau, theta, zeta, lambda, deshidroascorbato reductasas dependientes de glutatión, tetraclorohidroquinona deshidrogenasa (TCHQD) y proteínas asociadas a la membrana en el metabolismo eicosanoide y de glutatión (MAPEG) (Csiszár *et al.* 2014, Xu *et al.* 2015). Las cuatro primeras clases de GST son específicas de plantas, en especial las de tipo U y tipo F (Edwards *et al.* 2000, Edwards y Dixon 2005, Rezaei *et al.* 2013, Xu *et al.* 2015) que son también las clases más abundantes y, además, se encuentran muy específicamente en organismos fotosintéticos simples, por lo que podrían ser necesarias para enmendar las consecuencias metabólicas del oxígeno activo generado por la fotosíntesis. Estas dos clases específicas de plantas son además a menudo inducibles por estrés.

Las GSTs de las plantas han sido el centro de atención en los últimos años debido a su papel en la desintoxicación de herbicidas. El estudio en diferentes tipos de tejidos vegetales revela la presencia de estas enzimas en todas las etapas del desarrollo de la planta, desde la embriogénesis temprana hasta la senescencia (Soranzo *et al.* 2004, Rezaei *et al.* 2013). La actividad enzimática de las GST está regulada de forma diferencial por diversos factores inductivos (Rezaei *et al.* 2013), como factores bioquímicos y abióticos, las hormonas vegetales como las auxinas, el etileno, las citoquininas y el ABA, los metales pesados, el GSH y la peroxidasa de hidrógeno. Las GST de las plantas también están implicadas en el metabolismo endógeno, actuando como isomerasas dependientes de GSH y también de forma no catalítica como proteínas de unión a flavonoides, proteínas de señalización de estrés y reguladores de apoptosis (Dixon *et al.* 2002). Algunas de las isoformas de GST actúan como glutatión peroxidasas (GPOX) protegiendo la integridad de la membrana al reducir los productos tóxicos de la peroxidación lipídica (Cummins *et al.* 2011, Rezaei *et al.* 2013). No sólo reducen los peróxidos lipídicos directamente, sino que también pueden actuar para eliminar la peroxidación lipídica de productos finales tales como alquenes, 4-hidroxinonal, ácido etacrínico (EA) y otros aldehídos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados (Dalton *et al.* 2009).

Sin embargo, la alta variabilidad de esta familia de enzimas, en cuanto a secuencia, estructura y función, dificulta su estudio, y es por ello que se requiere más investigación en este campo.



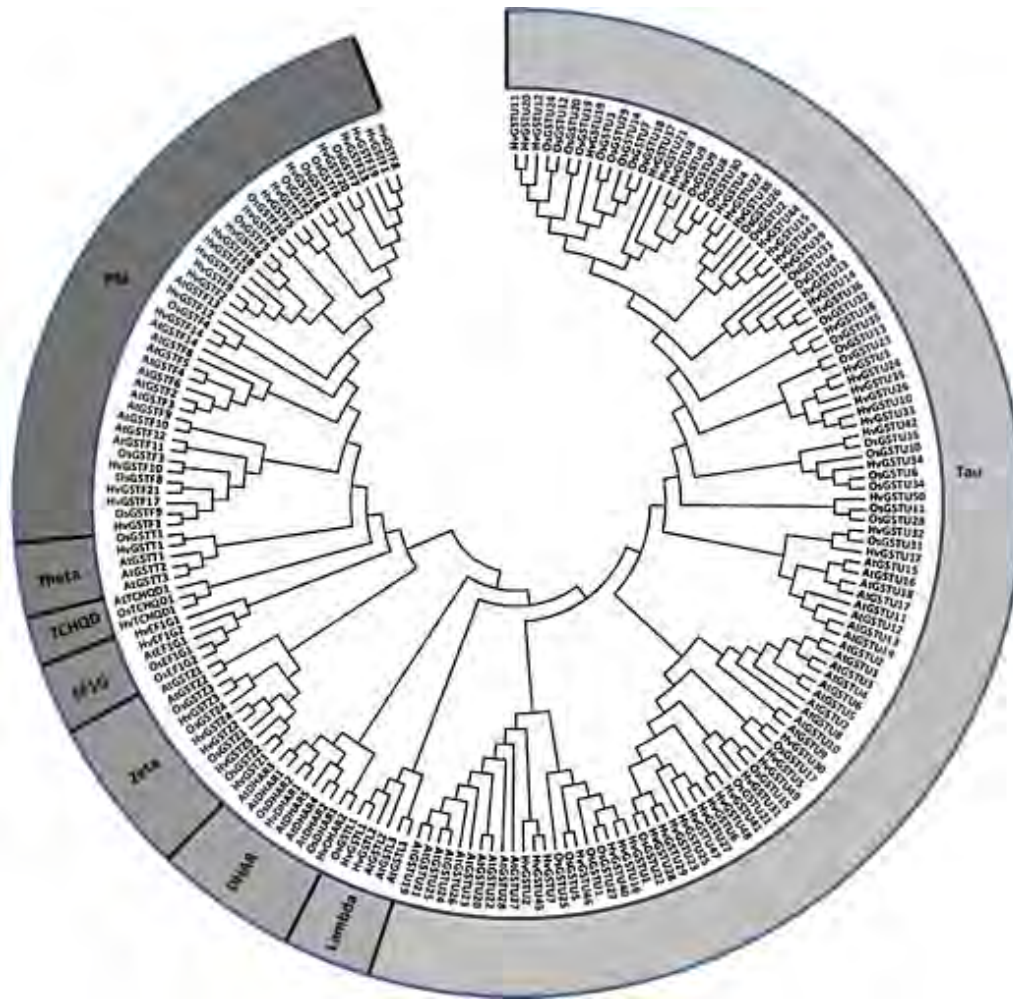


Figura 15. Árbol filogenético y clasificación de proteínas GST de cebada, arroz y Arabidopsis (Rezaei *et al.* 2013). Se muestra la enorme diversidad de GST que existen en el reino vegetal.

### 3. La reproducción sexual en las Angiospermas.

La reproducción sexual es el proceso de generación de un nuevo organismo a partir de la combinación del material genético de dos organismos diferentes. Durante la meiosis propia de la reproducción sexual, se produce la recombinación del material genético de ambos progenitores, lo que le otorga una ventaja biológica frente a la reproducción asexual.

La reproducción sexual en Angiospermas tiene lugar en las estructuras denominadas flores (figura 16), que presentan un órgano reproductor masculino (uno o varios estambres) y un órgano reproductor femenino (un pistilo formado por un carpelo (pistilo simple o monocarpelar) o varios carpelos fusionados (pistilo compuesto o pluricarpelar)). La reproducción sexual de estas plantas comprende dos eventos principales:

- 1) La meiosis, en donde se forman los gametos haploides.

- 2) La fertilización y la fusión de los gametos femenino y masculino, que darán como resultado la formación del cigoto diploide.

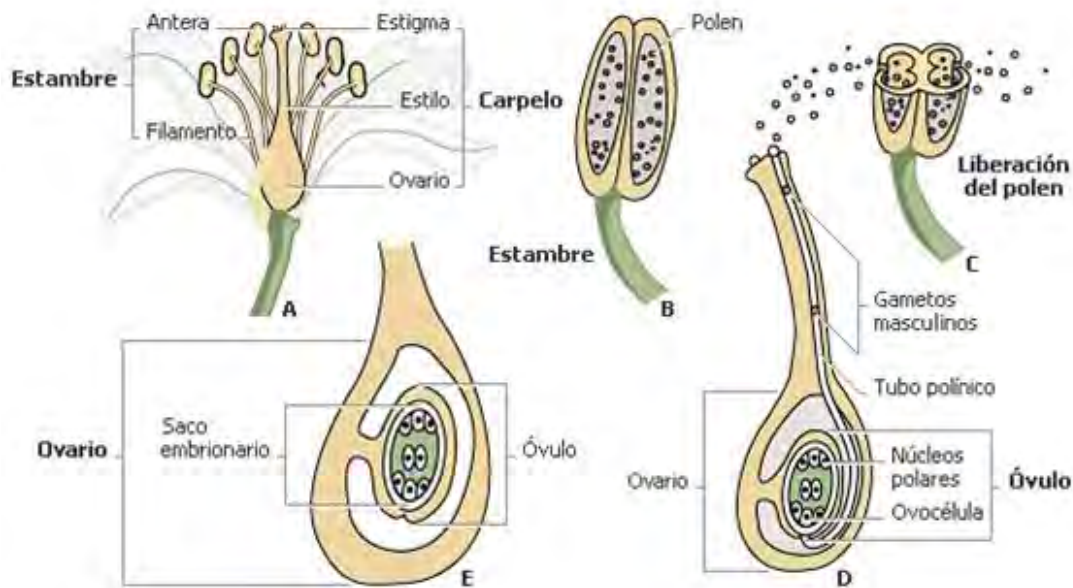
La microsporogénesis (ontogenia del grano de polen) tiene lugar en el interior del lóculo de la antera, en la cual, mediante la meiosis de la célula madre del polen (CMP) (diploide), se generan cuatro microsporas (haploides) agrupadas en tétradas (Figura 17). Después de una larga interfase y tras la vacuolización del citoplasma (maduración), la microspora se libera de la tétrada con la ayuda de la enzima calasa y sufre una división mitótica asimétrica. Se producen entonces las células generativa y vegetativa que serán diferentes en cuanto al tamaño, el contenido genético y su función. La célula vegetativa tiene como función nutrir a la célula generativa, y será la encargada también de desencadenar la cascada metabólica que genera y elonga el tubo polínico (Higashiyama *et al.* 2001, McCormick *et al.* 2004). El grano de polen maduro puede estar constituido por 2 o 3 células (polen bicelular y tritelular, respectivamente), según la especie vegetal. En las especies con polen tritelular, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*, la célula generativa se divide mediante mitosis en el interior de la célula vegetativa, originando los dos núcleos gaméticos o espermáticos. En las especies con polen bicelular, como es el caso del olivo, la división mitótica de la célula generativa tiene lugar en el citoplasma del tubo polínico, una vez iniciada la germinación del polen (Figura 17). Los núcleos espermáticos son los encargados de llevar a cabo la fertilización (Higashiyama *et al.* 2001, McCormick *et al.* 2004).

El pistilo o gineceo es el órgano reproductor femenino de la flor y presenta una morfología muy variada según las especies. En general suele tener forma de botella, con un ensanchamiento en la base, de forma más o menos ovoide, que corresponde al ovario. El ovario se prolonga con una estructura tubular en forma de cuello de botella conocida como estilo, que termina en una región más o menos engrosada denominada estigma (Figura 16).

El estigma es muy variable dependiendo de la especie. Consta de un tejido parenquimático basal interno, rodeado por un tejido secretor que suele terminar en unas extensiones a modo de papilas. Existen dos tipos básicos de estigmas, húmedo y seco. Los estigmas de tipo húmedo (por ejemplo *Lilium*) presentan papilas uni o multicelulares que secretan un exudado rico en proteínas, lípidos y polisacáridos (Heslop-Harrison y Shivanna 1977). Los estigmas de tipo seco, como el de *Arabidopsis* y el de olivo, no producen exudado y están recubiertos por una cutícula cerosa impermeable y una delgada película de naturaleza proteica (Hiscock y Allen 2008).

El estilo es una estructura tubular, de dimensiones variables según la especie, que conecta el estigma con el ovario. Consta de epidermis, parénquima (en el que se encuentran los vasos conductores) y una zona central que puede estar ocupada o no por el tejido transmisor (estilos sólidos y huecos, respectivamente) de naturaleza secretora.

El ovario es la parte inferior del pistilo con forma ovoide, en su interior existen una o varias cavidades (lóculos) donde se encuentran los óvulos.



**Figura 16.** Reproducción sexual en Angiospermas. Estructura de la flor y el gineceo.

La macroesporogénesis (desarrollo del saco embrionario) puede producirse en su totalidad al inicio de la polinización, siendo entonces receptivo al inicio de este proceso, o bien el saco embrionario puede completar su desarrollo durante dicho proceso.

Durante la reproducción sexual en Angiospermas, el polen es transportado desde la antera hasta el pistilo (superficie del estigma) en un proceso denominado polinización, que puede ser de dos tipos: anemófila (mediante aire) o entomófila (mediante insectos). Tras adherirse el grano de polen sobre la superficie del estigma receptivo comienza la fase progámica (Figura 18), durante la cual, el grano de polen se hidrata, activa su metabolismo y germina, emergiendo el tubo polínico a través de una de las aperturas de la pared del grano de polen (Feijó 2010).

El tubo polínico va elongándose, por su región apical, a través de los tejidos del pistilo (estilo) hacia el ovario, con una excepcional tasa de crecimiento. A través del micropilo, el tubo polínico penetra en el saco embrionario donde libera los dos núcleos espermáticos, participando de esta manera en la doble fertilización, característica estas plantas. En esta doble fertilización uno de los núcleos espermáticos se fusiona con la ovocélula para dar lugar al embrión, mientras que el otro núcleo espermático se fusiona con los dos núcleos polares dando lugar al endospermo triploide. Todos estos acontecimientos están controlados genéticamente de una forma muy específica (González *et al.* 1995, Sanzol y Herrero 2001, Sanzol *et al.* 2003).

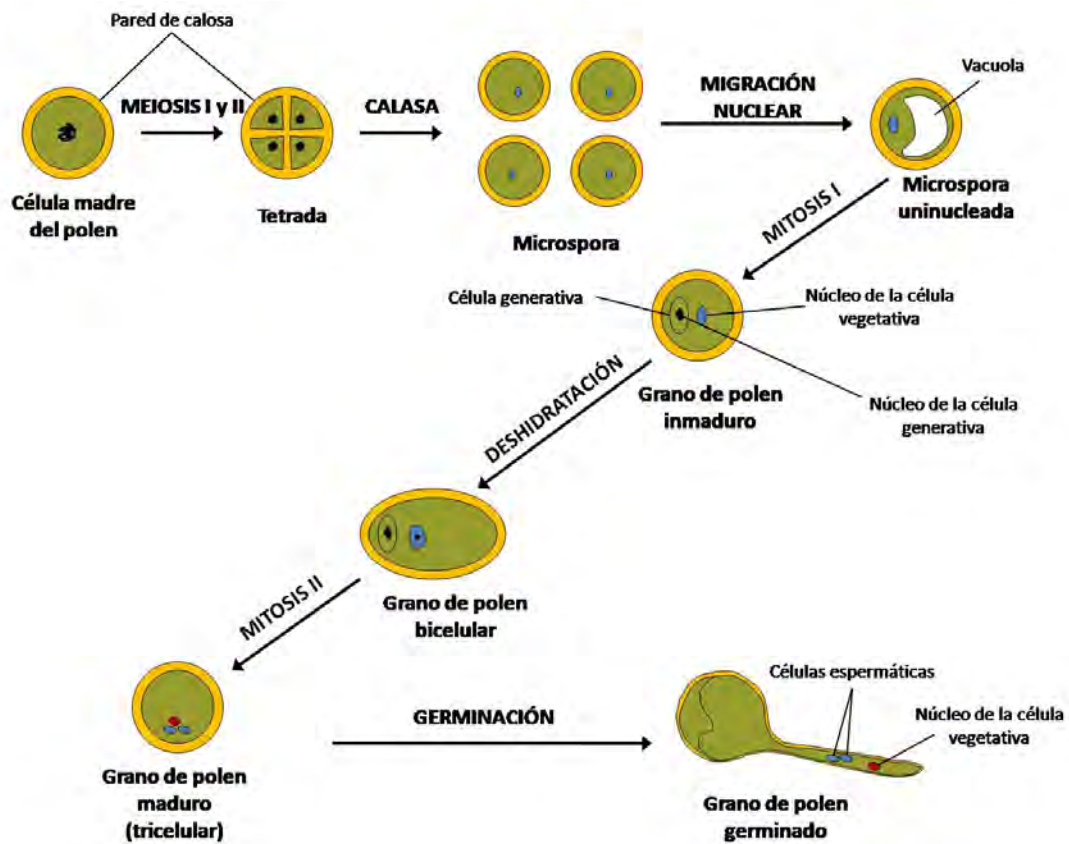


Figura 17. Microsporogénesis: Formación y desarrollo del grano de polen (esquema adaptado de McCormick 2004).

#### 4. El GSH en la reproducción sexual de Angiospermas.

Las ROS desempeñan importantes misiones en numerosos sucesos de la fisiología vegetal, entre los cuales, se incluyen por supuesto los procesos reproductivos. A diferencia de los tejidos somáticos donde las funciones de las ROS han sido ampliamente documentadas, en los tejidos reproductivos el conocimiento es aún limitado y es ahora cuando están empezando a ser caracterizadas.

El proceso de fertilización requiere un intercambio continuo de señales físicas y químicas entre los participantes (el polen, el estigma, óvulos...) que ha de tener lugar en un marco de tiempo concreto, ya que de lo contrario, podría no completarse la fertilización dando como resultado la limitación o ausencia de semillas (González *et al.* 1995, Sanzol y Herrero 2001, Sanzol *et al.* 2003). Con el fin de lograr este objetivo, los tubos polínicos han desarrollado un metabolismo extremadamente activo, con altos requerimientos de energía lo que conlleva a la generación de grandes cantidades de ROS, como consecuencia inevitable del metabolismo aeróbico. Las ROS intervienen en la señalización celular implicada en los procesos reproductores de las plantas, tales

como la germinación y el crecimiento del tubo polínico o la interacción polen-estigma. Además, durante el desarrollo floral, tanto en la microsporogénesis como en la macrosporogénesis, se producen grandes cantidades de ROS, en algunos casos, debido a la muerte celular programada que ocurre de forma natural en la determinación sexual de flores, la degeneración del tapetum, la dehiscencia de las anteras... Por último, también se ha evidenciado la implicación de las ROS en la senescencia floral. La presencia de ROS en las células en crecimiento apical es necesaria para el funcionamiento celular, esto se ha comprobado tras observar que antioxidantes tales como el ascorbato y el GSH inhiben el crecimiento del tubo polínico en el tabaco (Speranza *et al.* 2012).

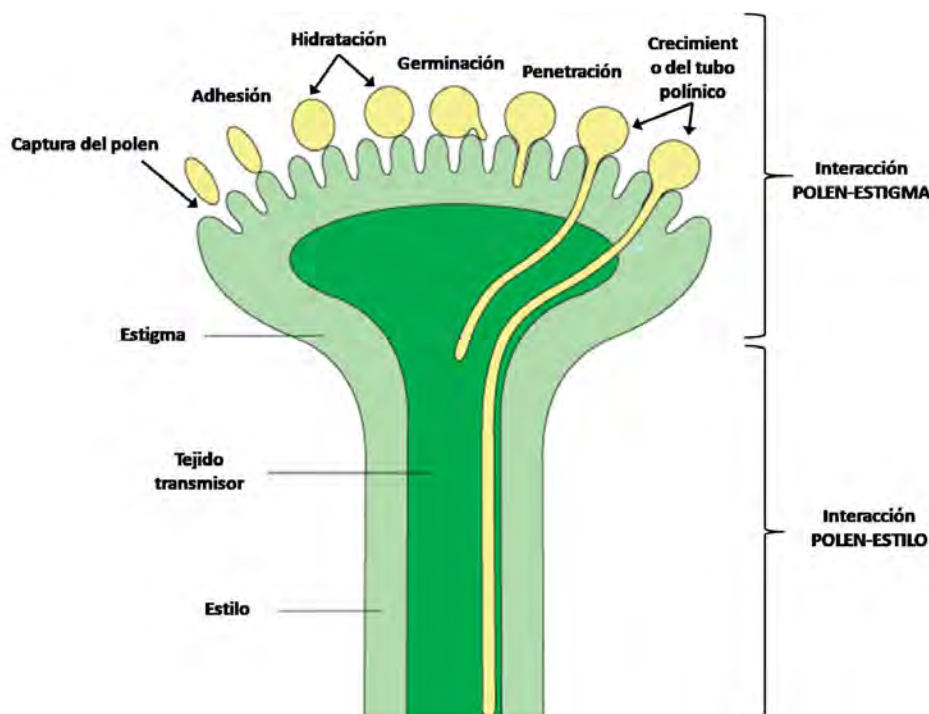


Figura 18. Etapas de la fase progámica en Angiospermas.

Durante el desarrollo y la maduración del fruto, los contenidos de GSH celulares disminuyen. Sin embargo, el potencial redox del pool de glutatión celular, permanece inalterado, manteniéndose unas condiciones reductoras en la célula tanto en frutos inmaduros, como maduros y postcosecha (Matamoros *et al.* 2010). Esto nos da una idea del papel tan importante que ejercen las especies antioxidantes, como el GSH, manteniendo la homeostasis redox celular en los tejidos reproductivos de plantas. Estudios anteriores ya establecieron que el estado redox de los tioles de bajo peso molecular como el GSH y los grupos tiol de distintas proteínas sufren cambios durante el desarrollo de la semilla y la germinación de la misma (Buchanan y Balmer 2005, Colville y Kranner 2010). Durante el secado, en el proceso de maduración de la semilla,

estos tioles se oxidan gradualmente a disulfuros (S-S), y tras la germinación, los disulfuros se reducen de nuevo a tioles. Como consecuencia, las semillas secas contienen considerablemente más disulfuros que los tejidos hidratados (Colville y Kranner 2010). También ha sido sugerida la implicación del GSH en la amortiguación de la latencia (Fontaine *et al.* 1995). Todos estos estudios establecen una relación entre el estado redox del GSH y la germinación de las semillas (Bahin *et al.* 2011).

Existen también estudios que relacionan los niveles de GSH celulares con la floración (Owaga e Iwabuchi 2001). Durante el desarrollo floral, también se ha observado un incremento en el potencial redox (la ratio GSH/GSSG) en las células de los pétalos, que disminuye después durante la senescencia de éstos (Rogers 2012). Tanto el glutatión reducido como las tiorredoxinas reducidas son requeridos tanto para el desarrollo de raíces como el de flores (Schippers *et al.* 2016). Estudios realizados en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la síntesis de GSH revelan que, estas plantas mutantes son capaces de crecer de forma similar al fenotipo silvestre a lo largo del desarrollo vegetativo, sin embargo son incapaces de sostener un desarrollo floral normal (Bashandy *et al.* 2010, Schippers *et al.* 2016).

En cuanto al polen, aunque ha sido poco estudiado, existen trabajos que manifiestan el papel del GSH frente a la acumulación de ROS durante el desarrollo de la antera (Wan *et al.* 2007). Zechmann *et al.* (2011a) demostraron, mediante experimentos realizados en mutantes deficientes en la síntesis de GSH así como experimentos depletorios de GSH en fenotipos silvestres, que el GSH es necesario para que se lleve a cabo la germinación y el crecimiento del tubo polínico. El GSH además se encuentra claramente presente y activo en el gametofito masculino, y su contenido en el polen depende claramente de su disponibilidad en la planta y en la antera, durante su desarrollo (Zechmann *et al.* 2011a, 2011b). Ciertos mutantes de *Arabidopsis*, deficientes en GSH y TRX, se caracterizan por su esterilidad polínica, lo cual demuestra que se requiere de la presencia de estos tioles en el desarrollo del polen (Marty *et al.* 2009, Schippers *et al.* 2016). Estudios recientes mostraron que se necesitan unas condiciones reducidas para la formación de las células germinales (Marty *et al.* 2009, Kelliher y Walbot 2012, Schippers *et al.* 2016).

## 5. El olivo como especie de estudio.

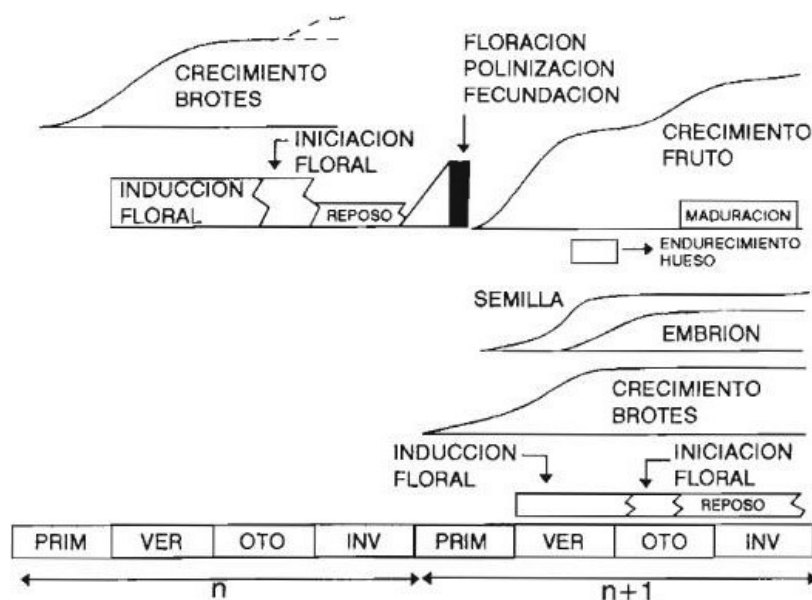
El olivo (*Olea europaea*) es una especie de gran interés agronómico en España, que es el primer país productor de aceite de oliva y aceituna de mesa del mundo. Es la segunda especie arbórea, en términos de producción, cultivada en España después de los cítricos. Concretamente en Andalucía, la superficie dedicada al olivar supera el 30% del total de producción europea y más del 75% de la producción nacional, siendo la principal comunidad productora de aceite de oliva y aceitunas de mesa. Jaén y Córdoba son las

principales comarcas olivareras, concentrando más del 60% de la superficie olivarera de Andalucía.

Existen referencias históricas que señalan al olivo como una de las plantas cultivadas más antiguas (hacia los años 4000-3000 a.C.) y cuyo origen se localiza en Persia, Egipto (en el valle del Nilo) y Jordania (en el valle del Jordán); aunque existen datos que contrastan con dicho origen y lo sitúan en la antigua Mesopotamia, e incluso en Italia, donde se han descubierto restos fósiles de más de un millón de años de antigüedad (Kapellakis *et al.* 2007).

Aunque los principales países productores son mediterráneos, también se han empezado a cultivar olivares en zonas de Asia Central, en Australia y en California entre otros (Barranco *et al.* 2017).

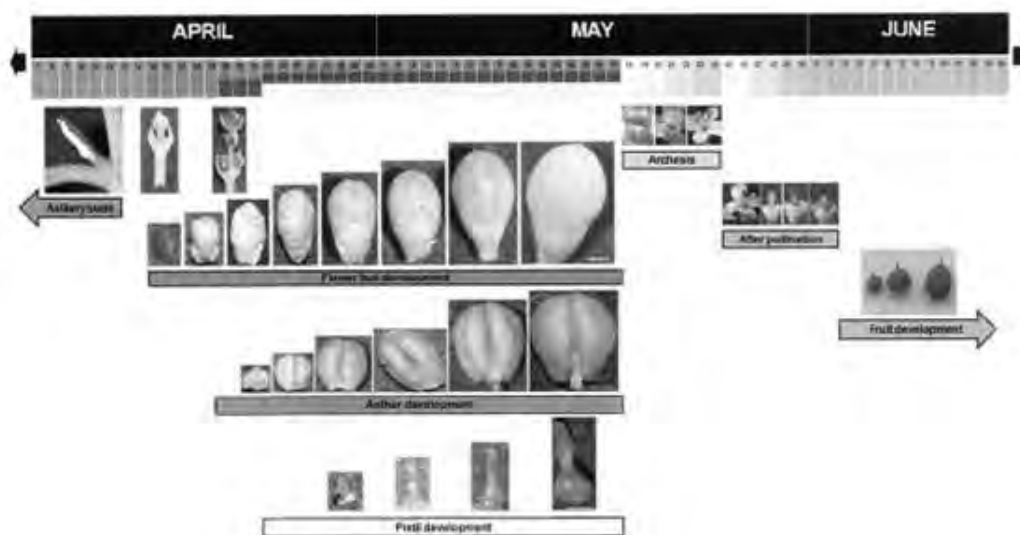
El olivo pertenece a la familia de las Oleáceas, que incluye 29 géneros y 35 especies, y es la única especie que posee un fruto comestible dentro de la familia. En España existen 272 variedades de olivo, que se clasifican en varias categorías en función de su importancia y de la extensión de cultivo que ocupan. Las categorías “principal” (que cuenta con 24 variedades) y “secundaria” (que agrupa a 50 variedades), forman la categoría de “variedad difundida”. Las 174 variedades restantes se incluyen en la categoría “local” (Rallo *et al.* 2005). Picual, con 857.746 ha (58,2% del olivar), representa la variedad más cultivada en Andalucía; seguida de Hojiblanca con 237.199 ha (18,2%) y Manzanilla de Sevilla con 73.766 ha (5%).



**Figura 19.** Ciclo reproductivo bienal del olivo (Rallo y Cuevas 2001).

Es un árbol polimórfico de crecimiento lento, con una fase juvenil y una fase adulta. Alcanza su madurez reproductiva en la fase adulta, a los 5-8 años, y un pleno desarrollo a los 20 años. Presenta un ciclo bienal de fructificación, en el que se solapan el crecimiento vegetativo y reproductor (Figura 19). El crecimiento vegetativo se produce en primavera, donde aparecen los brotes terminales y axilares que originarán las ramas leñosas del año siguiente, y en menor medida en otoño.

El crecimiento reproductor se completa en dos años consecutivos. El primer año se producen las yemas y la inducción floral de las mismas. Tras una etapa de latencia, en el segundo año se completa la floración, fecundación y desarrollo de los frutos (Rallo y Cuevas 2001). La floración y la reproducción transcurren en un periodo de tiempo de entre 5 y 6 semanas, según las condiciones climatológicas (Rodríguez-García *et al.* 2012). El periodo más largo es el que corresponde al desarrollo floral, el cual dura aproximadamente un mes, y que culmina con la formación de los órganos reproductores. El inicio del desarrollo de las anteras es anterior al desarrollo del pistilo, el cual comienza una vez completada la meiosis de las CMP. La polinización se inicia tras la antesis o apertura de la flor, y dura entre 5 y 7 días. Tras la fecundación se produce la caída de los pétalos, degeneración del estigma y el estilo, y el engrosamiento del ovario.



**Figura 20.** Cronograma del ciclo reproductivo del olivo (Rodríguez-García *et al.* 2012).

La mayoría de las investigaciones sobre ROS y GSH en biología reproductiva, se han llevado a cabo en especies modelo como *Lilium* y *Arabidopsis*, por lo que se necesitarían más estudios para determinar si la presencia de estas moléculas en el desarrollo de los tejidos reproductivos es una característica general de todas las



Angiospermas. El olivo es una especie adecuada para los estudios propuestos, ya que es una dicotiledónea en contraste con las especies modelo en las que se han llevado a cabo la mayoría de los estudios hasta la fecha. Además, el polen de olivo muestra una serie de características diferenciales cuando se compara con otros pólenes, como la ausencia de grandes cantidades de almidón, que se sustituyen en el polen de olivo por proteínas y lípidos. Por lo tanto, es predecible la existencia de un metabolismo basal diferente en comparación con el de otros pólenes respecto a la activación y la hidratación del polen y el crecimiento del tubo polínico. Además, nuestro grupo de investigación ya ha evidenciado la presencia de ROS durante el desarrollo floral del olivo (Traverso *et al.* 2013, Potocký *et al.* 2012, Zafra *et al.* 2010, 2016, Jiménez-Quesada *et al.* 2016, 2017) que facilitará el buen fin de este proyecto.

# **O**BJETIVOS



## OBJETIVOS

Los estudios sobre la reproducción sexual son claves desde un punto de vista agronómico para las especies con fruto cultivadas. El olivo es un cultivo de gran impacto económico debido a la importancia de su fruto para la obtención de aceite de oliva o aceituna de mesa. Es por ello que el estudio de los procesos que garantizan el éxito de la fertilización es de gran interés.

La información actual que tenemos del metabolismo del oxígeno y de las ROS, así como de la señalización redox en los sistemas reproductivos vegetales es aún fragmentaria, a pesar de la gran importancia de estos procesos fisiológicos que conducen a la formación de semillas y frutos, y generan la variación genética necesaria para la evolución.

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es en el papel fisiológico del glutatión y de las enzimas de su metabolismo en las diferentes etapas del proceso reproductivo en esta planta. La finalidad última de la propuesta es la generación de modelos funcionales que determinen las relaciones básicas entre los diferentes agentes implicados en el metabolismo y la señalización mediada por glutatión durante la microsporogénesis, la emergencia, el crecimiento y la orientación del tubo polínico, la receptividad estigmática y la interacción polen-pistilo.

En este contexto, los objetivos específicos de este trabajo de tesis doctoral son los siguientes:

1. Determinar los componentes principales de la red génica que controla el metabolismo del glutatión en los tejidos reproductivos del olivo, centrándose especialmente en los que puedan diferir de su contraparte somática.
2. Obtener y caracterizar secuencias completas de los genes que muestran potencial interés en biología de la reproducción, el análisis de su variabilidad molecular y la presencia de isoformas.
3. Determinar la localización y la concentración de glutatión (así como las variaciones de potencial redox) durante el desarrollo del polen, la germinación del tubo polínico y la interacción polen-estigma en los diferentes tejidos reproductivos. Optimizar los métodos bioquímicos para el análisis de glutatión y de las actividades de las enzimas de su metabolismo correspondientes para análisis adicionales.
4. Determinar con precisión los tejidos y el tiempo en los que se produce la expresión génica y proteínica de los genes candidatos durante el desarrollo de la antera y del gineceo, en la interacción polen-pistilo, en la emergencia del tubo polínico, en su formación y crecimiento.
5. Complementar el estudio mediante análisis con organismos modelo para obtener una comparativa de los resultados en olivo.

## OBJETIVOS

6. Generar modelos de participación de los diferentes elementos claves en el control del metabolismo del glutatión y las interacciones en los diferentes escenarios reproductivos, en particular los que se describen en el objetivo 4.

# **M**ATERIALES Y **M**ÉTODOS



### 1. Material vegetal.

#### 1.1. Polen maduro de olivo.

El polen maduro de olivo (*Olea europaea* L.) se recolectó a partir de anteras dehiscentes mediante la técnica del embolsado de las inflorescencias (Figura 21.A) en el caso de plantaciones plurivarietales o mediante aspiración directa de las inflorescencias tras la dehiscencia de las anteras (Figura 21.B) en el caso de plantaciones monovarietales. Las muestras se tomaron durante el mes de Mayo del periodo comprendido entre 2013 y 2016 a partir de árboles de las variedades 'Picual', 'Arbequina', y otras... pertenecientes a la colección de germoplasma de olivo del Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA) "Venta del Llano" (Mengíbar, Jaén, España).

En el método del embolsado de las inflorescencias tras la antesis, se retiraron las bolsas de papel y el polen depositado en las mismas fue aspirado. Las muestras de polen se filtraron a través de un tamiz de nylon de 50  $\mu\text{m}$  de poro con objeto de eliminar los restos florales y otras impurezas.

Para el método por aspiración directa se utilizó una aspiradora industrial (Stihl), a la cual se acopló un tubo flexible de 12 cm de diámetro y 3 m de longitud con un dispositivo de filtrado selectivo en su extremo libre, compuesto por 3 mallas de nylon Saatilene® Hitech® (SAATI) con poros de 150, 50 y 20  $\mu\text{m}$ , respectivamente.



Figura 21. Métodos de recolección del polen de olivo. A. Recolección mediante embolsado de las inflorescencias. B. Recolección mediante aspiración selectiva de las inflorescencias.

#### 1.2. Anteras de olivo.

La recolección de anteras de olivo se realizó a partir de flores frescas de la variedad 'Picual' en distintos estadios de desarrollo, de olivos cultivados en Güejar Sierra (Granada, España) y la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC, Granada, España). Las anteras fueron diseccionadas bajo una lupa binocular usando un escalpelo y unas pinzas de punta fina. Tras la disección, la antera es aplastada en orceína para definir el estadio concreto en el que se encuentran las flores.



Para los estudios bioquímicos, el material vegetal recolectado se utilizó inmediatamente, tal y como se describe a continuación en los métodos de laboratorio, o bien se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -80 °C hasta su posterior uso, con objeto de disponer de este material durante todo el año.

Para los estudios de microscopía, el material fue procesado fresco, tal y como se describe en el apartado 2.16 (Preparación de muestras para inmunocitoquímica).

### 1.3. Material vegetal de *Arabidopsis thaliana* y condiciones de crecimiento.

Se usó la accesión de *Arabidopsis* Columbia-0 (Col-0) de tipo silvestre como planta de control. Las semillas roGFP2 que utilizamos en estos estudios se obtuvieron originalmente de Andreas Meyer (Universidad de Bonn, Alemania), quien previamente clonó la línea roGFP2 en el vector binario pBinAR. Los mutantes *cad2-1* que expresan el ecotipo Columbia (Col-0) de roGFP2 (*cad2-1/roGFP2*; generación F2) fueron proporcionados por Till K. Pellny (Rothamsted Research, Reino Unido). La línea roGFP se cruzó con el mutante *cad2-1* para obtener la línea *cad2-1 / roGFP* en el laboratorio de Christine H. Foyer (Universidad de Leeds, Reino Unido). Las semillas de los mutantes *pad2* y *clt* también fueron cedidas por el laboratorio de Christine H. Foyer.

Las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas superficialmente como fue descrito anteriormente por Meyer y Fricker (2000) y luego se lavaron dos veces con agua estéril. Tras la estratificación (durante 2 días en oscuridad a 4 °C) las semillas de *Arabidopsis* se sembraron en placas con medio MS (2,2 g de medio base, 0,1 g de mioinositol, 0,5 g MES y 10 g de sacarosa en 1 l de agua destilada, pH 5.7. Tras ajustar el pH se añadieron 10 g de agar) y se cultivaron en cámaras de germinación (a 20 °C, día largo y una humedad relativa del 60 %) durante 7 días. Posteriormente se seleccionaron unas 30 semillas germinadas de cada genotipo y se transplantaron a suelo fértil en cámaras de crecimiento, con un fotoperíodo día/noche de 8/16 h, un intervalo de temperatura de 22 °C durante el día y de 18 °C durante la noche, y una humedad relativa del 60 %. Se suministró agua a las plantas de forma regular según fue necesario, manteniendo aproximadamente el 100 % de humedad relativa en el suelo. La intensidad de la luz fue de 120-150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Seis semanas después de la siembra, se recolectaron muestras en diferentes etapas de desarrollo de la flor (Alvarez-Buylla *et al.* 2010), desde un botón floral más joven y aún verde (etapas de floración 6-12) hasta estadios más avanzados de floración en las que la flor ya está abierta (etapa de floración 14), pasando por etapas intermedias en las que los pétalos comenzaron a aparecer entre los sépalos (etapa de floración 13).

La recolección de las muestras se realizó en las cámaras de crecimiento. Para los estudios bioquímicos, el material vegetal recolectado se utilizó inmediatamente, tal y como se describe a continuación en los métodos de laboratorio, o bien se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -80 °C hasta su posterior uso, con objeto de disponer de este material durante más tiempo.

Para los estudios de microscopía, el material fue procesado fresco, tal y como se describe en el apartado 2.16 (Preparación de muestras para inmunocitoquímica).

## 2. Métodos de laboratorio.

### 2.1. Germinación in vitro del polen y medidas de germinabilidad.

#### 2.1.1. Germinación in vitro del polen.

##### A. Polen de olivo:

La germinación *in vitro* del polen de olivo (cv. 'Picual') se llevó a cabo mediante el método descrito por M'rani-Alaoui (2000), el cual se describe a continuación:

1. Preparar el medio de germinación [ácido bórico y nitrato potásico al 0,01 % (p/v), sulfato magnésico al 0,02 % (p/v), nitrato cálcico al 0,03 % (p/v), sacarosa al 10 % (p/v) y PEG 8000 al 5 % (v/v)]. Ajustar el pH a 5,5-6,5 con HCl 1 M y NaOH 0,1 M.
2. Pesar 0,3 g de polen de olivo y extenderlo en una placa de Petri.
3. Colocar la placa Petri sobre papel de filtro humedecido con H<sub>2</sub>O en un recipiente cerrado para crear un ambiente saturado de humedad.
4. Prehidratar el polen mediante incubación en el recipiente con saturación de humedad a 30 °C y en oscuridad durante 1 h.
5. Transferir el polen al medio de germinación (20 ml) y homogenizar con una espátula evitando la formación de grumos.
6. Incubar el polen en agitación suave, a temperatura ambiente y oscuridad, durante 1 h, 3 h, 6 h, 9 h y 12 h. Se considera que el polen ha germinado cuando la longitud del tubo polínico es al menos el doble del diámetro del grano (Pinney y Polito 1990).
7. Confirmar que el polen ha germinado observando una muestra al microscopio óptico.
8. Separar el polen germinado del medio de cultivo mediante filtración a través de un tamiz de nylon de 5 µm de poro.

##### B. Polen de Arabidopsis:

Aproximadamente 25-30 flores recién abiertas (día 0 según Boavida y McCormick 2007) de 30 plantas diferentes de Arabidopsis (WT y mutantes que expresan roGFP2, roGFP2 y *cad2-1/roGFP2*) se incubaron en un tubo eppendorf con 1 ml de medio de germinación según Fan *et al.* 2001 y Li 2011 [MES 5 mM (pH 5,8), KCl 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM, ácido bórico 1,5 mM, sacarosa al 5 % (p/v) y PEG4000 al 15 % (p/v)] a 28 °C durante 1-3 h en la oscuridad. Se confirmó que el polen había germinado observando una muestra a microscopio óptico y se tomaron imágenes a 1, 2 y 3 h de germinación para calcular la germinabilidad.

#### 2.1.2. Medida de la germinabilidad del polen y de la longitud del tubo polínico.

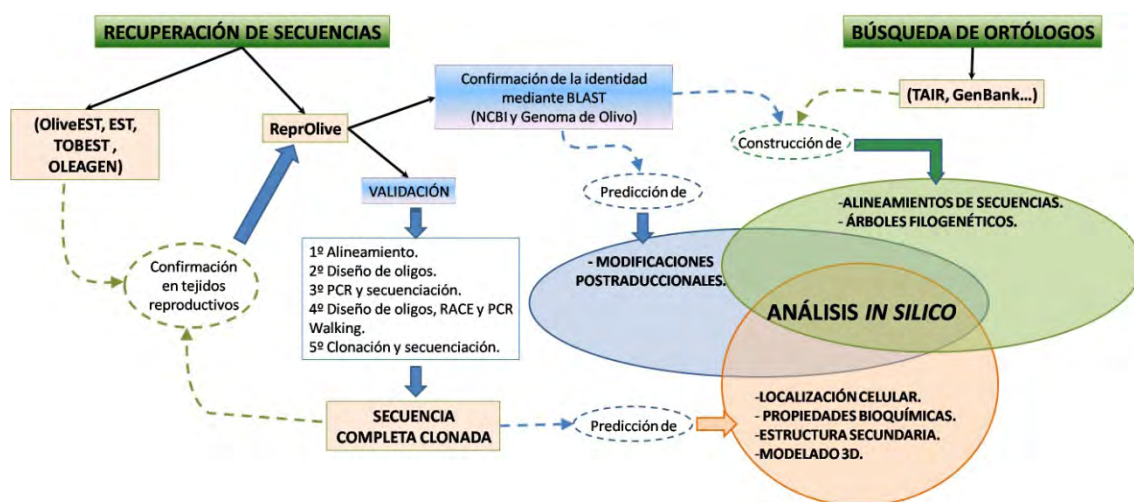
El porcentaje de germinación del polen se midió directamente contando los granos germinados en los diferentes tiempos de germinación (1 h, 3 h, 6 h, 9 h y 12 h en el caso del olivo, 1 h, 2 h y 3 h en el caso de Arabidopsis) en relación con el número total de granos de polen, según la ecuación:

$$\% \text{ germinación} = (\text{número de granos germinados} \times 100) / \text{número total de granos}$$

La longitud del tubo polínico se calculó utilizando la herramienta “Straight” del software ImageJ.

Para realizar el análisis estadístico correspondiente, se seleccionaron al azar varias zonas de la muestra en el portaobjetos, y se contaron un total de 500 granos de polen. Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U. La cuantificación se realizó en al menos 9 muestras diferentes y se calculó el promedio y la desviación estándar para que el resultado fuera estadísticamente significativo.

**2.2. Selección e identificación de transcritos de  $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST en el transcriptoma reproductivo del olivo (polen y pistilo).**



**Figura 22.**Diagrama de flujo de trabajo para la obtención e identificación de las secuencias de los genes  $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST del polen de olivo, y su posterior análisis *in silico*.

Las secuencias de los genes  $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST se obtuvieron mediante la estrategia explicada en el diagrama de flujo de la figura 22. Se optó por una estrategia mixta de clonación e identificación de secuencias, ya que el transcriptoma reproductivo de olivo estaba en proceso de transición cuando comenzó a desarrollarse esta tesis doctoral. Una primera selección de los transcritos se realizó a partir de referencias bibliográficas y de bases de datos (OliveEST, EST, TOBEST, OLEAGEN y un borrador previo de ReprOlive). A continuación, los transcritos se enfrentaron por BLAST a la base de datos ReprOlive y además se realizaron búsquedas por definición utilizando los términos, códigos y nombres de estos genes en las bases de datos GO, EC, KEGG e InterPro del transcriptoma generado *de novo* (Carmona *et al.* 2015, <http://reprolive.eez.csic.es/olivodb/>). Los transcritos finalmente seleccionados se enfrentaron por BLASTing a la reciente base de datos de anotaciones genómicas de

Olivo (Cruz *et al.* 2016, <http://denovo.cnag.cat/genomes/olive/>). También se realizaron búsquedas en BLAST utilizando secuencias homólogas de otras especies de plantas (ortólogos) disponibles en bases de datos públicas y recursos bibliográficos bien establecidos como TAIR y GenBank.

**2.3. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.**

El ARN total se extrajo a partir de material vegetal fresco (anteras de olivo en distintos estadios de desarrollo, polen maduro y polen germinado a 1, 3, 6 y 9 h de germinación), utilizando el kit comercial RNeasy® Plant Mini Kit (Quiagen), siguiendo el protocolo que detalla el fabricante. El ARN resultante fue tratado con DNasa I mediante un protocolo estándar con objeto de eliminar el ADN genómico contaminante.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo con una transcriptasa inversa M-MLV (Fermentas), según el protocolo que se adjunta con dicha enzima. Las incubaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf™ Mastercycler™ Pro-S Vapo-Protect.

La cantidad y la pureza del ARN total y del ADNc se estimaron midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	% GC	Tamaño (pb)
γ-ECSFw	5'-CCAAAGTTGGGTCTCTTGGGA-3'	60,1	50	234
γ-ECSRev	5'-GCATCCCAGAGCGGTTATTA-3'	60,1	50	
GSFw	5'-GAGCTTCTGCCAGATGGAAC-3'	60	55	211
GSRev	5'-CATTGGGTTTGGCAAGTTCT-3'	60	45	
GR1Fw	5'-GGTAGGGCACCTAACACAAAGA-3'	56,7	50	280
GR1Rev	5'-CAATGGTGGTATGCAGAAAAACAGC-3'	57	46	
GR2Fw	5'-GGACGCAAACCCAATACAAAG-3'	56,3	48	260
GR2Rev	5'-GGTGGTTGAGAAAAAACTGCAG-3'	57	41	
GPXFw	5'-AGTGCGGTCTACCAATTCA-3'	59,6	50	219
GPXRev	5'-ACAGTGGAGCAGCATTGGAA-3'	59,9	50	
GSTFw	5'-TCAACCTTCGCGTGCAGTAA-3'	60,25	50	439
GSTRev	5'-ACGTCCATTTCCCTTGAGCC-3'	60,32	55	
OeActF	5'-TTGCTCTCGACTATGAACAGG-3'	58	48	100
OeActR	5'-CTCTCGGCCCAATAGTAATA-3'	58	48	

**Tabla 3.** Cebadores para la amplificación de los genes de interés del metabolismo del GSH. Se utilizó la actina como gen de referencia.

**2.4. Amplificación del ADNc mediante PCR y secuenciación de los productos génicos obtenidos.**

2.4.1. Amplificación por PCR semicuantitativa.

Se utilizaron los alineamientos de las secuencias (parciales y completas) recuperadas del transcriptoma del polen de olivo correspondientes a homólogos de  $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST para diseñar cebadores específicos (tabla 3), con el fin de amplificar las secuencias de ADNc de polen. Para el diseño de los cebadores se utilizaron los programas SeaView (Galtier *et al.* 1996, Gouy *et al.* 2010) y Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

La amplificación de los genes se llevó a cabo como se explica a continuación:

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Tampón de la Taq ADN Polimerasa 10x (Biotools)	2,5
MgCl <sup>2</sup> 50 mM (Biotools)	0,75
Mezcla de dNTPs 10 mM (Promega)	0,5
Oligo forward 10mM	0,5
Oligo reverse 10 mM	0,5
ADNc procedente de la reacción RT (50 ng)	Dependerá de la concentración de ADN de la muestra.
Taq Polimerasa (5 U/ $\mu$ l) (Biotools)	0,2
H <sub>2</sub> O bidestilada	Hasta un volumen final de 25

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para la amplificación de los genes de interés.

2. Incubar a 94 °C durante 2 minutos en un temociclador Eppendorf™ Mastercycler™ Pro-S Vapo-Protect.
3. Aplicar el programa de amplificación siguiente durante 35 ciclos:
  - Desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos.
  - Hibridación a 55 °C durante 30 segundos.
  - Elongación a 72 °C durante 1 minuto.
4. Incubar las muestras a 72 °C durante 10 minutos y mantener a 4 °C.

Nota: las temperaturas y los tiempos hibridación para cada pareja de cebadores fueron optimizados y determinados empíricamente.

2.4.2. Electroforesis de ADN y tinción.

Los productos resultantes de las amplificaciones se corrieron electroforéticamente en un gel de agarosa siguiendo el protocolo descrito a continuación:

1. Preparar el gel de electroforesis con agarosa al 1,5 % (p/v) en tampón TAE 1x (Diluir 100 ml de tampón TAE 10x [48.4 g de Tris-base (Trizma® base, Sigma-Aldrich), 11.4 mL de ácido acético glacial (17.4 M), 3.7 g de EDTA] en 900 ml de H<sub>2</sub>O destilada).
2. Llenar la cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis hasta que cubra el gel.
3. Mezclar las muestras (productos de la amplificación por PCR) con tampón de carga 6x [azul de bromofenol al 0,25 % (p/v), xileno cianol al 0,25 % (p/v), ficoll 400 al 1 % (p/v) y glicerol al 60 % (v/v)], y cargar en el gel. En la primera calle del gel se carga el marcador molecular (100pb DNA Ladder, Promega) para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados mediante coelectroforesis.
4. Separar los productos mediante electroforesis a 100V durante 20-30 minutos.
5. Tras la electroforesis, teñir el gel con un compuesto intercalante como GelRed (Biotium) o Bromuro de Etidio, durante 10-15 minutos. Posteriormente revelar el gel en un escáner.

Los niveles de expresión de las distintas enzimas a lo largo del desarrollo del polen se determinaron mediante la herramienta “análisis volumétrico” del programa Quantity One v4.6.2 (Bio-Rad).

### 2.4.3. Secuenciación de los fragmentos amplificados.

A continuación, los fragmentos de  $\gamma$ -ECS, GS, GR1, GR2, GPX y GST de polen de olivo, amplificados mediante PCR semicuantitativa se secuenciaron mediante secuenciación Sanger en las instalaciones del Servicio de Secuenciación de ADN del instituto EEZ-CSIC de Granada, utilizando un equipo ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies/Applied Biosystems).

### **2.5. Amplificación de los extremos 3' y 5' mediante RACE.**

A partir de las secuencias obtenidas del paso anterior se diseñaron oligos específicos (Tabla 5) para la amplificación de los extremos 5' y 3' de los genes  $\gamma$ -ECS, GS, GR1, GR2, GPX y GST, que se realizó mediante RACE 3' y 5' usando un kit comercial (“Smart<sup>TM</sup> Race cDNA Amplification Kit”, Clontech), siguiendo las especificaciones del fabricante.

La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf<sup>TM</sup> Mastercycler<sup>TM</sup> Pro-S Vapo-Protect aplicando el siguiente programa:

1. 5 ciclos: desnaturalización (94 °C, 30 segundos) + hibridación (72 °C, 3 minutos).
2. 5 ciclos: desnaturalización (94 °C, 30 segundos) + hibridación (70 °C, 30 segundos) + Elongación (72 °C, 3 minutos).
3. 27 ciclos: desnaturalización (94 °C, 30 segundos) + hibridación (68 °C, 30 segundos) + Elongación (72 °C, 3 minutos).

Nombre	Secuencia oligo	Concentración (mM)
$\gamma$ -ECSa $\gamma$ -ECSs	5'-GGAAGATACGAGATTATGAG-3' 5'-GCGGTTATTATCAGTATCAG-3'	10
GSa GSs	5'-GATGGAACACTTGTTGTGGA-3' 5'-CTGAAGGATAATCACTTGGTGC-3'	10
GR1a GR1s	5'-CCTTCACAGCTCCAGTCTTA-3' 5'-CCTCCACTCAGATGTTGCTT-3'	10
GR2a GR2s	5'-CCTACAGCTTCCAGATTCAA-3' 5'-GCCTATTGTAGAAGACACTG-3'	10
GPXa GPXs	5'-GGTTTTTGTCTTCTGTGGCT' 5'-CATGAAGTATTGTGGGTTA-3'	10
GSTa GSTs	5'-GGCTTCCGAGGATGTGAAAC-3' 5'-GACAGACTTAATGTTGAGTG-3'	10

**Tabla 5.** Cebadores para la amplificación de los extremos 3' y 5' de los genes de interés.

Los productos de la amplificación fueron secuenciados (secuenciación de Sanger) en las instalaciones del Servicio de Secuenciación de ADN de la EEZ (apartado 3.2.4.C).

## 2.6. Clonación y secuenciación de los genes $\gamma$ -ECS, GS, GR1, GR2, GPX y GST de polen de olivo.

### 2.6.1. Clonación.

#### A. Ligación:

Los distintos productos de PCR fueron ligados en el vector comercial pGEM®-T Easy (Promega) con el fin de clonar los genes, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### B. Transformación:

#### Reactivos:

- Células competentes (*Escherichia coli* JM109).
- Medio LB + Ampicilina (100  $\mu$ g/ml) + Xgal.

#### Procedimiento:

1. Tras la ligación, se añaden 150-200  $\mu$ l de células competentes a la mezcla de ligación (5  $\mu$ l). Mezclar suavemente con la mano y poner en hielo durante 30 minutos.

Nota: agitar suavemente con la uña cada 10 minutos aproximadamente.

2. Realizar un choque térmico en un baño a 42 °C, durante 1 minuto y 15 segundos (Green y Sambrook 2014).
3. Poner en hielo durante 5 minutos.
4. Añadir a los tubos el volumen suficiente de medio LB + Ampicilina (100 µg/ml) + Xgal para llegar a un volumen final de 1 ml.
5. Mantener los tubos a 37 °C durante 45 minutos.
6. Centrifugar suavemente (3.000 rpm, durante 3 minutos, a temperatura ambiente).
7. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en menos volumen.
8. Sembrar las células transformadas en placas con medio de cultivo LB + Ampicilina (100 µg/ml) + Xgal.
9. Incubar las placas a 37 °C toda la noche.

Nota: El vector pGEMT proporciona a las células resistencia a ampicilina, por lo que sólo crecerán aquellas que hayan incluido al plásmido con nuestro inserto. Sin embargo también habrá células que hayan incluido solamente el plásmido cerrado (sin nuestro inserto), así que para distinguir unas de otras se añade al medio X-gal. La colonia de bacterias se tornará azul si sólo contiene plásmidos cerrados (sin el inserto) o de color blanco si contiene nuestro producto de ligación.

### C. PCR sobre colonias:

Tras la transformación se picaron 5 colonias transformadas (colonias blancas) y las sembramos simultáneamente (y de forma individualizada) en 3 ml de medio LB con ampicilina (para hacer réplicas de las colonias transformadas) y en un tubo de PCR.

Las condiciones de PCR fueron:

1. una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 minuto.
2. 37 ciclos de desnaturalización/amplificación que consistieron en: 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 1 minuto.
3. Etapa de enfriamiento a 72 °C durante 10 minutos.

#### 2.6.2. Separación y purificación de los fragmentos amplificados.

Los fragmentos resultantes de las distintas amplificaciones por PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. La purificación de las bandas de ADN a partir de los geles se llevó a cabo utilizando el kit comercial “MBL-Agarosa QuickClean” (Dominion-MBL), tal y como se describe en las especificaciones del fabricante.

#### 2.6.3. Purificación del ADN plasmídico.

El aislamiento del ADN plasmídico se llevó a cabo a través del kit comercial “Real Miniprep Turbo” (Real Biotech Co.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de restricción fue llevada a cabo con una enzima de restricción EcoRI (Fermentas).



### 2.6.4. Secuenciación del ADN.

Los fragmentos de  $\gamma$ -ECS, GS, GR1, GR2, GPX y GST de polen de olivo, amplificados mediante PCR, fueron secuenciados mediante secuenciación de Sanger en las instalaciones del Servicio de Secuenciación de ADN del instituto EEZ-CSIC de Granada, utilizando un equipo ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies/Applied Biosystems). En las secuenciaciones, se utilizaron entre 0,4-1  $\mu$ g de ADN plasmídico y 6,4  $\mu$ mol de los oligos SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') y T7 (5'-TAATACGAGTCACTATAGGG-3'). De aquí pudimos obtener las secuencias completas de  $\gamma$ -ECS, GS, GR1, GR2, GPX y GST de polen de olivo.

### 2.7. Análisis *in silico* de las secuencias.

Para la obtención de las secuencias de los genes  $\gamma$ -ECS, GS, GR1, GR2, GPX y GST se llevó a cabo una estrategia mixta (Figura 22) de clonado de las secuencias y recuperación de las mismas a partir del transcriptoma de olivo (Carmona *et al.* 2015) y de otras bases de datos (apartado 3.2.2). La identidad de estas secuencias se confirmó mediante el análisis por homología de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) contra la base de datos de GenBank. Por otro lado, los inputs obtenidos del transcriptoma, y previamente seleccionados, fueron confrontados individualmente por BLASTing contra la base de datos genómica de *Olea europea* L. (Cruz *et al.* 2016).

Las secuencias de nucleótidos se alinearon con secuencias homólogas de otras plantas, utilizando la herramienta de alineación múltiple CLUSTAL OMEGA (McWilliam *et al.* 2013) con parámetros predeterminados, y se visualizó el alineamiento mediante el software SeaView (Gouy *et al.* 2010). Se construyeron árboles filogenéticos a partir de las secuencias nucleotídicas con la ayuda del software SeaView (Gouy *et al.* 2010) utilizando el método de máxima verosimilitud (PhyML) e implementando el modelo de sustitución de nucleótidos más probable (ej. GTR) previamente calculado por JmodelTest2 (Darriba *et al.* 2012). El soporte de las ramas se estimó mediante un bootstrap con 100 repeticiones.

A partir de las secuencias nucleotídicas y con la ayuda de la herramienta Translate de Expasy (ExpASy – SIB Bioinformatics Resource Portal, Translate tool, <http://web.expasy.org/translate/>) se obtuvieron las secuencias aminoacídicas, a partir de las cuales se elaboraron también árboles filogenéticos, usando el software SeaView (Gouy *et al.* 2010) mediante el método de máxima verosimilitud (PhyML) e implementando el modelo de sustitución aminoacídico más probable (ej. LG+G) previamente calculado por el software de predicción ProtTest ([http://darwin.uvigo.es/software/prottest2\\_server.html](http://darwin.uvigo.es/software/prottest2_server.html)). Tanto los árboles de las secuencias nucleotídicas como los árboles de las secuencias aminoacídicas fueron

enraizados con una secuencia de *Mus musculus*, homóloga lejana a cada uno de los genes de interés.

Para la predicción de la localización celular de las distintas proteínas ( $\gamma$ -ECS, GS, GR1, GR2, GPX y GST), se utilizó el software Plant-mPloc (Chou y Shen 2010). Para la predicción de distintos parámetros bioquímicos, como la masa molecular teórica y el punto isoeléctrico, se utilizó la herramienta de Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). Los softwares PhosPhAt (Heazlewood *et al.* 2008) y PlantPhos (Lee *et al.* 2011) se utilizaron para predecir la fosforilación de la serina, la treonina y la tirosina. El software GPS-SNO 1.0 se utilizó para la predicción de los sitios de *S*-nitrosilación (Xue *et al.* 2010). La herramienta TermiNator se utilizó para predecir la escisión de metionina N-terminal, acetilación, miristoilación o palmitoilación (Martinez *et al.* 2008).

La predicción de la estructura secundaria de nuestras secuencias aminoacídicas se modeló utilizando el servidor Phyre2 basado en el reconocimiento de pliegues (Kelley y Sternberg 2009). El modelado 3D fue llevado a cabo por PyMol (<https://www.pymol.org/>). Estas aplicaciones usan la base de datos de proteínas PDB para encontrar la matriz más cercana a nuestra secuencia aminoacídica.

### 2.8. PCR cuantitativa en tiempo real.

#### 2.8.1. qPCR durante la ontogenia y la germinación in vitro del polen de olivo.

Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Como gen de referencia se utilizó la ubiquitina. Los cebadores utilizados se enumeran en la tabla 6.

Se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en cDNA a partir del ARN de las muestras recolectadas (anteras en desarrollo, polen maduro y polen a diferentes tiempos de germinación de olivo). Para ello se utilizó el kit comercial FastStart Essential DNA Green Master (SYBR) (Roche), según las especificaciones del fabricante, en un sistema de qPCR en tiempo real LightCycler® 480 System (Roche).

Las curvas de melting fueron calibradas para cada pareja de primers y finalmente las condiciones de reacción fueron las siguientes:

1. una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos.
2. 45 ciclos de desnaturalización/amplificación que consistieron en: 95 °C durante 10 segundos, 57 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 20 segundos.
3. Una etapa de enfriamiento a 72 °C durante 10 minutos.

Se realizó un análisis de las curvas de melting para detectar posibles artefactos como los dímeros de los cebadores.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
$\gamma$ -ECSFw	5'-CCAAAGTTGGGTCTCTTGGA-3'	60,1
$\gamma$ -ECSRev	5'-GCATCCCAGAGCGGTTATTA-3'	60,1
GSFw	5'-GAGCTTCTGCCAGATGGAAC-3'	60
GSRev	5'-CATTGGGTTTGGCAAGTTCT-3'	60
GRFw	5'-GGACGCAAACCCAATACAAAG-3'	56,3
GRRRev	5'-GGTGGTTGAGAAAAAAGTGCAG-3'	57
GPXFw	5'-AGTGCGGTCTCACCAATTCA-3'	59,6
GPXRev	5'-ACAGTGGAGCAGCATTGGAA-3'	59,9
GSTFw	5'-TCAACCTTCGCGTGCAGTAA-3'	60,25
GSTRev	5'-ACGTCCATTTCCCTTGAGCC-3'	60,32
OeUbiF	5'-ATGCAGATCTTTGTGAAGAC-3'	58
OeUbiR	5'-ACCACCACGAAGACGGAG-3'	58

**Tabla 6.** Cebadores utilizados para el análisis qPCR en polen de olivo (ontogenia y germinación). Se utilizó la ubiquitina como gen de referencia

### 2.8.2. qPCR durante el desarrollo floral de Arabidopsis.

Los cebadores se diseñaron utilizando el visor de secuencias de TAIR (<http://arabidopsis.org>). Para diseñar cebadores basados en la secuencia de genes diana, se utilizó el software primer3 (<http://primer3.ut.ee>). Como gen de referencia se utilizó la ubiquitina (UBQ7) de Arabidopsis. Las secuencias de los cebadores de los genes diana, así como de los genes de referencia (housekeeping), se enumeran en la Tabla 7.

Se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en cDNA a partir del ARN de las muestras recolectadas (flores de Arabidopsis en distintos estadios de desarrollo). Para ello se utilizó el kit comercial QuantiFast® SYBR® Green PCR (Quiagen), según las especificaciones del fabricante, en un sistema de qPCR en tiempo real C100TM Cyclor (BIO-RAD).

Las curvas de melting fueron calibradas para cada pareja de primers y finalmente las condiciones de reacción fueron las siguientes:

1. una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos.
2. 40 ciclos de desnaturalización/amplificación que consistieron en: 95 °C durante 10 segundos, 59-62 °C (según la pareja de primers) durante 30 segundos y

- Una etapa de enfriamiento que consistió en un incremento de temperatura desde 55 °C a 95 °C (por incremento de 0,5 °C) durante 5 segundos.

Se realizó un análisis de las curvas de melting para detectar posibles artefactos como los dímeros de los cebadores.

Cebador	Secuencia	Tm (°C)
(γ-ECS) At-GSH1 Fw	5'-AACTTCCCTGTCTCCCTGGT-3'	61,5
(γ-ECS) At-GSH1 Rev	5'-CCAGTCAGCTGTCTCAGATCCA-3'	61,7
(GS) At-GSH2 Fw	5'-AGAGAGAAGGCGGAGGAAAC-3'	61,3
(GS) At-GSH2 Rev	5'-TTCGTCTTTGCTCCTGAGGT-3'	60,0
At-GR1 Fw	5'-TTTTGCGAACACTGCTTTTG-3'	59,1
At-GR1 Rev	5'-AGCCTGAGGTGAAGACCAGA-3'	61,2
At-GR2 Fw	5'-AAGGCAAAAGAAGGTGCTGA-3'	59,0
At-GR2 Rev	5'-ACATGCGAAAATCCCTCAAC-3'	59,0
AtGpx1-1_F	5'-TGAAAATTCCTCGTGTTTTGG-3'	59,1
AtGpx1-1_R	5'-TTTTCAAGTGTTCAAAGCGAAG-3'	60,0
GST2.R	5'-ATGCGATCTTCGTGCGCATTAG-3'	61,4
GST2.F	5'-GGTGCAGAGAAGGCGTTTACCAT-3'	62,7
UBQ7 Fw	5'-CAGACTACAACATCCAGAAG-3'	59,3
UBQ7 Rev	5'-TATTAGACGACGACATCCATA-3'	59,7

**Tabla 7.** Cebadores utilizados para el análisis qPCR en flores en desarrollo de Arabidopsis. Se utilizó la ubiquitina 7 como gen de referencia.

### 2.8.3. Cálculo de la expresión génica a partir de los datos de qPCR.

Se realizó una cuantificación relativa de la expresión de los distintos genes en las muestras mediante el “método de comparativa de CT”. Este método compara el valor de Ct de un gen objetivo con otro gen de referencia (mediante la fórmula:  $2^{\Delta\Delta CT}$ ), en una única muestra. Este modelo no necesita curva de calibración.

Como controles se utilizaron polen maduro (para el caso de muestras de olivo) y el fenotipo WT (para el caso de muestras de Arabidopsis).

### **2.9. Análisis bioquímico mediante LC-MS del contenido de glutatión y cálculo del potencial redox dependiente del tampón de glutatión celular.**

La cuantificación del contenido de GSH y GSSG presentes a lo largo del desarrollo de la flor (en Arabidopsis), así como durante el desarrollo de la antera y la germinación *in vitro* del polen (en olivo), se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acopada a espectrometría de masas (LC-MS), utilizando un sistema de HPLC Waters Alliance 2995 (Waters) con longitud de onda dual, compuesto de una precolumna Atlantis T3 de 3 μm x 3 mm x 150 mm (Waters), y acoplado a un detector de masas de triple cuádruplo

Quattro Micro (Waters). Dichos análisis se llevaron a cabo en el Servicio de Instrumentación de la EEZ-CSIC (<https://www.eez.csic.es/es/servicio-de-instrumentacion>), según el protocolo modificado de Airaki *et al.* (2011) que se detalla a continuación:

### Reactivos:

- Flores abiertas y botones florales (verde y blanco) de Arabidopsis, ó anteras de olivo en diferentes estadios de desarrollo, ó polen de olivo germinado a diferentes tiempos de germinación.
- HCl 0,1 M.
- Filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm.
- Viales de análisis.

### Procedimiento:

1. Moler las muestras en un mortero enfriado con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo blanquecino y fino.
2. Pesar 50 mg de muestra y añadir 2 ml de HCl 0,1M.
3. Homogenizar mediante mezcla en un agitador tipo vórtex durante 1 minuto.
4. Centrifugar a 3200 G durante 20 minutos y a 4 °C.
5. Filtrar el sobrenadante a través de una membrana de 0,45 µm de diámetro de poro (Scharlau) y depositarlo en los viales de análisis.
6. **Los pasos 1-5 deben hacerse en oscuridad.**

Tras analizar las muestras en el sistema LC-MS, obtuvimos la concentración (que el aparato nos proporciona expresada en ppm) de GSH o de GSSG, que en los gráficos de resultados aparece en mg de GSH (o GSSG) por g de muestra (µg/g). Con estos datos de concentración se calculó el potencial redox dependiente del tampón de glutatión celular (ratio GSH/GSSG) según la ecuación de Nernst (Figura 23).

$$E = E^0 - (RT/nF) \ln ([GSH]^2/[GSSG])$$

**Figura 23. Ecuación de Nernst.** Donde E es el potencial redox del glutatión; E<sup>0</sup>, el potencial medio del glutatión; R, la constante de los gases; T, la temperatura; n, el número de electrones intercambiados; y F, la constante de Faraday. Basado en la ecuación de Nernst y las propiedades del glutatión (se requiere 2 moléculas de GSH para formar una de GSSG), tanto la concentración total de glutatión como la relación GSH/GSSG influyen en el potencial redox.

### 2.10. Extracción de proteínas totales.

Los análisis proteicos se realizaron a partir de extractos de proteínas procedentes de anteras en desarrollo, polen maduro y polen germinado de olivo, así como de flores en desarrollo de Arabidopsis.

#### 2.10.1. Extracción de proteínas totales en anteras, polen maduro y polen germinado de olivo.

##### Reactivos:

- Tampón de extracción: Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4), Triton X-100 al 1 % (v/v), CHAPS al 4 % (p/v), DTT 40 mM, PVPP al 5 % (p/v).
- Tampón de equilibrado: Tris-HCl 0,05 M (pH 7.4).
- Tampón de elución: Tris-HCl 0,01 M (pH 7,4).
- Inhibidor de proteasas (Plant protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich).
- Columnas PD10 Sephadex G-25M (GE Healthcare BioSciences AB).
- Unidades Amicon® Ultra-15 para filtración con centrifuga (Merck Millipore Ltd.).
- Solución de precipitación de las proteínas: ácido tricloroacético (TCA) al 20 % (p/v) y DTT al 0,2 % (p/v) en acetona.
- Acetona.

##### Procedimiento:

La extracción de proteínas totales y posterior delipidación de los extractos se llevó a cabo en 3 etapas:

#### A. ETAPA 1: homogeneización

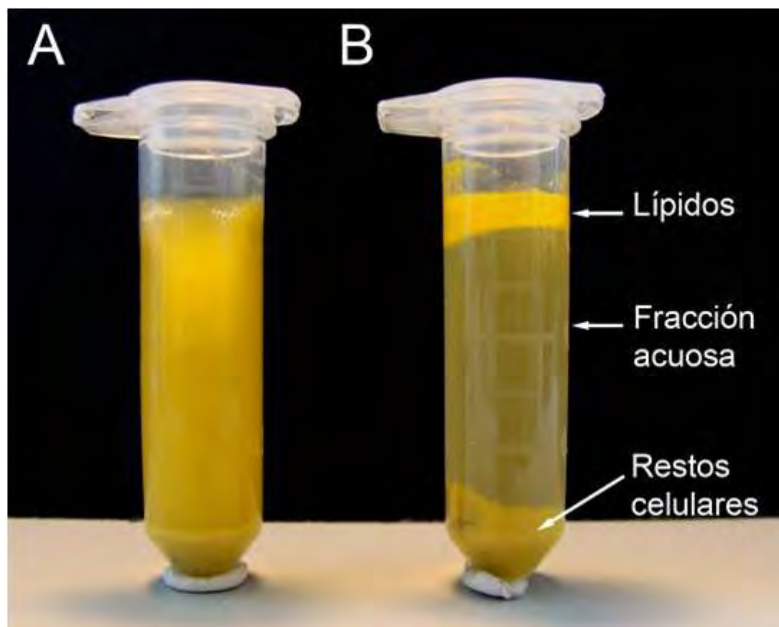
1. Añadir la muestra (0,1 g) en un mortero enfriado con nitrógeno líquido, y moler hasta obtener un polvo muy fino.
2. Transferir la muestra a un tubo de 2 ml y añadir 1,5 ml de tampón de extracción e inhibidor de proteasas (a una concentración de 10 µl/ml).
3. Mezclar bien y agitar en un agitador magnético durante 1-6 horas a 4 °C.
4. Homogenizar la mezcla y centrifugar a 14.000 rpm durante 30 min a 4 °C.
5. Recuperar la fracción acuosa con una jeringa de aguja fina, intentando no romper la capa de lípidos superior que se ha formado en la centrifugación (Figura 24).

#### B. ETAPA 2: filtración por gravedad

1. Equilibrar la columna de sefarosa PD-10 con 25 ml de tampón de equilibrado. Desechar el filtrado.
2. Añadir la muestra a la columna y dejar que entre completamente en la matriz. Si el volumen de la muestra es inferior a 2,5 ml, añadir tampón de equilibrado hasta

obtener un volumen final de 2,5 ml (Figura 25). Desechar el filtrado.

3. Eluir las proteínas añadiendo 3,5 ml de tampón de elución a la columna. Recoger la fracción filtrada en un tubo limpio.



**Figura 24.** A. Extractos de proteína total preparados a partir de polen maduro de olivo. B. Después de la centrifugación, se observan 3 fracciones: un precipitado con los restos celulares en la parte inferior del tubo, un sobrenadante acuoso con las proteínas en la zona media, y una capa superior de lípidos.

### C. ETAPA 3: concentración y precipitación de las proteínas

1. Concentrar las proteínas mediante un dispositivo Amicon®Ultra-15 mediante centrifugación a 6500 rpm durante 15-20 minutos a 4 °C, siguiendo el protocolo que se adjunta en el manual del fabricante.
2. Añadir 9 volúmenes de la solución de precipitación a la solución proteica obtenida de la etapa 2. Incubar a -20 °C durante toda la noche.
3. Centrifugar las muestras a 10.000 rpm y 4 °C durante 30 min.
4. Lavar las muestras con acetona y centrifugar a 4.000 rpm y 4 °C durante 20 min. Repetir dos veces más este paso.
5. Dejar que la muestra se seque bajo una campana de extracción durante 3-5 min a temperatura ambiente para asegurar la eliminación total de la acetona.
6. Resuspender las proteínas del precipitado resultante en tampón de muestras 1-D (Laemmli 1970).
7. Centrifugar a 50.000 rpm durante 1 hora a 4 °C para eliminar las partículas insolubles de la muestra. Hacer alícuotas de los extractos y conservarlos a -80 °C hasta su uso.

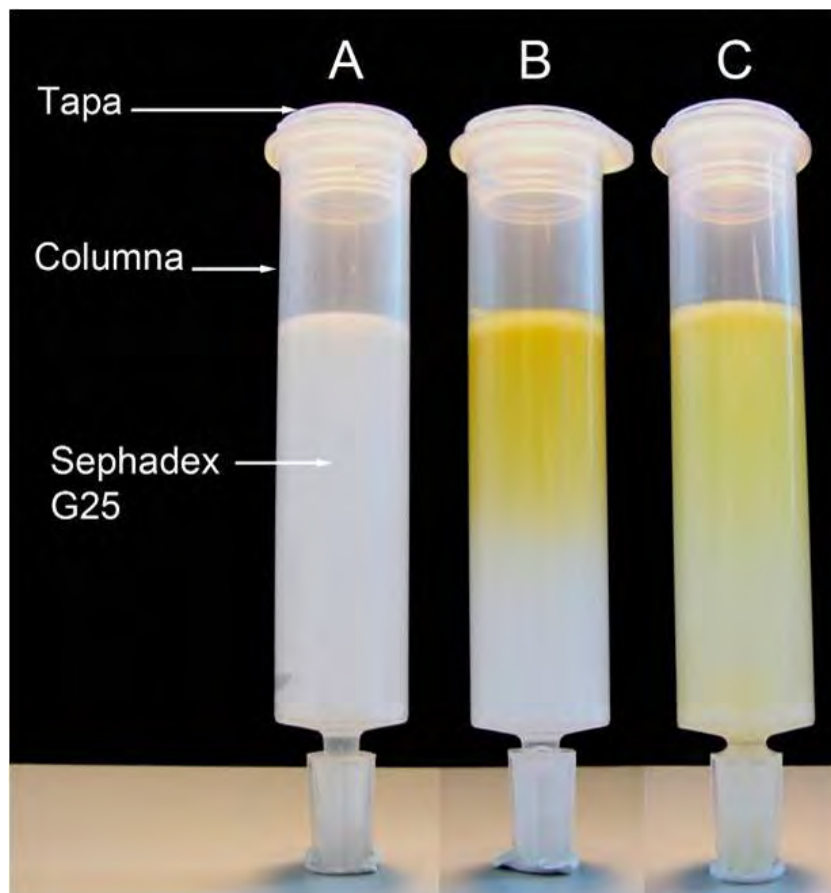
2.10.2. Extracción de proteínas totales en flores de Arabidopsis.

Reactivos:

- Tampón PEB 4x (Agrisera, AS08300).
- Tampón de extracción de proteínas PEB 1x: Se obtiene diluyendo el tampón PEB 4x. Ajustar el pH entre 8.25 y 8.75.

Procedimiento:

1. Pesar 0,1 g de muestra (flores de Arabidopsis).
2. Moler en un mortero enfriado con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. Transferir el polvo a un tubo eppendorff de 1,5 ml.
3. Añadir 500 µl de tampón de extracción. Inmediatamente congelar en N<sub>2</sub> líquido.  
Nota: Mantener el tubo en posición vertical para mantener la muestra en la parte inferior del tubo.
4. Someter la muestra a sonicación hasta que la muestra se descongele. Congelar inmediatamente después en N<sub>2</sub> líquido para evitar el calentamiento de la muestra.
5. Repetir el paso anterior 2 veces más.
6. Seguidamente poner las muestras en hielo hasta que todas sean procesadas.



**Figura 25. Filtración de extractos proteicos de polen de olivo a través de una columna que contiene medio Sephadex G25 (columna PD-10, GE Healthcare Biosciences AB).A. Columna PD-10 tras el equilibrado y antes de la carga de la muestra. B-C. La misma columna después de filtrar la muestra (B) y eluir las proteínas (C), respectivamente.**



7. Centrifugar a 9.500 rpm durante 3 minutos y a 4 °C para separar el material insoluble y los restos celulares.

Nota: El pellet debe ser blanco o grisáceo. Un color verde intenso indica que el procedimiento no ha sido óptimo y hay que repetir de nuevo el proceso optimizando la extracción.

8. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo con ayuda de una pipeta, evitando arrastrar el pellet.
9. Hacer alícuotas y conservar a -80 °C hasta su uso.

### **2.11. Extracción de proteínas totales en condiciones nativas para determinar actividades enzimáticas.**

Los análisis de actividad enzimática se realizaron a partir de extractos nativos de proteínas procedentes de anteras en desarrollo, polen maduro y polen germinado (6 h) de olivo.

#### Reactivos:

- Tampón de extracción HB: KCl 0,1 M, Hepes 20 mM (pH 7.0).

#### Procedimiento:

1. Añadir la muestra (0,1 g) en un mortero enfriado con nitrógeno líquido, y moler hasta obtener un polvo muy fino.
2. Transferir la muestra a 1ml de tampón de extracción.
3. Mezclar bien y agitar vigorosamente en un agitador tipo vórtex hasta que se homogenice la muestra.
4. Sonicar las muestras manteniéndolas en hielo (2 ciclos de 5 s).
5. Centrifugar las muestras a 1000 rpm y 4 °C durante 5 minutos.
6. Recuperar el sobrenadante y conservarlo a -80 °C para su posterior análisis.

### **2.12. Cuantificación de proteínas.**

Para los análisis electroforéticos, los extractos proteicos se cuantificaron mediante 3 procedimientos distintos:

#### 2.11.1. Método de Bradford.

Se realizó midiendo en un espectrofotómetro Shimadzu 1800 (Shimadzu) la absorbancia a 595 nm, según el protocolo descrito por Bradford (1976), utilizando un reactivo comercial (Bio-Rad).

### 2.11.2. Sistema comercial 2D-Quant kit.

Para los análisis electroforéticos el contenido total de proteínas se estimó utilizando el sistema comercial 2D-Quant kit (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.11.3. Kit comercial DC Protein Assay.

En algunos casos la cuantificación de proteínas se hacía imposible debido a que interferían en la medición los detergentes utilizados al realizar el extracto proteico. Por ello también se utilizó el kit comercial DC<sup>TM</sup> Protein Assay (Bio-Rad) para cuantificar las proteínas. Consiste en un ensayo colorimétrico compatible con el uso de detergentes con una reacción ligeramente modificada del método de Lowry *et al.* (1951). Los ensayos fueron realizados según las especificaciones del fabricante, midiendo las absorbancias a 750 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 1800 (Shimadzu).

## **2.13. Electroforesis desnaturalizante en gel (SDS-PAGE).**

Los extractos proteicos se analizaron en geles de TGX (TGX (Tris-Glycine eXtended) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en un equipo Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad), según el protocolo que se describe a continuación.

### Reactivos:

- Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free<sup>TM</sup> Precast Gels (Bio-Rad).
- Marcadores de peso molecular proteicos (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards Dual Color, Bio-Rad).
- Tampón de electroforesis 1x: se obtiene diluyendo el tampón de electroforesis 10x [Tris-HCl 100 mM (pH 8.3), glicina 100 mM y SDS al 0,1 % (p/v)].
- Tampón de muestras Laemmli 2x: Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), SDS al 4 % (p/v), glicerol al 12 % (v/v), DTT al 0,4 % (p/v) y azul de bromofenol al 0,0025 % (p/v).

### Procedimiento:

1. Preparar las muestras mezclando el extracto proteico (25 µg) con tampón de muestras en proporción 1:1 hasta un volumen final de 25 µl.
2. Hervir las muestras durante 5 minutos a 95 °C en un baño termostático.
3. Transferir los tubos de las muestras a hielo y enfriar durante 5 minutos.
4. Retirar los peines de los geles y cargar las muestras en los pocillos. En uno de los pocillos laterales cargamos los marcadores de peso molecular.
5. Llenar el tanque de electroforesis con tampón de electroforesis 1x.

6. Separar las proteínas aplicando al gel un voltaje inicial de 90 V durante unos 20 min, y posteriormente 180 V durante 20 min (hasta que el frente de azul de bromofenol alcance el final del gel separador).
7. Observar el gel en un sistema Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad) y capturar imágenes con el software Image Lab 5.2.1.

**2.14. Inmunodetección de las enzimas mediante Western blotting.**

Se llevaron a cabo análisis de expresión de las enzimas  $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST en el polen de olivo (durante su ontogenia y durante la germinación *in vitro*) y en flores de Arabidopsis durante su desarrollo, mediante inmunodetección de las proteínas por Western blotting, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación.

Reactivos:

- Tampón de transferencia: Tris-HCl 25 mM (pH 8.1-8.4), glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v).
- Membranas de fluoruro de polivinilideno, PVDF (Biotrace PVDF™, PALL Co.).
- Metanol.
- Tampón TBST: Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), cloruro sódico 150 mM y Tween 20 al 0,3 % (v/v).
- Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo (Nestlé) al 3 % (p/v) en tampón TBST.
- Anticuerpo primario (ver tabla 8).
- Anticuerpo secundario (ver tabla 8).

Proteína	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
$\gamma$ -ECS	Gamma-ECS   Gamma glutamylcysteine synthase, Agrisera (AS06 186 )	1: 5000	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:2000
GS	GS   Glutathione synthase, GSH-S, Agrisera (AS06 183)	1:2000	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:2000
GR	GR   Glutathione reductase, Agrisera (AS06 181)	1:5000	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:2000
GPX	GPX   Glutathione peroxidase (chloroplasic), Agrisera (AS04 055)	1:5000	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:2000
GST	GST class-phi   Glutathione S tranferase, Agrisera (AS09 479)	1:1000	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:2000

**Tabla 8.** Anticuerpos primarios (Agrisera) y secundarios (Molecular Probes) utilizados en los experimentos de Western blotting.

### Procedimiento:

1. Tras la electroforesis, incubar el gel en tampón de transferencia durante 15 min.
2. Pretratar la membrana de PVDF incubándola en agitación suave unos 5-10 segundos en metanol, 5 min con H<sub>2</sub>O destilada y 10 min en tampón de transferencia.
3. Montar los módulos de transferencia cuidando que no queden burbujas.
4. Realizar la transferencia en un sistema de Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) a 20 V durante 30 min.
5. Tras la transferencia, sumergir la membrana en una solución de bloqueo e incubar durante 6 h.
6. Incubar la membrana con el anticuerpo (Ac) primario correspondiente (Tabla 8) diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche (12 horas) en agitación y a 4 °C.
7. Lavar la membrana con tampón de TBST durante 20 min.
8. Incubar la membrana con el Ac secundario correspondiente diluido en TBST, durante 2 h y en oscuridad.
9. Lavar las membranas con TBST durante 15 min.
10. Escanear las membranas en un dispositivo Pharos FX Plus Molecular Imager (Bio-Rad).

### **2.15. Ensayos in vitro de la actividad glutatión reductasa.**

El estudio y la cuantificación de la actividad glutatión reductasa en las muestras (anteras en desarrollo, polen maduro y polen germinado de olivo) se llevó por colorimetría mediante el kit de ensayo “OxiSelect™ Glutathione Reductase Assay Kit” (STA-812, Cell Biolabs). La actividad de la glutatión reductasa se define como 1 unidad de enzima que reduce 1 μmol de glutatión oxidado (GSSG) por minuto a pH 7,6 y 25 °C. El kit emplea una reacción de reciclaje enzimático simple para la cuantificación de glutatión, donde la reducción de un cromógeno se correlaciona con la actividad enzimática de la glutatión reductasa, según el protocolo del fabricante.

#### 2.15.1. Preparación de muestras.

Previo al análisis de la actividad GR se realizó un lisado de los tejidos usados en el ensayo (anteras en desarrollo, polen maduro y polen germinado a 5 h de olivo).

### Reactivos:

- Tampón salino de extracción: Solución salina fría de PBS y EDTA 1mM.
- Tampón de análisis 1x (ver apartado C, análisis de la actividad glutatión reductasa).

Procedimiento:

1. Pesar 100 mg de tejido y moler en un mortero enfriado con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvillo fino y blanquecino.
2. Añadir el polvillo a 1 ml de tampón salino de extracción, y homogenizar vigorosamente en un agitador tipo vórtex.
3. Centrifugar el homogenado a 12.000 rpm durante 15 minutos y a 4 °C.
4. Recuperar el sobrenadante y guardar en hielo (o a -80 °C si no se va a usar en ese momento).

Nota: Diluir las muestras con tampón de análisis tanto como sea necesario para el test.

2.15.2. Preparación de la curva patrón.

Para realizar el ensayo de la actividad GR fue necesario realizar una curva patrón.

Reactivos:

- Solución stock de glutatión reductasa (suministrada por el kit comercial “OxiSelect™ Glutathione Reductase Assay Kit”).
- Tampón de análisis 1x (ver apartado C, análisis de la actividad glutatión reductasa).

Procedimiento:

1. Realizar una dilución 1:5000 a partir de la solución stock de GR en tampón de análisis.

Nota: usar sólo la cantidad suficiente para el experimento inmediato. Esta solución tiene una concentración de 1 U/ml (ó 1000 mU/ml).

2. Preparar estándares (frescos para cada ensayo, nunca reutilizar) en tubos de centrifuga de acuerdo con la tabla 9.

Nota: Agitar bien los tubos al prepararlos, ya que la GR se encuentra en suspensión y tiende a asentarse.

Estándares	GR estándar 1000 mU/ml (µl)	Tampón de análisis 1x (µl)	GR mU/ml
1	80	920	80
2	500 del estándar 1	500	40
3	500 del estándar 2	500	20
4	500 del estándar 3	500	10
5	500 del estándar 4	500	5
6	500 del estándar 5	500	2.5
7	500 del estándar 6	500	1.25
8	0	1000	0

**Tabla 9.** Elaboración de los estándares para la curva patrón.

### 2.15.3. Análisis de la actividad glutatión reductasa.

Antes de comenzar el ensayo de actividad se prepararon y mezclaron bien todos los reactivos. Los estándares para realizar la curva de calibrado se prepararon a la misma vez que las muestras ya que han de medirse juntos. Cada muestra (de tejido biológico o estándar) se realizó por triplicado en placas de 96 pocillos.

#### Reactivos:

- Tampón de análisis 1x: Añadir 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada a 50 ml del tampón de análisis 5x. Mezclar hasta su completa homogenización. Usar este tampón para preparar todos los reactivos del ensayo.
- Cromógeno 1x: Diluir la solución patrón de cromógeno 1:15 con tampón de análisis 1x. Agitar vigorosamente en un agitador tipo vórtex.  
Nota: Preparar el cromógeno justo antes de usar y preparar sólo la cantidad necesaria para el ensayo.
- NADPH 1x: Diluir la solución stock de NADPH 1:50 con tampón de análisis 1x.  
Nota: Agitar vigorosamente con vórtex la solución stock de NADPH antes de preparar la dilución 1x. Preparar sólo la cantidad necesaria para el ensayo.

#### Procedimiento:

1. Añadir 25 µl de NADPH 1x en cada pocillo a analizar.
2. Añadir 100 µl de los estándares de GR o de las muestras problema en cada pocillo.
3. Añadir 50 µl de cromógeno 1x y mezclar suavemente.
4. Añadir 25 µl de GSSG y mezclar suavemente.
5. Inmediatamente comenzar las medidas de absorbancia a 405 nm a intervalos de 1 minuto y durante un total de 10 minutos (la reacción puede mantenerse más tiempo si es necesario en muestras con poca actividad) en un lector de de microplacas para absorbancia/Elisa IMARK (Bio-Rad).
6. Calcular la concentración de estándares y muestras, así como la actividad enzimática según las especificaciones del kit.

### **2.16. Preparación de muestras para inmunocitoquímica.**

#### 2.16.1. Fijación de muestras e inclusión en resina.

El material fresco se procesó para su inclusión en dos tipos de resina: Unicryl y BMM.

##### A. Fijación:

Las muestras (anteras en desarrollo y polen germinado de olivo, flores en desarrollo de Arabidopsis) se fijaron en tubos de centrifuga de 1,5 ml.

Reactivos

- Solución de fijación: paraformaldehído al 4 % (p/v) y glutaraldehído al 0,2 % (v/v) en tampón cacodilato sódico 0,05 M (pH 7.2).
- Solución de lavado: tampón cacodilato sódico 0,05 M (pH 7.2). Nota: Elaborar el tampón en H<sub>2</sub>O milliQ.

Procedimiento

1. Añadir 1 ml de solución de fijación a las muestras de material vegetal e incubar durante 1-6 horas (según el tamaño de las muestras) a 4 °C. Aplicar vacío varias veces (cada 2 horas aproximadamente).
2. Cambiar el fijador e incubar las muestras durante toda la noche (12 horas) a 4 °C.
3. Lavar las muestras en solución de lavado durante 30 minutos a 4 °C.
4. Repetir el paso 3 dos veces más.

**B. Deshidratación:**

Deshidratar las muestras mediante cambios en alcohol.

Reactivos

- Etanol a distintas concentraciones (30, 50, 70, 90, 96 y 100 %; v/v).

Procedimiento

La deshidratación de las distintas muestras se realizó según la tabla 10.

<b>UNICRYL</b>	<b>BMM</b>
<b>Deshidratación</b>	<b>Deshidratación</b>
Etanol al 30% (v/v) durante 1h a 4°C	Etanol al 30% (v/v) durante 1h a 4°C
Etanol al 50% (v/v) durante 1h a 4°C	Etanol al 50% (v/v) durante 1h a 4°C
Etanol al 70% (v/v) durante 12h a 4°C	Etanol al 70% (v/v) durante 12h a 4°C
Etanol al 90% (v/v) durante 6h a -20°C	Etanol al 96% (v/v) durante 1h a 4°C
Etanol al 100% (v/v) durante 1h a -20°C (3x)	Etanol al 100% (v/v) durante 1h a 4°C
<b>Inclusión en resina</b>	<b>Inclusión en resina</b>
Etanol + Unicryl (1:1) durante 1 día a -20°C	Etanol + BMM (3:1) durante 12h a 4°C
Etanol + Unicryl (1:2) durante 6h a -20°C	Etanol + BMM (1:1) durante 12h a 4°C
Unicryl durante 1 día a -20°C	Etanol + BMM (1:3) durante 12h a 4°C
----	BMM durante 12h a 4°C
<b>Polimerización</b>	<b>Polimerización</b>
Cambiar la resina Unicryl y polimerizar con luz UV a -20°C durante 3 días	Cambiar la resina BMM y polimerizar con luz UV a -20°C durante 2 días

**Tabla 10.** Etapas en la preparación de las muestras para microtomía.

### C. Inclusión:

Infiltrar las muestras en resina Unicryl o BMM mediante cambios sucesivos en diferentes soluciones mezcla de resina con etanol.

#### Reactivos

- Etanol 100 % (v/v).
- Resina Unicryl (British BioCell).
- Resina BMM [20 ml de butil-metacrilato, 5 ml de metil-metacrilato, 125 mg de benzoín-etil-éter y 38,5 mg de DTT]: tras mezclar los componentes es necesario burbujear con N<sub>2</sub> y proteger de la luz.

#### Procedimiento

La inclusión en resina de las distintas muestras se realizó según la tabla 10.

### D. Polimerización:

1. Colocar las muestras en cápsulas de gelatina y rellenar con la resina Unicryl, ó colocar las muestras en cápsulas BEEM Embedding (TED PELLA, INC.) y rellenar con la resina BMM.
2. Polimerizar las resinas bajo una lámpara de UV tal y como se indica en la tabla 10.

#### 2.16.2. Microtomía.

Una vez que las muestras estaban incluidas en las cápsulas con la resina polimerizada se procedió a realizar cortes de las mismas para su análisis inmunohistoquímico.

#### Procedimiento

1. Fijar en el portamuestras del micrótopo el bloque de resina con la muestra que queremos cortar.
2. Tallar una pirámide trapezoidal en el extremo de la cápsula donde se halla la muestra.
3. Fijar el portamuestras en el brazo del micrótopo (Ultracut E, Reichert-Jung).
4. Montar y alinear la cuchilla de vidrio respecto a la muestra. Aproximar manualmente la pieza a la cuchilla con pasos de 1-3 µm hasta que se produzca el primer corte.
5. Realizar las secciones semifina (1 µm de grosor), que se depositan sobre una gota de H<sub>2</sub>O milliQ en un portaobjetos tratado con 3-aminopropil-triethoxysilano (TESPA, 3-Aminopropyl-triethoxysilane, APTES, Sigma).
6. Fijar los cortes al portaobjetos en una placa calefactora a 38 °C.
7. Para realizar secciones utrafinas (70 nm de grosor) es necesario retallar de nuevo la pirámide, centrándola en la zona del tejido que se desea estudiar. Los cortes se depositan por contacto sobre rejillas de níquel de 200 agujeros recubiertar por una



fina película de Formvar.

### 2.16.3. Contrastado de cortes ultrafinos.

Para aumentar el contraste de los tejidos vegetales se realiza un doble contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo a las secciones ultrafinas, según se describe a continuación.

#### Reactivos

- Solución de EMS (sustituto del acetato de uranilo) al 5 % (p/v). La solución se filtra y se almacena en oscuridad a 4 °C.
- Solución de citrato de plomo. Mezclar 10 ml de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  80 mM y 10 ml de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  113 mM, y dejar reposar durante 30 minutos. Añadir 4 ml de NaOH 1 M y completar con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta 25 ml. Hacer alícuotas de citrato de plomo:hidróxido sódico 0,01 M (1:8, v/v).

#### Procedimiento

1. Colocar un trozo de parafilm en una placa de Petri y dispensar una gota de EMS para cada rejilla que se va a teñir.
2. Colocar cada rejilla en la gota de modo que los cortes estén en contacto con la solución e incubar durante 15 minutos y en oscuridad, para que no se formen cristales sobre los cortes.
3. Lavar cada rejilla con  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ durante 5 minutos.
4. Repetir el lavado 2 veces más.
5. Dejar secar las rejillas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos.
6. Poner un nuevo trozo de parafilm y añadir una gota de la solución de citrato de plomo para cada rejilla que se va a teñir.
7. Colocar cada rejilla en la gota de modo que los cortes estén en contacto con la solución e incubar durante 5 minutos en oscuridad.  
Nota: colocar unas lentejas de NaOH dentro de la placa de Petri para evitar la precipitación del citrato de plomo al entrar en contacto con el  $\text{CO}_2$ .
8. Lavar las rejillas con  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ durante 5 minutos.
9. Repetir el lavado dos veces.
10. Dejar secar las rejillas sobre papel secante.

## 2.17. Inmunolocalización de GSH, $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST.

### 2.17.1. Inmunolocalización a microscopía de fluorescencia (MF).

La localización de GSH a nivel celular en anteras en desarrollo (olivo y Arabidopsis), pistilo (Arabidopsis), estigma (Arabidopsis) y polen germinado (olivo), así como la localización de  $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST en anteras en desarrollo y polen germinado de olivo, se realizó mediante microscopía de fluorescencia a partir de secciones

semifinas obtenidas por microtomía.

Reactivos

- Acetona (para muestras incluidas en resina BMM).
- Solución de PBS (pH 7.4).
- Solución de bloqueo: BSA al 2,5 % (p/v) en tampón PBS.
- Solución de Citifluor (Ted Pella Inc.).
- Anticuerpos primarios: anti-GSH,  $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST (Tabla 11).
- Anticuerpo secundario (Tabla 11).

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Gamma-ECS   Gamma glutamylcysteine synthase, Agrisera (AS06 186 )	1:30	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:100
GS   Glutathione synthase, GSH-S, Agrisera (AS06 183)	1:30	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:100
GR   Glutathione reductase, Agrisera (AS06 181)	1:30	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:100
GPX   Glutathione peroxidase (chloroplatic), Agrisera (AS04 055)	1:30	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:100
GST class-phi   Glutathione S tranferase, Agrisera (AS09 479)	1:30	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:100
GSH   Glutathione (rabbit antibody), Agrisera (AS09 594)	1:30	Anti-Ig de conejo conjugado con Alexa fluor 488nm (Molecular Probes)	1:100

**Tabla 11.** Anticuerpos primarios (Agrisera) y secundarios (Molecular Probes) utilizados en los experimentos de inmunolocalización.

Procedimiento

1. Disolver la resina (en el caso de las muestras incluidas en BMM) mediante dos lavados con acetona seguidos de 2 lavados con H<sub>2</sub>O milliQ.
2. Depositar una gota del anticuerpo primario correspondiente (diluido 1:30 en la solución de bloqueo) sobre las secciones de anteras (previamente fijadas a un portaobjetos). Proteger con un cubreobjetos e incubar durante 14 h a 4 °C.
3. Lavar los portaobjetos con tampón PBS durante 10 minutos.
4. Repetir el paso anterior dos veces más.
5. Incubar las secciones con el anticuerpo secundario (diluido 1:100 en PBS)

- durante 1 h en oscuridad.
6. Lavar con PBS durante 10 minutos y en oscuridad.
  7. Repetir el paso anterior dos veces más.
  8. Dejar secar los portaobjetos durante 5 minutos en oscuridad.
  9. Añadir una gota de la solución de Citifluor en cada sección y cubrir con un cubreobjetos.
  10. Observar las muestras en un microscopio invertido de epifluorescencia (DMI6000 B, Leica; ó Nikon Eclipse TE2000-U) dotado de un juego de filtros de epifluorescencia (UV, azul, GFP, verde). Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital ProgRes MF Cool CCD (Jenoptik) y el programa ProgRes CapturePro v2.6 (Jenoptik AG).
  11. El control negativo se llevó a cabo omitiendo el anticuerpo primario de la reacción de inmunocitoquímica.

### 2.17.2. Inmunolocalización a microscopía electrónica de transmisión (MET).

La localización a nivel ultraestructural del GSH durante la ontogenia y la germinación del polen de olivo (muestras incluidas en Unicryl) se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión a partir de las secciones ultrafinas obtenidas por microtomía.

#### Reactivos

- Solución de PBS (pH 7.4).
- Solución de bloqueo I: BSA al 5 % (p/v) en tampón PBS.
- Solución de bloqueo II: BSA al 2,5 % (p/v) en tampón PBS.
- Anticuerpo primario: anti-GSH (Agrisera, AS09 594).
- Anticuerpo secundario: Anti-IgG de conejo conjugado con oro coloidal de 20 nm (BBInternational).
- Solución de acetato de uranilo y solución de citrato de plomo (Ver apartado 3.2.19(Preparación de muestras para inmunocitoquímica) sección C (Contrastado de cortes ultrafinos)).

#### Procedimiento

1. Colocar la rejilla (con las secciones hacia abajo) sobre una gota de H<sub>2</sub>O milliQ durante 1 minuto.
2. Colocar la rejilla sobre una gota con la solución de bloqueo I e incubar durante 4 horas a temperatura ambiente.
3. Colocar la rejilla sobre una gota con el anticuerpo primario (dilución 1:100 en solución de bloqueo II) e incubar durante 3 h a temperatura ambiente.
4. Lavar la rejilla con tampón PBS durante 5 minutos.
5. Repetir el paso anterior 2 veces más.
6. Colocar la rejilla sobre una gota con anticuerpo secundario (dilución 1:50 en solución de bloqueo) e incubar durante 1,5 horas.
7. Lavar la rejilla con tampón PBS durante 5 minutos.

8. Repetir el paso anterior 2 veces más.
9. Lavar la rejilla con H<sub>2</sub>O milliQ durante unos segundos.
10. Dejar secar las rejillas sobre papel secante en el interior de una caja de Petri.
11. Contrastar las rejillas con EMS y citrato de plomo (ver procedimiento en el apartado 3.2.18 sección C).
12. Visualizar las muestras en un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1011, JEOL LTD) operando a 80 kV. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital MegaView III, con ayuda del software AnalySIS DOCU (OLYMPUS).
13. El control negativo se llevó a cabo omitiendo el anticuerpo primario de la reacción de inmunocitoquímica.

### **2.18. Medida y cálculo del potencial redox *in vivo* mediante GFP sensible a redox (roGFP2) en tejidos reproductivos de *A. thaliana*.**

Se utilizó la sonda roGFP2 para monitorear los cambios *in vivo* en el potencial redox celular en el desarrollo floral, la germinación del polen y la señalización polen-estigma de *Arabidopsis thaliana*.

#### 2.18.1. Microscopía de barrido láser confocal (CLSM).

Para este estudio se utilizaron aproximadamente 20 flores recién abiertas (día 0 según Boavida y McCormick 2007) de cada tipo de planta de *Arabidopsis* (WT, roGFP y *cad2-1/roGFP*) por cada experimento.

#### Reactivos

- Medio de germinación (ver apartado 3.2.1.A.II. Germinación *in vitro* del polen de *Arabidopsis*).
- Portaobjetos excavados.
- DTT 2,5 mM.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM.

#### Procedimiento

1. Incubar las muestras en 1 ml de medio de germinación a 28 °C durante 1 h en oscuridad.
2. Colocar 2-3 flores en un portaobjetos excavado con unas gotas del medio de germinación utilizado.
3. Observar en un sistema modular de microscopía de barrido laser confocal Nikon C-1 (integrado por un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U) equipado con láseres para la excitación a 405 (excita a la roGFP2 oxidada) y 488 nm (excita a la roGFP oxidada y reducida).
4. Tomar imágenes (Objetivos CFI PL FLUOR 20x AN 0,75 WD 0,35 mm multi-immersión y CFI PL FLUOR 40x AN 1,30 WD 0,2 mm oil) en modo multi-track con tansposición (switching) de línea, tomando un promedio de 4 lecturas,

generando así un flujo de adquisición de imágenes a las dos longitudes de onda de excitación indicadas.

Nota: Las imágenes de emisión se registraron individualmente para cada longitud de onda de excitación. Para eliminar la posible autofluorescencia que podría falsear los resultados, se realizaron mediciones previas con muestras de flores WT con las mismas condiciones de excitación, determinando los valores de intensidad de fluorescencia en los que las muestras WT no emitían ninguna señal.

5. Calibrar la sonda roGFP: Tratar las muestras (ya observadas) primero con DTT 2,5 mM (5 minutos) y seguidamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM (10-15 minutos) bajo el microscopio para llevar la sonda a sus formas totalmente reducida u oxidada, respectivamente.
6. Tomar imágenes después tras cada tratamiento de calibración para obtener los controles de oxidación y reducción.

Nota: En todos los casos (WT, roGFP y *cad2-1/roGFP*) se utilizaron un mínimo de 10 muestras por tratamiento. Se realizó una calibración de la sonda para cada experimento.

### 2.18.2. Análisis ratiométrico de imágenes.

Los análisis ratiométricos se realizaron utilizando el software ImageJ v 1.37v (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La fluorescencia a 405 nm (roGFP2 oxidada) se corrigió mediante la sustracción del ruido de fondo. La imagen de roGFP2 reducida (verde) se calculó restando a la emisión a 488 la emisión a 405. La imagen corregida de la roGFP2 oxidada se dividió por la imagen obtenida de roGFP reducida obteniendo una relación 405/488 con un threshold (umbral) de 10.

Para poder ilustrar las imágenes de diferencia de potencial redox (405/488) evaluadas, se convirtió la imagen ratiométrica a la escala de grises. Posteriormente, la imagen en escala de grises se transformó a una escala de pseudocolor (color falso) mediante la herramienta “Fire” del software ImageJ. Todas las mediciones se tomaron con ajustes y parámetros idénticos para poder compararlas en términos absolutos.

### 2.18.3. Cálculo del potencial redox.

Se midió la intensidad de fluorescencia (por área) para cada tejido en los diferentes genotipos de las flores de *Arabidopsis* (WT, roGFP2 y *cad2-1/roGFP*) mediante el software ImageJ. Tanto el promedio como la desviación estándar se calcularon después de medir un mínimo de diez imágenes correspondientes a tres experimentos independientes. Estos datos fueron usados para determinar el grado de oxidación y el potencial redox en cada tejido, según la Ecuación de Nernst adaptada en la figura 26 (de Simone *et al.* 2017).

La sonda roGFP2 se equilibra con el glutatión, lo que permite la estimación del grado de oxidación del glutatión y el potencial redox del glutatión mediante mediciones de fluorescencia de roGFP2. El potencial redox medio de roGFP2 ( $E^{\circ}_{roGFP2}$ ) es de -280 mV, mientras que el potencial redox de roGFP2 ( $E_{roGFP2}$ ) depende del grado de oxidación de su puente disulfuro. El grado de oxidación de roGFP2 ( $Ox_{roGFP2}$ ) se calculó como se describe en la figura 26. A., donde R es la relación de 405/488 nm de la muestra,  $R_{red}$  es la relación de 405/488 nm de la forma totalmente reducida de la sonda,

$R_{ox}$  es la relación de 405/488 nm de la forma completamente oxidada de la sonda,  $I_{488min}$  y  $I_{488max}$  son la intensidad mínima y máxima de fluorescencia a 488 nm respectivamente (Meyer *et al* 2007).

A

$$OxD_{roGFP2} = \frac{R - R_{red}}{(I_{488min}/I_{488max})(R_{ox} - R) + (R - R_{red})}$$

B

$$E_{roGFP2} = E^{\circ}_{roGFP2} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{1 - OxD_{roGFP2}}{OxD_{roGFP2}} =$$

$$E^{\circ}_{GSH} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{2[GSH]_{total} (1 - OxD_{GSH})^2}{OxD_{GSH}} = E_{GSH}$$

**Figura 26. Fórmulas utilizadas para calcular el grado de oxidación (A) y el potencial redox dependiente de glutatión (B).** A. El grado de oxidación se calculó a partir de la relación de fluorescencia roGFP2 de 405/488 nm para el experimento *in vivo* utilizando CLSM. B. Ecuación de Nernst utilizada para calcular el potencial de GSH a partir del potencial redox de roGFP2. En esta ecuación  $E_{GSH}$ ,  $E^{\circ}_{GSH}$ ,  $OxD_{GSH}$  y  $E_{roGFP2}$ ,  $E^{\circ}_{roGFP2}$  y  $OxD_{roGFP2}$  son el potencial redox, el potencial medio y el grado de oxidación del glutatión y de la sonda roGFP2, respectivamente.

Dado que roGFP2 y el glutatión intercambian electrones de una manera reversible, el potencial redox de glutatión se pudo calcular utilizando la ecuación de Nernst (Figura 26 .B) donde  $E_{GSH}$  es el potencial redox del glutatión,  $E^{\circ}_{GSH}$  es el potencial medio del glutatión (-240 mV), R es la constante de los gases ( $8.315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), T es la temperatura (298.15 K), z es el número de electrones intercambiados (2) y F es la constante de Faraday ( $9.648 \text{ 104 C mol}^{-1}$ ).

## 2.19. Análisis densitométricos y de intensidad de fluorescencia.

### 2.19.1. Análisis densitométricos.

Se llevaron a cabo análisis densitométricos de las bandas resultantes de los experimentos de inmunodetección con los distintos anticuerpos. Para ello, se utilizó la herramienta “Volume Analysis Report” del programa Quantity One v4.6.2 (Bio-Rad). Los datos obtenidos, expresados inicialmente en valores de densidad (intensidad/mm<sup>2</sup>), se representaron gráficamente mediante el programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp.) en forma de porcentajes relativos referidos al valor del estadio de Polen Maduro.

### 2.19.2. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia por área.

La intensidad de la fluorescencia se cuantificó utilizando el software ImageJ. Los datos

son el promedio de un mínimo de nueve imágenes obtenidas en tres experimentos independientes. Los datos obtenidos, expresados inicialmente en valores de densidad (intensidad/mm<sup>2</sup>), se representaron gráficamente mediante el programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp.) en forma de porcentajes relativos referidos al valor del estadio de Polen Maduro.

### **2.20. Análisis estadísticos.**

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos en el presente trabajo se llevaron a cabo mediante el programa SPSS Statistics v22.0 para Windows (SPSS Inc.). Para evaluar la normalidad de los datos, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks combinada con Kolmogórov-Smirnov. Las comparaciones de las medias de las variables continuas para tres o más grupos se llevaron a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante el test de Mann-Whitney. Se consideraron significativos los valores de  $p < 0,05$ . Para verificar la importancia estadística de las medias de las variables discontinuas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA one way) en combinación con un test de rango de variable múltiple (Duncan y Bonferroni post hoc). Se consideraron significativos los valores de  $p < 0,05$ .

# **R**ESULTADOS





- 1.1. Identificación, caracterización y análisis *in silico* de los principales genes involucrados en la síntesis de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo.**
- 1.2. Identification and *in silico* Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil.
- 1.3. Identificación, caracterización y análisis *in silico* de los enzimas principales implicados en la detoxificación dependiente de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo.



Debido a la importancia del olivo (*Olea europaea* L.) como principal cultivo en los países mediterráneos, recientemente se ha generado *de novo* un transcriptoma a partir de los tejidos reproductivos del olivo (ReprOlive, <http://reprolive.eez.csic.es>) que ha sido también anotado (Carmona *et al.* 2015). Tal herramienta nos permitió estudiar la compleja red enzimática implicada en el metabolismo de GSH. Por otro lado, la información genómica recién liberada con respecto al olivo se ha utilizado para refinar y complementar nuestras búsquedas (Cruz *et al.* 2016).

El glutatión se sintetiza a partir de los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina, en dos pasos ATP dependientes. En primer lugar, la  $\gamma$ -EC se sintetiza a partir del L-glutamato y la cisteína mediante la acción de la enzima  $\gamma$ -ECS. En segundo lugar, la glicina se añade al C terminal de la  $\gamma$ -EC, a través de la enzima GS.

### **1.1.1. Recuperación, clonación y análisis filogenético de las secuencias de las enzimas $\gamma$ -ECS y GS de los tejidos reproductivos del olivo.**

Se seleccionaron nueve clones putativos de  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS) y cuatro de GS de olivo a partir de referencias bibliográficas y de diferentes bases de datos (OliveEST, EST, TOBEST, OLEAGEN, ReprOlive). De estos nueve clones de  $\gamma$ -ECS, ocho entradas fueron identificadas entre los datos en bruto del transcriptoma reproductivo de olivo, ya fuesen secuencias parciales o secuencias completas, correspondientes a  $\gamma$ -ECS (Tabla 12.A). Sin embargo los cuatro clones de GS se identificaron dentro del transcriptoma reproductivo de olivo como secuencias parciales correspondientes a GS (Tabla 13.A). La identificación se llevó a cabo mediante *BLAST* de cada secuencia individual contra la base de datos GenBank. Por otro lado, estos doce inputs previamente seleccionados fueron confrontados individualmente por *BLAST* contra la base de datos genómica de *Olea europaea*. Las Tablas 12.B y 13.B muestran los resultados obtenidos en este segundo *BLAST*.

De las ocho secuencias de  $\gamma$ -ECS, sólo 3 resultaron ser exclusivamente de tejidos reproductivos (ninguna de ellas se expresó en tejidos vegetativos):  $\gamma$ -ECS\_Pistil\_6 y  $\gamma$ -ECS\_Pistil\_7, que son específicas de pistilo; y  $\gamma$ -ECS\_Pollen\_1, que es específica de polen.  $\gamma$ -ECS\_Pistil\_1,  $\gamma$ -ECS\_Pistil\_5 y  $\gamma$ -ECS\_Pistil\_7 tienen una alta homología (más del 98%) con la entrada OE6A102325T3 de la base de datos de ensamblaje y anotación genómica de *Olea europaea*. Así mismo,  $\gamma$ -ECS\_Pistil\_2,  $\gamma$ -ECS\_Pistil\_6 y  $\gamma$ -ECS\_Pollen\_1 se identifican con OE6A090660T6 (más del 99,5%), y  $\gamma$ -ECS\_Pistil\_3 y  $\gamma$ -ECS\_Pistil\_4 se identifican respectivamente con OE6A102325T2 (99,51 %) y OE6A102325P3 (97,8%). Todas estas secuencias del genoma de olivo fueron identificadas después como la forma cloroplastidial (X2,  $\gamma$ -ECS2) mediante *BLAST* [Olive genome and annotation files. <http://denovo.cnag.cat/genomes/olive/>].

**A**

Sequence	Sequence name	Lenght (pb)
$\gamma$ -ECS_Pistil_1	st11_olive_016083	1113
$\gamma$ -ECS_Pistil_2	st11_olive_004815	1768
$\gamma$ -ECS_Pistil_3	st11_olive_049627	611
$\gamma$ -ECS_Pistil_4	st11_olive_046807	629
$\gamma$ -ECS_Pistil_5	st11_olive_053229	591
$\gamma$ -ECS_Pistil_6	st11_olive_059922	549
$\gamma$ -ECS_Pistil_7	st11_olive_054803	583
$\gamma$ -ECS_Pollen_1	po11_olive_010602	321

**B**

Sequence	Genomic homologous	Homology	Identity
$\gamma$ -ECS_Pistil_1	OE6A102325T3	98,14	glutamate-cysteine ligase ( $\gamma$ -ECS2)
$\gamma$ -ECS_Pistil_2	OE6A090660T6	99,51	glutamate-cysteine ligase ( $\gamma$ -ECS2)
$\gamma$ -ECS_Pistil_3	OE6A102325T2	99,51	glutamate-cysteine ligase ( $\gamma$ -ECS2)
$\gamma$ -ECS_Pistil_4	OE6A102325P3	97,8	glutamate-cysteine ligase ( $\gamma$ -ECS2)
$\gamma$ -ECS_Pistil_5	OE6A102325T3	99,74	glutamate-cysteine ligase ( $\gamma$ -ECS2)
$\gamma$ -ECS_Pistil_6	OE6A090660T6	99,71	glutamate-cysteine ligase ( $\gamma$ -ECS2)
$\gamma$ -ECS_Pistil_7	OE6A102325T3	98,05	glutamate-cysteine ligase ( $\gamma$ -ECS2)
$\gamma$ -ECS_Pollen_1	OE6A090660T6	99,68	glutamate-cysteine ligase ( $\gamma$ -ECS2)

**Tabla 12.A.** Secuencias (*output sequences*) identificadas como  $\gamma$ -ECStras el cribado. Se indican las longitudes de las secuencias ensambladas. **B.**BLAST con el genoma de olivo.

Por otro lado, de las cuatro secuencias de GS, sólo 2 resultaron ser exclusivamente de tejidos reproductivos, pero tan sólo GS\_Pistil\_2 resultó ser específica de pistilo. Un 50% de las secuencias consultadas (incluida la única secuencia que se expresa en polen) tienen una altísima homología (más del 98%) con la entrada OE6A064658T1 de la base

de datos de ensamblaje y anotación genómica de *Olea europaea*. Es de destacar que GS\_Pistil\_2 (la única secuencia específica de pistilo obtenida del transcriptoma reproductivo) es la única secuencia que es homóloga a una entrada diferente a las demás, en este caso la homología fue del 98,77% con la entrada OE6A086980T1 de la base de datos genómica del olivo. La homología más alta de las secuencias de GS enfrentadas a la base de datos del genómico la presenta GS\_Pistil\_3, que se identifica en un 99,82% con OE6A064658T2. Las 4 secuencias del genoma de olivo fueron identificadas después como GS cloroplastidial (GS2) mediante *BLAST*.

Se alinearon las secuencias de  $\gamma$ -ECS y GS, tanto de pistilo y de polen de olivo, con diferentes  $\gamma$ -ECSs homólogas de otras plantas, utilizadas frecuentemente como modelo, procedentes de las bases de datos de libre acceso (Anexo1). A partir del alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas es posible observar la enorme conservación de la secuencia de estas enzimas implicadas en el metabolismo del glutatión a lo largo de la evolución.

<b>A</b>	<b>Sequence</b>	<b>Sequence name</b>	<b>Lenght (pb)</b>
	GS_Pistil_1	st11_olive_014603	1163
	GS_Pistil_2	st11_olive_042088	467
	GS_Pistil_3	st11_olive_045091	641
	GS_Pollen_1	po11_olive_010924	326

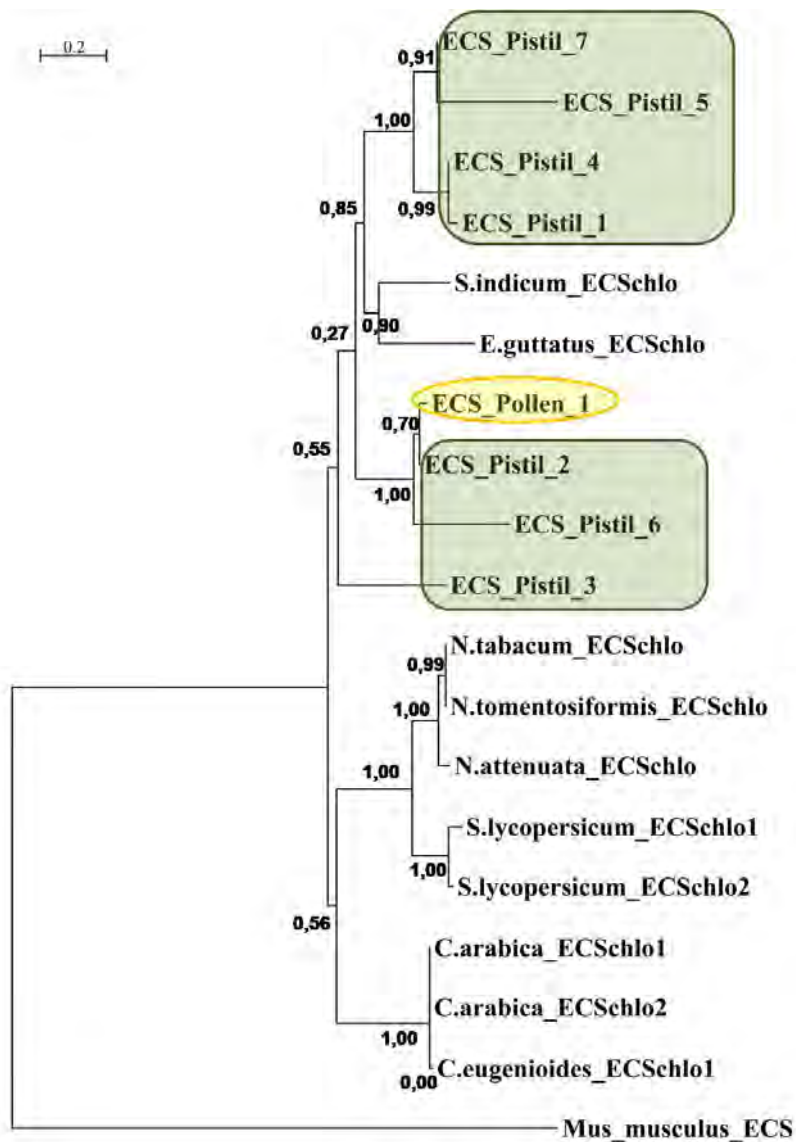
  

<b>B</b>	<b>Sequence</b>	<b>Genomic homologous</b>	<b>Homology</b>	<b>Identity</b>
	GS_Pistil_1	OE6A064658T1	99,66	Glutathione synthetase (GS2)
	GS_Pistil_2	OE6A086980T1	98,77	Glutathione synthetase (GS2)
	GS_Pistil_3	OE6A064658T2	99,82	Glutathione synthetase (GS2)
	GS_Pollen_1	OE6A064658T1	98,16	Glutathione synthetase (GS2)

**Tabla 13.** A. Secuencias (*output sequences*) identificadas como GS tras el cribado. Se indican las longitudes de las secuencias ensambladas. B. *BLAST* con el genoma de olivo.

Las Figuras 27 y 28 muestran el análisis filogenético que incluye los 8 productos identificados como  $\gamma$ -ECS en el transcriptoma anotado junto con una representación de  $\gamma$ -ECSs identificados en diferentes grupos taxonómicos. Las 8 secuencias  $\gamma$ -ECS rescatadas del transcriptoma reproductivo del olivo se identificaron como isoformas cloroplastidiales de la enzima, y se encuentran agrupadas en ramas cercanas dentro del árbol (Figuras 27 y 28). En la Figura 27, en donde se representa el análisis filogenético

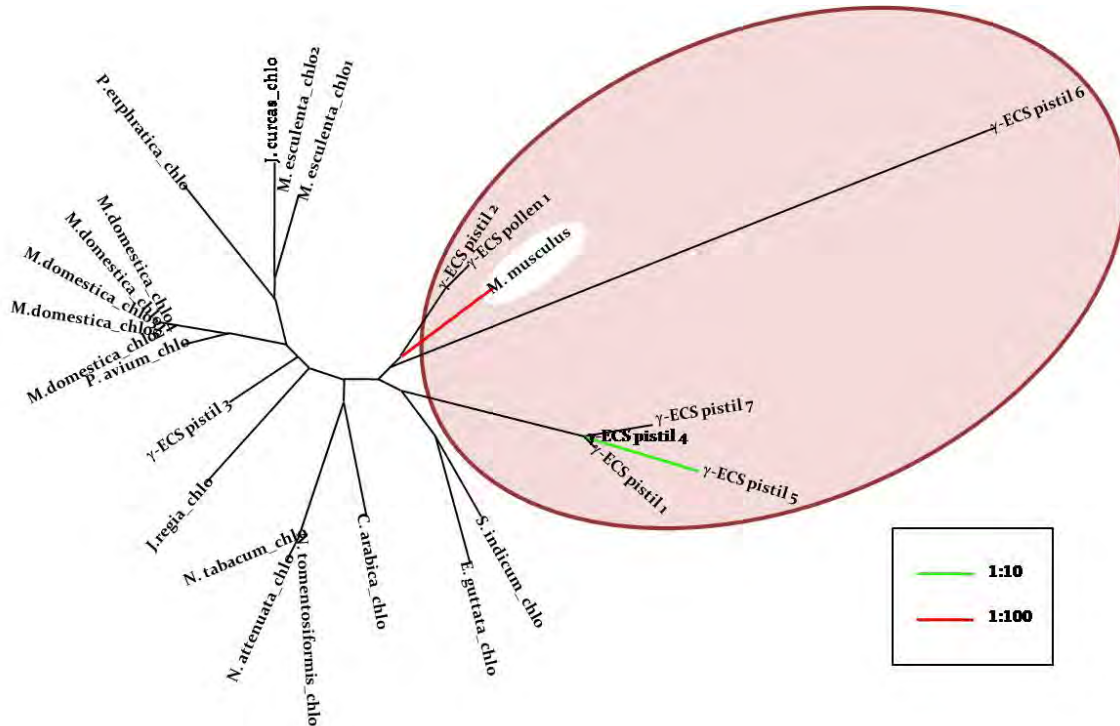
de las secuencias nucleotídicas, no se observó una clara diferenciación entre las isoformas 1 y 2 de la forma cloroplastidial (que es la homóloga a las 8 secuencias de olivo). De hecho, la alta similitud entre ambas isoformas fue particularmente evidente en algunas de las especies homólogas utilizadas para el estudio filogenético, como *S. lycopersicum* o *C. arabica*.



**Figura 27.** Relaciones filogenéticas entre los genes de  $\gamma$ -ECS de polen y pistilo de olivo con sus homólogos en los tejidos vegetativos y reproductivos de otras plantas. El árbol filogenético fue arraigado con una secuencia nucleotídica de  $\gamma$ -ECS de ratón.

Tras la traducción de las secuencias nucleotídicas correspondientes a  $\gamma$ -ECS de polen y pistilo de olivo, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas, a partir de las cuales se pudo realizar el análisis de la relación filogenética de estas proteínas con las de otras especies homólogas (ExpASy – SIB Bioinformatics Resource Portal, Translate tool). En la Figura 28, en donde se representa el análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas, junto con las isoformas cloroplastidiales de diversas especies vegetales, se agrupan filogenéticamente las secuencias de  $\gamma$ -ECS obtenidas del olivo. Las

secuencias de olivo se encuentran repartidas entre 2 ramas cercanas del árbol. Tampoco existe diferencia entre las 5 isoformas de la enzima  $\gamma$ -ECS cloroplastidial, como puede observarse en las secuencias de *M. doméstica* y *M. esculenta*. Este hecho nos da información de cuán conservada está esta enzima a lo largo de la evolución.



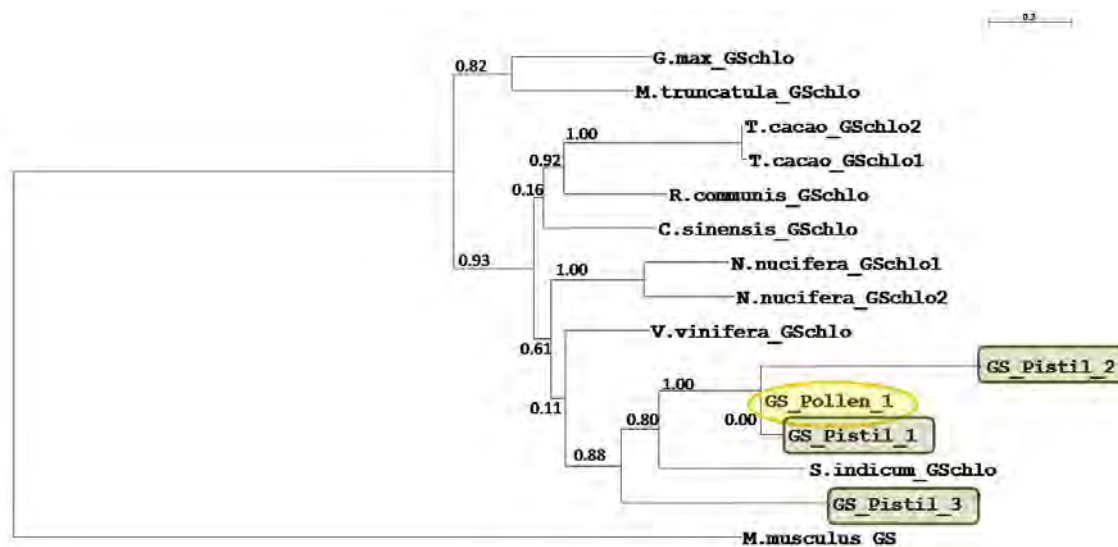
**Figura 28.** Relaciones filogenéticas entre las secuencias aminoacídicas de  $\gamma$ -ECS de polen y pistilo de olivo con sus homólogos en los tejidos vegetativos y reproductivos de otras plantas. El árbol filogenético fue arraigado con una secuencia aminoacídica también de  $\gamma$ -ECS de ratón.

En cuanto a la GS, las figuras 4.3 y 4.4 muestran el análisis filogenético que incluye los 4 productos identificados en el transcriptoma anotado junto con una representación de GSs identificados en diferentes grupos taxonómicos. En la Figura 4.4, en donde se representa el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas, no se observó una clara diferenciación entre las isoformas 1 y 2 de la forma cloroplastidial (que es la homóloga a las 4 secuencias de olivo), existiendo una alta similitud entre ambas isoformas en algunas de las especies homólogas utilizadas para el estudio filogenético (*T. cacao* *N. nucifera*). Las 4 secuencias GS rescatadas del transcriptoma reproductivo del olivo también se identificaron como isoforma cloroplastidial, y se encuentran agrupadas en la misma rama.

Una posterior traducción de las secuencias nucleotídicas de GS de polen y pistilo de olivo (ExpASy – SIB Bioinformatics Resource Portal, Translate tool) nos permitió obtener las secuencias aminoacídicas, a partir de las cuales se realizó un análisis filogenético de estas proteínas con las secuencias de otras especies homólogas. En la figura 4.4, se representa el análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas, y en este caso puede observarse una clara diferenciación entre las isoformas 1 (roja) y 2



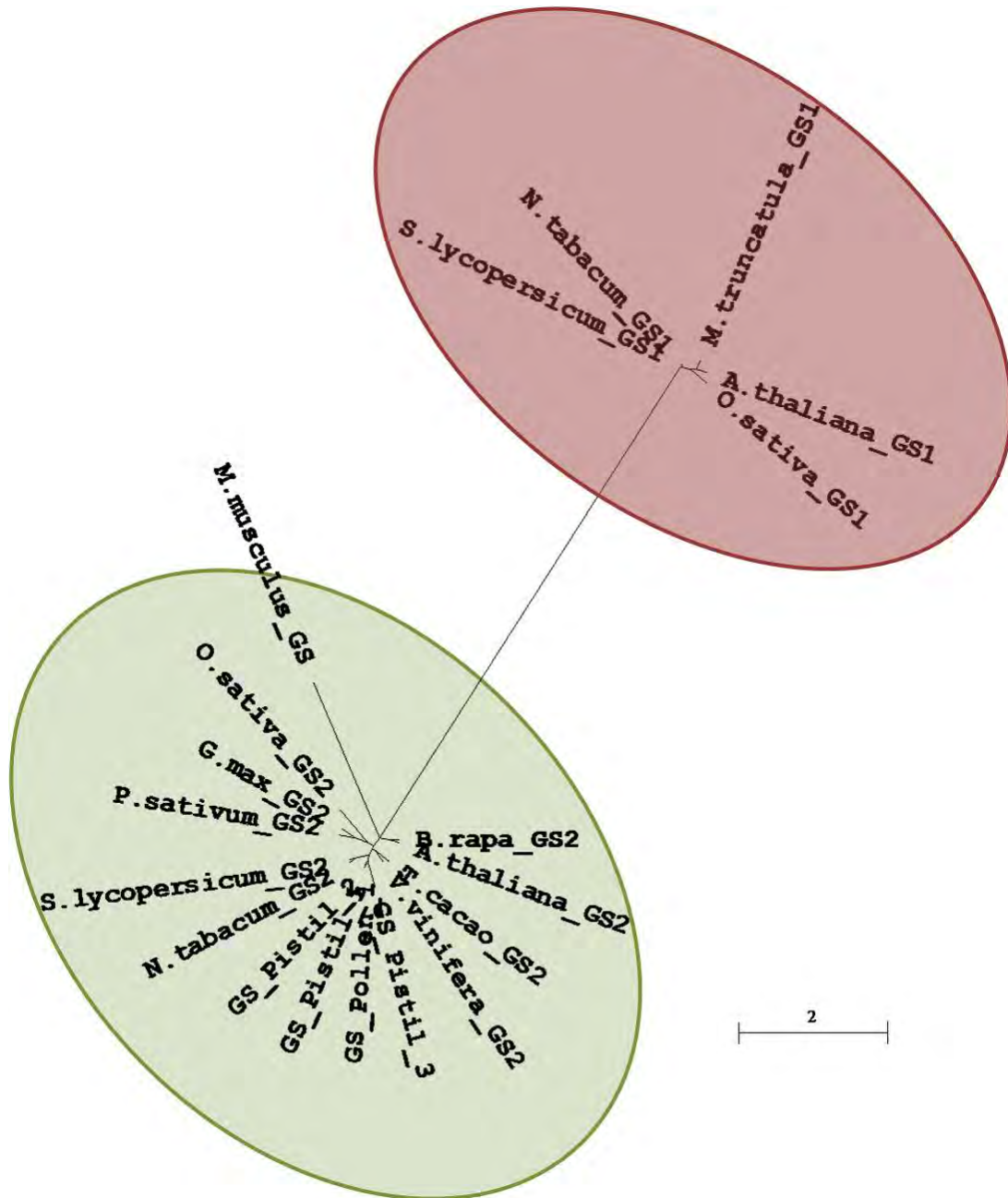
(verde) de la enzima GS. Las secuencias de GS obtenidas del olivo se agrupan filigenéticamente junto con las isoformas cloroplastidiales, "de tipo 2", de diversas especies vegetales.



**Figura 29.** Relaciones filogenéticas entre los genes de GS de polen y pistilo de olivo con sus homólogos en los tejidos vegetativos y reproductivos de otras plantas. El árbol filogenético fue arraigado con una secuencia nucleotídica de GS de ratón.

Estos resultados se ajustan tanto a lo obtenido en la identificación inicial de las secuencias mediante BLASTing como a la predicción de la localización celular, en cuanto a la isoforma del enzima se refiere.

En última estancia, se llevó a cabo la clonación de  $\gamma$ -ECS y la GS de polen de olivo mediante una estrategia de RT-PCR (tal y como se indica en los materiales y métodos de esta tesis). A partir del alineamiento múltiple de las distintas secuencias nucleotídicas obtenidas del Transcriptoma Reproductivo del Olivo, se diseñaron cebadores específicos con los cuales se amplificó un fragmento de 234 pb de la zona central del ADNc de  $\gamma$ -ECS2, y de 211pb de la zona central de la GS2. A partir de estas secuencias se diseñaron otros cebadores específicos con los cuales se amplificaron los extremos 5' y 3' del ADNc de  $\gamma$ -ECS2 y de la GS2 en polen de *Olea europea* mediante latécnica de RACE explicada con detalle en los materiales y métodos. La amplificación por PCR del cDNA y su posterior secuenciación (Secuenciación Sanger, ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer) nos permitió obtener las secuencias completas de la región codificante de  $\gamma$ -ECS2 (1768bp) y GR2 (1843bp) en polen de olivo (Anexo 2).



**Figura 30.** Relaciones filogenéticas entre las secuencias aminoácidas de GS de polen y pistilo de olivo con sus homólogos en los tejidos vegetativos y reproductivos de otras plantas. El árbol filogenético fue arraigado con una secuencia aminoácida también de GS de ratón.

	Locations (AA)	Modification	Substrate side
1	12	Phosphotyrosine(INSR)	VLMSQAGSSQYIHYKIIQCKV
2	15	Phosphotyrosine(INSR)	SQAGSSQYIHYKIIQCKVRYN
3	29	Phosphoserine(CK1)	QCKVRYNVVRSIASNMAESKK
4	32	Phosphoserine(CK1)	VRYNVVRSIASNMAESKKKEF
5	37	Phosphoserine(CK1)	VRSIASNMAESKKKEFFGSGR
6	48	Phosphoserine(CK1)	KKKEFFGSGRSSWNSLKVIRN
7	49	Phosphoserine(CK1)	KKEFFGSGRSSWNSLKVIRNM
8	52	Phosphoserine(CK1)	FFGSGRSSWNSLKVIRNMNLD
9	89	Phosphothreonine(PKC)	SPPTEDAVIATEPLTKEDLVG
10	93	Phosphothreonine(PKC)	EDAVIATEPLTKEDLVGYLAS
11	100	Phosphotyrosine(INSR)	EPLTKEDLVGYLASGCKPKEK
12	115	Phosphothreonine(CK2)	CKPKEKWRIGTEHEKFGFEFR
13	126	Phosphothreonine(CK2)	EHEKFGFEFRTLRPMPKYEQIA
14	132	Phosphotyrosine(INSR)	FEFRTLRPMPKYEQIAELLNGI
15	166	Phosphoserine(CK1)	KIIGLKQGKQSISLEPGGQFE
16	197	Phosphotyrosine(Jak)	QTCAEVNSHLYQVKAVAEELG
17	232	Phosphotyrosine(Jak)	KDIPVMPKGRYEIMRNYMPKV
18	238	Phosphotyrosine(Jak)	PKGRYEIMRNYMPKVGSGLD
19	264	Phosphoserine(CK1)	CTVQVNLDVFSEVDMIKKFRA
20	283	Phosphothreonine(PKC)	RAGLALQPVATALFANS PFTE
21	299	Phosphotyrosine(INSR)	SPFTEGKPNGYLSMRSQIWTD
22	304	Phosphoserine(CK1)	GKPNGYLSMRSQIWTDTDNNR
23	308	Phosphothreonine(CK2)	GYLSMRSQIWTDTDNNRSGML
24	310	Phosphothreonine(CK2)	LSMRSQIWTDTDNNRSGMLPF
25	325	Phosphoserine(CK1)	SGMLPFVFDDFSFGFEQYVDYA
26	331	Phosphotyrosine(Jak)	VFDDFSFGFEQYVDYALDVPMY
27	334	Phosphotyrosine(Jak)	DSFGFEQYVDYALDVPMYFAY
28	341	Phosphotyrosine(Jak)	YVDYALDVPMYFAYRKKXYID
29	344	Phosphotyrosine(Jak)	YALDVPMYFAYRKKXYIDCAG
30	349	Phosphotyrosine(INSR)	PMYFAYRKKXYIDCAGLSFRD
31	383	Phosphothreonine(CK2)	PNLNDWENHLTIFPEVRLKR
32	384	Phosphothreonine(CK2)	NLNDWENHLTIFPEVRLKRY
33	394	Phosphotyrosine(INSR)	TIFPEVRLKRYLEMARGADGGP
34	432	Phosphothreonine(CK2)	EISLQNVVDMTADWTRERQM
35	450	Phosphotyrosine(Jak)	RQMLRNAVPKYGLQTPFRDGL
36	454	Phosphothreonine(PKC)	RNAVPKYGLQTPFRDGLLKHV
37	484	Phosphothreonine(PKC)	DGLERRGFKETGFLNEVTEVA
38	496	Phosphothreonine(PKC)	FLNEVTEVARTGV TSAEKLELLE
39	499	Phosphothreonine(PKC)	EVTEVARTGV TSAEKLELYH
40	500	Phosphothreonine(PKC)	VTEVARTGV TSAEKLELYHE
41	508	Phosphotyrosine(INSR)	VTSAEKLELYHEKWGRXVDP

Tabla 14. Aminoácidos propensos a la fosforilación dentro de la secuencia  $\gamma$ -ECS según lo predicho por PhosPhAt / PlantPhos.

### **1.1.2. Predicción in silico de la localización celular, características bioquímicas y modificaciones post-traduccionales de la $\gamma$ -ECS y la GS.**

Mediante el software Plant-mPloc fue posible predecir la localización celular de las secuencias clonadas de la  $\gamma$ -ECS y la GS. Tanto  $\gamma$ -ECS como GS aparecían localizadas de forma predictiva en el cloroplasto. La secuencia nucleotídica completa de  $\gamma$ -ECS de polen obtenida mediante clonación codifica un polipéptido de 526 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 59,71 KDa y un punto isoeléctrico de 7,05 (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). Esta secuencia no posee posibles sitios de N-glicosilación. En el caso de la GS, la secuencia nucleotídica completa de polen clonada codifica un polipéptido de 491 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 54,52 KDa y un punto isoeléctrico de 6,26. La GS del polen de olivo posee un posible sitio de N-glicosilación en la posición 444.

Los algoritmos PhosPhAt y PlantPhos nos permitieron predecir 41 sitios putativos de fosforilación post-traducciona l en la secuencia clonada de la  $\gamma$ -ECS (Tabla 14). En 2 de las 8 secuencias de  $\gamma$ -ECS rescatadas del transcriptoma reproductivo del olivo, se identificaron sitios potenciales de S-nitrosilación en 2 péptidos que contenían Cys usando el software GPS-SNO, como se describe en la Tabla 4.4. Además, en el extremo N-terminal de la proteína madura, se predijo acetilación: en la glicina en la posición 1 de ECS\_Pistil\_3 con un 46,7% de probabilidad, en la serina en la posición 2 de ECS\_Pistil\_4 con un 49,9% de probabilidad, en la serina en la posición 3 de ECS\_Pistil\_6 con un 50,1% de probabilidad y en la serina en la posición 1 de ECS\_Pollen\_1 con un 49,2% de probabilidad. Por el contrario, no se predijeron la presencia de sitios de miristoilación o palmitoilación.

También mediante PhosPhAt y PlantPhos se predijeron 19 sitios putativos de modificación post-traducciona l en la secuencia clonada de la GS (Tabla 16). En las 4 secuencias de GS rescatadas del transcriptoma reproductivo del olivo, se identificaron sitios potenciales de S-nitrosilación en hasta 7 péptidos que contenían Cys usando el software GPS-SNO, como se describe en la Tabla 4.6. Además, se predijo que la metionina N-terminal de la proteína madura puede ser acetilada con un 99% de probabilidad en las secuencias de pistilo. Sin embargo en el caso del polen, la metionina inicial puede sufrir excisión y el aminoácido en la posición 2 (V) sufrir acetilación en un 64% de probabilidad. Por el contrario, no se predijeron la presencia de sitios de miristoilación o palmitoilación.

Sequence	Position	Peptide
ECS_Pistil_4	12	PQTGSSHCMHFDTMQ
ECS_Pollen_1	5	SMRLCALPAFWV

**Tabla 15.** Péptidos que contienen Cys propensas a la S-nitrosilación dentro de las secuencias ECS\_Pistil\_4 y ECS\_Pollen\_1 del enzima  $\gamma$ -ECS, según la predicción realizada mediante el algoritmo GPS-SNO.

	Locations (AA)	Modification	Substrate side
1	11	O-linked_Serine_Man	SLSYSSSST
2	11	Phosphoserine(IKK)	SLSYSSSST
3	15	O-linked_Threonine_Man	SSSSTFIAT
4	19	O-linked_Threonine_Man	TFIATTTLS
5	20	O-linked_Threonine_Man	FIATTLSS
6	21	O-linked_Threonine_Man	IATTLSSS
7	55	Phosphoserine(CDK)	LTMESPKPI
8	150	Phosphoserine(CK1)	QDSLSTRTRK
9	187	Phosphotyrosine(INSR)	HRSDYMLDE
10	195	Phosphoserine(CK1)	EETKLLQI
11	240	N-linked_Asparagine	RVPRNGSTS
12	244	Phosphoserine(ATM)	NGSTSQFAD
13	293	Phosphothreonine(PKC)	HNIVTIRKS
14	297	Phosphoserine(PKG)	TIRKSLAEV
15	329	Phosphotyrosine(INSR)	YRSGYTPRD
16	329	Phosphotyrosine(Syk)	YRSGYTPRD
17	452	Phosphotyrosine(INSR)	ENAAVILMQ
18	503	Phosphotyrosine(Syk)	EHSGYLMRT
19	512	Phosphoserine(CK1)	KVSSSDEGG

**Tabla 16.** Aminoácidos propensos a la fosforilación dentro de la secuencia GS según lo predicho por PhosPhAt / PlantPhos.

Sequence	Position	Peptide
GS_Pistil_1	8	MYDQHWLCTTLYERY
	80	EQSSAIKPSIAYHL
	119	DIVKLRKCFAGLWSL
GS_Pistil_2	8	MYDQHWICTTLKERY
	80	EQSSAIKPSIAYHL
GS_Pistil_3	78	ESHWKQACQAPIFN
GS_Pollen_1	18	MYDQHWLCTTLKERY

**Tabla 17.** Los péptidos que contienen Cys son propensos a la S-nitrosilación según la predicción realizada mediante el algoritmo GPS-SNO.

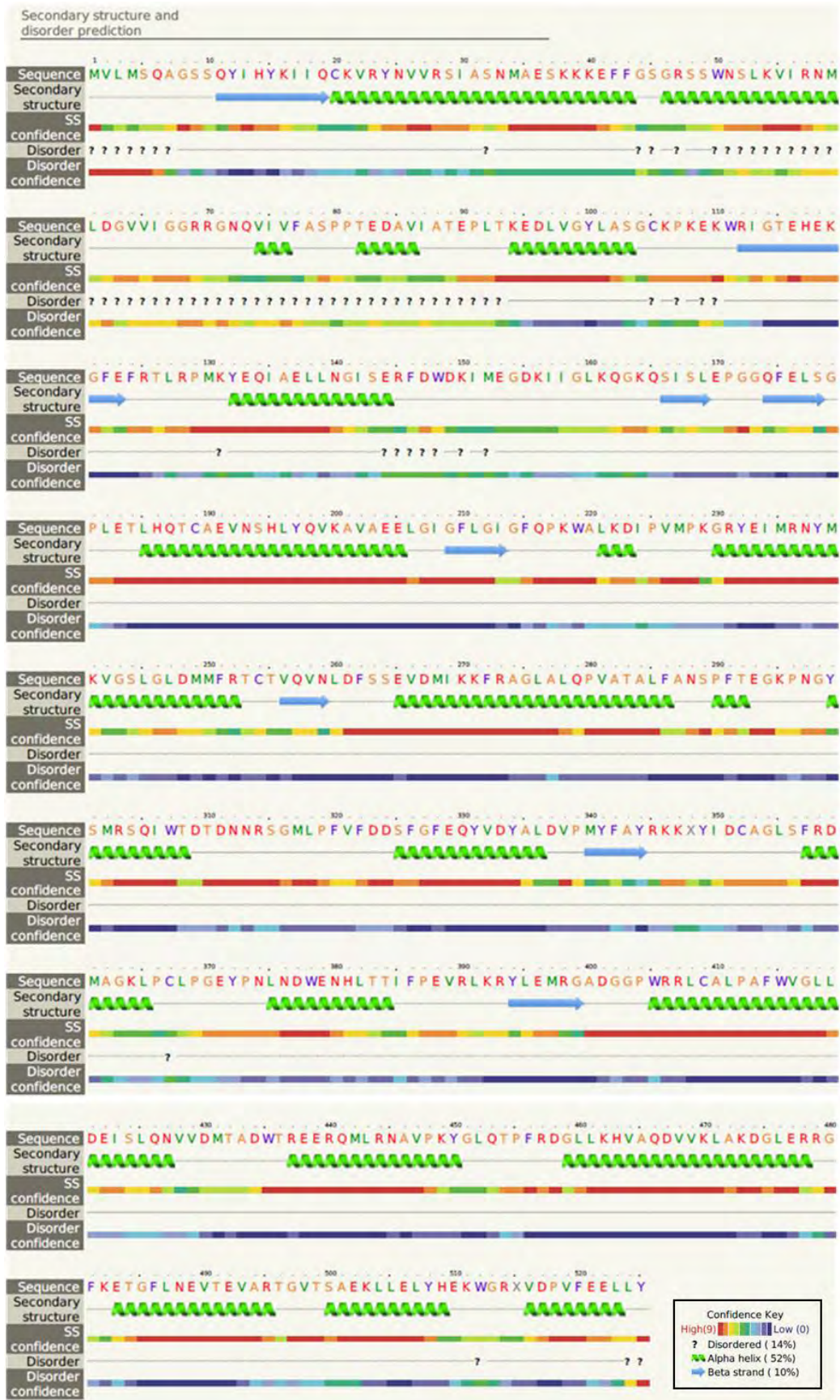
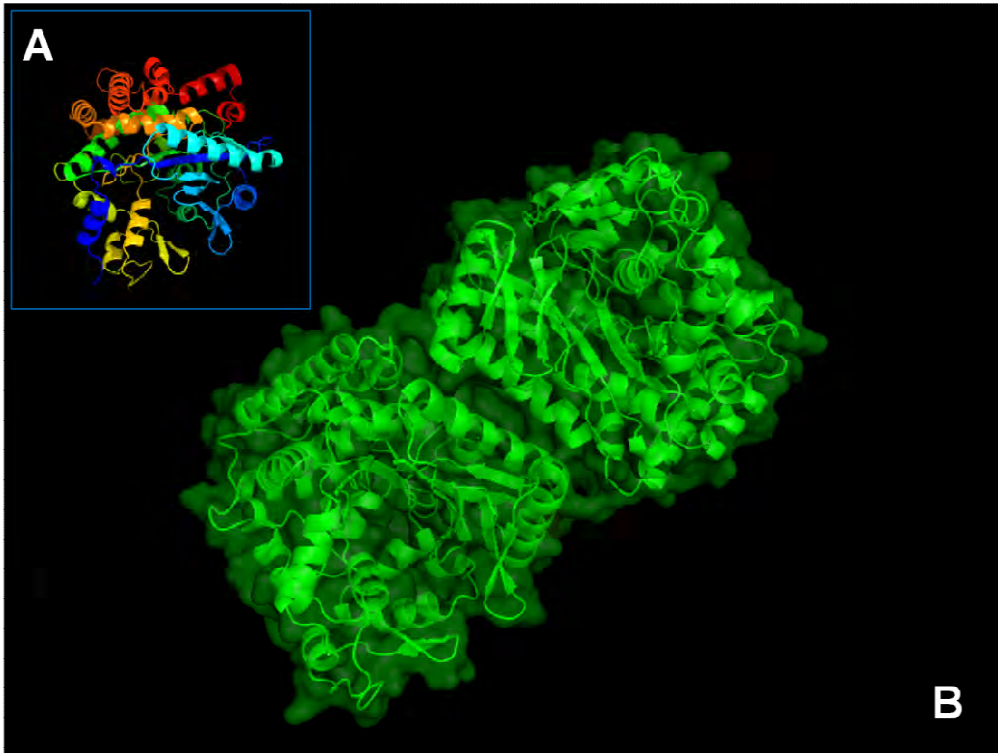


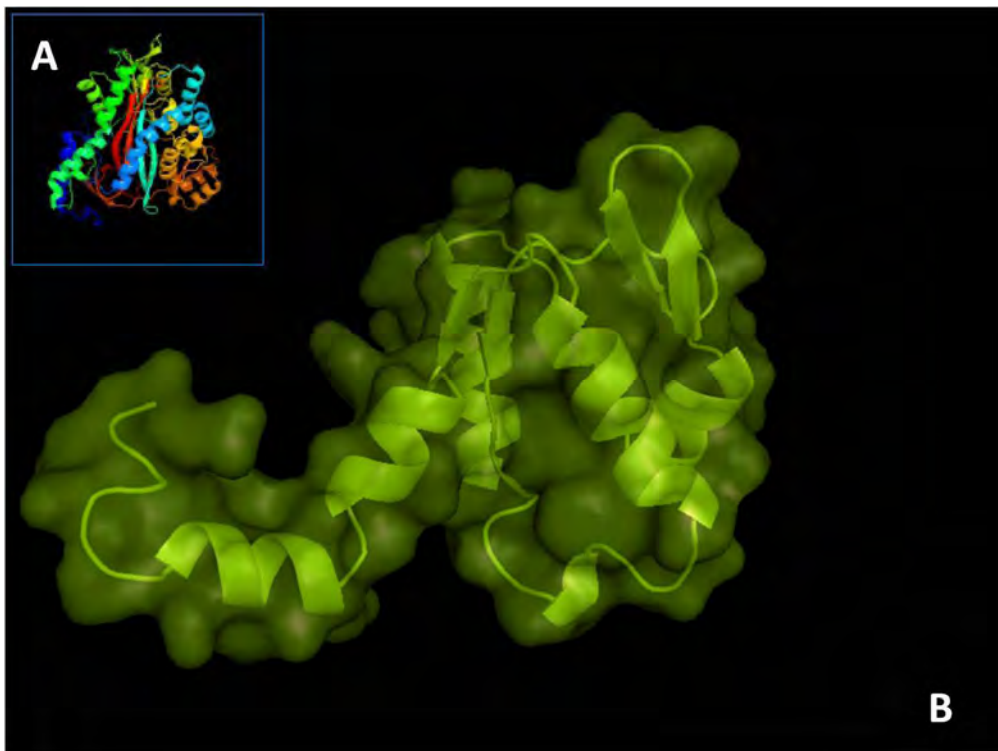
Figura 31. Predicción de la estructura secundaria de  $\gamma$ -ECS en polen de olivo.



Figura 32. Predicción de la estructura secundaria de GS en polen de olivo.



**Figura 33.**A) Predicción de la estructura 3D en la  $\gamma$ -ECS del polen de olivo (mediante Phyre2). B) Modelado 3D de la  $\gamma$ -ECS de polen de olivo.



**Figura 34.**A) Predicción de la estructura 3D en la GS del polen de olivo (mediante Phyre2). B) Modelado 3D de la GS de polen de olivo.



**1.3. Predicción de la estructura secundaria y modelado 3D de las enzimas  $\gamma$ -ECS y GS de polen de olivo.**

Las secuencias clonadas de  $\gamma$ -ECS y GS de polen se utilizaron para predecir la estructura secundaria (Figuras 31 y 32) y el modelado 3D (Figuras 33 y 34) de estas enzimas. La estructura predicha confirmó que la secuencia de aminoácidos traducida de  $\gamma$ -ECS era consistente con los modelos 3D disponibles desarrollados mediante el uso de software de reconocimiento de plegado (c2gwcE), con una cobertura de la secuencia del 83% y un nivel de confianza del 100%.

Al mismo tiempo, la estructura predicha confirmó que la secuencia aminoacídica de la GS de polen era consistente con los modelos 3D disponibles desarrollados mediante el uso de software de reconocimiento de plegado (c3kalB), con una cobertura de identidad del 97% y un nivel de confianza del 100%.

- 1.1. Identificación, caracterización y análisis *in silico* de los principales genes involucrados en la síntesis de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo.
- 1.2. **Identification and in silico Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil.**
- 1.3. Identificación, caracterización y análisis *in silico* de los enzimas principales implicados en la detoxificación dependiente de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo.



El capítulo 1.2 (Identification and *in silico* Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil) ha sido publicado con la siguiente referencia:

**García-Quirós, E.,** Carmona, R., Zafra, A., Claros, M.G., & Alché, J.D. (2017). Identification and *in silico* Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil. Springer. IWBBIO 2017, Part II, LNBI 10209, pp. 185–195, 2017. DOI:10.1007/978-3-319-56154-7\_18.

La versión publicada puede verse en el apartado Publicaciones.

---

## **Identification and *in silico* Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil.**

Estefanía García-Quirós<sup>1</sup>, Rosario Carmona<sup>1,2</sup>, Adoración Zafra<sup>1</sup>, M. Gonzalo Claros<sup>2</sup>, and Juan de Dios Alché<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain  
{estefania.garcia, dori.zafra, juandedios.alche}@eez.csic.es

<sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga, Málaga, Spain  
{rosariocarmona, claros}@uma.es

**Abstract.** Glutathione (GSH) protects proteins against oxidation of their thiol-containing groups, by alternatively becoming the subject of oxidation, forming glutathione disulfide (GSSG). Appropriate GSH:GSSG levels are maintained by glutathione reductase (GR), a homodimeric flavoprotein which uses NADPH to reduce one GSSG molecule to two of GSH. This enzyme has been characterized in several species, and described as highly conserved, with two isoforms only. Heterogeneity and disctinctiveness of plant reproductive tissues led us to investigate the presence of GR sequences. A *de novo* assembled and annotated olive reproductive transcriptome was subjected to screening, which allowed us to identify at least 11 GR homologues (1 pollen-specific and 10 from pistils). Primers were designed, and full-length sequences were obtained through PCR. *In silico* analysis, including phylogeny, 3-D modeling of N-terminus, and prediction of cellular localization and post-translational modifications was carried out to shed light into the involvement of olive pollen-intrinsic GR in reproductive development.

**Keywords:** Glutathione reductase · Pollen · Pistil · ROS · Glutathione

### **Introduction**

Olive tree is one of the most important crops in the Mediterranean area, representing one 95% of globally cultivated olive trees, and the source of olive oil, accounting the sixth most abundant vegetable oil produced worldwide. It exhibits a high tolerance towards salinity and drought as compared to other salinity susceptible fruit trees as recently reviewed [1]. Resistance to different abiotic stresses is modulated by reactive oxygen species (ROS) metabolism in numerous plant species. Concomitantly, other metabolically related chemicals like total glutathione, reduced glutathione (GSH) and

oxidized glutathione (GSSG) contents, GSH/GSSG ratio and glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity have been described as key actors in the response to salt-stress in plants [2]. Compounds with high ability to oxidize GSH include ROS such as superoxide or hydroxyl radicals. Glutathione reductase (GR) is a flavoprotein enzyme that functions as dimeric disulfide oxidoreductase and utilizes an FAD prosthetic group and NADPH to reduce one molar equivalent of GSSG to two molar equivalents of GSH [3-4]. Classical fractionation studies described higher GR activities in chloroplasts [5] but it has also been detected in mitochondria, cytosol and peroxisomes [4, 6-9]. Of the four enzymes of glutathione metabolism, GR is by far the best genetically characterized. GR is conserved between all kingdoms. In plant genomes, two GR genes are encoded. Of the two genes encoding GR in *Arabidopsis*, the second, GR2 (At3g54660), encodes a GR homologous to the GR pea protein with dual localization in plastids and mitochondria [10]. Such dual localization was also demonstrated in *Arabidopsis* [11]. GR cytosolic activity is encoded by GR 1 (At3g24170), but proteomic analysis also suggested that this gene encoded GR peroxisomal activity [12]. From the results obtained in peas it appears that the peroxisomal enzyme represents a relatively low part of the gene product GR1 [9], responsible for 30 to 60% of total enzyme activity in leaves of *Arabidopsis* [13]. Available information suggests that GR1 is therefore primarily addressed to the cytosol, although an intriguing question is the physiological significance of its location in peroxisomes, which can be important sources of ROS and related signals [14-17]. Glutathione reductase is a homodimer consisting of 52Kd monomers, each containing 3 domains. GR exhibits single sheet, double layered topology where an anti-parallel beta-sheet is largely exposed to the solvent on one face while being covered by random coils on the other face [18]. This includes a NADPH-binding Domain, FAD-binding domain(s) and a dimerization domain. Each monomer contains 478 residues and one FAD molecule. As mentioned, two GRs are encoded in *Arabidopsis thaliana* [19], both with an isoform in pollen and pistil nonspecific. GR activity is essential for proper pollen development and pollen tube growth, leading to fertilization [20]. Although it is expected that the pollen GR is mainly of type I, and therefore located in the cytosol, a chloroplastidial localization has also been described.

Recently a complete transcriptome of reproductive tissues olive (pollen, pistil and seed) was generated from cDNA using a / Roche 454 Titanium + platform [21]. We have riddled such transcriptome to identify the presence of GR transcripts in the olive reproductive tissues, using the retrieved sequences for further sequence confirmation and bioinformatics analysis.

## **Materials and Methods**

### **Screening and identification of GR transcripts in the olive reproductive transcriptome.**

Different strategies for selecting these transcripts were defined. The searches were conducted by definition using GO, EC, KEGG and InterPro terms and codes, orthologues and gene names in the annotated transcriptome. BLAST searches were carried on using heterologous sequences available in public databases and well established library resources well established as TAIR, GenBank and the recent Plant DNA C-values Database and Olive genome and annotation files [22-23].

## **Olive pollen GR cloning and sequencing**

Olive pollen transcriptome retrieved sequences corresponding to GR-homologues (partial and complete sequences) were used to design primers in order to amplify the known sequence from pollen cDNA. Plant material was obtained according to [24]. Total RNA from mature pollen was extracted using the RNeasy Plant Total RNA kit (Quiagen, U.S.A.) and first-strand cDNA was synthesized with oligo(dT)19 primer and M-MLV reverse transcriptase (Fermentas). Standard PCR was carried out using Taq polymerase (Promega) and Pfu (Promega) to obtain or confirm nucleotide sequences. Full sequences were obtained by means of both 3'- and 5'-RACE (smarter RACE, Clontech), following manufacturer's specifications. pGEMT-easy (Promega) was used for cloning purposes. Sanger sequencing was achieved in the facilities of the EEZ-CSIC institute in Granada.

## ***In silico* analysis of the sequences**

Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL OMEGA multiple alignment tool with default parameters [25]. Phylogenetic trees were constructed with the aid of the software Seaview [26] using the maximum likelihood (PhyML) method and implementing the most probable nucleotide substitution model (GTR) previously calculated by JmodelTest2 [27]. The branch support was estimated by bootstrap resampling with 100 replications.

For the prediction of protein cell localization, the software Plant-mPloc [28] was used. PhosPhAt [29] and PlantPhos [30] were used to predict serine, threonine and tyrosine phosphorylation. GPS-SNO 1.0 was used for prediction of S-nitrosylation sites [31]. TermiNator was used to predict N-terminal methionine excision, acetylation, myristoylation or palmitoylation [32].

Structure prediction of GR2 N-terminal region was modeled by using the fold recognition-based Phyre2 server [33], with c4dnaA as the template and a 100% confidence. 3D modeling was carried out by PyMol (<https://www.pymol.org/>).

## **Results**

### **Recovery, cloning and phylogenetic analysis of GR sequences from the olive reproductive transcriptome.**

Eleven entries were identified within the raw data transcriptome, either as partial sequences or as complete sequences corresponding to GR (Table 17A) by BLASTing each individual sequence against the GenBank database. On the other hand, these eleven previously selected inputs were individually confronted by BLASTing against the genomic *Olea europaea* assembly and annotation database. Table 1B shows the results obtained in this second BLASTing. Most query sequences have high homology (more than 94%) with the input OE6A000198T2 from genomic *Olea europaea* assembly and annotation database. Noteworthy, GR\_Pollen\_1 (the only pollen specific sequence obtained from the reproductive transcriptome), and GR\_Pistil\_8 have full identity with OE6A112067T2, whereas GR\_Pistil\_1 has also full identity with Oe\_s02429. All these olive genome sequences were identified as chloroplastial GRs (GR2) by blasting [23].

**Table 17. Upper panel.** Output sequences identified as GR after screening. The lengths of the assembled sequences are indicated. **Lower panel.** Blasting with genome from olive.

Sequence	Sequence Name	Length (pb)
GR_Pistil_1	st11_olive_039691	687
GR_Pistil_2	st11_olive_007100	193
GR_Pistil_3	st11_olive_003323	128
GR_Pistil_4	st11_olive_051636	513
GR_Pistil_5	st11_olive_003115	2020
GR_Pistil_6	st11_olive_003323	1974
GR_Pistil_7	st11_olive_004231	1838
GR_Pistil_8	st11_olive_018143	1049
GR_Pistil_9	st11_olive_004231	1838
GR_Pistil_10	st11_olive_003323	1979
GR_Pollen_1	po11_olive_018706	435

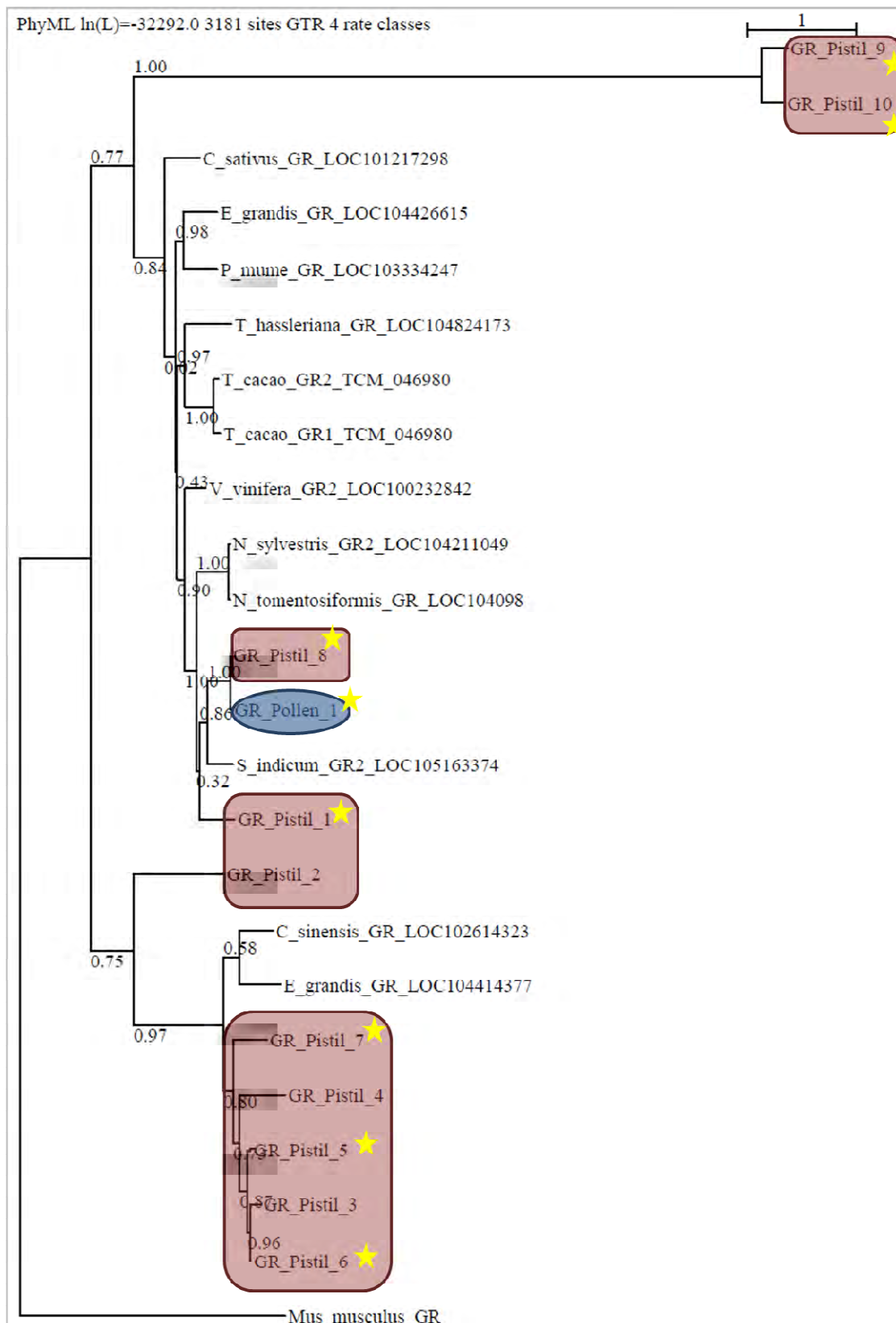
Sequence	Genomic homologous	Homology	Identity
GR_Pistil_1	Oe6_s02429	100%	Glutathione reductase
GR_Pistil_2	Oe6_s07823	95,53%	Uncharacterized
GR_Pistil_3	OE6A000198T2	100%	Glutathione reductase
GR_Pistil_4	OE6A000198T2	94,64%	Glutathione reductase
GR_Pistil_5	OE6A091299T1	98,24%	Glutathione reductase
GR_Pistil_6	OE6A000198T2	94,88%	Glutathione reductase
GR_Pistil_7	OE6A117561T3	99,67%	Glutathione reductase
GR_Pistil_8	OE6A112067T2	99,43%	Glutathione reductase
GR_Pistil_9	OE6A117561T3	99,67%	Glutathione reductase
GR_Pistil_10	OE6A000198T2	94,83%	Glutathione reductase
GR_Pollen_1	OE6A112067T2	100%	Glutathione reductase

Figure 35 shows a phylogenetic analysis including the 11 outputs identified in the annotated transcriptome together with a representation of GRs identified in different taxonomical groups. No clear differentiation between GR1 and GR2 was observed, and the high similarity between both isoforms was particularly evident in one of the homologous species used for phylogenetic study (*T. cacao*). Most (8 of 11) of the rescued GR sequences from the olive reproductive transcriptome were identified as chloroplastial isoforms of the enzyme, and two of these forms (GR\_pistil\_9 and 10) clustered together, slightly apart from the remaining sequences. This discovery corroborates the data obtained from recent studies showing that in fact the isoform involved in pollen development is GR2 [13].

***In silico* prediction of cellular localization and post-translational modifications.**

PCR amplification of cDNA enabled us to obtain the whole sequence of the coding region of GR1 (1978bp) and a large proportion of the coding region of GR2 (1839bp). The nucleotide sequences of both genes were subjected to the present analysis. After using Software Plant-mPloc we were able to predict the cellular localization of GR1 in the cytoplasm and the plasma membrane, and the localization of GR2 in chloroplasts and the nucleus, as it occurs with AtGR1 and AtGR2 from *Arabidopsis thaliana* and GRs from other species.

PhosPhAt and PlantPhos allowed us to predict 10 putative post-translational modification sites (Table 18). In 5 sequences rescued from the olive reproductive transcriptome, potential S-nitrosylation sites were identified in up to 10 Cys-containing peptides by using the software GPS-SNO, as described in Table 19. Moreover, the N-terminus methionine of the mature protein was predicted to be acetylated with a 97% probability for GR2 and a 78% probability for GR1 by using the prediction tools cited in material and methods. On the contrary, the presence of myristoylation or palmitoylation sites was not predicted.



**Figure 35.** Phylogenetic relationships between olive pollen GRs and their homologues in vegetative and reproductive tissues. The phylogenetic tree was rooted with a sequence of mouse GR. Yellow stars indicate sequences corresponding to the GR2 (chloroplastial isoform).



**Table 18.** Amino acids prone to phosphorylation within the GR sequence as predicted by PhosPhAt/PlantPhos.

	Locations (aa)	Modification	Substrate side
1	5	Phosphoserine(CK1)	EDNH <b>S</b> TVED
2	182	Phosphothreonine(CK2)	ELAI <b>T</b> SDEA
3	188	Phosphoserine(CK1)	DEAL <b>S</b> LEEF
4	203	Phosphotyrosine(INSR)	LGGG <b>Y</b> ISVE
5	203	Phosphotyrosine(Jak)	LGGG <b>Y</b> ISVE
6	256	Phosphothreonine(PKC)	HPRT <b>L</b> TEL
7	315	Phosphotyrosine(Jak)	KVDE <b>Y</b> SRTS
8	316	Phosphoserine(CK1)	VDE <b>Y</b> SRTSV
9	334	N-linked Asparagine	TNR <b>M</b> NLTPV
10	360	Phosphotyrosine(INSR)	SKPD <b>Y</b> SNIA

**Table 19.** Cys-containing peptides prone to S-nitrosylation within the GR\_Pistil\_5, GR\_Pistil\_6, GR\_Pistil\_7, GR\_Pistil\_9 and GR\_Pistil\_10 sequences as predicted by GPS-SNO.

Sequence	Position	Peptide	Sequence	Position	Peptide
GR_Pistil_5	51	YGAKVGICELPFHPI	GR_Pistil_6	51	YGAKVGICELPFHPI
	70	IGGVGGTCVIRGCVP		70	IGGVGGTCVIRGCVP
	75	GTCVIRGCVPKKILV		75	GTCVIRGCVPKKILV
	229	MGASVDLCFRKELPL		229	MGATVDLCFRKELPL
	352	VALMEGTCTFAKTVFG		352	VALMEGTCTFAKTVFG
	372	PDYSHVPCAVFCIPP		372	PDYSHVPCAVFCIPP
	376	HVPCAVFCIPPLSVV		376	HVPCAVFCIPPLSVV
	438	KVLGASMCSPDAAEI		438	KVLGASMCSPDAAEI
	455	GIAVALKCGATKAQF		455	GIAVALKCGATKAQF

**Table 19 (continued).** Cys-containing peptides prone to S-nitrosylation within the GR\_Pistil\_5 to GR\_Pistil\_10 sequences as predicted by GPS-SNO.

Sequence	Position	Peptide	Sequence	Position	Peptide
GR_Pistil_7	51	YGAKVGICELPFHPI	GR_Pistil_9	51	YGAKVGICELPFHPI
	70	IGGVGGTCVIRGCVP		70	IGGVGGTCVIRGCVP
	75	GTCVIRGCVPKKILV		75	GTCVIRGCVPKKILV
	277	TENGIKVCCTDHGEEL		267	TENGIKVCCTDHGEEL
	352	VALMEGSCFAKTVFG		342	VALMEGSCFAKTVFG
	372	PDHTNVPCAVFCIPP		362	PDHTNVPCAVFCIPP
	376	NVPCAVFCIPPLSVV		266	NVPCAVFCIPPLSVV
	438	KVLGASMCSPDAPEI		428	KVLGASMCSPDAPEI
	455	GIAIALKCGATKAQF		445	GIAIALKCGATKAQF
GR_Pistil_10	18	RLAMTLICLLIGAGS			
	44	YGAKVGICELPFHPI			
	63	IGGVGGTCVIRGCVP			
	68	GTCVIRGCVPKKILV			
	222	MGATVDLCFRKELPL			
	345	VALMEGTCTFAKTVFG			
	365	PDYSHVPCAVFCIPP			
	369	HVPCAVFCIPPLSVV			
	431	KVLGASMCSPDAAEI			
	448	GIAVALKCGATKAQF			

## 2D structure prediction and 3D modeling of the structure and in silico analysis of the function

After several tests, it was elucidated that both GR1 and GR2 isoforms share the same predicted secondary structure, as expected. The GR\_Pistil\_10 sequence corresponding to a GR of the chloroplastial type was chosen to predict the secondary structure (Figure 36) and 3D modeling shown in figure 37. The predicted structure confirmed that the corresponding translated amino acid sequences of GR\_Pistil\_10 were consistent with available 3D models developed by using folding-recognition software.

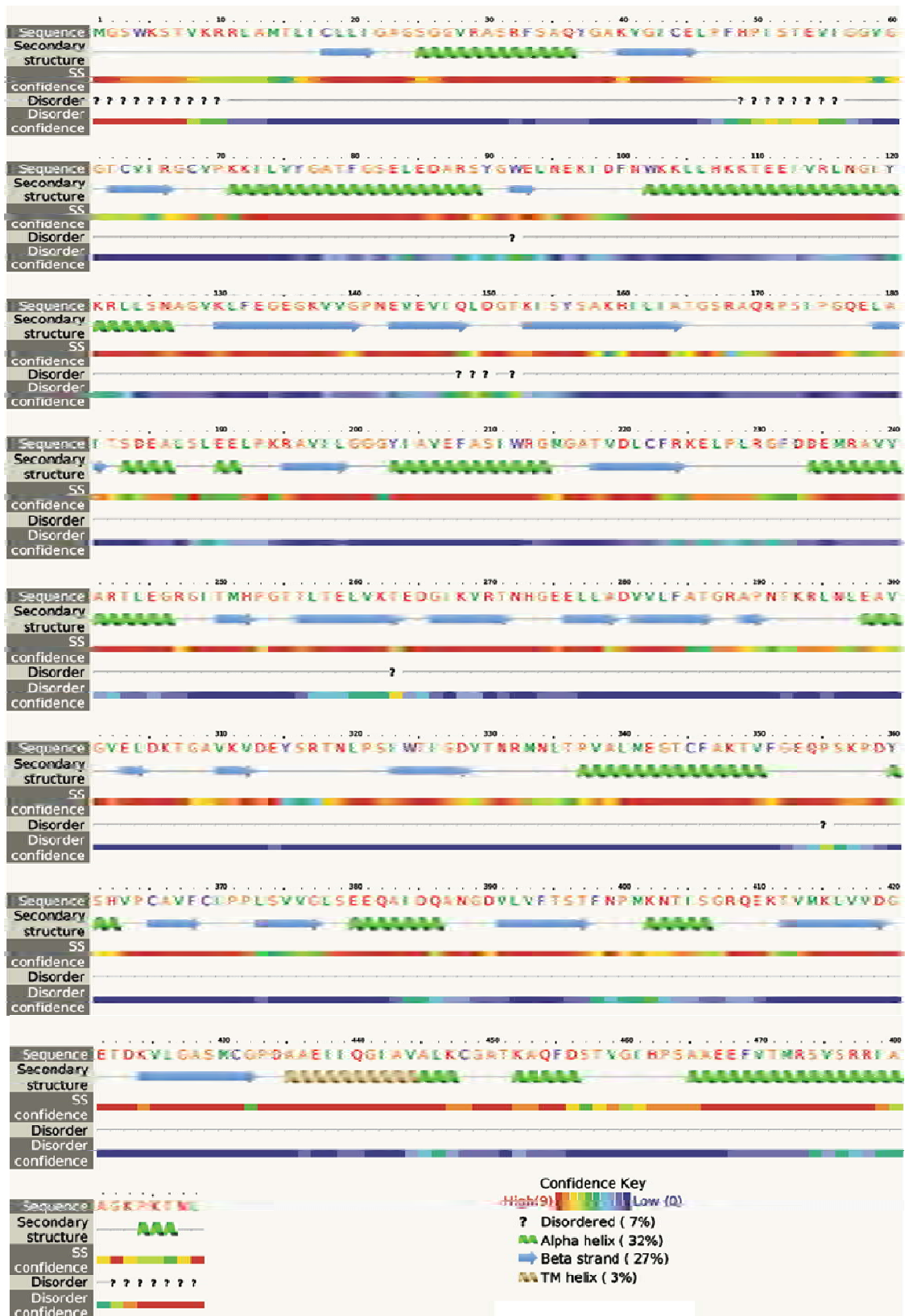
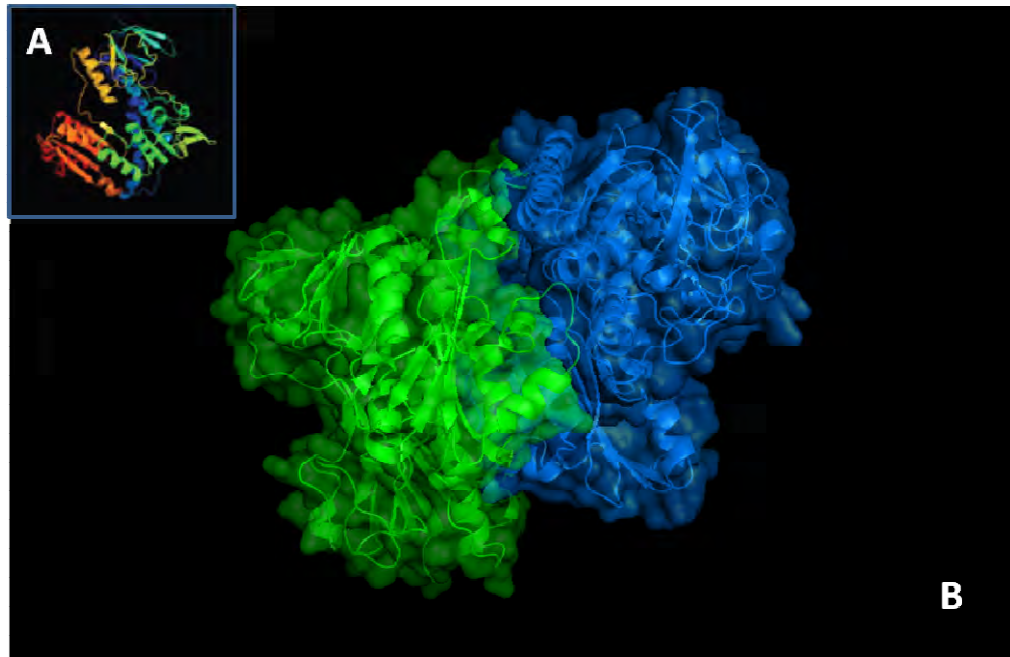


Figure36 .Prediction of secondary structure in olive pollen GR2.



**Figure 37.** A) Prediction of 3D structure in olive pollen GR2 (by Phyre2). B) 3D modeling by PyMol of olive pollen GR2.

## Discussion

Reproductive tissue transcriptomes differ from their somatic counterpart due to the large number of specific transcripts that are produced during the physiological event that involves reproduction in plants [34]. This can be explained by the requirement of signaling that must take place during pollen tube germination, pollen-pistil interaction ... etc, which triggers an increase in transcription during these processes. Thereby, the use of transcriptomes can be an useful way to elucidate enzymatic or signaling networks involved in the development of the micro- and macrosporocytes in Angiosperms, pollen tube germination and pollen-pistil interactions at the time of fertilization [35]. This paper has conducted a bioinformatic screening of exome sequences of olive tree mature pollen and pistil. It has been able to detect the existence of at least two GR genes homologous to other GR genes described above in plant species such as *A. thaliana* or *T. cacao*. The use of PCR and RACE experiments has confirmed the expression of these genes in olive tree pollen, and led to obtain the complete or a majority of the sequence of GR1 and GR2 genes. Cleaning and filtering of all outputs of the transcriptome to identify those eleven GR sequences obtained proved highly complicated due to the high homology between these two genes. The phylogenetic analysis carried out did not clustered GR1 and GR2 within specific group, thus we cannot suggest distinctive features for these GR homologous in the reproductive tissues. However, by predicting the cellular location of these genes we identified that most of the GR2s are expressed in the chloroplast, thus confirming previous studies which suggested that this is the isoform really involved in adequate pollen development [13].

GSH production by GR is essential for proper pollen tube tip growth [13, 36-37] controlling both the speed and orientation during pollen tube elongation. Due to the high metabolism rate in olive pollen grand quantities of ROS are generated and this can be detected by using confocal microscopy [38]. Still many aspects have to be

elucidated, such as the importance of GSH in pollen-stigma signaling, and the action of this and GR activity during pollen hydration among others.

**Conflict of Interest.** The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

**Acknowledgments.** This work was supported by ERDF-cofunded projects BFU2016-77243-P, P2011-CVI7487, 201540E065, RTC-2015-4181-2 and RTC2016-4824-2. EGQ thanks the MINECO for FPI grant funding.

## References

1. Shah, Z.H., Bahget T. Hamooh, B.T., Daur, I., Ha Rehman, H.M., Alghabari, F.: Transcriptomics and biochemical profiling: current dynamics in elucidating the potential attributes of olive. *Curr Issues Mol Biol* 21, 73-98 (2017)
2. Kaur, H., Bhatla, S.C.: Melatonin and nitric oxide modulate glutathione content and glutathione reductase activity in sunflower seedling cotyledons accompanying salt stress. *Nitric oxide* 59, 42–53 (2016)
3. Halliwell, B., Foyer, C. H.: Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* 139 Issue 1 9-17 (1978)
4. Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M.: Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180 278-284 (1990)
5. Foyer, C. H, Halliwell, B.: The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133 Issue 1 21-25 (1976)
6. Rasmusson , A.G., Møller, I.M.: NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant Physiology* 94 1012–1018 (1990)
7. Jiménez, A., Hernández, J.A., del Río, L.A., Sevilla, F.: Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* 114 175–284 (1997).
8. Stevens, R.G., Creissen, G.P., Mullineaux, P.M.: Characterization of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta* 211 537–545 (2000)
9. Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., del Río, L. A., Palma, J. M.: Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist* 170 43-52 (2006)
10. Creissen, G., Edwards, E.A., Enard, C., Wellburn, A., Mullineaux, P.: Molecular characterization of glutathione reductase cDNAs from pea (*Pisum sativum* L.). *The Plant Journal* 2129–131 (1992)
11. Chew, O., Whelan, J., Miller, A.H.: Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defences in plants. *Journal of Biological Chemistry* 27846869–46877 (2003)
12. Kaur, N., Reumann, S., Hu, J.: Peroxisome biogenesis and function. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0123 (2009)
13. Marty, L., Siala, W., Schwarzländer, M., Fricker, M.D., Wirtz, M., Sweetlove, L.J., Meyer, Y., Meyer, A.J., Reichheld, J.P., Hell, R.: The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9109–9114 (2009)
14. Foyer, C.H., Noctor, G.: Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119: 355–364 (2003)
15. del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., and Barroso, J. B.: Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *PlantPhysiol.* 141, 330–335 (2006)

16. Nyathi, Y., Baker, A.: Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 1478–1495 (2006)
17. Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 61:4197–4220 (2010c)
18. Garrett, R. H., Grisham, C. M.: *Biochemistry* (3rd ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. ISBN 0534490336 (2005)
19. Anjum, N. A., Umar, S., Chan, M. T. (Eds.): *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Springer ISBN 978-90-481-9404-9 (2010)
20. Cejudo, F. J., Meyer, A. J., Reichheld, J. P., Rouhier, N., Traverso, J. A.: Thiol-based redox homeostasis and signalling. *Frontiers Media SA* ISBN: 978-2-88919-284-7 (2014)
21. Carmona, R., Zafra, A., Seoane, P., Castro, A.J., Guerrero-Fernández, D., Castillo-Castillo, T., Medina-García, A., Cánovas, F.M., Aldana-Montes, J.F., Navas-Delgado, I., Alché, J.D., Claros, M.G.: ReprOlive: a database with linked data for the olive tree (*Olea europaea* L.) reproductive transcriptome. *Frontiers in Plant Science* 6, 625 (2015)
22. Cruz, F., Julca, I., Gómez-Garrido, J., Loska, D., Marcet-Houben, M., Cano, E., Galán, B., Frias, L., Ribeca, P., Derdak, S., Gut, M., Sánchez-Fernández, M., García, J.L., Gut, I.G., Vargas, P., Alioto, T.S., Gabaldón, T.: Genome sequence of the olive tree, *Olea europaea*. *GigaScience* 5, 29 (2016)
23. Olive genome and annotation files. <http://denovo.cnag.cat/genomes/olive/>.
24. Alché, J.d.D., M'rani-Alaoui, M., Castro, A.J., Rodríguez-García, M.I.: Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during *in vitro* germination. *Plant and Cell Physiology* 45,1149-1157 (2004)
25. McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., Lopez, R.: Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research* 41,W597-W600 (2013)
26. Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O.: SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 27,221-224 (2010)
27. Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.: jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Meth* 9,772-772 (2012)
28. Chou, K.C., Shen, H.B.: Plant-mPLoc: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS One* 5,e11335 (2010)
29. Heazlewood, J.L., Durek, P., Hummel, J., Selbig, J., Weckwerth, W., Walther, D., Schulze, W.X.: PhosPhAt: a database of phosphorylation sites in Arabidopsis thaliana and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucleic acids research* 36,D1015-1021 (2008)
30. Lee, T.-Y., Bretana, N., Lu, C.-T.: PlantPhos: using maximal dependence decomposition to identify plant phosphorylation sites with substrate site specificity. *BMC Bioinformatics* 12,261 (2011)
31. Xue, Y., Liu, Z., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X., Ren, J.: GPS-SNO: Computational Prediction of Protein S-Nitrosylation Sites with a Modified GPS Algorithm. *PLoS ONE* 5,e11290 (2010)
32. Martinez, A., Traverso, J.A., Valot, B., Ferro, M., Espagne, C., Ephritikhine, G., Zivy, M., Giglione, C., Meinnel, T.: Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes. *Proteomics* 8,2809-2831 (2008)
33. Kelley, L.A., Sternberg, M.J.: Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols* 4,363-371 (2009)
34. Rutley, N., Twell, D.: A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reproduction* 28, 73–89 (2015)
35. Dukowic-Schulze, S., Chen, C.: The meiotic transcriptome architecture of plants. *Frontiers in Plant Science*, 5:220 (2014)
36. Zechmann B., Mauch F., Sticher L., Müller M.: Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *Journal of Experimental Botany* 59, 4017–4027 (2008)
37. Zechmann B., Koffler B.E., Russell S.D.: Glutathione synthesis is essential for pollen germination in vitro. *BMC Plant Biology* 11, 54 (2011)
38. Zafra, A., Rodríguez-García, M.I., Alche Jde, D.: Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biol* 10,36 (2010)

- 1.1. Identificación, caracterización y análisis *in silico* de los principales genes involucrados en la síntesis de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo.
- 1.2. Identification and *in silico* Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil.
- 1.3. **Identificación, caracterización y análisis *in silico* de los enzimas principales implicados en la detoxificación dependiente de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo.**



La glutatión peroxidasa es una de las enzimas que participan en la transformación de las ROS, catalizando la reducción del peróxido de hidrógeno, para lo cual utiliza como agente reductor al GSH. Esta enzima desempeña un importante papel en la defensa antioxidante por su localización en todos los órganos y tejidos, como parte del sistema antioxidante del glutatión, por lo que está involucrada en diversos procesos fisiológicos. Por su parte, las glutatión *S*-transferasas, comprenden una familia de isozimas metabólicas eucarióticas y procarióticas de fase II, mejor conocidas por su capacidad para catalizar la conjugación del GSH a sustratos xenobióticos con el propósito de desintoxicación celular.

### **1.3.1. Recuperación, clonación y análisis filogenético de las secuencias de GPX y GST del transcriptoma reproductivo de olivo.**

A partir de referencias bibliográficas y diferentes bases de datos (OliveEST, EST, TOBEST, OLEAGEN, ReprOlive), se seleccionaron un total de 83 clones putativos, 19 de GPX y 64 de GST. De los 83 clones de GPX, dieciseis entradas fueron identificadas entre los datos en bruto del transcriptoma reproductivo de olivo, ya fuesen secuencias parciales o secuencias completas correspondientes a GPX (Tabla 20.A) y otras 54 entradas fueron identificadas como secuencias parciales o completas correspondientes a GST (Tabla 21.A). La identificación se llevó a cabo mediante *BLAST* de cada secuencia individual contra la base de datos GenBank. Por otro lado, estos 83 inputs previamente seleccionados fueron confrontados individualmente por *BLAST* contra la base de datos genómica de *Olea europaea*. Las Tablas 20.B y 21.B muestran los resultados obtenidos en este segundo *BLAST*.

De las diecinueve secuencias de GPX, tan sólo 6 resultaron ser exclusivamente de tejidos reproductivos (ninguna de ellas se expresó en tejidos vegetativos): GPX\_Pistil\_5 (se expresa tanto en pistilo como en polen); GPX\_Pistil\_1 y GPX\_Pistil\_6, que son específicas de pistilo; GPX\_Pollen\_5, GPX\_Pollen\_6 y GPX\_Pollen\_8, que son específicas de polen. Una gran parte de las secuencias consultadas tienen una alta homología (más del 93%) con la entrada OE6A102751T1 de la base de datos de ensamblaje y anotación genómica de *Olea europaea*, que se identifica con una GPX de tipo 2 (GPX2). Sin embargo, GPX\_Pistil\_4, GPX\_Pistil\_9 y GPX\_Pollen\_3, las únicas secuencias que se identifican al 100% con entradas de la base de datos genómica (OE6A094589T1, OE6A103343P1, OE6A094589T1, respectivamente), corresponden a genes que codifican para la isoforma 8 del enzima GPX (GPX8). Todas estas secuencias del genoma de olivo fueron identificadas después mediante *blasting*, y si bien es cierto que la mayoría se identifican con GPX2 y GPX8, existe variabilidad en cuanto al tipo de isoforma con la que parecen tener homología, tal y como se muestra en la Tabla 20.B.



**A**

Sequence	Sequence name	Lenght (pb)
GPX_Pistil_1	st11_olive_045503	636
GPX_Pistil_2	st11_olive_034663	745
GPX_Pistil_3	st11_olive_024133	910
GPX_Pistil_4	st11_olive_021131	976
GPX_Pistil_5	st11_olive_022097	955
GPX_Pistil_6	st11_olive_040544	459
GPX_Pistil_7	st11_olive_035157	454
GPX_Pistil_8	st11_olive_056525	575
GPX_Pistil_9	st11_olive_043781	651
GPX_Pistil_10	st11_olive_006122	910
GPX_Pistil_11	st11_olive_034663	745
GPX_Pollen_1	po11_olive_012321	739
GPX_Pollen_2	po11_olive_012321	740
GPX_Pollen_3	po11_olive_008468	285
GPX_Pollen_4	po11_olive_009025	864
GPX_Pollen_5	po11_olive_028014	527
GPX_Pollen_6	po11_olive_028014	527
GPX_Pollen_7	po11_olive_020043	598
GPX_Pollen_8	po11_olive_020775	590

**B**

Sequence	Genomic homologous	Homology	Identity
GPX_Pistil_1	OE6A035552T1	99,31	Glutathione Peroxidase (GPX8)
GPX_Pistil_2	OE6A024348T2	99,73	Glutathione Peroxidase (GPX2)
GPX_Pistil_3	OE6A102751T1	99	Glutathione Peroxidase (GPX2)
GPX_Pistil_4	OE6A094589T1	100	Glutathione Peroxidase (GPX8)
GPX_Pistil_5	OE6A093520T3	99,79	Glutathione Peroxidase (GPX4)
GPX_Pistil_6	OE6A102113T1	98,22	Glutathione Peroxidase (GPX2)
GPX_Pistil_7	OE6A086410T1	98,78	Glutathione Peroxidase (GPX1)
GPX_Pistil_8	OE6A119461T1	99,85	Glutathione Peroxidase (GPX6)
GPX_Pistil_9	OE6A103343P1	100	Glutathione Peroxidase (GPX7)
GPX_Pistil_10	OE6A102751T1	98,79	Glutathione Peroxidase (GPX2)
GPX_Pistil_11	OE6A024348T2	99,33	Glutathione Peroxidase (GPX5)
GPX_Pollen_1	OE6A093520T1	99,59	Glutathione Peroxidase (GPX4)
GPX_Pollen_2	OE6A093520T1	99,59	Glutathione Peroxidase (GPX5)
GPX_Pollen_3	OE6A094589T1	100	Glutathione Peroxidase (GPX8)
GPX_Pollen_4	OE6A102751T1	93,63	Glutathione Peroxidase (GPX2)
GPX_Pollen_5	OE6A011686T1	73,02	Glutathione Peroxidase (GPX8)
GPX_Pollen_6	OE6A011686T1	73,02	Glutathione Peroxidase (GPX8)
GPX_Pollen_7	OE6A102751T1	93,63	Glutathione Peroxidase (GPX2)
GPX_Pollen_8	Oe6_s06239	81,82	Glutathione Peroxidase (GPX8)

Tabla 20. A. Secuencias (*output*) identificadas como GPX tras el cribado. Se indican las longitudes de las secuencias ensambladas. B. *BLAST* con el genoma de olivo.

A

Sequence	Sequence identification in ReprOlive	Lenght (pb)
GST_Pistil_1	st11_olive_040199	682
GST_Pistil_2	st11_olive_054621	584
GST_Pistil_3	st11_olive_010243	1356
GST_Pistil_4	st11_olive_019977	1004
GST_Pistil_5	st11_olive_016037	1115
GST_Pistil_6	st11_olive_013653	1199
GST_Pistil_7	st11_olive_026567	866
GST_Pistil_8	st11_olive_026911	860
GST_Pistil_9	st11_olive_007578	201
GST_Pistil_10	st11_olive_012138	252
GST_Pistil_11	st11_olive_042377	662
GST_Pistil_12	st11_olive_052147	596
GST_Pistil_13	st11_olive_012140	252
GST_Pistil_14	st11_olive_031590	406
GST_Pistil_15	st11_olive_032018	409
GST_Pistil_16	st11_olive_025399	887
GST_Pistil_17	st11_olive_014186	273
GST_Pistil_18	st11_olive_016037	1115
GST_Pistil_19	st11_olive_019157	1022
GST_Pistil_20	st11_olive_026911	860
GST_Pistil_21	st11_olive_029819	810
GST_Pistil_22	st11_olive_034233	750
GST_Pistil_23	st11_olive_028573	833
GST_Pistil_24	st11_olive_047440	493
GST_Pistil_25	st11_olive_025399	887
GST_Pistil_26	st11_olive_040852	461
GST_Pistil_27	st11_olive_018317	1044
GST_Pistil_28	st11_olive_025399	887
GST_Pistil_29	st11_olive_055169	581
GST_Pistil_30	st11_olive_044967	642
GST_Pistil_31	rp11_olive_063353	596
GST_Pistil_32	st11_olive_023981	913
GST_Pistil_33	st11_olive_040099	683
GST_Pistil_34	st11_olive_045459	638
GST_Pistil_35	st11_olive_042761	659
GST_Pistil_36	st11_olive_021980	338
GST_Pistil_37	st11_olive_036100	433
GST_Pistil_38	st11_olive_029895	809
GST_Pistil_39	st11_olive_024171	909
GST_Pistil_40	st11_olive_049054	501
GST_Pistil_41	st11_olive_023981	913
GST_Pistil_42	st11_olive_031590	406
GST_Pollen_1	po11_olive_024116	489
GST_Pollen_2	po11_olive_022030	469
GST_Pollen_3	po11_olive_007981	916
GST_Pollen_4	po11_olive_008343	896
GST_Pollen_5	po11_olive_007867	923
GST_Pollen_6	po11_olive_003725	1300
GST_Pollen_7	po11_olive_014482	380
GST_Pollen_8	rp11_olive_012308	228
GST_Pollen_9	po11_olive_012325	738
GST_Pollen_10	po11_olive_026866	513
GST_Pollen_11	po11_olive_014734	382
GST_Pollen_12	po11_olive_007867	1603
GST_Pollen_13	po11_olive_008343	896
GST_Pollen_14	po11_olive_007957	917
GST_Pollen_15	po11_olive_008137	908
GST_Pollen_16	po11_olive_012325	736
GST_Pollen_17	po11_olive_007981	916
GST_Pollen_18	po11_olive_004066	193
GST_Pollen_19	po11_olive_009181	856
GST_Pollen_20	po11_olive_021657	581
GST_Pollen_21	po11_olive_016132	401
GST_Pollen_22	po11_olive_003488	176

Tabla 21. A. Secuencias (*output*) sequences identificadas como GST tras el cribado. Se indican las longitudes de las secuencias ensambladas.

**B**

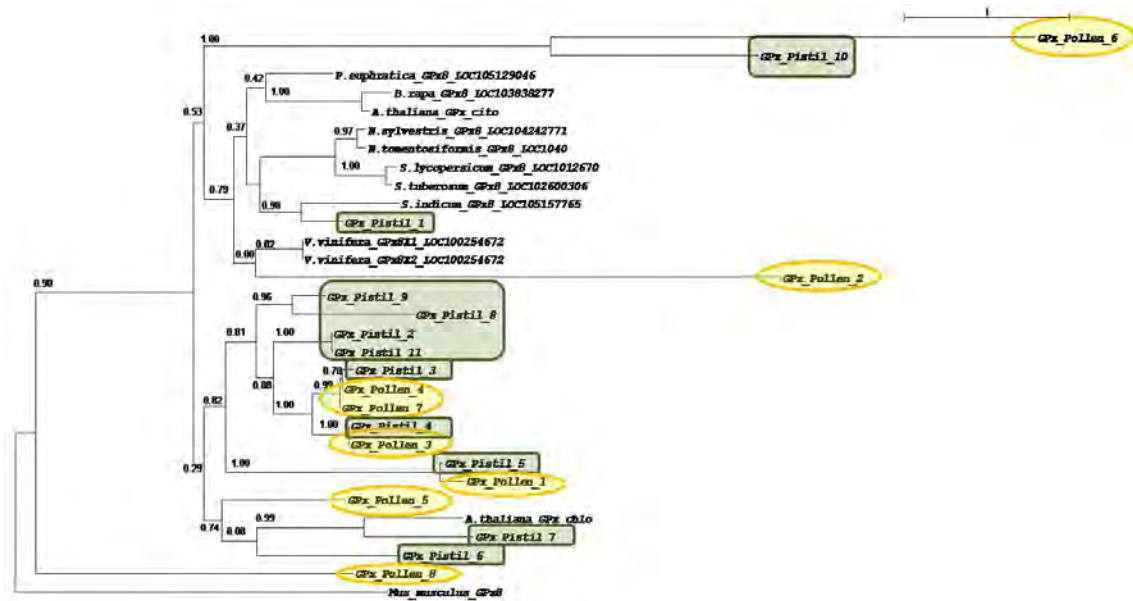
Sequence	Genomic homologous	Homology	Identity
GST_Pistil_1	OE6A089567T3	99,2	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pistil_2	Oe6_s07843	100	Glutathione S-transferase (F12)
GST_Pistil_3	Oe6_s05833	97,66	Glutathione S-transferase (F10)
GST_Pistil_4	OE6A050768T1	98,4	Glutathione S-transferase (C)
GST_Pistil_5	OE6A025764T1	99,91	Glutathione S-transferase (3)
GST_Pistil_6	OE6A108328T2	99,41	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pistil_7	OE6A054227T1	99,88	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pistil_8	OE6A103647T1	98,77	Glutathione S-transferase (F9)
GST_Pistil_9	Oe6_s07720	90,32	Glutathione S-transferase (parC)
GST_Pistil_10	OE6A106323T1	100	Glutathione S-transferase (parC)
GST_Pistil_11	OE6A066243T1	99,4	Glutathione S-transferase (3)
GST_Pistil_12	OE6A121268T1	96,33	Glutathione S-transferase (F9)
GST_Pistil_13	Oe6_s07748	99,21	Glutathione S-transferase (23)
GST_Pistil_14	OE6A103647T1	99,31	Glutathione S-transferase (F9)
GST_Pistil_15	OE6A008995T1	100	Glutathione S-transferase
GST_Pistil_16	Oe6_s04061	98,07	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pistil_17	Oe6_s04003	98,17	Glutathione S-transferase (parC)
GST_Pistil_18	OE6A025764T1	99,82	Glutathione S-transferase (3)
GST_Pistil_19	OE6A108328T3	99,36	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pistil_20	OE6A103647T1	98,77	Glutathione S-transferase (F9)
GST_Pistil_21	OE6A000692T1	99,49	Glutathione S-transferase (F9)
GST_Pistil_22	OE6A022486T1	99,72	Glutathione S-transferase
GST_Pistil_23	OE6A089567T3	93,24	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pistil_24	Oe6_s03881	97,2	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pistil_25	OE6A077467T1	100	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pistil_26	OE6A114786T2	98,91	Glutathione S-transferase (zeta)
GST_Pistil_27	OE6A114786T2	97,05	Glutathione S-transferase (zeta)
GST_Pistil_28	OE6A077467T1	100	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pistil_29	OE6A098481T1	98,28	Glutathione S-transferase (23)
GST_Pistil_30	OE6A035235T1	97,92	Glutathione S-transferase (23)
GST_Pistil_31	Oe6_s05985	97,67	Glutathione S-transferase (F9)
GST_Pistil_32	OE6A024298T2	99,75	Glutathione S-transferase (F4)
GST_Pistil_33	Oe6_s04003	97,58	Glutathione S-transferase (parC)
GST_Pistil_34	Oe6_s02261	100	Glutathione S-transferase (parC)
GST_Pistil_35	Oe6_s07720	95,53	Glutathione S-transferase (parC)
GST_Pistil_36	OE6A019836T1	99,7	Glutathione S-transferase (parC)
GST_Pistil_37	Oe6_s05982	98,49	Glutathione S-transferase (23)
GST_Pistil_38	OE6A088562T3	99,38	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pistil_39	OE6A018645T1	98,81	Glutathione S-transferase (L3)
GST_Pistil_40	Oe6_s03882	100	Glutathione S-transferase (23)
GST_Pistil_41	OE6A024298T2	100	Glutathione S-transferase (F4)
GST_Pistil_42	OE6A103647T1	100	Glutathione S-transferase (F9)
GST_Pollen_1	OE6A018645T1	93,87	Glutathione S-transferase (L3)
GST_Pollen_2	OE6A018645T1	98	Glutathione S-transferase (L3)
GST_Pollen_3	OE6A108328T2	97,74	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pollen_4	OE6A022486T1	99,67	Glutathione S-transferase
GST_Pollen_5	OE6A088562P3	100	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pollen_6	OE6A043694T1	97,5	Glutathione S-transferase (F9)
GST_Pollen_7	Oe6_s09780	99,21	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pollen_8	Oe6_s06059	73,33	Glutathione S-transferase (F9)
GST_Pollen_9	OE6A088562T4	99,47	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pollen_10	OE6A088562T1	98,64	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pollen_11	OE6A017358T1	67,52	Glutathione S-transferase
GST_Pollen_12	OE6A088562T3	99,89	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pollen_13	OE6A022486T1	99,67	Glutathione S-transferase
GST_Pollen_14	OE6A018645T1	99,02	Glutathione S-transferase (L3)
GST_Pollen_15	OE6A054227T1	99,78	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pollen_16	OE6A088562T4	99,47	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pollen_17	OE6A108328T3	98,54	Glutathione S-transferase (T1)
GST_Pollen_18	OE6A077467T1	99,3	Glutathione S-transferase (2)
GST_Pollen_19	OE6A114786T2	96,76	Glutathione S-transferase (zeta)
GST_Pollen_20	OE6A050768T1	98,97	Glutathione S-transferase (C)
GST_Pollen_21	OE6A101905T1	95,45	Glutathione S-transferase (zeta)
GST_Pollen_22	OE6A039937T1	99,43	Glutathione S-transferase (3)

Tabla 21. B.BLAST de las secuencias de GST con el genoma de olivo.

De las 64 secuencias de GST, sólo 16 resultaron ser exclusivamente de tejidos reproductivos: 7 específicas de pistilo (GST\_Pistil\_10, GST\_Pistil\_13, GST\_Pistil\_17, GST\_Pistil\_29, GST\_Pistil\_30, GST\_Pistil\_31 y GST\_Pistil\_36), 2 específicas de polen (GST\_Pollen\_11 y GST\_Pollen\_21) y otras 7 secuencias que se expresan tanto en pistilo como en polen (GST\_Pistil\_4, GST\_Pistil\_5, GST\_Pistil\_8, GST\_Pistil\_21, GST\_Pollen\_6, GST\_Pollen\_8 y GST\_Pollen\_20). La mayoría de las secuencias de pistilo consultadas tienen una alta homología (más del 98,77%) con la entrada OE6A103647T1 de la base de datos de ensamblaje y anotación genómica de *Olea europaea*. Sin embargo, la mayoría de las secuencias de polen consultadas tienen mayor homología (más del 94%) con la entrada OE6A018645T1 de dicha base de datos. Cabe destacar que de las 64 secuencias de GST obtenidas del transcriptoma de olivo sólo 10 se identifican al 100% con 9 entradas del genoma de olivo: GST\_Pistil\_2 con Oe6\_s07843 (identificada como GST-F12), GST\_Pistil\_10 con OE6A106323T1 (identificada como GST-parC), GST\_Pistil\_15 con OE6A008995T1, GST\_Pistil\_25 y GST\_Pistil\_28 con OE6A077467T1 (identificada como GST-2), GST\_Pistil\_34 con Oe6\_s02261 (identificada como GST-parC) , GST\_Pistil\_40 con Oe6\_s03882 (identificada como GST-23), GST\_Pistil\_41 con OE6A024298T2 (identificada como GST-F4), GST\_Pistil\_42 con OE6A103647T (identificada como GST-F9), y por último, la única secuencia de polen, GST\_Pollen\_5, que tiene una homología del 100% con la entrada OE6A088562P3 (identificada como GST-T1) [Olive genome and annotation files. <http://denovo.cnag.cat/genomes/olive/>].

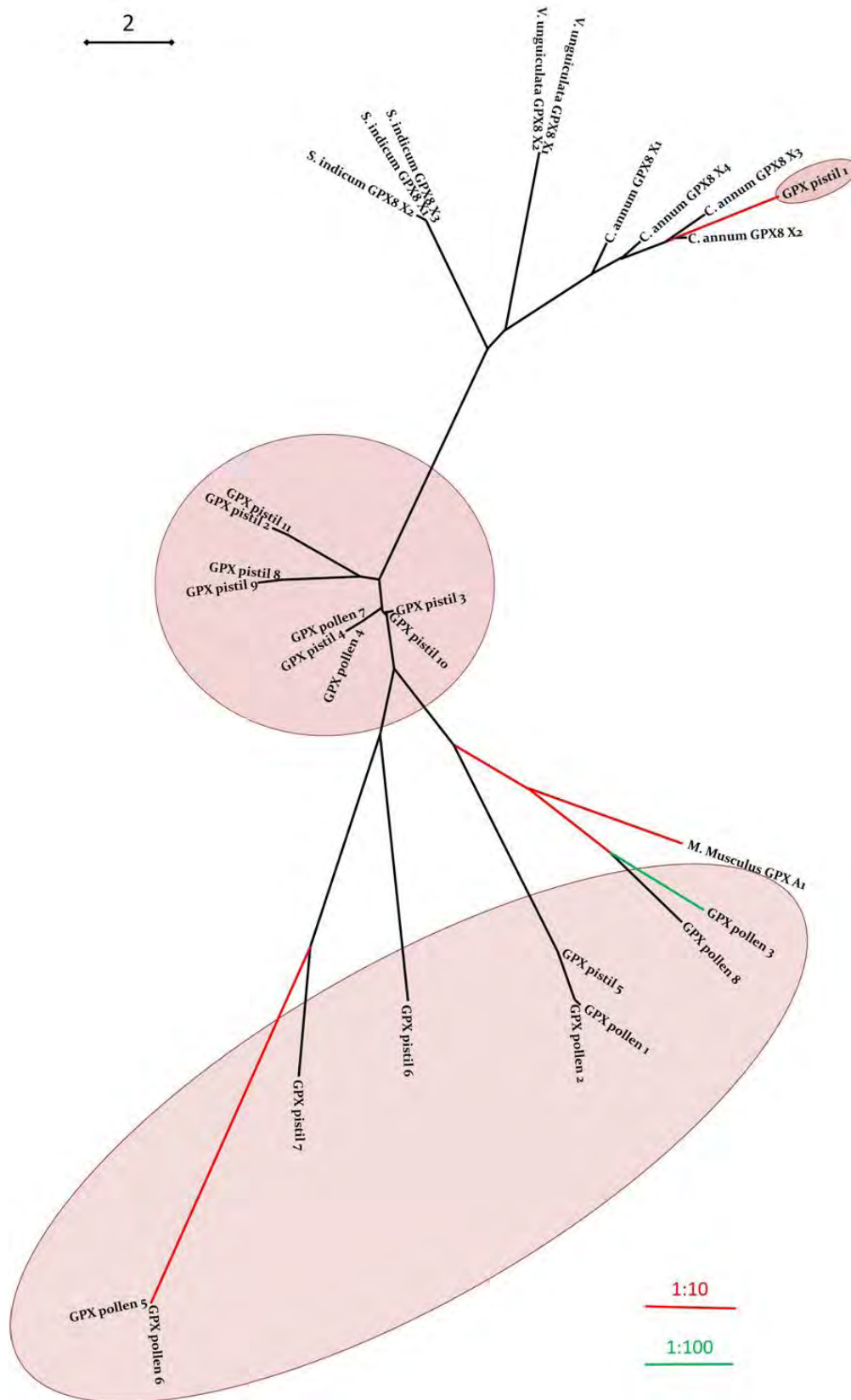
Las secuencias GPX y GST de pistilo y polen de olivo se alinearon con diferentes secuencias homólogas de otras plantas, utilizadas frecuentemente como modelo, procedentes de las bases de datos de libre acceso (Anexo 1). A partir del alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de las GPXs es posible observar la enorme conservación de los dominios de esta enzima a lo largo de la evolución.

Las Figuras 38 y 39 muestran el análisis filogenético que incluye los 19 productos identificados en el transcriptoma anotado junto con una representación de GPXs identificados en diferentes grupos taxonómicos. En la Figura 38, en donde se representa el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas, no se observó una clara diferenciación entre las distintas isoformas, de hecho la alta similitud entre ambas isoformas fue particularmente evidente en una de las especies homólogas utilizadas para el estudio filogenético (*V. vinífera*). Aunque sí es cierto que parece haber una diferenciación entre las formas citoplasmáticas y las cloroplastidiales, observándose que la mayoría de las secuencias de GPX obtenidas a partir del transcriptoma reproductivo del olivo corresponden a éstas últimas. Dos de estas formas (GPX\_pollen\_6 y GPX\_Pistil\_10) se agruparon, ligeramente separadas de las secuencias restantes.



**Figura 38.** Relaciones filogenéticas entre los genes de GPX de polen y pistilo de olivo con sus homólogos en los tejidos vegetativos y reproductivos de otras plantas. El árbol filogenético fue arraigado con una secuencia nucleotídica de GR de ratón.

Tras la traducción de las secuencias nucleotídicas correspondientes a GPXs de polen y pistilo de olivo, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas, a partir de las cuales se pudo realizar el análisis de la relación filogenética de estas proteínas con las de otras especies homólogas (ExpASy – SIB Bioinformatics Resource Portal, Translate tool). En la Figura 39, en donde se representa el análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas, puede observarse que las secuencias de polen y pistilo de olivo corresponden a una GPX de tipo 8, sin embargo, no se aprecia una diferenciación entre las distintas isoformas. Estos datos concuerdan con la identificación inicial de las secuencias mediante BLSTing. Además, todas las secuencias obtenidas de olivo parecen estar agrupadas en el árbol filogenético, salvo las secuencias GPX\_pistil\_1, GPX\_pollen5 y GPX\_pollen\_6, que se encuentran bastante más alejadas filogenéticamente de las demás.



**Figura 39.** Relaciones filogenéticas entre las secuencias aminoácidas de GPX de polen y pistilo de olivo con sus homólogos en los tejidos vegetativos y reproductivos de otras plantas. El árbol filogenético fue arraigado con una secuencia aminoácida también de GPX de ratón.

Las Figura 40 y 41 muestran el análisis filogenético que incluye los 64 productos identificados en el transcriptoma anotado junto con una representación de GSTs identificados en diferentes grupos taxonómicos. En la Figura 40, en donde se representa el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas, no se observó una clara diferenciación entre los distintos tipos de GST. Las secuencias GST rescatadas del transcriptoma reproductivo del olivo y enfrentadas a BLASTing se identificaron como GSTs de tipo 2, T1 y F9, principalmente. Aunque también se encontraron representaciones de tipo parC, y algunos otros más. Sin embargo, según lo observado en el árbol filogenético de la figura 40, estas secuencias tienen una alta homología con una GST DHAR2-like.

Tras la traducción de las secuencias nucleotídicas correspondientes a GST de polen y pistilo de olivo, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas, a partir de las cuales se pudo realizar el análisis de la relación filogenética de estas proteínas con sus homólogos en otras especies. En la Figura 41, en donde se representa el análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de la GST, puede observarse que las secuencias de olivo pueden englobarse dentro de las GST de tipo F11 y F12, sin embargo, no existe una clara diferenciación entre las distintas isoformas.

Estos datos sin embargo, contrastan con la identificación inicial de las secuencias mediante BLASTing en cuanto al tipo de GST se refiere.

Por último, se llevó a cabo la clonación de los genes GPX y GST de polen de olivo mediante una estrategia de RT-PCR (tal y como se indica en los materiales y métodos de esta tesis). A partir del alineamiento múltiple de las distintas secuencias nucleotídicas obtenidas del Transcriptoma Reproductivo del Olivo, se diseñaron cebadores específicos con los cuales se amplificó un fragmento de 219 pb de la zona central del ADNc de GPX, y de 439 pb de la zona central de la GST. A partir de esta secuencia se diseñaron otros cebadores específicos con los cuales se amplificaron los extremos 5' y 3' del ADNc de la GPX8 y de la GSTF12 en polen de *Olea europea* mediante la técnica de RACE, explicada en detalle en los materiales y métodos.

La amplificación por PCR del cDNA y su posterior secuenciación (Secuenciación Sanger, ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer) nos permitió obtener las secuencias completas de la región codificante de GPX8 (955bp) y GSTF12 (903bp) en polen de olivo (Anexo 2).

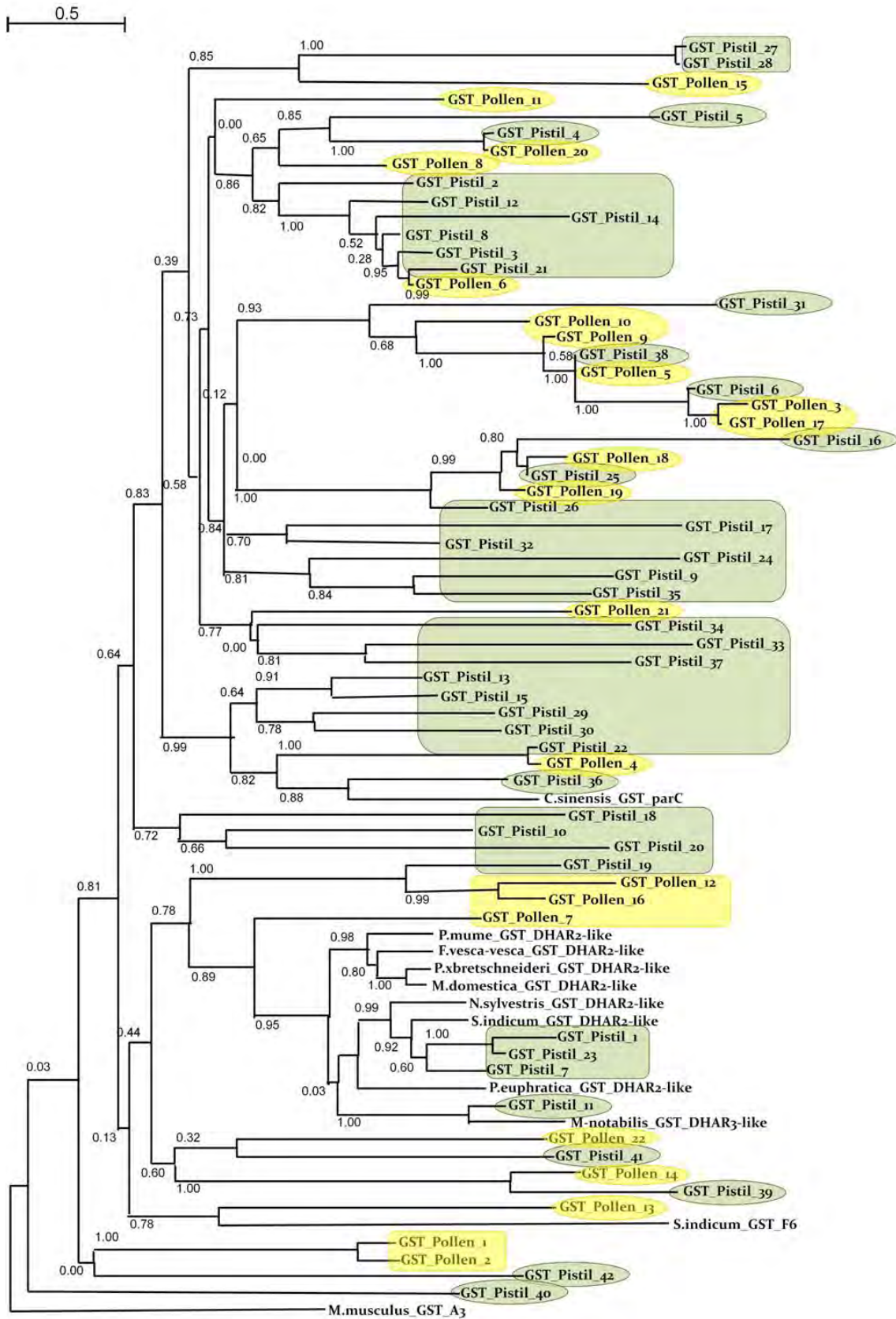
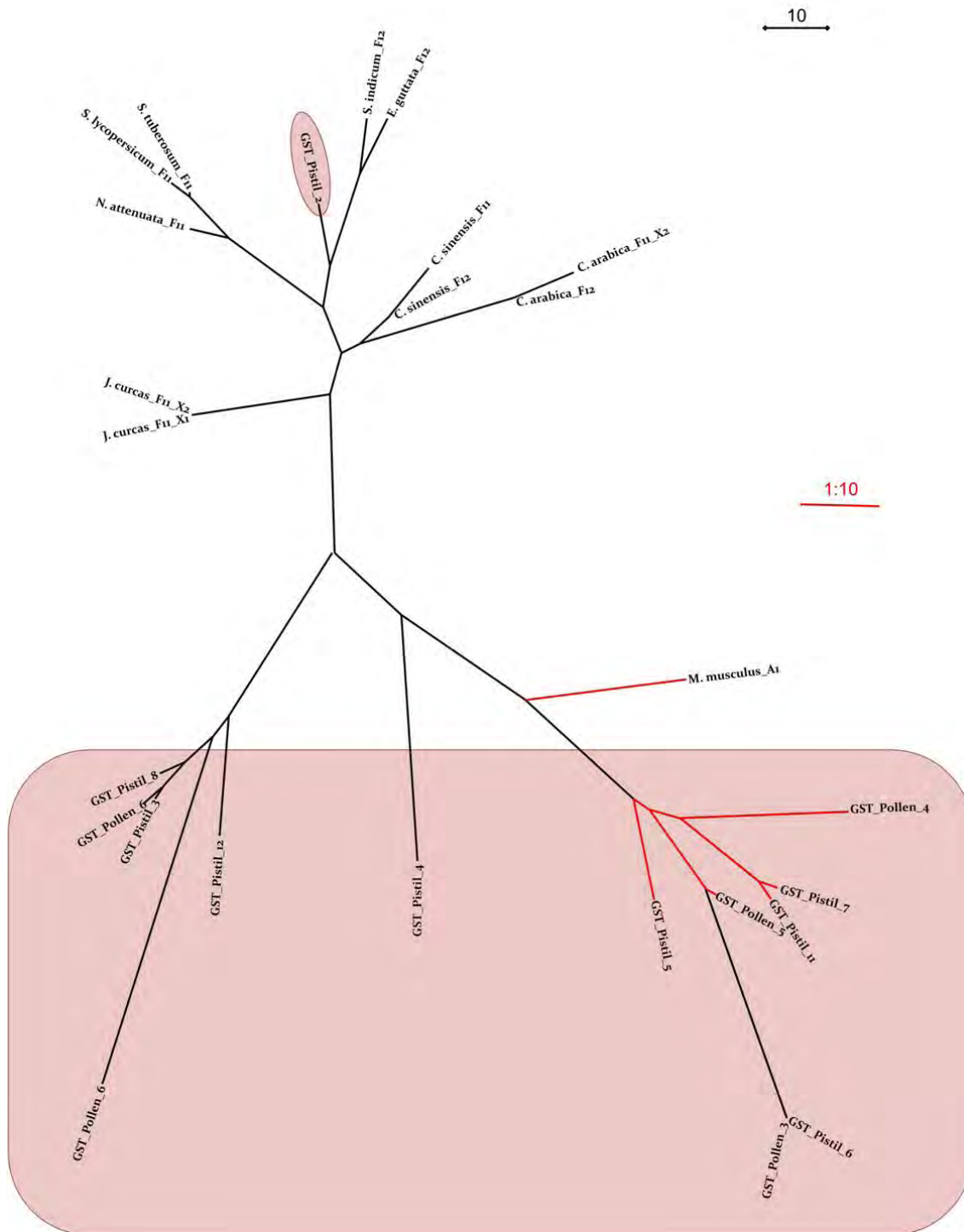


Figura 40. Relaciones filogenéticas entre los genes de GST de polen y pistilo de olivo con sus homólogos en los tejidos vegetativos y reproductivos de otras plantas. El árbol filogenético fue arraigado con una secuencia nucleotídica de GST de ratón.





**Figura 41.** Relaciones filogenéticas entre las secuencias aminoácidas de GST de polen y pistil de olivo con sus homólogos en los tejidos vegetativos y reproductivos de otras plantas. El árbol filogenético fue arraigado con una secuencia aminoácida también de GST de ratón.

**1.3.2. Predicción in silico de la localización celular, características bioquímicas y modificaciones post-traduccionales de las enzimas GPX y GST en tejidos reproductivos de olivo.**

Usando el Software Plant-mPloc se pudo predecir la localización celular de la GPX8 en cloroplastos y mitocondrias, mientras que la GSTF12 se localizó en el citoplasma. La secuencia nucleotídica completa de GPX de polen obtenida mediante clonación codifica para un polipéptido de 172 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 18,81 KDa y un punto isoeléctrico de 9,11. La GPX de polen de olivo posee dos posibles sitios de N-glicosilación en las posiciones 50 y 134. En cuanto a la GST de polen de olivo clonada, su secuencia nucleotídica codifica para un polipéptido de 250 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 28,31 KDa y un punto isoeléctrico de 9,46. Además, esta GST de polen presenta tres posibles sitios de N-glicosilación en las posiciones 117, 202 y 206.

	Locations (AA)	Modification	Substrate side
1	6	Phosphoserine(CK1)	ASQ <b>S</b> KPQS
2	6	Phosphoserine(IKK)	ASQ <b>S</b> KPQS
3	49	N-linked_Aspargine	LTNS <b>N</b> YTDL
4	57	Phosphotyrosine(Syk)	LTEI <b>Y</b> KKYK
5	82	Phosphoserine	QEPG <b>S</b> IEEI
6	133	N-linked_Aspargine	SIKW <b>N</b> FSKF
7	154	Phosphothreonine(CDC2)	SPT <b>T</b> PASM

**Tabla 22.** Aminoácidos propensos a la fosforilación dentro de la secuencia GPX según lo predicho por PhosPhAt / PlantPhos.

Al introducir la secuencia completa clonada de la GPX de polen de olivo en los algoritmos PhosPhAt y PlantPhos, se predijeron 7 sitios putativos de fosforilación (Tabla 22). Mediante el uso del software GPS-SNO se identificaron en las 19 secuencias seleccionadas del transcriptoma reproductivo del olivo sitios potenciales de S-nitrosilación en hasta 47 péptidos que contenían Cys, como se describe en la Tabla 23. Sólo en el caso de la secuencia GPX\_Pistil\_7, la treonina N-terminal (en la posición 2) de la proteína madura, se predijo que puede ser acetilada con un 77% de probabilidad mediante el uso de las herramientas de predicción citadas en el capítulo de materiales y los métodos. La glicina N-terminal (en la posición 2) de las secuencias GPX\_Pistil\_5, GPX\_Pollen\_1 y GPX\_Pollen\_2 podrían sufrir miristoilación con una probabilidad del 87,6%. Por el contrario, no se predijeron la presencia de sitios de palmitoilación.

Sequence	Position	Peptide	Sequence	Position	Peptide
GPx_Pistil_2	43	IVNVASQCGLANSNY	GPx_Pollen_1	44	VVNVASKCGYTNLNY
	72	LEILAFPCNQFGSQE		73	FEILAFPCNQFLYQE
	91	EEIQQFACTRFKAQY		92	EDAEQFACTRFKAQY
		169		LSVSHNTCLFVVLES	
GPx_Pistil_3	43	IVNVASQCGLTNSNY	GPx_Pollen_2	44	VVNVASKCGYTNLNY
	72	FEILAFPCNQFGSQE		73	FEILAFPCNQFLYQE
	91	EEIQQFACTRFKAQY		92	EDAEQFACTRFKAQY
144	FLVDKEGCVVDRYAP	164		LAIEASLCLS*****	
GPx_Pistil_4	43	IVNVASQCGLTNSNY	GPx_Pollen_4	43	IVNVASQCGLTNSNY
	72	LEILAFPCNQFGSQE		72	LEILAFPCNQFGSQE
	91	EEIQQFACTRFKAQY		91	EEIQQFACTRFKAQY
GPx_Pistil_5	44	VVNVASKCGYTNLNY	GPx_Pollen_8	144	FLVDKEGCVVDRYAP
	73	FEILAFPCNQFLYQE		39	VVNTASKCGFTPQFE
	92	EDAEQFACTRFKAQY		70	VEFLGFPCNQFGSQD
GPx_Pistil_6	43	IVNVASKCGLTQSNY	88	NDTIQEFQQLNYGVS	
	72	FEILAFPCNQFAWQE			
	91	EEIQETACTR*****			
GPx_Pistil_7	114	IVNVASKCGLTSSNY			
	143	FEILAFPCNQFGGQE			
	162	PDIKQFACTRFKAQY			
GPx_Pistil_8	14	LEILAFPCNQFGSQE			
	33	EEIQEFVCTRFKAQY			
	2	*****MCGLANSNY			
GPx_Pistil_9	31	LEILAFPCNQFGSQE			
	50	EEIREFVCTRFKAQY			
	43	IVNVASQCGLTNSNY			
GPx_Pistil_10	72	FEILAFPCNQFGSQE			
	91	EEIQQFACTRFKAQY			
	144	FLVDKEGCVVDRYAP			
GPx_Pistil_11	43	IVNVASQCGLANSNY			
	72	LEILAFPCNQFGSQE			
	91	EEIQQFACTRFKAQY			

**Tabla 23.** Los péptidos que contienen Cys son propensos a la S-nitrosilación dentro de las secuencias de GPXsegún la predicción realizada mediante el algoritmo GPS-SNO.

También mediante PhosPhAt y PlantPhos se predijeron 4 sitios putativos de modificación post-traducciona (Tabla 24) en la secuencia clonada de GST de polen de olivo. En 13 de las 64 secuencias rescatadas del transcriptoma reproductivo del olivo, se identificaron sitios potenciales de S-nitrosilación en hasta 23 péptidos que contenían Cys usando el software GPS-SNO, como se describe en la Tabla 25.

	Locations (AA)	Modification	Substrate side
1	178	N-linked_Aspargine	IQYLLGTPT
2	187	Phosphothreonine(PKC)	KKLFD <sup>R</sup> ERPH
3	209	Methionine_amide	AKKV <sup>L</sup>
4	212	Alanine_amide	VL

**Tabla 24.** Aminoácidos propensos a la fosforilación dentro de la secuencia GST según lo predicho por PhosPhAt / PlantPhos.

Sequence	Position	Peptide
GST_Pistil_2	18	DMTVVQNCKTKLEKV
GST_Pistil_4	57	SRYLVNACGRGELFT
GST_Pistil_5	258	RTLLKTWCYVQIRRL
GST_Pistil_6	21	SRAVLTFCKVNGIDF
	174	IADSLACEVMQLEL
GST_Pistil_7	6	**MAVEVCVAAAAGA
	20	APDILGDCPFCQRVL
	23	ILGDCPFCQRVLMTL
	147	YVNGGNICAVDLSLA
GST_Pistil_8	19	SSKRIVCLLEKEME
GST_Pistil_11	12	PSDPLEVCAKASLTK
	26	KPNTLGDCPFTQRVL
GST_Pistil_12	142	WKKVLQHCPLQIYPK
GST_Pollen_3	124	IADSLACEVMQLEL
	139	VETEDRDCILSHRKR
GST_Pollen_4	66	IHGKPICESLIIVE
	144	LEDAFIKCSKGKSF
	165	YLDIALGCFLGWLRV
GST_Pollen_5	21	SRAVIFCKINGIEF
	174	IADSLVCEIMQLEV
GST_Pollen_6	19	SSKRIVCLVEKEIE
GST_Pollen_8	18	YESRLSMCKYLAGDF
	45	HYFMTTPCASMVKDR

**Tabla 25.** Los péptidos que contienen Cys son propensos a la S-nitrosilación dentro de todas las secuencias de GST, excepto en GST\_Pistil\_3, según la predicción realizada mediante el algoritmo GPS-SNO.

Se encontraron modificaciones postraduccionales en el extremo N-terminal de la proteína madura en 14 de las 64 secuencias seleccionadas de GST:

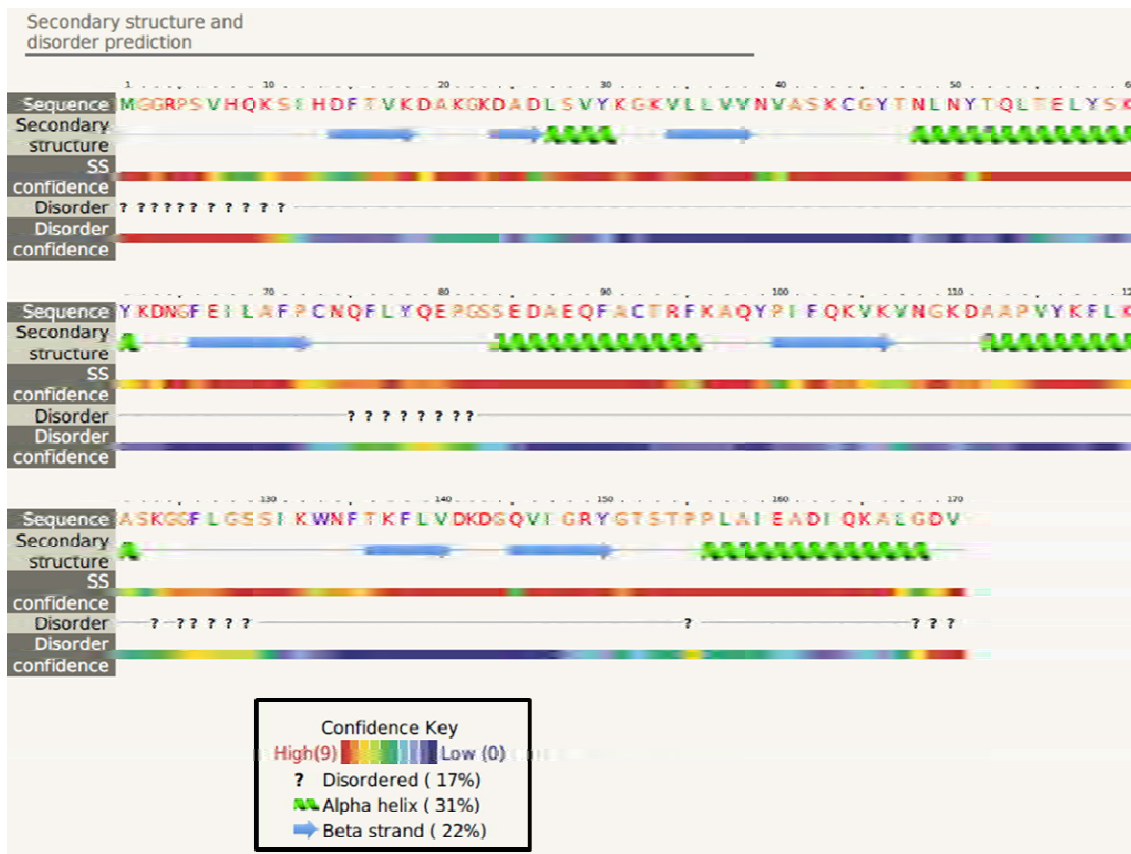
- Excisión de la metionina inicial en GST\_Pistil\_4, GST\_Pistil\_5, GST\_Pistil\_12 y GST\_Pollen\_3, con una probabilidad del 89%.
- Excisión de la valina en la posición 2 de GST\_Pistil\_2, GST\_Pistil\_8 y GST\_Pollen\_6, con una probabilidad del 100%.
- Excisión de la glicina en la posición 2 de GST\_Pollen\_8 con una probabilidad del 100%.
- Acetilación de la metionina inicial en GST\_Pollen\_3 con una probabilidad del 100%.

- Acetilación de la alanina en la segunda posición de GST\_Pistil\_6, GST\_Pistil\_6 y GST\_Pollen\_4, con una probabilidad del 83%.
- Acetilación de la serina en la segunda posición de GST\_Pistil\_11 con una probabilidad del 85%.
- Acetilación de la treonina en la segunda posición de GST\_Pollen\_5 con unaprobabilidad del 77%.

Estas predicciones se llevaron a cabo mediante el uso de las herramientas de predicción citadas en el capítulo de materiales y los métodos. Por el contrario, no se predijeron la presencia de sitios de miristilación o palmitoilación.

### 1.3.3. Predicción de la estructura secundaria y modelado 3D de la GPX y la GST del polen de olivo.

Se utilizaron las secuencias clonadas de GPX y GST de polen para predecir la estructura secundaria (Figuras 42 y 43) y el modelado 3D mostrado en las figuras 44 y 45.



**Figura 42.** Predicción de la estructura secundaria de GPX8 en polen de olivo.

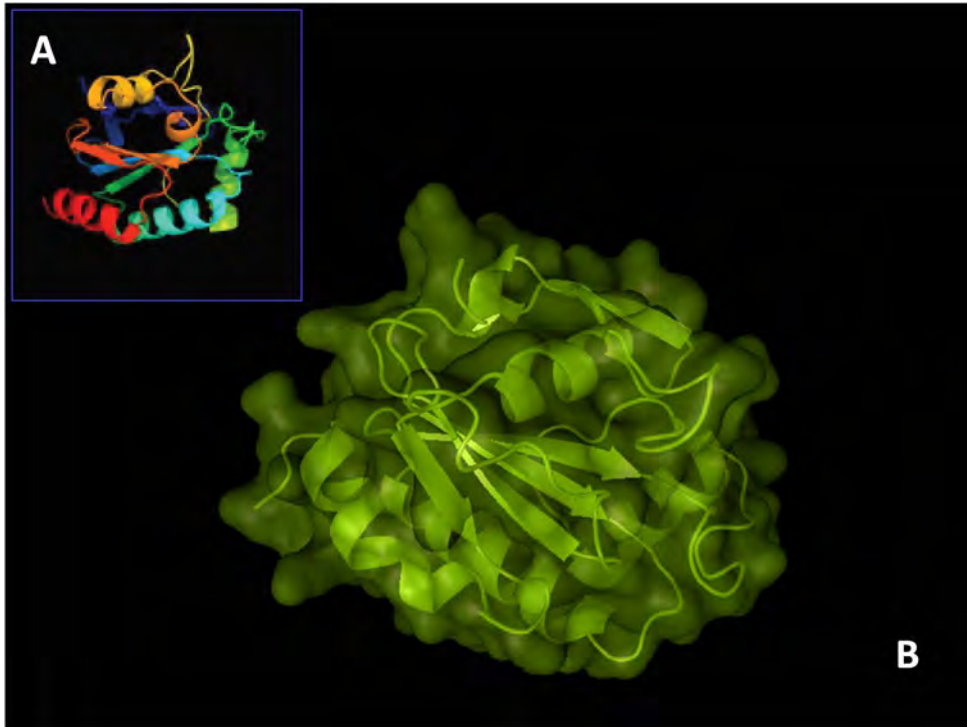
La estructura predicha confirmó que la secuencia aminoacídica de GPX de polen era consistente con los modelos 3D disponibles desarrollados mediante el uso de un

software de reconocimiento de plegado (c3cynC), identificándose en un 94% con una GPX8 y un nivel de confianza del 100%.

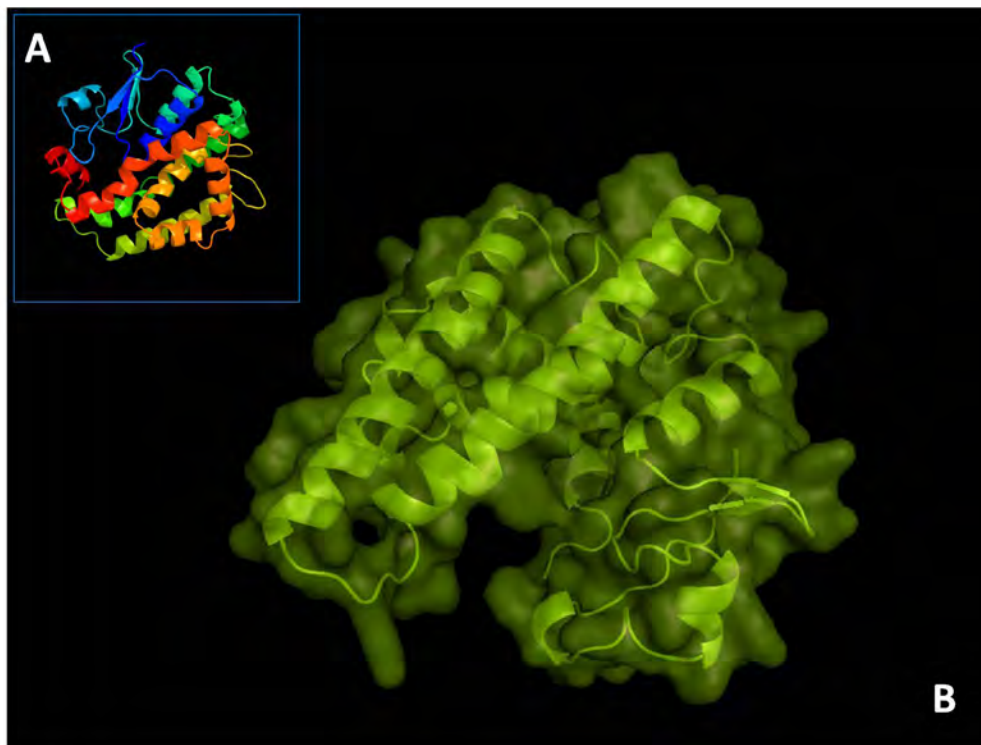


Figura 43.Predicción de la estructura secundaria de GST en polen de olivo.

Al mismo tiempo, la estructura predicha confirmó que la secuencia aminoacídica de GST de polen era consistente con los modelos 3D disponibles desarrollados mediante el uso de software de reconocimiento de plegado (c11jrB), con una cobertura de identidad del 95% y un nivel de confianza del 100%.



**Figura 44.**A) Predicción de la estructura 3D en la GPX8 del polen de olivo (mediante Phyre2). B) Modelado 3D de la GPX8 de polen de olivo.



**Figura 45.**A) Predicción de la estructura 3D en la GST del polen de olivo (mediante Phyre2). B) Modelado 3D de la GST de polen de olivo.

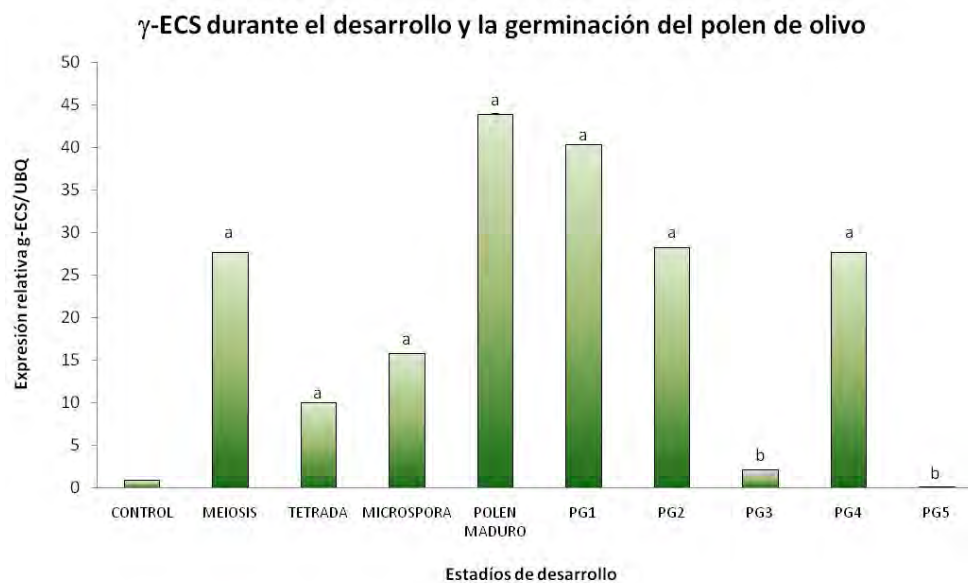
- 2.1. Análisis bioquímico y molecular de los enzimas implicados en la síntesis de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo.**
- 2.2. Involvement of glutathione and glutathione reductase in the development of the microsporocyte and during the germination of the olive pollen.
- 2.3. Determinación de la localización y la expresión génica y proteica de los enzimas responsables de la detoxificación mediada por GSH durante la ontogenia y la germinación del polen de olivo.





### 2.1.1. Análisis de expresión génica de las enzimas $\gamma$ -ECS y GS.

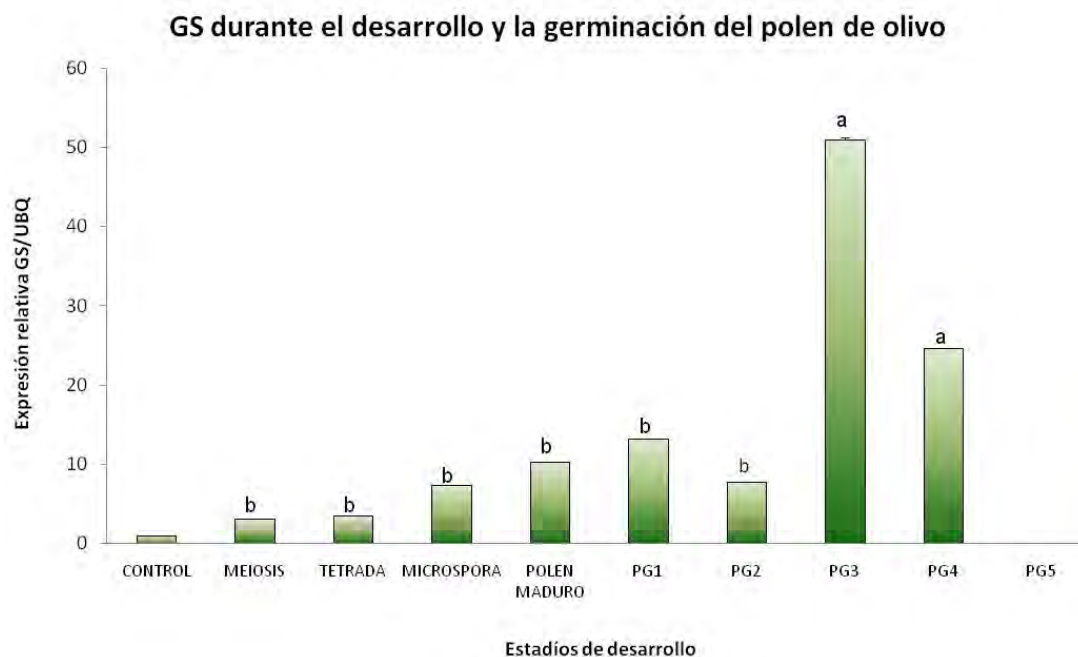
Una vez que se habían clonado los enzimas implicados en la síntesis del glutatión en el polen de olivo, se llevaron a cabo análisis de expresión a nivel de los transcritos. El análisis de expresión de los transcritos durante la ontogenia del polen en la antera, así como durante su germinación, se evaluaron mediante ensayos de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando cebadores específicos (Tabla 6 de Materiales y Métodos).



**Figura 46.** Análisis de expresión mediante qPCR de la  $\gamma$ -ECS del polen de olivo durante el desarrollo de la antera y la germinación *in vitro* del polen. Polen germinado a 1h, 3h, 6h, 9h y 12h (PG1, PG2, PG3, PG4 Y PG5). “a” y “b” en el gráfico representan un significado estadístico con un intervalo de confianza del 99% ( $P \leq 0,01$ ) y del 95% ( $P \leq 0,05$ ), respectivamente. El control se realizó en polen maduro.

Con respecto a la enzima de la primera etapa de la síntesis de GSH, los resultados de la amplificación revelaron que durante el desarrollo de la antera, existe una gran cantidad de transcritos al principio de la ontogénesis del polen (meiosis) y al final (polen maduro). En la figura 46 puede observarse cómo la expresión de la enzima  $\gamma$ -ECS disminuye en la etapa de tétrada y después va aumentando poco a poco hasta alcanzar su máximo en el estadio de polen maduro. El máximo de expresión de la  $\gamma$ -ECS durante el proceso de germinación del polen se da al principio de la misma (hasta 1 hora de germinación), la cantidad de transcritos a lo largo de este proceso biológico va disminuyendo progresivamente hasta las 6 horas de germinación (estadio de germinación 4), donde se observa otro pico (figura 46).

En cuanto a la GS, del análisis de expresión por qPCR (Figura 47) se obtuvieron los siguientes resultados: a lo largo del desarrollo de la antera los transcritos van aumentando hasta alcanzar su máximo en el estadio de polen maduro. Durante la germinación del polen, se observa expresión al principio de ésta (estadio 1), después va disminuyendo hasta el estadio de germinación 3 (a las 6h de germinación) en donde se observa un elevado aumento en la expresión, para disminuir progresivamente después.



**Figura 47.** Análisis de expresión mediante qPCR de la GS del polen de olivo durante el desarrollo de la antera y la germinación *in vitro* del polen. Polen germinado a 1h, 3h, 6h, 9h y 12h (PG1, PG2, PG3, PG4 Y PG5). “a” y “b” en el gráfico representan un significado estadístico con un intervalo de confianza del 99% ( $P \leq 0,01$ ) y del 95% ( $P \leq 0,05$ ), respectivamente. El control se realizó en polen maduro.

### 2.1.2. Análisis de expresión proteica de las enzimas $\gamma$ -ECS y GS.

El análisis de expresión proteica fue llevado a cabo mediante Western blot y reveló la presencia de  $\gamma$ -ECS y GS durante la ontogenia y la germinación del polen de olivo. Para la expresión relativa cuantificada por densitometría a partir de las bandas de Western blot, se consideró el 100% en el estadio de polen maduro, por ser el estadio más estable y el nexo de unión entre el desarrollo del polen y su germinación.

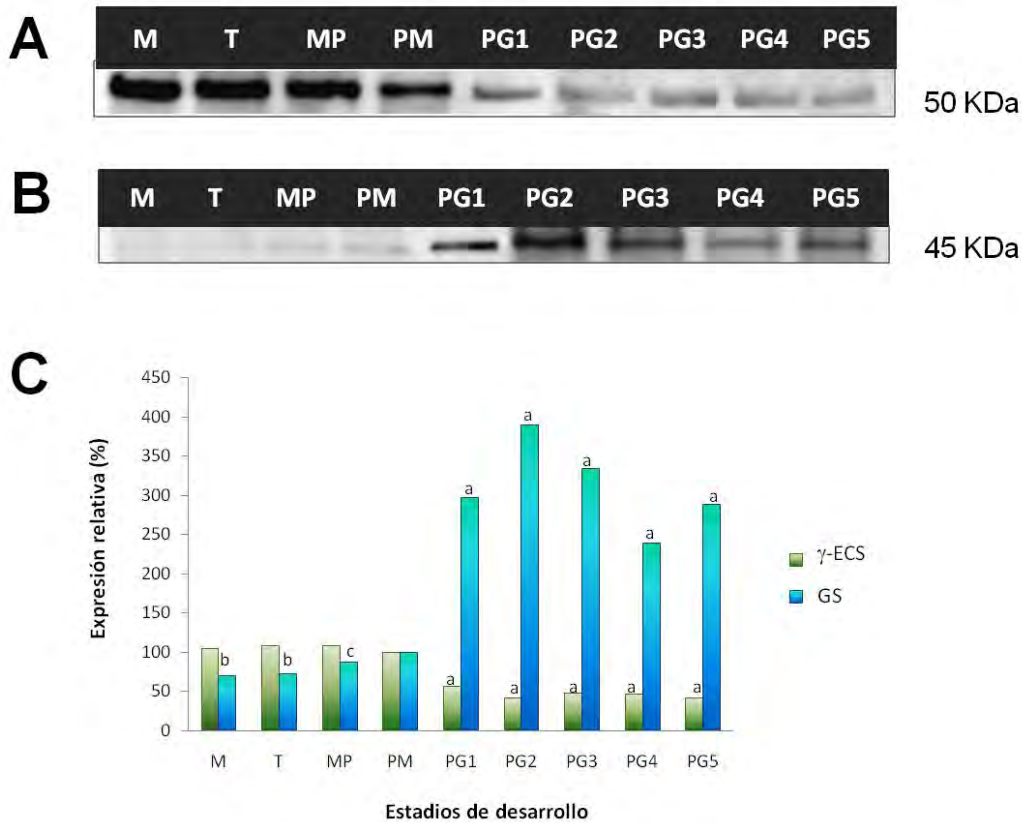
Analizando los resultados (Figura 48), se observa que la  $\gamma$ -ECS se expresa durante todo el desarrollo del polen dentro de la antera, con una mayor intensidad en los primeros estadios de desarrollo (meiosis y tétrada), para después disminuir durante la germinación del polen, manteniendo su expresión a lo largo de este proceso.

Por el contrario, la GS se expresa con una ínfima intensidad durante la ontogenia del polen y comienza a expresarse a niveles considerables durante la germinación del polen, con especial interés entre las 6 primeras horas de germinación del tubo polínico (Figura 48), y continúa expresándose hasta el final de la germinación.

### 2.1.3. Localización celular de las enzimas $\gamma$ -ECS y GS.

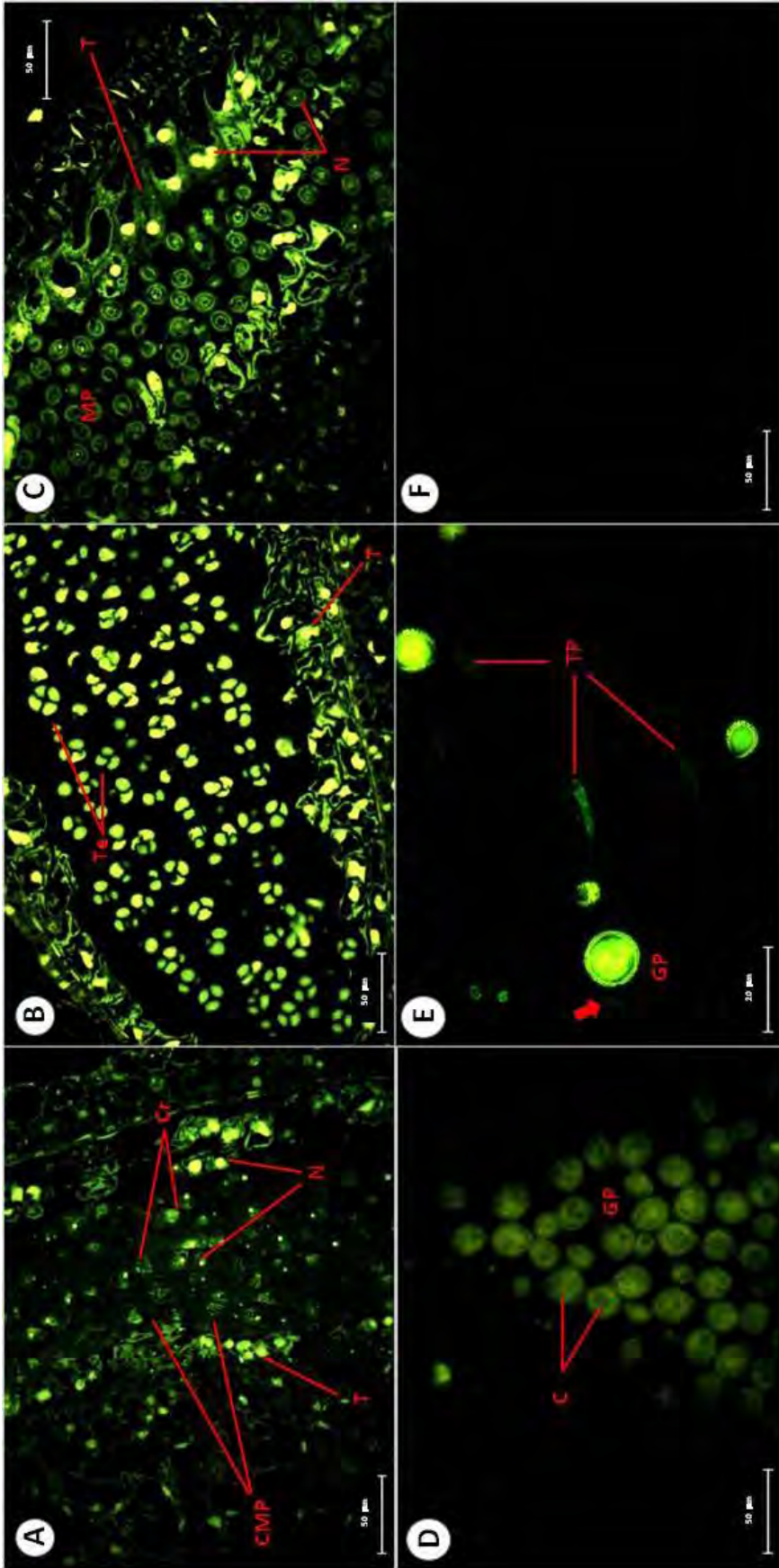
En la figura 49 se puede observar que la  $\gamma$ -ECS está presente a lo largo de todo el desarrollo del polen de olivo (CMP, tétrada, microspora y polen maduro) y durante la

germinación del mismo. Se expresa en todos los tejidos reproductivos del polen y la antera, incluido el tapetum, con una localización remarcable en los núcleos y más generalizada (aunque con menor intensidad) en el citoplasma. La  $\gamma$ -ECS, además, alcanza su máximo de expresión en el estadio de tetrada y su mínimo en el citoplasma del tubo polínico durante la germinación.

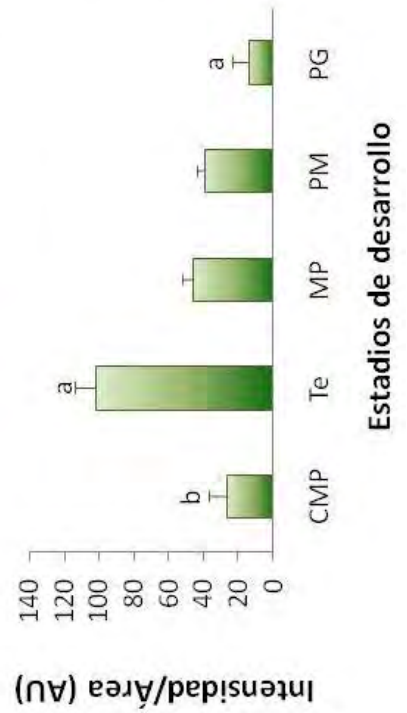


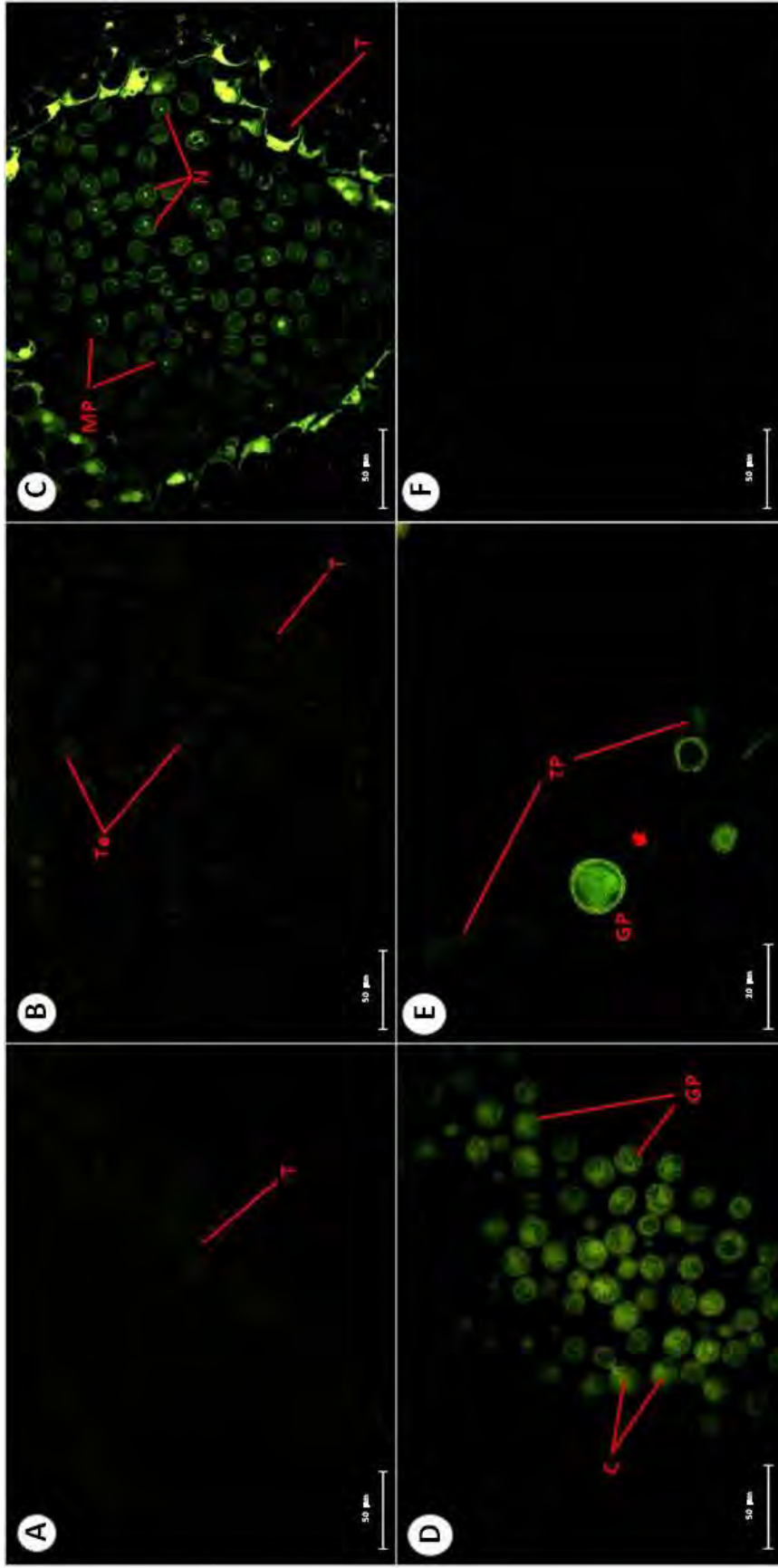
**Figura 48.** **A.** Análisis de expresión mediante Western blotting de la proteína  $\gamma$ -ECS del polen de olivo durante el desarrollo de la antera y la germinación *in vitro*. **B.** Análisis de expresión mediante Western blotting de la proteína GS del polen de olivo durante el desarrollo de la antera y la germinación *in vitro*. **C.** Cuantificación de los niveles de expresión de ambas proteínas mediante densitometría a partir de las bandas de la figura 48.A., y relativización con respecto al estadio de polen maduro. “a”, “b” y “c” en el gráfico representan un significado estadístico con un intervalo de confianza del 99% ( $P \leq 0,01$ ), del 95% ( $P \leq 0,05$ ) y del 90% ( $P \leq 0,10$ ), respectivamente. Meiosis (M), Microspora (MP), Polen germinado a 1h, 3h, 6h, 9h y 12h (PG1, PG2, PG3, PG4 Y PG5), Polen Maduro (PM), Tetrada (T).

La localización de la GS se muestra en la figura 50. Esta enzima se expresa con muy baja concentración en los primeros estadios del desarrollo del polen (CMP y tetrada) mientras que muestra una expresión intensa en los estadios de microspora y polen maduro al final del desarrollo, donde alcanza su máximo. Cabe destacar también la localización generalizada de la GS en el citoplasma durante la ontogenia y la germinación y remarcablemente en los núcleos, con una alta intensidad de expresión en el estadio de microspora.

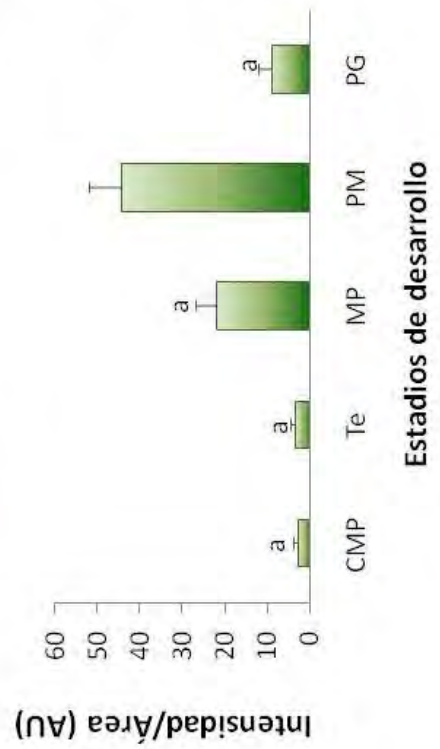


**Figura 49.** Arriba: Inmunolocalización del enzima  $\gamma$ -ECS, mediante microscopía de fluorescencia, durante el desarrollo del polen de olivo y la germinación de polen. Localización en la antera de olivo en A) el estadio de meiosis, B) el estadio de tetrad, C) el estadio de microspora, D) el estadio de polen maduro. E) Localización en granos de polen germinado. F) Control negativo. Abajo: Gráfico de Intensidad por Área de la actividad  $\gamma$ -ECS en los distintos estadios de desarrollo y durante la germinación del polen de olivo.





**Figura 50.** Arriba: Inmunolocalización del enzima GS, mediante microscopía de fluorescencia, durante el desarrollo del polen de olivo y la germinación de polen. Localización en la antera de olivo en A) el estadio de meiosis, B) el estadio de tetrada, C) el estadio de microspora, D) el estadio de polen maduro. E) Localización en granos de polen germinado. F) Control negativo. Abajo: Gráfico de Intensidad por Área de la actividad GS en los distintos estadios de desarrollo y durante la germinación del polen de olivo. "a" en el gráfico representa una significación estadística con un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ). Citoplasma (C), Grano de Polen (GP), Microspora (MP), Núcleo (N), Tapetum (T), Tétrada (Te), Tubo Polínico (TP).





- 2.1. Análisis bioquímico y molecular de los enzimas implicados en la síntesis de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo.
- 2.2. Involvement of glutathione and glutathione reductase in the development of the microsporocyte and during the germination of the olive pollen.**
- 2.3. Determinación de la localización y la expresión génica y proteica de los enzimas responsables de la detoxificación mediada por GSH durante la ontogenia y la germinación del polen de olivo.





# **Involvement of glutathione and glutathione reductase in the development of the microsporocyte and during the germination of the olive pollen**

Estefanía García-Quirós<sup>1</sup> and Juan de Dios Alché<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain  
{estefania.garcia, juandedios.alche}@eez.csic.es

Glutathione and glutathione reductase (GR) are undoubtedly two of the best-known cellular antioxidants, whose role is paramount in the ascorbate-glutathione cycle. Maintaining appropriate levels of reduced glutathione (GSH) with respect to oxidized glutathione (GSSG) is necessary for the proper functioning of the plant cell, and the enzyme responsible for this purpose is GR, one of the most important enzymatic antioxidants in all organisms.

Based on previous studies, which show that GSH is essential for the germination of the pollen tube, this study aims to shed light on these hypotheses and also on the implication of these two closely related antioxidants in the development process of the pollen grain. For this purpose a wide range of biochemical and molecular techniques have been used, such as immunohistochemistry, westernblotting, qPCR, spectrophotometry and LC-MS. An enormous expression of GSH, as well as of GR, was observed throughout the development of the olive pollen and also during the pollen tube germination. Their location stands out mainly in the nuclei of all structures and in the pollen tube.

Our results demonstrate that the availability of GSH is essential not only for proper development of pollen but also for the germination of pollen.

---

## ***Introduction***

The olive tree is one of the most important crops in the Mediterranean area, accounting for 95% of world production. This plant is the source from which olive oil is obtained, which is the sixth most abundant vegetable oil produced in the world. The main reason for cultivation in this location apost from is because it has a high tolerance for salinity and drought compared to other salinity-sensitive fruit trees (Shah et al., 2017). In anthers of angiosperms, meiosis produces unicellular haploid microspores that, once mature, will be further divided by mitosis, (mitosis of pollen I, PM I) producing a larger vegetative cell and a smaller generative cell (GC). This generative cell will undergo a second mitosis (PM II) consisting of a symmetric division that produces two sperm cells (Borges et al., 2008). Therefore, the male gametophyte (the pollen grain), is composed

of a vegetative cell containing the vegetative cell in bicellular pollen species, or two spermatid nuclei in tricellular pollen species (Boavida and McCormick, 2007). In most plant species, pollen grains are desiccated after anther dehiscence (Crowe et al., 1992) and on contact with the surface of the stigma, thanks to the intervention of a set of signals between the grain of pollen and stigma, are hydrated and the pollen tube is formed (Boavida and McCormick, 2007). This is the core of the olive sexual reproduction, with pollen grains of the bicellular type. The pollen tube will then grow, reorienting through the transmitting tissues of the pistil (style), and transporting the two spermatid nuclei to the embryonic sac, where they are liberated giving rise to double fertilization characteristic of angiosperms (Boavida and McCormick, 2007).

When exposed to different types of stress, or also as a result of their aerobic metabolism, plants tend to accumulate excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) that react with cellular lipids, proteins and DNA. Glutathione (GSH) is a tripeptide ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) considered as one of the thiol metabolites of low molecular weight, water soluble, most important and widely distributed in all types of cells and tissues, as a strong non-enzymatic antioxidant (Hasanuzzaman et al., 2017, Gill et al., 2013). In general, GSH synthesis takes place mainly in the chloroplast (Pasternak et al., 2008), but also occurs in cytosol and mitochondria (Mahmood et al., 2010, Zechmann and Müller 2010). Once synthesized, GSH can be imported directly or indirectly to other organelles to meet the metabolic needs of the cell. GSH regulates multiple metabolic functions. For example, it directly or indirectly participates in ROS detoxification (Foyer and Noctor 2005a, b), improving plant tolerance to different biotic and abiotic stresses (Sharma and Dietz 2006, Srivalli and Khanna-Chopra 2008, Szalai et al., 2009, Hasanuzzaman et al., 2011, 2017, Hasanuzzaman and Fujita 2011, 2013). It has been shown that GSH can be applied exogenously to improve tolerance to abiotic stress in plants (Kattab, 2007, Salama and Al-Mutawa 2009, Wang et al., 2011, Chen *et al.*, 2012, Nahar et al, 2015a, b, c), which could contribute significantly to the improvement of crops and their costs. For these reasons, much attention has been rendered to clarifying the role of this molecule in stress tolerance for a long time. However, recently, the study of this molecule has revolved around its interaction with other signaling molecules and phytohormones, acting as cofactor, and its redox state can in turn trigger the transduction of multiple signals (Foyer and Noctor 2005a, b), providing the possibility of being involved in physiological processes, such as modulation of cell proliferation, apoptosis, fibrogenesis, growth, development, cell cycle, gene expression, enzyme activity and immune function (Noctor and Foyer, Ogawa, 2005, Qiu et al., 2013, Nahar et al, 2015a). On the other hand, recent studies have proposed that ROS are involved in the signaling network that takes place between pollen and pistil during the olive fertilization process, regulating pollen germination and/or pollen tube growth (Hiscock & Allen 2008, McInnis et al. 2006a, b, Zafra et al. 2010). Likewise, Zechmann et al. (2010, 2011a) demonstrated not only the presence of GSH in the male gametophyte, but also the need for an appropriate concentration of glutathione in the pollen for germination to occur. It has been demonstrated in recent years that GSH, both endogenous and exogenous, delay senescence and flowering time

(Cheng et al., 2015). In addition, there is a direct relationship between GSH-dependent cellular redox status and plant growth regulators (Bashandy et al., 2010, Koffler et al., 2014), enhancing cell division and controlling seed germination (Vernoux et al., 2000, Chen *et al.*, 2010, Wang et al., 2011).

Glutathione reductase (GR) is the key enzyme in GSH regeneration. GR is a homodimeric flavoprotein oxidoreductase that uses FAD (as a prosthetic group) and NADPH to reduce one GSSG molecule to two GSH molecules (García-Quirós *et al.*, 2017). This reaction is understood as the main route to maintain GSH levels in its reduced form in all subcellular compartments (Mullineaux and Rausch 2005, Yin et al., 2017). The classical studies of fractionation in plants described a greater activity of GR in chloroplasts (Foyer and Halliwell 1976), but it has also been detected in mitochondria, cytosol and peroxisomes (Edwards *et al.*, 1990, Rasmusson and Møller 1990, Jiménez et al., 1997, Stevens et al., 2000, Romero-Puertas et al., 2006). In the genomes of the plants, two GR genes have been coded: GR1 encodes cytosolic and peroxisomal GR activity, whereas GR2 encodes for plastidial and mitochondrial GR activity and is responsible for 70-80% of GR activity in the plant (Gill et al., 2013, García-Quirós et al., 2017). GR regulates the GSH/GSSG ratio within the cell, so that a higher GR activity tends to increase the cellular levels of total and reduced glutathione (Foyer *et al.*, 1995, Pilon-Smits et al., 2000, Kouřil et al. 2003, Chen *et al.*, 2007, Yin et al., 2017). To date, few studies exist about GR in plant reproductive tissues, but recent bioinformatic studies have found that the isoform present in olive pollen is that of the chloroplastidial type (which has been cloned), that is, GR 2, whereas both isoforms can be found in pistil (García-Quirós et al., 2017).

There are still many gaps in the metabolic network that regulates the processes of maturation and germination of olive pollen. Also, there are only a few immunolocalization and germination works performed with *Arabidopsis* mutants deficient in GSH (Zechmann et al. 2011a). More molecular, biochemical and physiological analyzes on the development of the male gametophyte, pollen grain rehydration, germination and pollen tube growth are therefore essential to study angiosperms reproduction, fundamental for the formation of the fruit. The objective of this study was to identify and characterize GRs in reproductive tissues, at molecular and biochemical levels, as well as investigate the levels and location of GSH, during the process of olive pollen development and its germination. In order to finally verify the role of both antioxidants in the good end of these physiological processes.

## **Materials and methods**

### **Plant material**

Fresh anthers, at different stages of development, were collected from olive trees of 'Picual' variety, grown in Güejar Sierra (Granada, Spain).

Mature olive pollen was collected from dehiscent anthers using the bagging technique of inflorescences. Samples were taken from olive trees of the "Picual" variety belonging to the olive germplasm collection of the Center for Research and Agrarian Training (CIFA) "Venta del LLano "(Mengíbar, Jaén, Spain). The pollen samples were filtered through a 50 µm pore diameter nylon sieve, in order to remove the flower remains.

Samples were taken during the months between April and May of each year (from 2013 to 2016).

### **In vitro germination of olive pollen**

*In vitro* germination of isolated pollen was performed by following standard protocols, described by M'rani-Alaoui (2000), in liquid germination medium (0.01% (w/v) boric acid, 0.01% (w/v) potassium nitrate, 0.02% (w/v) magnesium sulfate, 0.03% (w/v) calcium nitrate, 10 % (w/v) sucrose, 5% (v/v) PEG 8000). 0.1 g of mature pollen was prehydrated by incubation in a humid chamber at 30 ° C and in darkness for 1 h. The pollen was then incubated in germination medium, under gentle agitation, at room temperature and in the dark for 30 min, 1 h, 3 h, 6 h and 9 h. Later, the pollen was filtered with nylon sieves of different pore diameters (M'rani-Alaoui *et al.* 2000), in order to isolate the germinated pollen.

### **Liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry**

Glutathione was determined according to Ariaki et al. (2006). Samples of anthers at the different stages of development and pollen germinated at different times were frozen in liquid nitrogen, ground and immediately homogenized in 1 mL of 0.1M HCl. After centrifugation, supernatants were extracted again. The supernatants then were pooled and filtered through 0.45 mm polyvinylidene fluoride (PVDF) filters and analyzed by LCMS on a Triple quadrupole mass spectrometer (Quattro micro) coupled to a liquid chromatograph (Waters Allience 2695) with dual wavelength detector. The whole process was done in darkness.

***Glutathione reductase activity assay***

Proteins from the anther samples, at different stages of development, and from germinated pollen (6h) were extracted under native conditions. The samples were powdered in a mortar pre-cooled with liquid nitrogen. 0.1 g of the resulting powder were transferred to 1 ml of HB extraction buffer (0.1 M KCl, 20 mM Hepes, pH 7.0) and vigorously vortexed. Samples were then sonicated (5 sec, 2 times). After sonication, they were centrifuged at 1000rpm and 4°C for 5 minutes. The supernatant was analyzed by the OxiSelect™ Glutathione Reductase Assay Kit (Cell Biolabs) to quantify the activity of glutathione reductase in the samples, according to the manufacturer's protocol.

***Isolation of RNA, generation of cDNA and GR expression analysis***

Total anther RNA at different stages of development and total pollen RNA at different germination periods was extracted using the RNeasy Plant Total RNA kit (Quiagen, U.S.A.) and first-strand cDNA was synthesized with oligo(dT)19 primer and M-MLV reverse transcriptase (Fermentas). Different pairs of primers were designed to amplify by standard PCR and qPCR from the different cDNAs the complete GR sequence, obtained in previous works (García-Quirós *et al.*, 2017) from the olive transcriptome. qPCR was performed based in Syber Green mix (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche) to analyze GR expression, and to corroborate these results a standard PCR was performed using Taq polymerase (Promega) and Pfu (Promega) to obtain or confirm nucleotide sequences.

***Extraction of total proteins, SDS-PAGE and Western blotting***

Anther and germinated pollen samples at different stages (0.1 g) were ground in a mortar precooled with liquid nitrogen. The extraction of total proteins and subsequent delipidation of the extracts was carried out according to Zienkiewicz *et al.* (2012). Total protein content was estimated using the 2D Quant Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions.

Protein extracts (~25 µg) were analyzed on 12% polyacrylamide gels (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, BIO-RAD) under denaturing conditions (SDS-PAGE). The electrophoresis was performed on a MiniProtean III Cell (BIO-RAD) device, applying to the gel an initial voltage of 90 V (~20 min) and then 180 V (~20 min).

Then, proteins were electroblotted onto a PVDF membrane in a TransBlot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membranes were blocked overnight at 4°C in a solution containing 3% (w/v) BSA in TBS buffer (pH 7.4), and probed with primary (anti-GR,

Agrisera prod. No. AS09 181) and the corresponding secondary (anti-rabbit IgG Alexa488-labelled secondary antibody - Molecular Probes) antibodies.

### ***Sample preparation for immunohistochemistry of GSH and GR***

Samples were collected from the 5 development stages (meiosis, M; tetrad, Te; microspore, Mi; mature pollen, MP and germinated pollen during 6h, GP) and immersed in a fixative solution composed of a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2). Further dehydration in ethanol series and embedding in Unicryl resin followed by polymerization using UV light, at -20 °C were performed. Thin (1 µm) and ultrathin (70nm) sections were attached to TESPAs treated slides and Ni-grids covered with formvar, respectively.

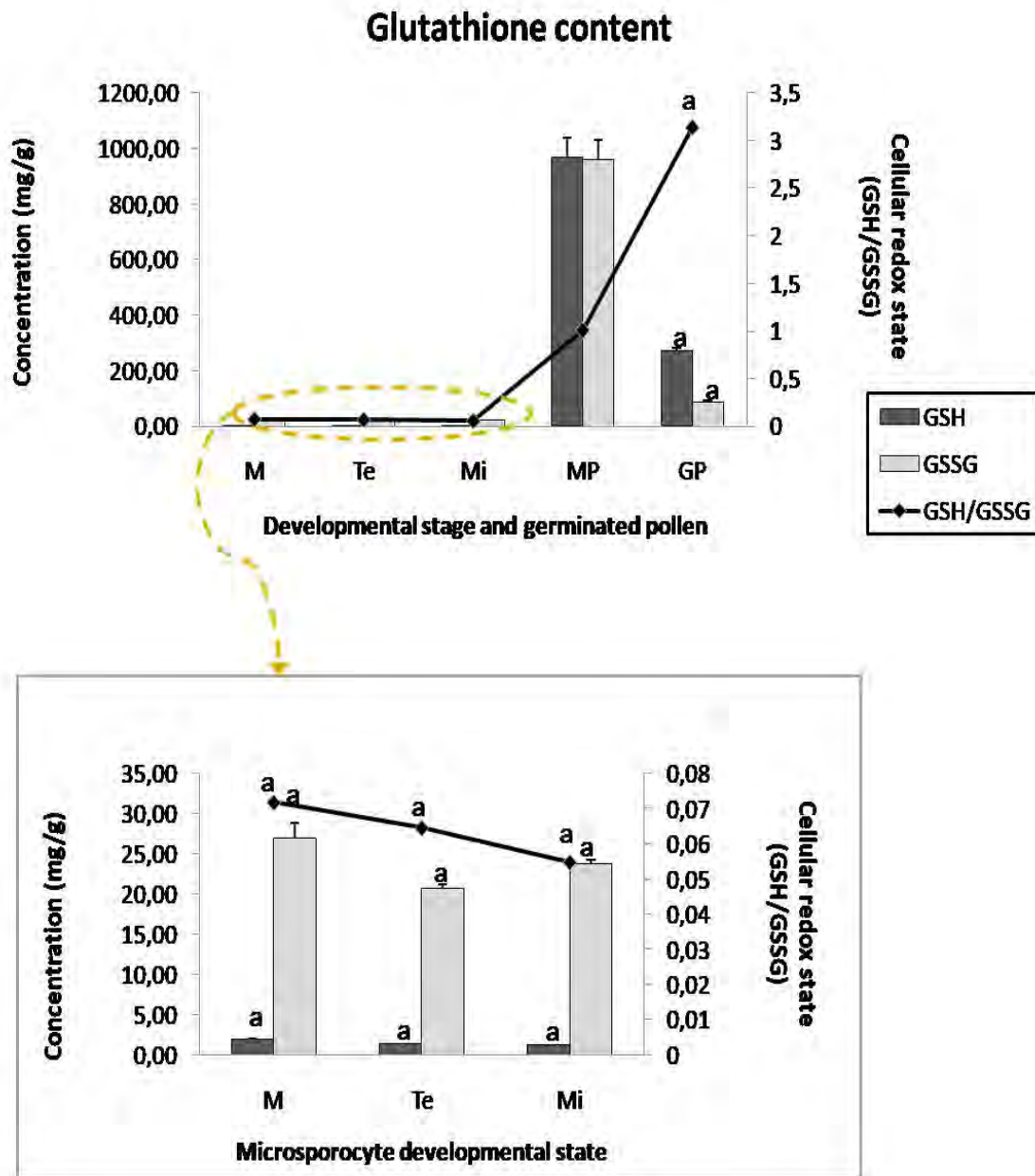
Thin sections were incubated in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) containing 2.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma–Aldrich) for 1h at room temperature and then treated with commercial polyclonal primary anti-GSH (Agrisera prod. No. AS09 594) and anti-GR (Agrisera prod. No. AS09 181) antibodies in 1:30 proportion, followed by secondary antibody (anti-rabbit IgG Alexa549-labelled secondary antibody - Molecular Probes) in 1:100 proportion. Negative controls were prepared by omitting the primary antibody. After washing three times, samples were mounted with citifluor (Ted Pella). Fluorescence microscopy (FM) observation was performed using a Leica DMI600B Inverted Epifluorescence Microscope. Fluorescence intensity was quantified using the ImageJ software. Data are the average of a minimum of nine images obtained in three independent experiments.

Ultrathin sections were incubated in PBS containing 5% bovine serum albumin (BSA; Sigma–Aldrich) for 1h at room temperature and then treated with primary anti-GSH (Agrisera prod. No. AS09 594) antibody in a proportion of 1:100, followed by secondary antibody (anti-rabbit IgG, 20nm gold-labelled secondary antibody, BBInternational) in a 1:50 proportion. After washing three times, samples were contrasted with EMS and lead citrate to contrast. Transmission Electron Microscope (TEM) observations were carried out in a JEOL JEM-1011 device.

## ***Results***

### ***Detection and levels of GSH during olive pollen development and germination.***

Biochemical analyzes of GSH were performed using LC-MS. The highest concentration of GSH was observed in the pollen mother cell (PMC) stage during mitosis, suggesting a role of GSH in the control of the cell cycle (Figure 51).



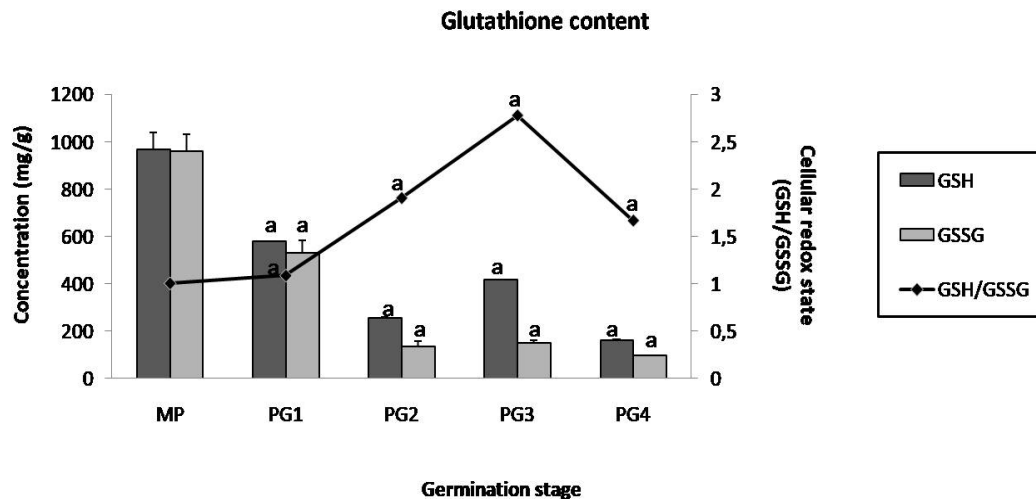
**Figure 51.** Changes in GSH and GSSG levels during anther development and pollen germination as determined by LC-ES / MS analysis. Meiosis (M), microspore (Mi), germinated pollen at 6h (GP), mature pollen (MP), tetrad (Te). "a" in the graph represents a statistical significance with a confidence interval of 95% ( $P \leq 0.05$ ). Referred to mature pollen.

On the other hand, during the mature pollen stage, the concentration of GSH undergoes a drastic increase. In addition, oxidized and reduced forms of glutathione are found in equilibrium in mature pollen. This result may suggest the idea that there is a high accumulation (and perhaps synthesis) of glutathione at this stage, because the mature pollen is preparing all its metabolic machinery for the germination of the pollen tube. During pollen germination, metabolic rates are very high and large concentrations of ROS are generated, requiring high amounts of glutathione to fight against the possible



oxidative damage that may be caused during these delicate stages of the fertilization process.

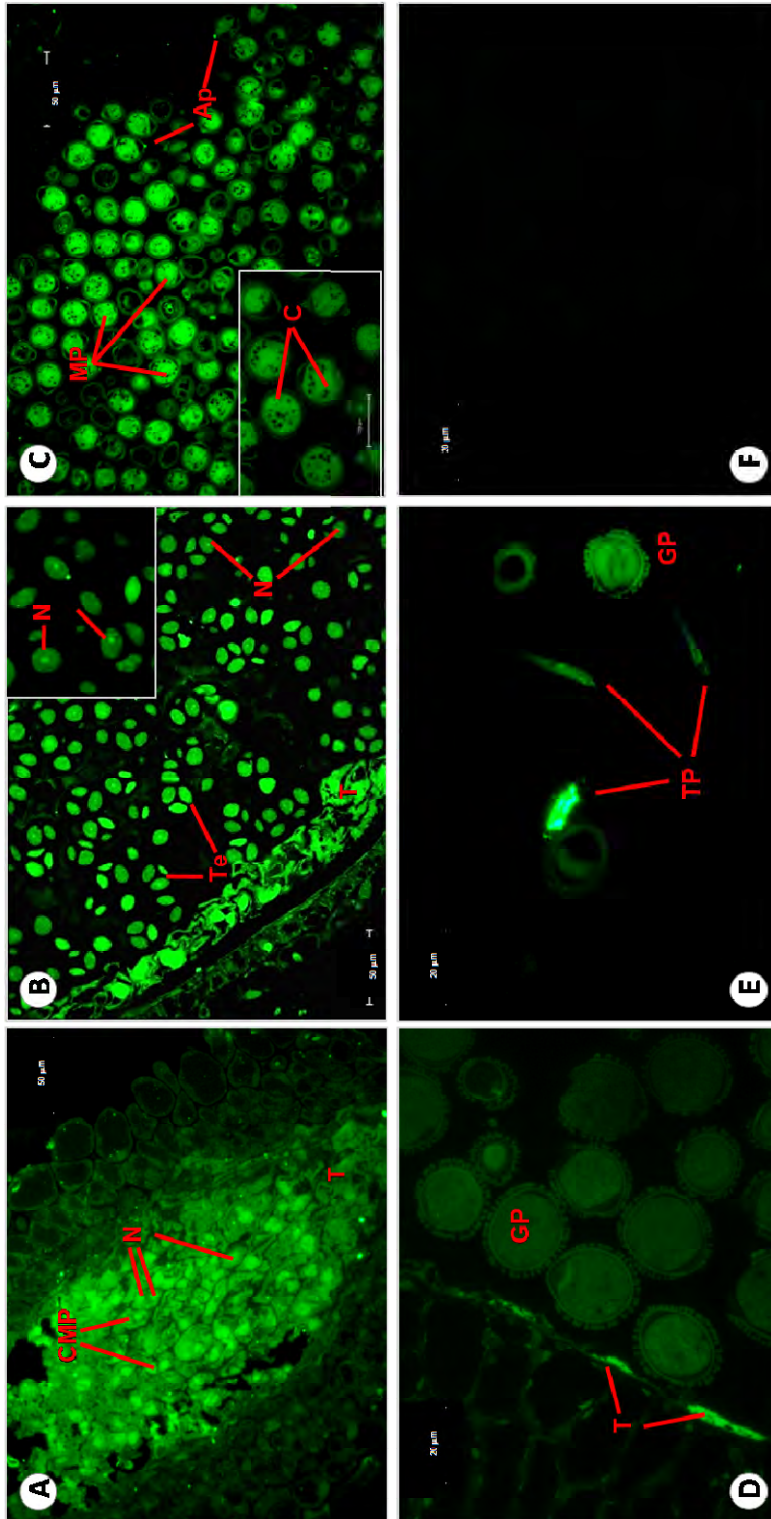
However, as the germination time progresses, glutathione concentrations also vary, suffering a decrease in GSH content, probably due to the high production of ROS occurring during this process (Figure 52).



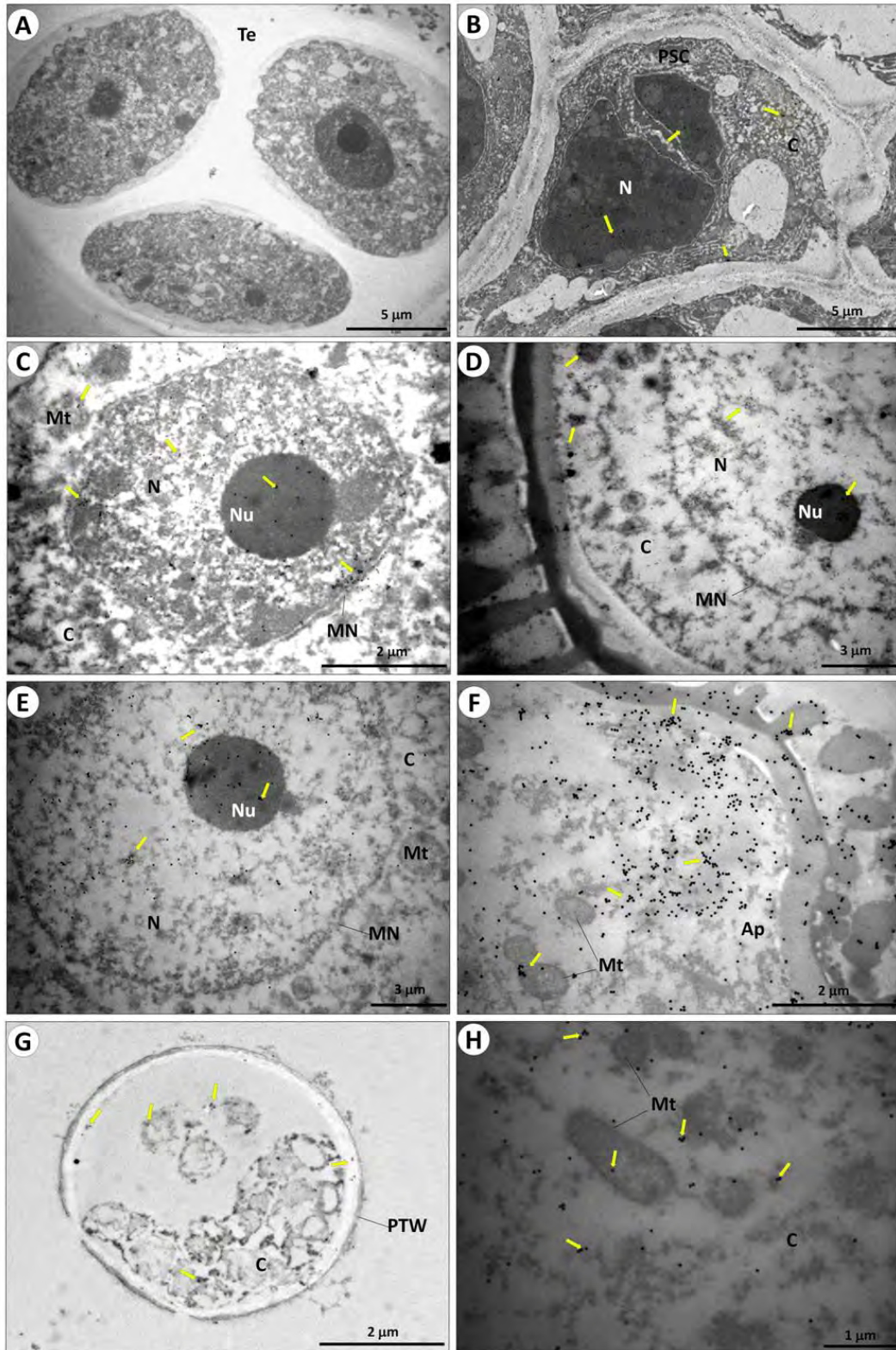
**Figure 52.** Changes in GSH and GSSG levels in mature pollen and during olive pollen germination as determined by LC-ES / MS analysis. Germinated pollen at 1h, 3h, 6h, and 9h (PG1, PG2, PG3 and PG4) and mature pollen (MP). "a" in the graph represents a statistical significance with a confidence interval of 95% ( $P \leq 0.05$ ). Referred to mature pollen.

Figure 53 shows the cell localization determined by immunohistochemistry of GSH throughout the development of anther, and during pollen germination. GSH is present in both the microsporocytes and other tissues of the anther (including the tapetum) with a wide distribution, throughout the pollen development process. The location of GSH in the nuclei of both the microsporocytes and the cells of the tapetum is highlighted. In the pollen stem cell, a greater signal intensity, as well as a very wide distribution of GSH, can be observed with respect to the more advanced stages of pollen development. During germination, the fluorescence signal intensifies again in the pollen tube, indicating a high concentration of GSH in the pollen tube during germination.

GSH location includes the cytosol, organelles such as mitochondria and plastids, and especially nuclei where a remarkable concentration of GSH was observed (Figure 54). The intense concentration of GSH in the aperture region of pollen grain is evident in the early stages of development of pollen tube (Figure 54. F), providing evidence that, as it has already been studied during pollen germination in other species (Zechmann et al., 2011a, 2011b), GSH is essential for the development and orientation of the pollen tube.



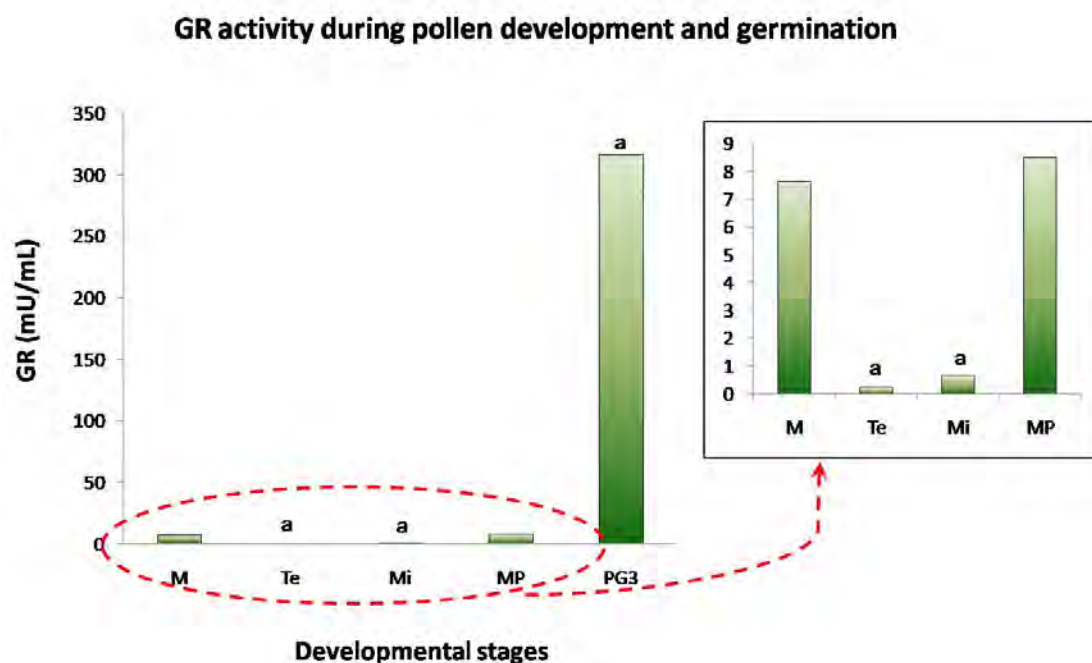
**Figure 53.** Arriba: Immunolocalization of GSH, by fluorescence microscopy, during of olive pollen development and pollen germination. A: Location in olive anther at meiosis stage. B: Location in olive anther at tetrad stage. C: Location in olive anther at microspore stage. D: Location in turgid anther of olive (mature pollen stage). E: Location in germinated grains pollen. F: Negative control. **Abajo:** Graph of Intensity by Area of the presence of GSH in the different developmental stages and during pollen germination of olive. "a" in the graph represents a statistical significance with a confidence interval of 95% ( $P \leq 0.05$ ). Aperture (AP), Cytoplasm (C), Germinated Pollen Grain (GP), Microspore (Mi), Nucleus (N), Pollen Grain (PG), Pollen Tube (PT), Pollen Stem Cell (PSC), Tapetum (T), Tetrad (Te).



**Figure 54.** GSH Immunolocalization, by transmission electron microscopy (TEM), during pollen development and germination in olive. A) Negative control. B) Location in the stem cell of olive pollen, at meiosis stage. C) Location at tetrad stage. D) Location at microspora stage. E) Location at mature pollen stage. F) Location in aperture region of the pollen grain at the beginning of germination. G) Location at germinated pollen stage. H) Location at germinated pollen stage (into pollen tube). Aperture (Ap), Cytoplasm (C), Mitochondria (Mt), Nuclear Membrane (MN), Nucleus (N), Nucleolus (Nu), Pollen Stem Cell (PSC), Pollen Tube Wall (PTW), Tetrad (Te).

**GR enzymatic activity during olive pollen development and germination.**

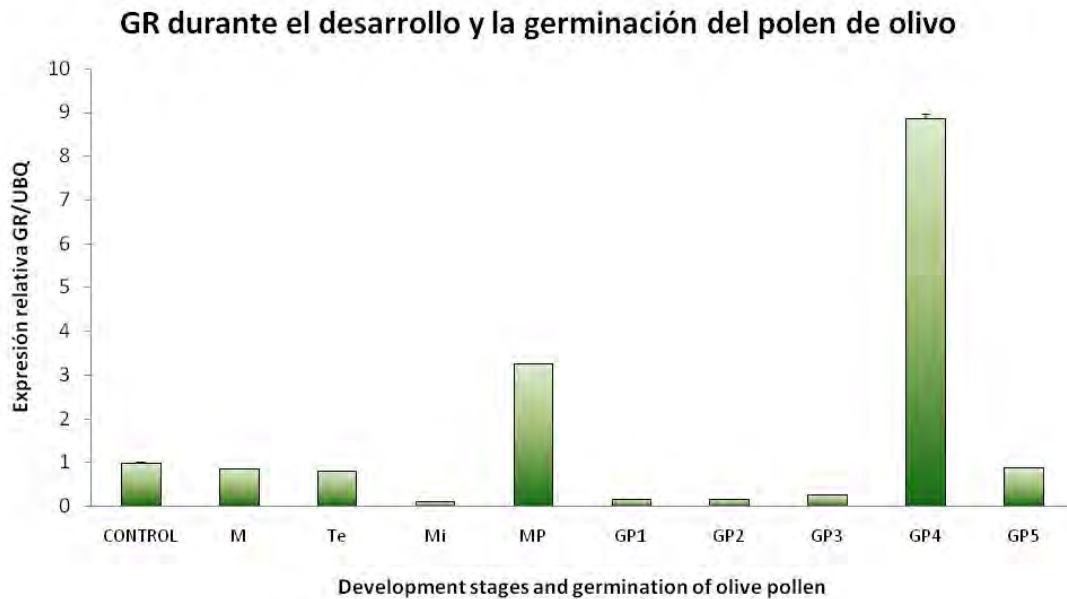
Enzyme activity data (Figure 55) clearly show how the GR enzyme acts during the biological processes of microsporogenesis and germination. Huge GR activity can be observed during pollen tube germination (after 6 h of germination), well above the activity present throughout the pollen development process, which could mean a direct implication of this enzyme during the germination and reorientation of the pollen tube in fertilization. On the other hand, a high GR activity is observed at the stages of meiosis and mature pollen. This could mean that GR has a regulatory role both in cell cycle control and in signaling that occurs within mature pollen and in pollen-pistil interactions to produce pollen tube germination.



**Figure 55.** GR enzymatic activity, measured by the kit mentioned in the section on materials and methods, expressed in mU/mL. Germinated Pollen at 6 h (PG3), Mature pollen (MP), Meiosis (M), Tetrad (Te), Microspore (Mi). "a" in the graph represents a statistical significance with a confidence interval of 95% ( $P \leq 0.05$ ).

**Protein and gene expression analysis of GR during olive pollen development and germination.**

According to its expression pattern (figure 56), the GR of olive pollen belongs to the late gene family, as it is mainly expressed at the final stages of pollen tube germination. Also a peak of expression can be observed at the mature pollen stage, which is consistent with the results of protein expression, therefore supporting the hypothesis that GR is directly involved in the signaling that occurs within the pollen grain and during pollen-pistil interaction, before germination of the pollen tube takes place.



**Figure 56.** GR gene expression throughout anther development and *in vitro* germination by qPCR. “a” and “b” in the graph represent a statistical significance with a confidence interval of 99% ( $P \leq 0.01$ ) and 95% ( $P \leq 0.05$ ). Germinated Pollen at 1h, 3h, 6h, 9h and 12h (PG1, PG2, PG3, PG4 and PG5, respectively), Mature pollen (MP), Meiosis (M), Microspore (Mi), Tetrad (Te). The control was carried out in mature pollen.

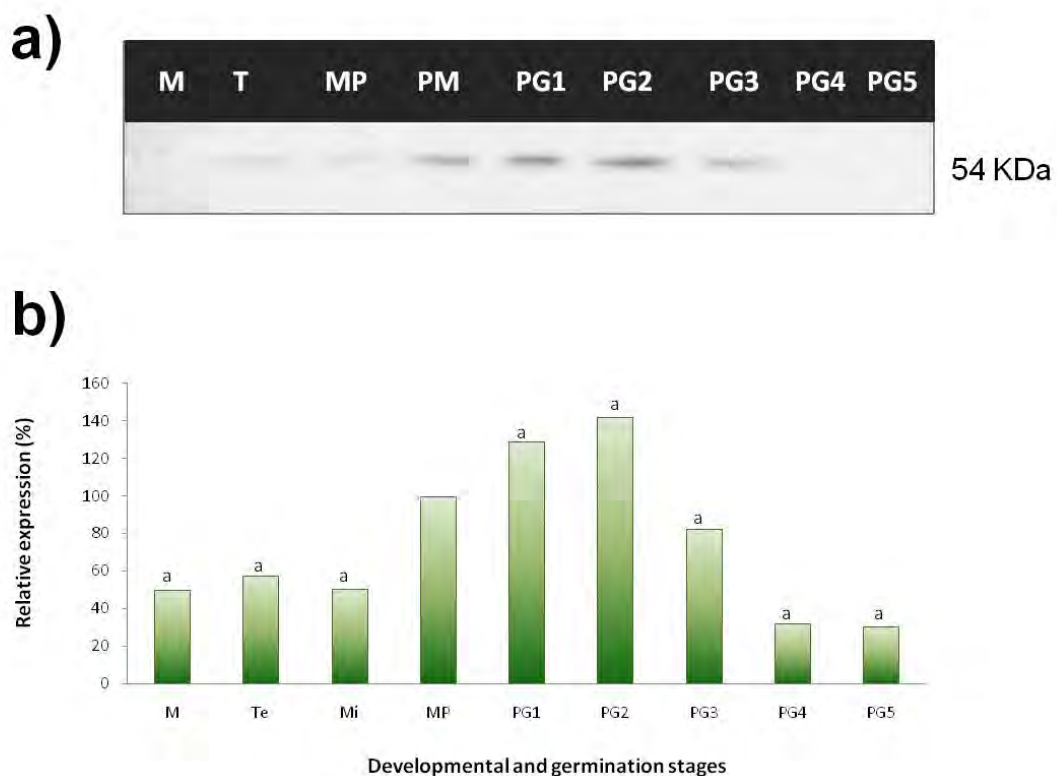
Protein expression analysis by Western blotting (Figure 57) is coincidental with immunohistochemical data. GR accumulation was detected from the tetrad stage onwards, reaching a peak in the mature pollen grain. An intense band is also observed during the first stages of pollen germination, at the beginning of the formation of the pollen tube (aperture) and along the pollen tube during the first three hours of germination, where the signal begins to weaken.

***GR immunolocalization during olive pollen development and germination.***

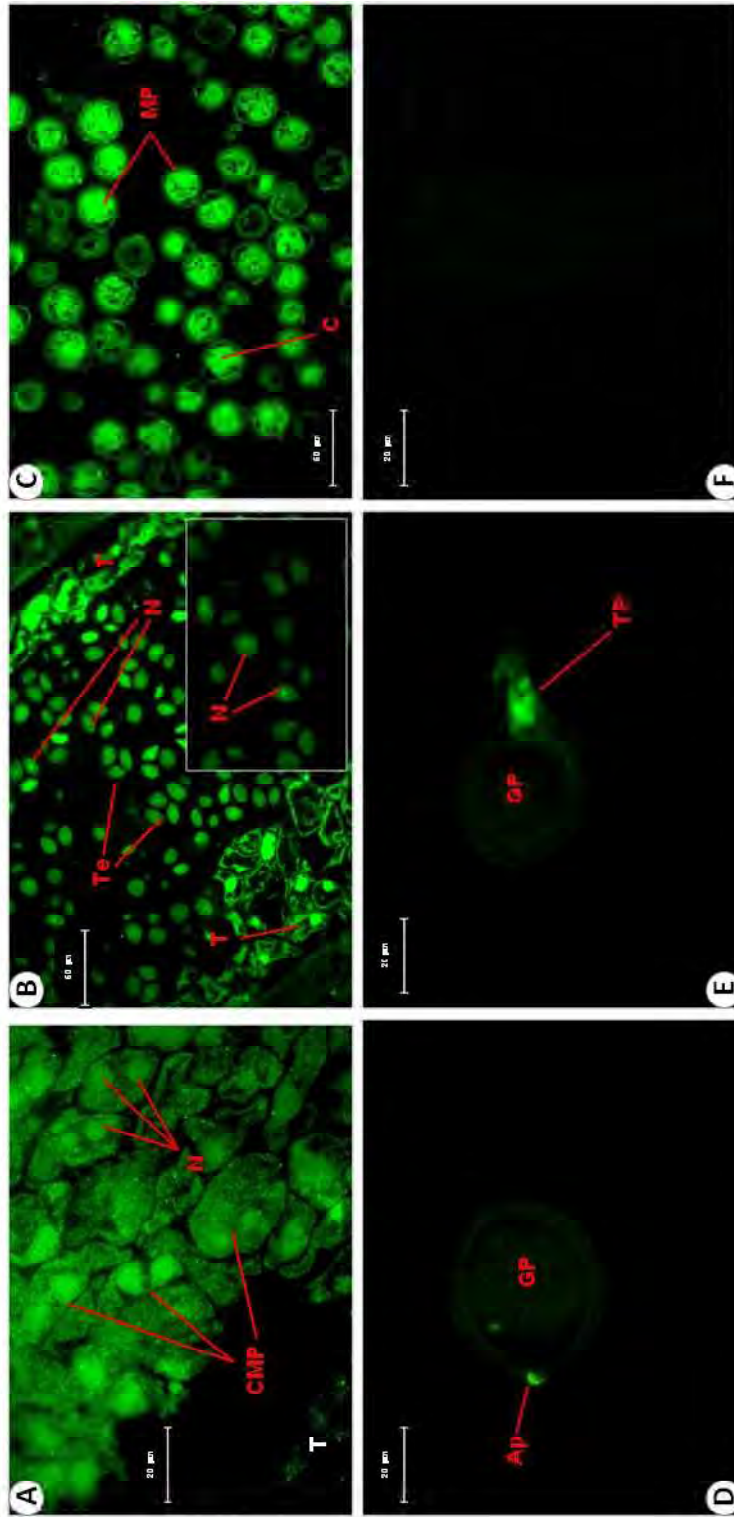
The immunohistochemical analysis of the presence of this enzyme is shown at figure 58. GR is localized in all reproductive tissues, including the tapetum, with a high signal in the nuclei, the apertural regions of the pollen grain and in the pollen tube. Unlike GSH biosynthetic enzymes, the GR is located mainly in the pollen tube (not in the pollen grains) during germination of the pollen tube. This suggests an important role of this enzyme during the pollen tube germination, especially at the beginning, which may be due to the intense metabolism (and therefore the high rate of ROS generation) that occurs during this biological event.

The occurrence of aerobic conditions gave organisms the opportunity to use oxygen as an electron acceptor, and at the same time allowed them to take advantage of their reactive properties for metabolism and signaling (Schippers et al., 2012, Foyer and Noctor 2015). Therefore, it is expected that plants, which have evolved in an

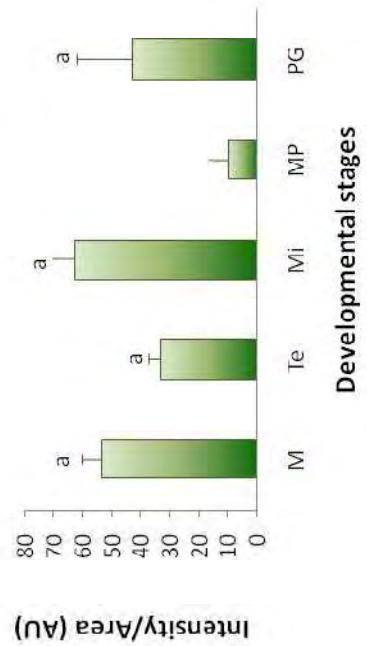
oxygenated environment, require the integration of cellular redox metabolism and ROS sensitivity and signaling in plant growth and development processes. In fact, in both animal and plant biology, references already exist regarding the relation of hypoxia in the maintenance of the stem cells, as well as the directed generation of ROS and the regulation and redox signaling during the cycle and the cellular proliferation (Díaz-Vivancos *et al.* 2010a, 2015, Suzuki *et al.* 2011, García-Giménez *et al.* 2013, Schmidt and Schippers 2015). A considerable number of researchers have already demonstrated that both ROS and redox signaling have the particularity of performing crucial functions in the development of outbreaks (Kocsy *et al.*, 2013, Considine and Foyer 2014, Schmidt and Schippers 2015, Rouhier *et al.* 2015, Schippers *et al.*, 2016). However, we are still at the beginning of the race to discover how these redox signaling pathways are involved in the regulation of development. Although there is a large number of evidence that cellular redox homeostasis is involved in the development of the plant and that both ROS and glutathione play a key role in the regulation of development of branches, roots and floral shoots, as well as in the growth of the pollen tube (Zechmann *et al.*, 2011a, Considine and Foyer 2014, Schmidt and Schippers 2015, Schippers *et al.*, 2016). The



**Figure 57.a)**Western blot of total olive pollen proteins, during pollen development and germination, after separation by SDS-PAGE (30 µg/lane) and using an anti-GR. **b)** Quantification of protein expression levels by densitometry from the bands of Figure 57.a., and relativization with respect to the mature pollen stage. "a" in the graph represents a statistical significance with a confidence interval of 95% (P<0.05).Germinated Pollen at 1h, 3h, 6h, 9h and 12 h (PG1, PG2, PG3, PG4 and PG5, respectively), Mature pollen (MP), Meiosis (M), Microspore (Mi), Tetrad (Te).



**Figure 58.** Above: GR Immunolocalization, by fluorescence microscopy, during of olive pollen development and pollen germination. A: Location in olive anther: at meiosis stage. B: Location in olive anther at tetrad stage. C: Location in olive anther: at microspore stage. D: Location in turgid anther of olive (mature pollen stage). E: Location in germinated grains pollen. F: Negative control. Below: Graph of Intensity by Area of the presence of GR in the different developmental stages and during pollen germination of olive. "a" in the graph represents a statistical significance with a confidence interval of 95% ( $P \leq 0.05$ ). Aperture (AP), Cytoplasm (C), Germinated Pollen Grain (GP), Microspore (Mi), Nucleus (N), Pollen Grain (PG), Pollen Tube (PT), Pollen Stem Cell (PSC), Tapetum (T), Tetrad (Te).



precise functions of each component during growth and development remain an unknown and unexplored area in the field of plant biology.

## **Discussion**

On the other hand, recent studies showed a gradual increase in the total content of glutathione (GSH + GSSG), both in cotyledons and seedlings, throughout their development (Kaur and Bhatla, 2016). In these studies a correlation was observed between the activity of GR, which is in charge of maintaining an adequate GSH/GSSG ratio by recycling glutathione in its reduced form (GSH) (Sharma et al., 2012), and GSH content in sunflower (Kaur and Bhatla 2016). It seems likely that changes in the expression of the GR enzyme modulate both the GSH/GSSG ratio and the amount of total glutathione (Foyer *et al.*, 1995, Noctor *et al.*, 1998). In other studies, in which GH was overexpressed in tobacco chloroplasts, an increase in both GSH reduction status and total glutathione was observed (Foyer *et al.*, 1991, Noctor *et al.*, 1998). Therefore, we can ensure that there is a direct relationship between the increase in GR activity and the total content of glutathione (GSH + GSSG).

In this work the aim is to shed light on the functions of GSH and the GR enzyme along the development of pollen (microsporogenesis) as well as during pollen tube growth.

### ***Redox regulation GSH-dependent in the development of olive pollen.***

Similar to what happens with the cell cycle in other plant tissues, it is expected that microsporogenesis is linked to redox metabolism. Certain bioinformatic data (Honors and Twell 2003, Borges et al., 2008, Zechmann et al., 2011a) call into question the importance of glutathione metabolism in the development and survival of the male gametophyte, since both GSH1 and GSH2 are transcribed at levels insignificant in pollen and spermatocytic nuclei. However, due to the apparent sensitivity of microspores to mitochondrial damage induced by chronic oxidative stress (Wan C 2007), we decided to investigate the need and location of glutathione in the male gametophyte of olive to reveal the strategies of pollen to cope with ROS produced both during its development and during germination and elongation of the pollen tube.

The results of GSH immunolocalization in developing anthers reveal that this metabolite has a great relevance during the development of olive pollen, especially in stages where cell division occurs, such as the stage of meiosis. In addition, the fact that GSH is localized primarily in the nucleus suggests a role for GSH in cell cycle control, which may be due to the decrease in auxin levels (Bashandy *et al.*, 2010, García-



Giménez *et al.* 2013). These results are consistent with the findings of previous studies in which an excessive import of GSH into the nucleus during the G1 phase of the cell cycle is observed (Burhans and Heintz NH 2009, Díaz-Vivancos *et al.*, 2010b, Schippers *et al.* 2016), we may venture that GSH conditions the cell cycle by redox regulation of several transcription factors. Transcription factors, NF-YC (Nuclear transcription factor Y subunit gamma) and TCP (TEOSINTE BRANCHED1 / CYCLOIDEA / PROLIFERATING CELL FACTOR1), are inactivated through the oxidation of cysteines, so both GSH and GR could reduce to these proteins and restore the activity thereof, thereby modulating the cell cycle directly. Similarly, TCP is an inhibitor of jasmonate synthesis (JA), which in turn appears to potentially induce GSH (Li *et al.*, 2017), so that the activity of the transcription factor TCP could cause cellular GSH depletion, restoring the cellular oxidative state which in turn inactivates the expression of TCP.

On the other hand, there are studies on enzymes and proteins involved in cellular redox metabolism that have revealed a clear role in the maintenance and size of apical meristem in plant roots. These studies suggest that GSH reduction is necessary for the development of roots, buds and flowers (Reichheld *et al.*, 2007, Bashandy *et al.*, 2010, Schippers *et al.*, 2016). Following these observations, cell proliferation and microsporocyte development are likely to be regulated by ROS through bound of proteins and enzymes GSH/GR regulated that influence cell cycle progression and / or maturation of the microsporocyte, as in the apical meristems (Burhans and Heintz 2009, Zechmann *et al.*, 2011b). Current work on reproductive development has revealed a clear link between redox processes and the pollen development. In mutants deficient in reducing enzymes, such as the double mutant *Arabidopsis ntra ntrb* (deficient in NADPH-dependent thioredoxin reductases), pollen fertility was diminished (Reichheld *et al.*, 2007). However, pollen fertility was further reduced in mutants lacking the GR enzyme, such as the triple mutant *Arabidopsis gr1 ntra ntrb*, whose pollen turns out to be sterile. Recently, other researchers have shown that maintaining a reduced condition is essential for the formation of germ cells (Kelliher and Walbot 2012), which is established in part through the hypoxic environment present in anther tissues. Our results complement these investigations, since a great amount of GSH can be observed throughout the development of the microsporocito (Figures 51,52, 53 and 54), especially in the stage of mature pollen prior to the germination of the pollen tube. These observations suggest that GSH is necessary for the formation of pollen (Marty *et al.*, 2009, Zechmann *et al.*, 2011a). But not only that, it is also essential that GSH is in its reduced state, as can be derived from the expression data of the GR enzyme. This enzyme is also present throughout the development in a cumulative manner, with a particular intensity in the microspore stage and in the openings of the mature pollen grain (Figures 57, 58), where probably the reserves of GSH have been exhausted throughout development and the enzyme is required for recycling. As for the enzymatic activity of the enzyme (Figure 55), a great activity is observed at the beginning of the development of the microsporocyte (stage of meiosis, where numerous cell divisions are taking place that require a reducing environment), only comparable with the mature

pollen, stage in which also a peak of activity of the enzyme is observed in agreement with previous results and with the gene expression of the GR (Figure 56). All this leads us to propose that the GSH is essential in the development of the microsporocyte, and that the participation of the GR is essential for it to remain in its reduced state in moments as crucial as the beginning of pollen development and just before of the germination of the same, to maintain its fertility.

For a relatively short time, flowering, and all physiological events associated with it, associated with redox homeostasis has attracted increasing attention. The redox changes are able to control various processes of development and growth in plants, including floral induction and floral organ development (Meyer and Hell 2005, Considine and Foyer 2014, Dietz 2014). It has been described that GR and glutaredoxin (GRX) exert a redox control on certain transcription factors that regulate floral developmental phenomena, such as the formation of petal primordia or the development of anthers (Li et al., 2009, Murmu et al. al., 2010, Wuest et al., 2012, ÓMóiléidigh et al., 2013). In this way we can establish the roles of regulating mechanisms based on thiols, as it is the case of these enzymes, which are directly involved in the control of the floral development.

In the flowering models postulated to date (Wuest et al., 2012, Schippers et al., 2013), anther development is regulated by the ROXY1 and ROXY2 genes. They control this process through redox state regulation of a cysteine key residue of two transcription factors (TGA9 and TGA10). TGA9 and TGA10, are activated by their reduction, mediated by glutaredoxin, and control (via redox metabolism) anther and tapetum development. With these indications and in view of the results of this work, we could not rule out the involvement of other redox systems, such as GSH and the GR enzyme, in pollen development processes. However, studies with mutants of Arabidopsis overexpressing GSH levels, and therefore the redox ratio of GSH, have been found to indicate that a high concentration of GSH delays flowering (Ogawa et al., 2001, Ogawa 2005, Hatano-Iwasaki et al. Ogawa 2012), the same thing happened in studies in which GSH was added (Chin *et al.*, 2016). Similar results were found in other plant species such as *Eustoma grandiflorum*, wheat or orchid (Yanagida et al., 2004, Gulyás et al., 2014, Chin *et al.*, 2016), suggesting that GSH metabolism is involved in flowering regulated by FLC (FLOWERING LOCUS C), so that a high GSH content delays flowering, while holding up quite forcefully that GSSG is a key regulator at the beginning of flowering. The genes of biosynthesis ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl synthetase and glutathione synthetase, GSH1 and GSH2 respectively) and the recycling (GR) of GSH contribute to the regulation of GSH redox homeostasis in the AsA-GSH cycle, and affect time of flowering (Chin *et al.*, 2016). The low expression of GR1 during the reproductive phase suggests that the down-regulation of coordinated regeneration of GSH leads to a decrease in the redox ratio of GSH, and thus results in the onset of flowering (Meyer et al., 2007, Chin *et al.* al. 2016). In this way, GSSG has been considered the key factor in the regulation of flowering thanks to studies in which GSSG was applied to plants (Kocsy et al., 2013, Chin *et al.*, 2016).

However, GSH homeostasis is not only under the regulation of its two biosynthetic enzymes (GSH1 and GSH2) and GR. Nitric oxide (NO), as evidenced from the animal literature (Xiaoyuan et al., 2017), also acts in the maintenance of the redox homeostasis of GSH. On the other hand, the content of GSH in a tissue and at a specific point of time is also modulated through the participation of glutathione peroxidase (GPX) and other reactions mediated by dehydroascorbate reductase (DHAR), (Rahantaniaina et al. 2017, Yin et al. 2017). Therefore, observed changes in GSH or GSSG content do not necessarily have to correlate with GR activity due to the crosstalk of more than one biochemical pathway.

Our reports demonstrate the coordination of GSH and its redox state in response to environmental factors to regulate flowering in plants. Now the question arises as to how environmental fluctuations can adjust endogenous GSH levels and their redox state, determined by biosynthesis and recycling of the oxidized form of GSH, trigger the induction of flowering. It would be possible to think that, in order for flowering to take place, a rusty environment is required, and once this begins, the metabolic networks of synthesis and recycling of GSH necessary for the correct development and viability of pollen will begin to be triggered.

#### ***Role of GSH and GR in the growth of the pollen tube of olive tree.***

Pollen germination and pollen tube growth are key events in the sexual reproduction of plants. The pollen-pistil interaction is a complex process that has been extensively studied in flowering plants (Cheung *et al.*, 1995; Kim et al., 2003; Palanivelu et al., 2003).

From previous studies on kiwi pollen (Speranza et al., 2012), it can be stated that ROS occur as a result of rehydration of pollen and during the delay phase that precedes the emergence of the pollen tube. In addition, ROS production continued during the emergence and elongation phases of the pollen tube. All this indicates that ROS are involved in the germination of pollen and agrees with the results that give ROS a role in the growth of the apical meristems (Potocky et al., 2007, Speranza et al., 2012). It is logical to think that in stages such as rehydration and emergence of the pollen tube (in which the pollen grain restarts its metabolic activity, which is verified by the increase in the number of mitochondria) and during pollen tube elongation (where the rate of growth is so fast that it requires a high energy expenditure and therefore an intense metabolism), the production of ROS is massive. Given these deductions we can hypothesize that, being GSH and GR two of the most important antioxidant systems of the cell, in situations such as those described above in which there is a large production of ROS species, both GSH and GR would also be important for maintain redox homeostasis at the non-hazardous limits for the cell and as signaling molecules.

The results of this study clearly demonstrate that GSH is essential for *in vitro* pollen germination, since this metabolite is clearly present and active in the male gametophyte (throughout its development), in apertures and into the pollen tube. In previous studies

with *pad2-1* mutants of *Arabidopsis thaliana* (Zechmann et al., 2011a), glutathione deficient due to a point mutation in the GSH1 gene, a reduction of pollen germination correlated with a reduction in the GSH content of ~ 80%. The addition of inhibitors, such as 1-chloro-2,4-dinitrobenzene or BSO, also induced strong depletions in GSH contents, which was associated with a significant reduction in pollen germination capacity, even with severe cell death (González-Párraga et al. 2005, Zechmann et al. 2011a). The addition of GSH in these cases resulted in the restoration of pollen germination rate. This demonstrates that the availability of GSH is essential for pollen tube germination to take place, but in a controlled and well regulated manner, since excessive amounts of GSH could also lead to aberrations, adversely affecting the germinative capacity of pollen (Zellnig et al. 2000, Zechmann et al. 2006, 2011). In addition, these studies also demonstrated that the low levels of glutathione in the mutant *pad2-1* decreased their ability to germinate, probably due to alterations during pollen development (Zechmann et al. 2011, García-Quirós *et al.* unpublished results).

As for the GSH localization (Figures 53 and 54), no compartmental differences were observed as in vegetative tissues, but GSH is widely distributed throughout the cytoplasm of the microsporocyte as already observed in previous studies (Zechmann et al. 2008, 2010) in pollen. The role of GSH during pollen tube growth has not yet been well established, let alone its participation in the early germination stage (pollen tube emergence). The synchronization of GSH and GR (Figures 53, 54, 58) and their location in the germinative apertures suggest an important role for GSH in the activation of pollen grain and emergence of the pollen tube. The LC-MS data verified what was observed in the immunolocalization, since a peak of GSH can be observed in the mature pollen stage (prior to germination of the pollen tube) and during germination, especially at the beginning, during the emergence of the pollen tube (Figure 52).

If we look at the data of protein and genomic expression (Figures 55-57) we can observe both high expression (of protein and gene) and intense enzymatic activity in the germinated pollen stage. According to its expression pattern, the olive pollen GR belongs to the late gene family. The GR protein was found to increase its levels during the first hour of germination and then progressively decreased. Since the GR protein concentration (and its enzymatic activity) appear to increase during the mature pollen stage and germination, above the average level in all other developmental stages, it is likely that its responsibility is to avoid the uncontrolled ROS accumulation, especially during emergence and elongation of the pollen tube.

In addition, the fact that both GSH and GR are expressed at such a high level in the germinated pollen stages, also suggests the role of these antioxidant systems in the growth and reorientation of the pollen tube.

## Conclusions

Therefore, these results clearly demonstrate that GSH availability is essential for pollen germination and demonstrate the importance of glutathione not only for plant development but also for pollen germination and pollen tube growth. We can conclude that sufficient glutathione contents are required both during pollen development and during germination to produce adequate pollen germination and both, GSH and GSSG, have a key role in pollen metabolism and physiology, as it has been determined already for somatic tissues. The high levels of GSH in the gametophyte at the stage of meiosis suggest the involvement of this molecule in the control of cell cycle.

These data support the hypothesis that GR and GSH may play an important role in a physiological context, such as pollen development and pollen tube growth and reorientation, and not as mere participants due to a stress condition.

## Acknowledgements

This work was supported by ERDF-cofunded projects BFU2011-22779 and BFU2016-77243-P, P2010-AGR6274, P2010-CVI5767 and P2011-CVI-7487. EGQ thanks the MINECO for FPI grant funding. Estefanía García-Quirós thanks the Instrumentation Service of EEZ for LC-MS analysis, and Microscopy Service of EEZ for guidance and assistance in the use of microscopes.

## References

- Airaki M, Sánchez-Moreno L, Leterrier M, Barroso JB, Palma JM, Corpas FJ. (2011). Detection and Quantification of *S*-Nitrosoglutathione (GSNO) in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Organs by LC-ES/MS. *Plant Cell Physiol* 52 (11): 2006-2015.
- Akter N, Sobahan MA, Uraji M, Ye W, Hossain MA, Mori IC, Nakamura Y, Murata Y (2012) Effects of depletion of glutathione on abscisic acid- and methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:2032–2037.
- Bashandy T, Guillemot J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichheld JP (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *Plant Cell* 22:376–391

Boavida LC and McCormick S (2007) Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 52, 570–582

Borges F, Gomes G, Gardner R, Moreno N, McCormick S, Feijo JA, Becker JD (2008) Comparative transcriptomics of *Arabidopsis thaliana* sperm cells. *Plant. Physiol.*, 148:1168-1181.

Burhans WC, Heintz NH (2009) The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med*, 47, 1282-1293

Chen F, Wang F, Wu F, Mao W, Zhang G, Zhou M (2010) Modulation of exogenous glutathione in antioxidant defense system against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance. *Plant Physiol Biochem* 48:663–672

Chen JH, Jiang HW, Hsieh EJ, Chen HY, Chien CT, Hsieh HL, Lin TP (2012) Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione *S*-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiol* 158:340–351.

Chen, Y. L., & Li, Q. Z. (2007). Prediction of apoptosis protein subcellular location using improved hybrid approach and pseudo-amino acid composition. *Journal of Theoretical Biology*, 248(2), 377-381.

Cheng MC, Ko K, Chang WL, Kuo WC, Chen GH, Lin TP (2015) Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in *Arabidopsis*. *Plant J* 83:926–939

Cheung AY, Wang H, Wu HM (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82:383–393

Chin DC, Hsieh CC, Lin HY, Yeh KW (2016) A Low Glutathione Redox State Couples with a Decreased Ascorbate Redox Ratio to Accelerate Flowering in *Oncidium Orchid*. *Plant Cell Physiol*, 57(2):423-36

Considine MJ, Foyer CH (2014) Redox regulation of plant development. *Antioxid Redox Signal*, 21 (2014), pp. 1305-1326

Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. (1992) Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599.

Díaz-Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardó FV & Foyer CH (2010a) A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochemical Journal*, 431(2), 169-178.

Díaz-Vivancos PD, Dong Y, Ziegler K, Markovic J, Pallardó FV, Pellny TK, ...& Foyer, C. H. (2010b). Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *The Plant Journal*, 64(5), 825-838.

Díaz-Vivancos P, de Simone A, Kiddle G, Foyer CH (2015) Glutathione — linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 89, pp. 1154-1164

Dietz KJ (2014) Redox Regulation of Transcription Factors in Plant Stress Acclimation and Development. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9): 1356-1372.

Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180 278-284

Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21-25.

Foyer CH, Lelandais M, Galap C, Kunert KJ (1991) Effects of elevated glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol.*, 97, 863-872

Foyer, C. H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K. J., Pruvost, C., & Jouanin, L. (1995). Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant physiology*, 109(3), 1047-1057.

Foyer CH, Noctor G (2005a) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17:1866–1875

Foyer CH, Noctor G (2005b) Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell Environ* 28:1056–1071

Foyer CH, Noctor G (2015) Stress-triggered redox signalling: What's in pROSpect?. *Plant Cell Environ*, 10.1111/pce.12621

García-Giménez JL, Markovic J, Dasí F, Queval G, Schnaubelt D, Foyer CH, Pallardó FV (2013) Nuclear glutathione. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3304-3316

García-Quirós E, Carmona R, Zafra A, Claros MG, Alché JD (2017) Identification and in silico Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil. In *International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 185-195). Springer, Cham.

Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N (2013) Glutathione reductase and glutathione: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol Biochem* 70:204–212

- González-Párraga P, Marín FR, Argüelles JC, Hernández JA (2005) Correlation between the intracellular content of glutathione and the formation of germ-tubes induced by human serum in *Candida albicans*. *Biochim.Biophys. Acta*, 1722:324-330
- Gulyás Z, Boldizsár A, Novák A, Szalai G, Pál M, Galiba G, Kocsy G (2014) Central role of the flowering repressor *ZCCT2* in the redox control of freezing tolerance and the initial development of flower primordia in wheat. *BMC Plant Biol.* 2014; 14: 91
- Halliwell B and Foyer CH (1978) Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* 139 Issue 1, 9-17
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M (2017) Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, Volume 23, Issue 2, pp 249–268
- Hatano-Iwasaki A and Ogawa K (2012) Overexpression of GSH1 gene mimics transcriptional response to low temperature during seed vernalization treatment of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 53(7):1195-203
- Hiscock SJ and Allen AM (2008) Diverse cell signalling pathways regulate pollen–stigma interactions: the search for consensus. *New Phytologist*, 179, 286–317.
- Honys D and Twell D (2003) Comparative Analysis of the *Arabidopsis* Pollen Transcriptome. *Plant Physiol*, 132: 640-652
- Jahan MS, Ogawa K, Nakamura Y, Shimoishi Y, Mori IC, Murata Y (2008) Deficient glutathione in guard cells facilitates abscisic acid-induced stomatal closure but does not affect light-induced stomatal opening. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:2795–2798
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Río, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant physiology*, 114(1), 275-284.
- Kattab H (2007) Role of glutathione and polyadenylic acid on the oxidative defense systems of two different cultivars of canola seedlings grown under saline condition. *Aust J Basic Appl Sci* 1:323–332
- Kaur H and Bhatla SC (2016) Melatonin and nitric oxide modulate glutathione content and glutathione reductase activity in sunflower seedling cotyledons accompanying salt stress. *Nitric Oxide* 59: 42-53
- Kelliher T, Walbot V (2012) Hypoxia triggers meiotic fate acquisition in maize. *Science*, 337, 345-348
- Kim S, Mollet JC, Dong J, Zhang K, Park SY, Lord EM (2003) Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:16125–16130



Kocsy G, Tari I, Vanková R, Zechmann B, Gulyás Z, Poór P, Galiba G (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Sci*, 211, 77-91

Koffler BE, Luschin-Ebengreuth N, Stabentheiner E, Müller M, Zechmann B (2014) Compartment specific response of antioxidants to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 227:133–144

Kouřil R, Lazar D, Lee H, Jo J, Nauš J (2003) Moderately elevated temperature eliminates resistance of rice plants with enhanced expression of glutathione reductase to intensive photooxidative stress. *Photosynthetica*, 41(4), 571-578.

Li L, Lu X, Ma H, Lyu D (2017) Jasmonic acid regulates the ascorbate–glutathione cycle in *Malus baccata* Borkh. roots under low root-zone temperature. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39: 174.

Li S, Lauri A, Ziemann M, Busch A, Bhave M, Zachgo S (2009) Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21, pp. 429-441

Liu P, Li RL, Zhang L, Wang QL, Niehaus K, Baluska F, Samaj J, Lin JX (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADP oxidasedependent ROS signalling in *Picea meryeri* pollen tube tip growth. *The Plant Journal*, 60, 303–313.

Mahmood Q, Ahmad R, Kwak SS, Rashid A, Anjum NA (2010) Ascorbate and glutathione: protectors of plants in oxidative stress. In: Mahmood Q, Ahmad R, Kwak SS, Rashid A, Anjum NA (eds) *Ascorbate–glutathione pathway and stress tolerance in plants*. Springer, Berlin, pp 209–229

Marty L, Siala W, Schwarzländer M, Fricker MD, Wirtz M, Sweetlove LJ, Meyer Y, Meyer AJ, Reichheld JP, Hell R (2009) The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9109-9114

McInnis SM, Desikan R, Hancock JT, Hiscock SJ (2006a) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? *New Phytologist*, 172, 221–228.

McInnis SM, Emery DC, Porter R, Desikan R, Hancock JT, Hiscock SJ (2006b) The role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidase (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *Journal of Experimental Botany*, 57, 1835–1846.

Meyer AJ and Hell R (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research*, 86, Issue 3, 435–457

Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *The Plant Journal*, 52, Issue 5, 973–986

M'rani-Alaoui M, Castro AJ, Alché JD, Wang W, Fernández MC & Rodríguez-García MI (2000, September). Expression of Ole e 1, the major olive pollen allergen, during in-vitro pollen germination. In *IV International Symposium on Olive Growing 586* (pp. 465-468).

Mullineaux, P. M., & Rausch, T. (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis research*, 86(3), 459-474.

Murmu J, Bush MJ, DeLong C, Li S, Xu M, Khan M, Malcolmson C, Fobert PR, Zachgo S, Hepworth SR (2010) *Arabidopsis* basic leucine-zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. *Plant Physiol*, 154, 1492-1504

Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, Fujita M (2015a) Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems. *AoB Plants*.

Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, Fujita M (2015b) Exogenous glutathione confers high temperature stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) by modulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system. *Environ Exp Bot* 112:44–54

Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, Fujita M (2015c) Roles of exogenous glutathione in antioxidant defense system and methylglyoxal detoxification during salt stress in mung bean. *Biol Plant* 59:745–756

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249–279

Noctor G, Arisi A-C M, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.*, 49, pp. 623-647

Ogawa K, Tasaka Y, Mino M, Tanaka Y, Iwabuchi M (2001) Association of Glutathione with Flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, Volume 42, Issue 5, 15 May 2001, Pages 524–530

Ogawa K (2005) Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxid Redox Signal* 7:973–981

ÓMaoiléidigh DS, Wuest SE, Rae L, Raganelli A, Ryan PT, Kwasniewska K, Das P, Lohan AJ, Loftus B, Graciet E, Wellmer F (2013) Control of reproductive floral

organ identity specification in *Arabidopsis* by the C function regulator AGAMOUS. *Plant Cell*, 25, pp. 2482-2503

Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell* 114:47–59

Pasternak M, Lim B, Wirtz M, Hell R, Cobbett CS, Meyer AJ (2008) Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *Plant J Cell Mol Biol* 53:999–1012

Pilon-Smits, E. A., Zhu, Y. L., Sears, T., & Terry, N. (2000). Overexpression of glutathione reductase in *Brassica juncea*: effects on cadmium accumulation and tolerance. *Physiologia plantarum*, 110(4), 455-460.

Potocky M, Jones MA, Bezvoda R, Smirnoff N, Zársky V (2007) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist*, 174, 742–751.

Qiu B, Zeng F, Cai S, Wu X, Haider SI, Wu F, Zhang G (2013) Alleviation of chromium toxicity in rice seedlings by applying exogenous glutathione. *J Plant Physiol* 170:772–779

Queval G, Jaillard D, Zechmann B & Noctor G (2011) Increased intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant, cell & environment*, 34(1), 21-32.

Rahantaniaina MS, Li S, Chatel-Innocenti G, Tuzet A, Mhamdi A, Vanacker H, Noctor G (2017) Glutathione oxidation in response to intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases. *Plant Signaling & Behavior*, 12:8

Rasmusson, A. G., & Møller, I. M. (1990). NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant physiology*, 94(3), 1012-1018.

Reichheld JP, Khafif M, Riondet C, Droux M, Bonnard G, Meyer Y (2007) Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 19, 1851-1865

Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., Del Río, L. A., & Palma, J. M. (2006). Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New phytologist*, 170(1), 43-52.

Rouhier N, Cerveau D, Couturier J, Reichheld JP, Rey P (2015) Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. *Biochim Biophys Acta*, 1850, 1479-1496

Salama KHA, Al-Mutawa MM (2009) Glutathione-triggered mitigation in salt-induced alterations in plasmalemma of onion epidermal cells. *Int J Agric Biol* 11, 639–642

Schippers JHM, Nguyen HM, Lu D, Schmidt R, Mueller-Roeber B (2012) ROS homeostasis during development: an evolutionary conserved strategy. *Cell Mol Life Sci*, 69, 3245-3257

Schippers JHM, Foyer CH, van Dongen JT (2016) Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Curr Opin Plant Biol.*, 29:121-8

Shah ZH, Hamooh BT, Daur I, Rehman HM, Alghabari F (2017) Transcriptomics and biochemical profiling: current dynamics in elucidating the potential attributes of olive. *Curr Issues Mol Biol* 21, 73-98

Sharma SS, Dietz KJ (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot* 57:711–726

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanisms in plants under stressful conditions. *J. Bot.*, pp. 1-26

Schmidt R, Schippers JHM (2015) ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1850 (2015), pp. 1497-1508

Speranza A, Crinelli R, Scoccianti V, Geitmann A (2012) Reactive oxygen species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit. *Plant Biology* 14, 64–76

Srivalli S, Khanna-Chopra R (2008) Role of glutathione in abiotic stress tolerance. In: Khan NA, Singh S, Umar S (eds) *Sulfur assimilation and abiotic stress in plants*. Springer, Berlin, pp 207–225

Stevens, R. G., Creissen, G. P., & Mullineaux, P. M. (2000). Characterisation of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta*, 211(4), 537-545.

Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 14, 691-699

Szalai G, Kellős T, Galiba G, Kocsy G (2009) Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Plant Growth Regul* 28:66–80

Tausz M, Sircelj H, Grill D (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stresser response concept valid? *J. Exp. Bot.*, 55, pp. 1955-1962

Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inze D (2000) The *ROOT MERISTEMLESS 1/CADMIUM SENSITIVE 2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12:97–110

Wan C, Li S, Wen L, Kong J, Wang K, Zhu W (2007) Damage of oxidative stress on mitochondria during microspores development in Honglian CMS line of rice. *Plant Cell Rep*, 26:373-382.

Wang F, Chen F, Cai Y, Zhang G, Wu F (2011) Modulation of exogenous glutathione in ultrastructure and photosynthetic performance against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance. *Biol Trace Elem Res* 144:1275–1288

Wuest SE, O'Maoileidigh DS, Rae L, Kwasniewska K, Raganelli A, Hanczaryk K, Lohan AJ, Loftus B, Graciet E, Wellmer F (2012) Molecular basis for the specification of floral organs by APETALA3 and PISTILLATA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13452-13457

Xiaoyuan R, Lili Z, Xu Z, Vasco B, Jun W, Cristina C, Arne H, Jun L (2017) Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System. *Antioxidants & Redox Signaling*, 27(13): 989-1010

Yanagida M, Mino M, Iwabuchi M, Ogawa K (2004) Reduced Glutathione is a Novel Regulator of Vernalization-Induced Bolting in the Rosette Plant *Eustoma grandiflorum*. *Plant and Cell Physiology*, 45, Issue 2, 129–137

Yin, L., Mano, J. I., Tanaka, K., Wang, S., Zhang, M., Deng, X., & Zhang, S. (2017). High level of reduced glutathione contributes to detoxification of lipid peroxide-derived reactive carbonyl species in transgenic *Arabidopsis* overexpressing glutathione reductase under aluminum stress. *Physiologia Plantarum*.

Zafra A, Rodriguez-Garcia MI, Alche JD (2010) Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biol* 10, 36

Zechmann B, Müller M, Zellnig G (2006) Intracellular adaptations of glutathione content in *Cucurbita pepo* (L.) induced by reduced glutathione and buthionine sulfoximine treatment. *Protoplasma*, 227:197-209.

Zechmann B, Mauch F, Sticher L & Müller M (2008) Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 4017-4027.

Zechmann B, Müller M (2010) Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma* 246:15–24

Zechmann B, Koffler BE, Russell SD (2011a) Glutathione synthesis is essential for pollen germination in vitro. *BMC Plant Biology* 11, 54

Zechmann B, Liou LC, Koffler BE, Horvat L, Tomašić A, Fulgosi H & Zhang Z (2011b) Subcellular distribution of glutathione and its dynamic changes under oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 11(8), 631-642

Zechmann, B. (2014). Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. *Frontiers in plant science*, 5.

Zellnig G, Tausz M, Pesec B, Grill D, Müller M (2000) Effects of glutathione on thiol redox systems, chromosomal aberrations, and the ultrastructure of meristematic root cells of *Picea abies* (L.) Karst. *Protoplasma*, 212:227-235

Zienkiewicz K, García-Quirós E, Alché JD, Rodríguez-García MI & Castro AJ (2012) Simultaneous detection and quantitation of pollen allergens using a fluorescence-based 2-D multiplex approach. In J. C. Jiménez-López (Ed.), *Current insights in pollen allergens* (pp. 41–56). Croatia: Intech Open Science.



- 2.1. Análisis bioquímico y molecular de los enzimas implicados en la síntesis de glutatión en los tejidos reproductivos del olivo.
- 2.2. Involvement of glutathione and glutathione reductase in the development of the microsporocyte and during the germination of the olive pollen.
- 2.3. **Determinación de la localización y la expresión génica y proteica de los enzimas responsables de la detoxificación mediada por GSH durante la ontogenia y la germinación del polen de olivo.**

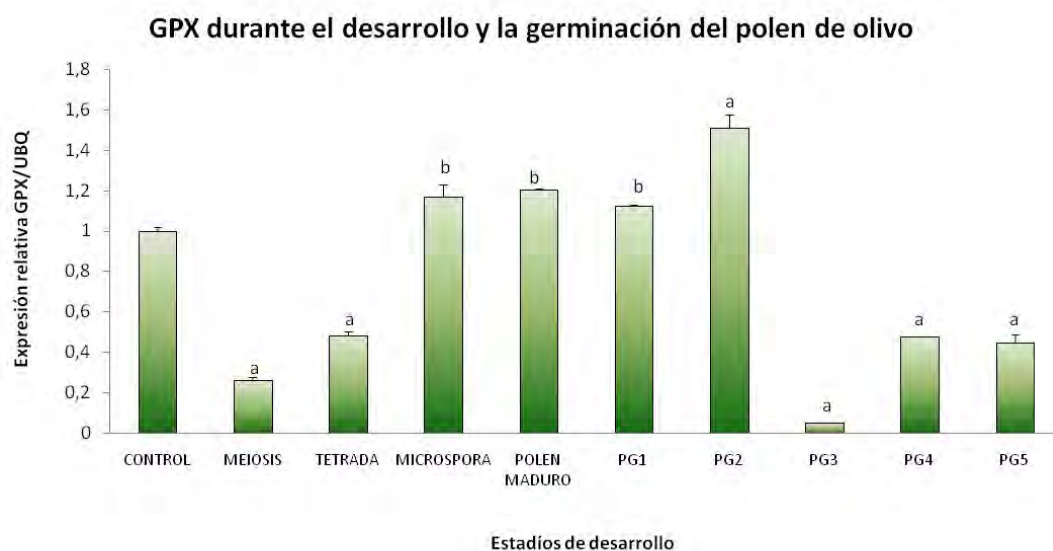




Las enzimas GSH-dependientes encargadas de la detoxificación celular son las ya mencionadas GPX y GST.

### 2.3.1. Análisis de expresión génica de las enzimas GPX y GST.

Tras clonar los genes de las enzimas implicadas en la detoxificación celular dependiente de glutatión en el polen de olivo, se llevaron a cabo análisis de expresión a nivel de los transcritos. El análisis de expresión de los transcritos durante la ontogenia del polen en la antera, así como durante su germinación, se evaluaron mediante ensayos de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando cebadores específicos (Tabla 6 de Materiales y Métodos).

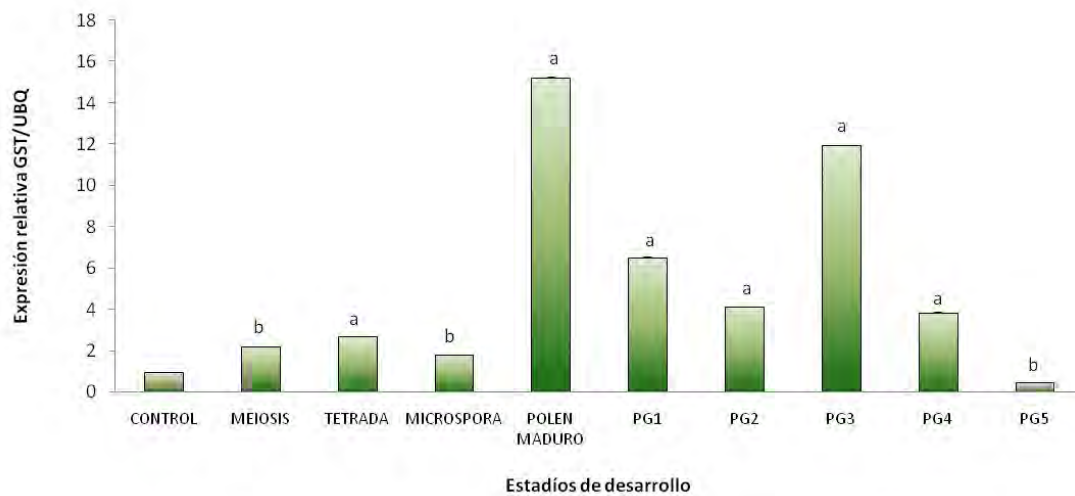


**Figura 59.** Análisis de expresión mediante qPCR de la GPX del polen de olivo durante el desarrollo de la antera y la germinación *in vitro* del polen. Polen germinado a 1h, 3h, 6h, 9h y 12h (PG1, PG2, PG3, PG4 y PG5). “a” y “b” en el gráfico representan un significado estadístico con un intervalo de confianza del 99% ( $P \leq 0,01$ ) y del 95% ( $P \leq 0,05$ ), respectivamente. El control se realizó en polen maduro.

Con respecto al análisis de expresión por qPCR de la GPX, los transcritos se fueron acumulando, durante el desarrollo del polen, desde la etapa de meiosis en adelante, alcanzando un pico en el estadio de grano de polen maduro (Figura 59). Durante la germinación del grano de polen, GPX aumenta su nivel de transcripción durante las tres primeras horas de germinación (PG1 y PG2), y después se vuelve a expresar con mucha menos intensidad tras 9 horas de germinación (PG4 y PG5) (Figura. 59).

En cuanto a la otra enzima dentro del ciclo del GSH encargada de la detoxificación celular, la GST, los resultados de la amplificación por qPCR del gen GST en polen de olivo se muestran en la figura 4.23.

**GST durante el desarrollo y la germinación del polen de olivo**

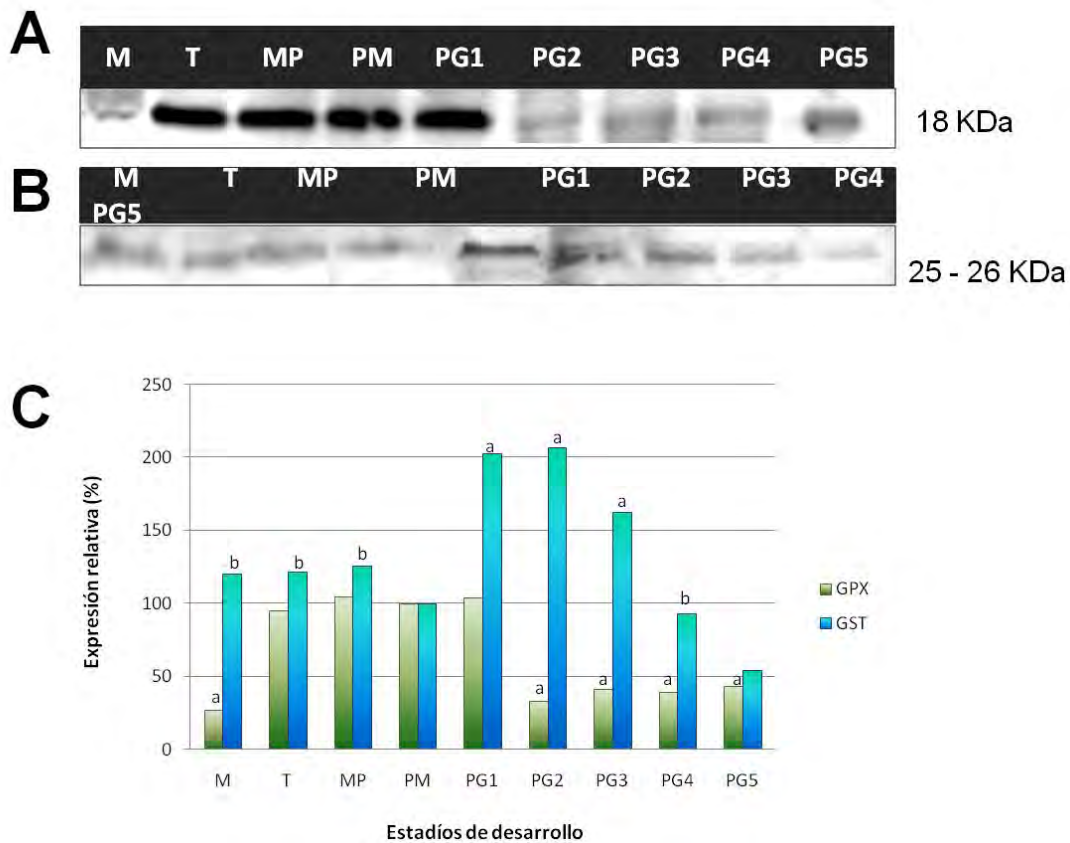


**Figura 60.** Análisis de expresión mediante qPCR de la GST del polen de olivo durante el desarrollo de la antera y la germinación *in vitro* del polen. Polen germinado a 1h, 3h, 6h, 9h y 12h (PG1, PG2, PG3, PG4 Y PG5. ). “a” y “b” en el gráfico representan un significado estadístico con un intervalo de confianza del 99% ( $P \leq 0,01$ ) y del 95% ( $P \leq 0,05$ ), respectivamente. El control se realizó en polen maduro.

Durante el desarrollo del polen, los transcritos de GST alcanzan un pico de expresión en el estadio de grano de polen maduro (al final del desarrollo de la antera). Después, durante la germinación del polen, el gen se expresa durante toda la germinación con un máximo de expresión en el estadio de germinación 3 (a las 6 h de germinación).

**2.3.2. Análisis de expresión proteica de las enzimas GPX y GST.**

El análisis de expresión proteica, llevado a cabo mediante Western blotting (Figura 61. A), reveló la presencia de GPX y GST durante el desarrollo y la germinación del polen de olivo. Para la expresión relativa cuantificada por densitometría a partir de las bandas de Western blot (Figura 61.B), se determinó el 100% en el estadio de polen maduro, por ser el estadio más estable y el nexo de unión entre el desarrollo del polen y su germinación. A la vista de los resultados obtenidos, la GPX parece tener más importancia durante el desarrollo del polen de olivo, especialmente en las primeras etapas del desarrollo y al principio de la germinación. Por el contrario, la GST parece ser mucho más importante durante la germinación del tubo polínico, con especial interés entre las 3 primeras horas de la germinación del tubo polínico (Figura 61).

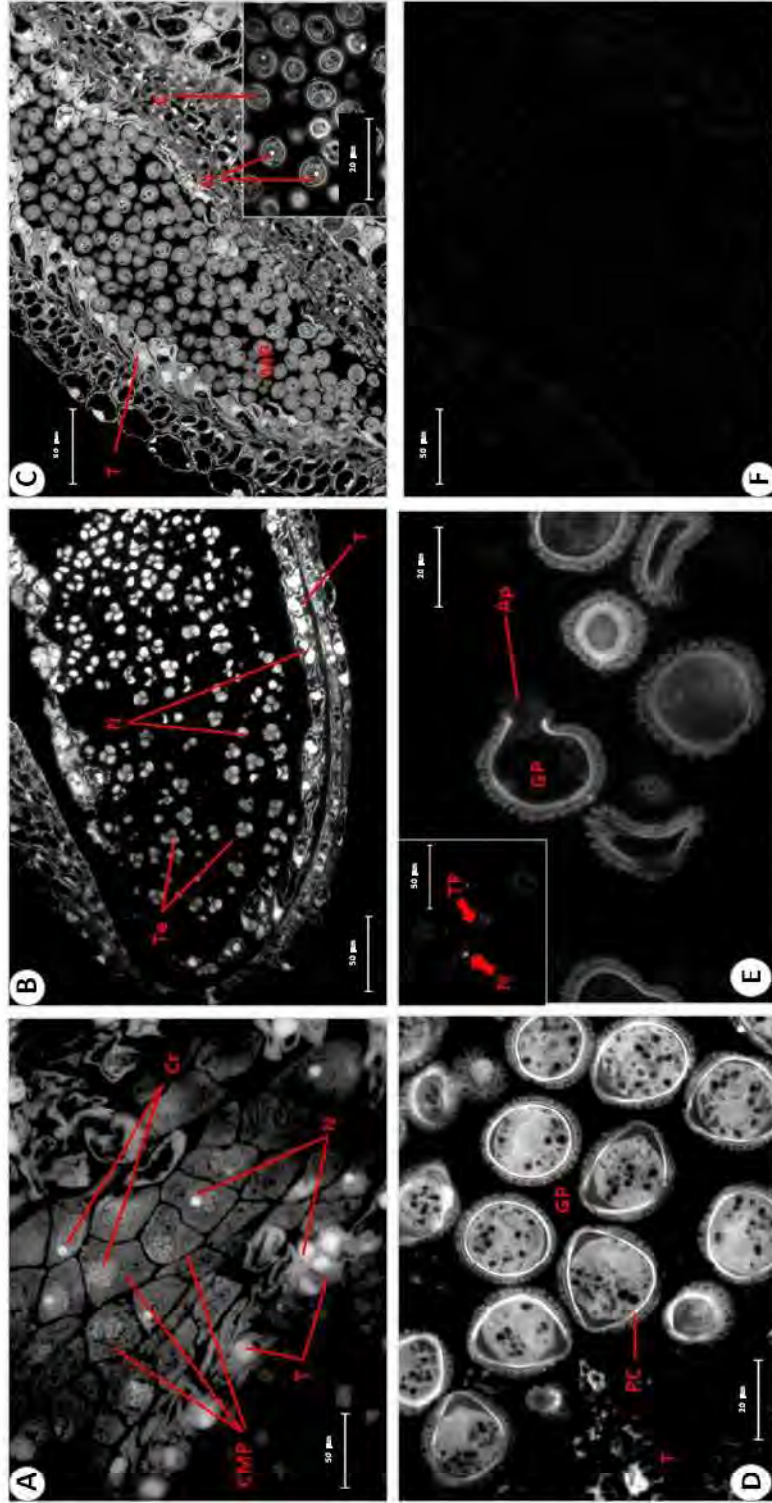


**Figura 61.** A. Análisis de expresión mediante Western blotting de la proteína GPX del polen de olivo durante el desarrollo de la antera y la germinación *in vitro*. B. Análisis de expresión mediante Western blotting de la proteína GST del polen de olivo durante el desarrollo de la antera y la germinación *in vitro*. C. Cuantificación de los niveles de expresión de ambas proteínas mediante densitometría a partir de las bandas de la figura 61.A., y relativización con respecto al estadio de polen maduro. “a” y “b” en el gráfico representan un significado estadístico con un intervalo de confianza del 99% ( $P \leq 0,01$ ) y del 95% ( $P \leq 0,05$ ), respectivamente. Meiosis (M), Microspora (MP), Polen germinado a 1h, 3h, 6h, 9h y 12h (PG1, PG2, PG3, PG4 Y PG5), Polen Maduro (PM), Tetrada (T).

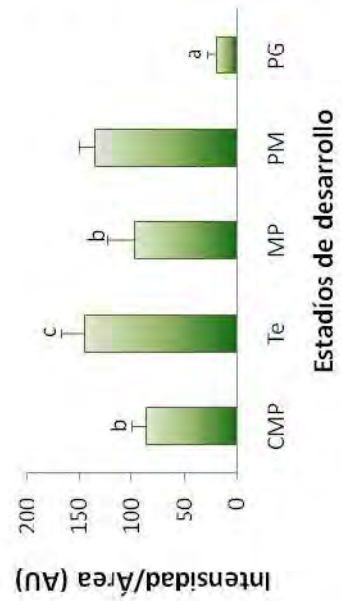
### 2.3.3. Localización celular de las enzimas GPX y GST.

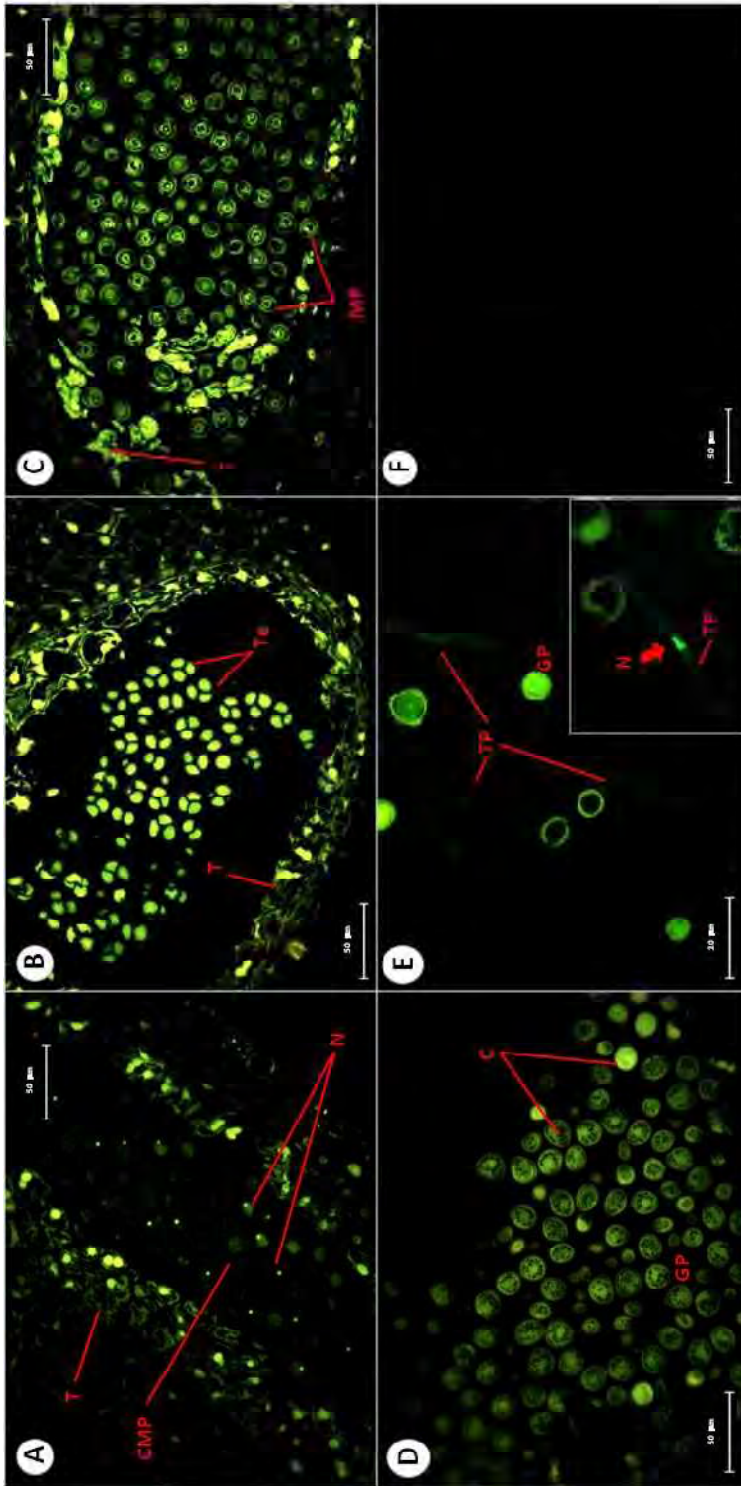
En la figura 62 se muestra la amplia localización tisular y celular que tiene la GPX en todos los tejidos de la antera durante la microsporogénesis y durante el desarrollo del tubo polínico. Se encontraron niveles detectables de GPX en el citoplasma y los núcleos a lo largo de todo el curso de desarrollo tanto en el grano de polen como en el tubo polínico en crecimiento. Destaca la detección de GPX (Figura 62.A) en el estadio de CMP, donde muestra un marcaje intenso tanto del nucleolo como de la cromatina. También se detectó esta enzima en las paredes del tubo polínico (incluido el extremo apical del tubo polínico), así como en los núcleos espermáticos que viajan a través del tubo (Figura 62.E).

Además, durante la ontogenia del polen, el máximo de expresión proteica de la GPX tuvo lugar en el estadio de tetrada, seguido de cerca del estadio de polen maduro.

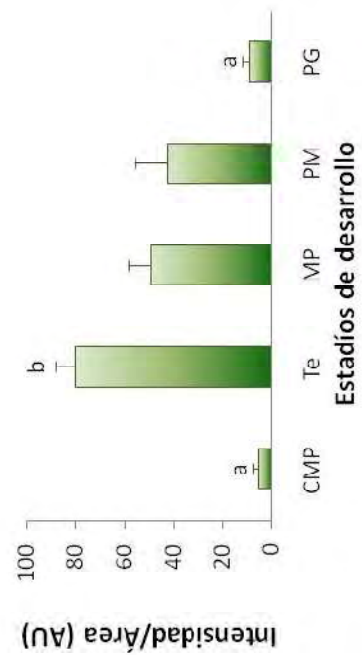


**Figura 62.** Arriba: Inmunolocalización del enzima GPX, mediante microscopía de fluorescencia, durante el desarrollo del polen de olivo y la germinación de polen. Localización en la antera de olivo en A) el estadio de meiosis, B) el estadio de tetradia, C) el estadio de microspora, D) el estadio de polen maduro, E) granos de polen germinados. F) Control negativo. Abajo: Gráfico de Intensidad por Área de la actividad GPX en los distintos estadios de desarrollo y durante la germinación del polen de olivo. “a”, “b” y “c” en el gráfico representan un significado estadístico con un intervalo de confianza del 99% ( $P \leq 0,01$ ), del 95% ( $P \leq 0,05$ ) y del 90% ( $P \leq 0,10$ ), respectivamente. Apertura (Ap), Citoplasma (C), Célula Madre del Polen (CMP), Cromatina (Cr), Grano de Polen (GP), Microspora (MP), Núcleo (N), Pared celular (PC), Tapetum (T), Tetradia (Te), Tubo Polínico (IP).





**Figura 63.** Arriba: Inmunolocalización de la actividad GST, mediante microscopía de fluorescencia, durante el desarrollo del polen de olivo y la germinación de polen. A) Localización en la antera de olivo en el estadio de meiosis. B) Localización en la antera de olivo en el estadio de tetradra. C) Localización en la antera de olivo en el estadio de microspora. D) Localización en la antera turgente de olivo (estadio de polen maduro). E) Localización en granos de polen germinado. F) Control negativo. **Abajo:** Gráfico de Intensidad por Área de la actividad GST en los distintos estadios de desarrollo y durante la germinación del polen de olivo. "a" y "b" en el gráfico representan un significado estadístico con un intervalo de confianza del 99% ( $P \leq 0,01$ ) y del 95% ( $P \leq 0,05$ ), respectivamente. **Abajo:** Célula Madre del Polen (CMP), Grano de Polen (GP), Microspora (MP), Núcleo (N), Pared celular (PC), Tapétum (T), Tetradra (Te), Tubo Polínico (TP).



Por otro lado, la GST fue detectada a todo lo largo del proceso de desarrollo del grano de polen (especialmente en el estadio de tétrada) en todos los tipos de tejidos reproductivos (incluido el tapetum) y durante la germinación del tubo polínico (Figura 63). Se observó una alta señal fluorescente en el citoplasma, y principalmente en los núcleos, durante todos los estadios de la ontogenia del polen. Además, durante el proceso de germinación, la GST se localizó en el citoplasma del tubo polínico, así como en los núcleos espermáticos con una elevada expresión.

**3.1. *Análisis bioquímico y molecular de los diferentes enzimas implicados en el metabolismo del glutatión durante el desarrollo floral de Arabidopsis thaliana.***

3.2. *Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour.*





Se realizó un análisis de expresión génica por PCR en tiempo real (qPCR) de todos los enzimas del metabolismo del glutatión en la biología reproductiva de *A. thaliana*. Sin embargo, se seleccionaron sólo dos enzimas, GR y GPX, para realizar el análisis de expresión proteica en los distintos tipos de plantas de *A. thaliana* durante el desarrollo floral. El motivo por el que se eligieron estas dos enzimas es porque parecen ser las más importantes, dentro del ciclo del GSH, en procesos de fertilización en Angiospermas, regulando tanto la microsporogénesis como el crecimiento del tubo polínico.

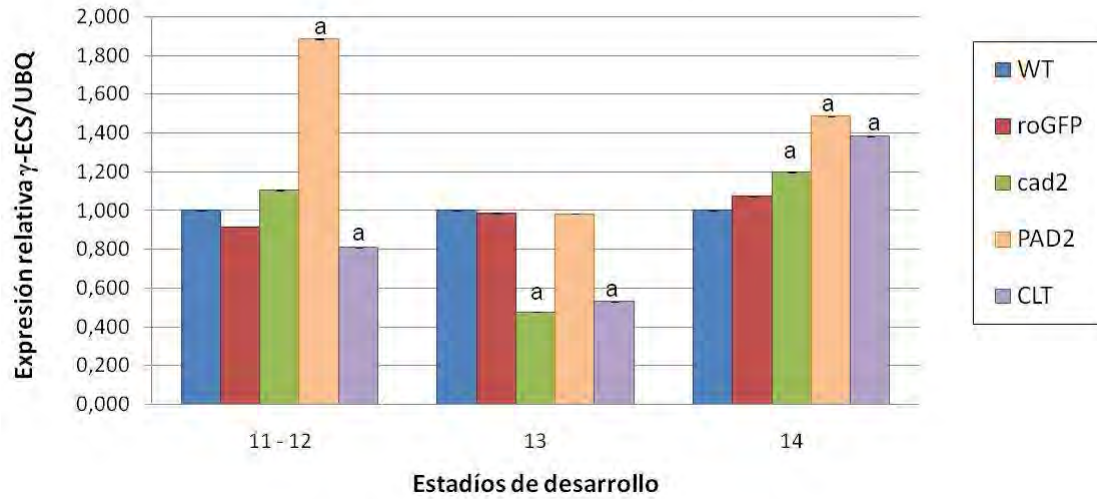
### **3.1.1. Análisis molecular de las enzimas involucradas en la síntesis de glutatión ( $\gamma$ -ECS y GS).**

Como ya se ha explicado anteriormente, la biosíntesis del GSH tiene lugar en 2 etapas reguladas por las enzimas  $\gamma$ -ECS (primera etapa) y GS (segunda etapa). El análisis de la expresión génica de estas dos enzimas mediante qPCR en los distintos tipos de plantas de *A. thaliana* revela que existen diferencias en cuanto a la expresión de estos genes en los mutantes deficientes de GSH con respecto al WT.

En la figura 64, referente a la expresión génica del enzima  $\gamma$ -ECS, se observa en roGFP un patrón de expresión similar al fenotipo silvestre (WT). Sin embargo, los fenotipos mutantes difieren de los silvestres, especialmente en los primeros estadios de desarrollo. En *cad2* y *pad2* la expresión de  $\gamma$ -ECS es mayor a la de los fenotipos silvestres en los estadios 11-12, menor en el estadio 13 y bastante similar al final del desarrollo floral (estadio 14). *clt* por el contrario, expresa niveles inferiores de  $\gamma$ -ECS durante los estadios 11-12 y 13, y en el estadio 14 expresa  $\gamma$ -ECS a niveles superiores a los fenotipos silvestres.

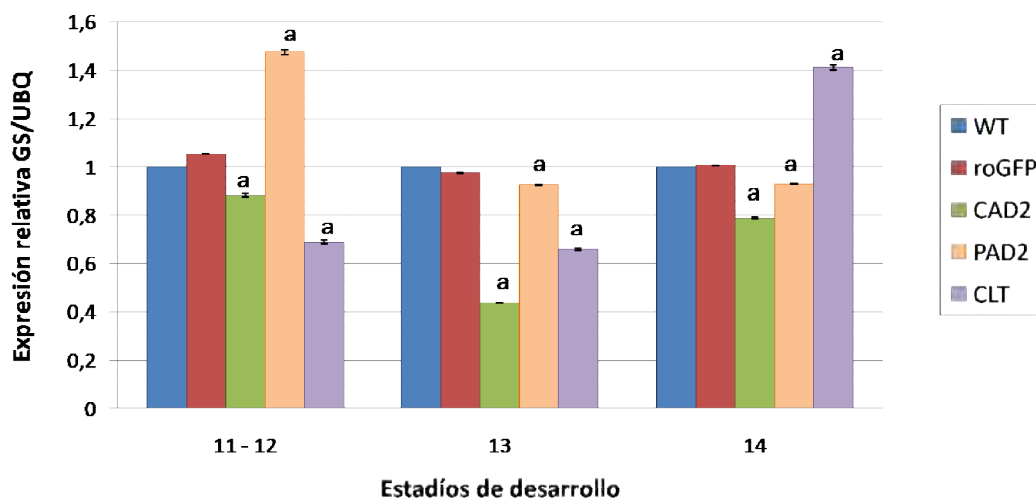
Los resultados de la amplificación por qPCR de transcritos GS en las distintas plantas de *A. thaliana* (Figura 65) revelaron diferencias de expresión entre los fenotipos silvestres y los mutantes. WT y roGFP poseían un patrón de expresión similar. *cad2* expresó menores niveles de GS que los fenotipos silvestres en todos los estadios de desarrollo estudiados. Por el contrario, *pad2* mostró niveles de expresión mayores a los de los fenotipos silvestres en el estadio de desarrollo 11-12, pero expresó GS a niveles similares a los de WT durante los estadios 13 y 14. El mutante *clt* mostró un patrón de expresión de GS similar al de  $\gamma$ -ECS, niveles de transcritos GS inferiores a los de los fenotipos silvestres durante los estadios 11-12 y 13, y superiores durante el estadio 14.

$\gamma$ -ECS durante el desarrollo floral de *A. thaliana*



**Figura 64.** Análisis de expresión mediante qPCR de la  $\gamma$ -ECS durante el desarrollo floral en distintos mutantes deficientes en GSH de *Arabidopsis thaliana*. "a" representa un significado estadístico con un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ).

GS durante el desarrollo floral de *A. thaliana*



**Figura 65.** Análisis de expresión mediante qPCR de la GS durante el desarrollo floral en distintos mutantes deficientes en GSH de *Arabidopsis thaliana*. "a" representa un significado estadístico con un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ).

### **3.1.2. Análisis molecular de la enzima implicada en el reciclado del glutatión (GR).**

La GR es la enzima encargada de reducir el GSSG a GSH para que pueda volver a estar biodisponible. Como ya se ha visto anteriormente, existen 2 isoformas, una citoplasmática (GR1) y otra cloroplastidial (GR2).

Para poder dilucidar cuál de las dos isoformas (GR1 y GR2) juega un papel más importante en el desarrollo floral se amplificaron ambos genes mediante qPCR (Figuras 66 y 67).

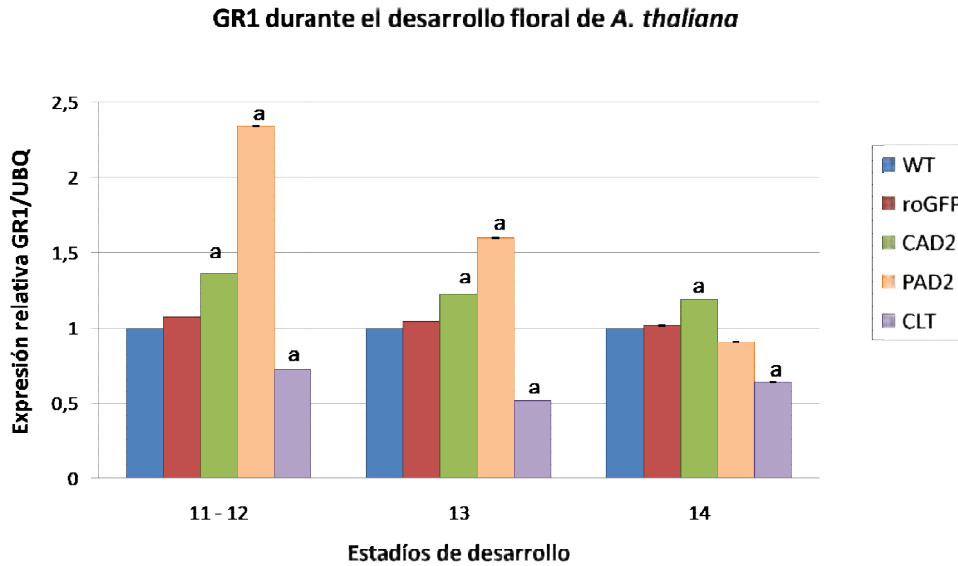
La figura 66 revela diferencias en los patrones de expresión de GR1 en los distintos tipos de plantas de *A. thaliana*. WT y roGFP poseían similares patrones de expresión. *cad2* expresó niveles superiores a WT de GR1 en todos los estadios de estudio. *pad 2* expresó niveles superiores a los de los fenotipos silvestres en los estadios de desarrollo 11-12 y 13, sin embargo, en el estadio 14 sus niveles de expresión de GR1 eran menores a los de los fenotipos silvestres. El contradictorio mutante *clt* expresó niveles inferiores de GR1 respecto a los fenotipos silvestres en todos los estadios de desarrollo.

En la figura 67 se observan diferencias en los patrones de expresión de GR2 en los distintos tipos de plantas de *A. thaliana*. WT y roGFP poseían similares patrones de expresión. *cad2* expresó niveles inferiores a WT de GR2 en todos los estadios de estudio. El patrón de expresión de *pad 2* para GR2 es similar al de GR1, los niveles de expresión fueron superiores a los de los fenotipos silvestres en los estadios de desarrollo 11-12 y 13, sin embargo, en el estadio 14 sus niveles de expresión de GR2 eran menores a los de los fenotipos silvestres. *clt* expresó niveles de GR2 ligeramente por encima de los fenotipos silvestres en los estadios 11-12, e inferiores a los de WT y roGFP en los estadios 13 y 14.

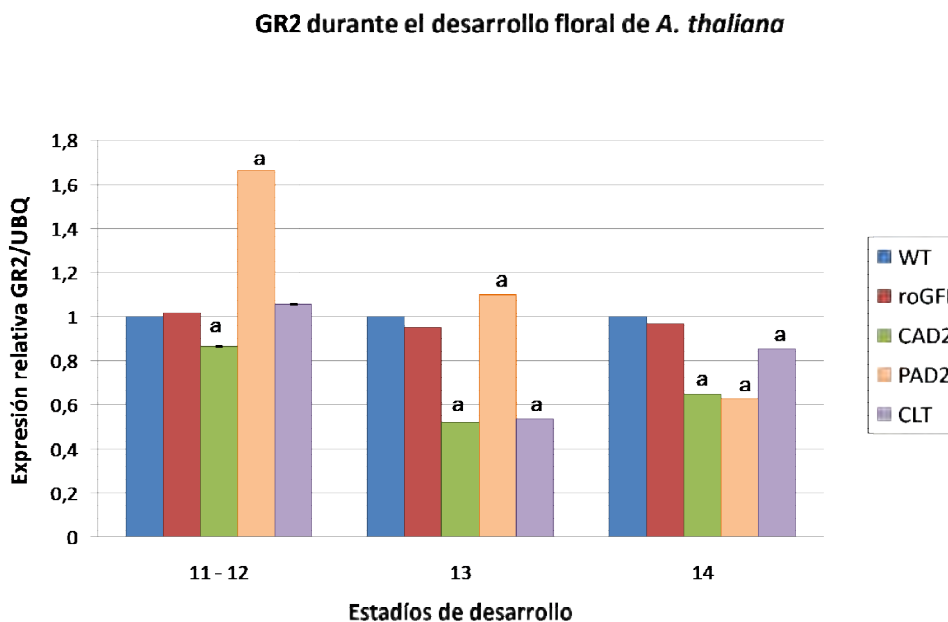
Para estudiar la expresión proteica de la GR a lo largo del desarrollo floral de *A. thaliana* se realizó un análisis por Western blot. En la figura 68 puede apreciarse la diferencia existente en la expresión de GR en los distintos mutantes de *A. thaliana* respecto al WT. Como ya se apreciaba en olivo (Fig. 57 del capítulo 2.2, artículo en preparación), la tendencia general de la expresión de GR es ir aumentando a lo largo de la microsporogénesis, teniendo un máximo en los estadios 13 y 14, en los que el polen está maduro y empezando a germinar.

roGFP expresó GR con un patrón similar al del WT. El mutante *cad2* expresó menor cantidad de GR en todos los estadios que los fenotipos silvestres. Además, a diferencia de los demás tipos de plantas, la expresión de GR fue disminuyendo conforme avanzaba el desarrollo floral. La tendencia de expresión de GR durante el desarrollo floral en *pad2* es similar a la de los fenotipos silvestres; sin embargo *pad2* expresó menor cantidad de GR en los estadios 11-12 y 13 y mayor cantidad en el estadio 14, con respecto al WT. En cuanto al mutante *clt*, GR se expresó en cantidades similares a los

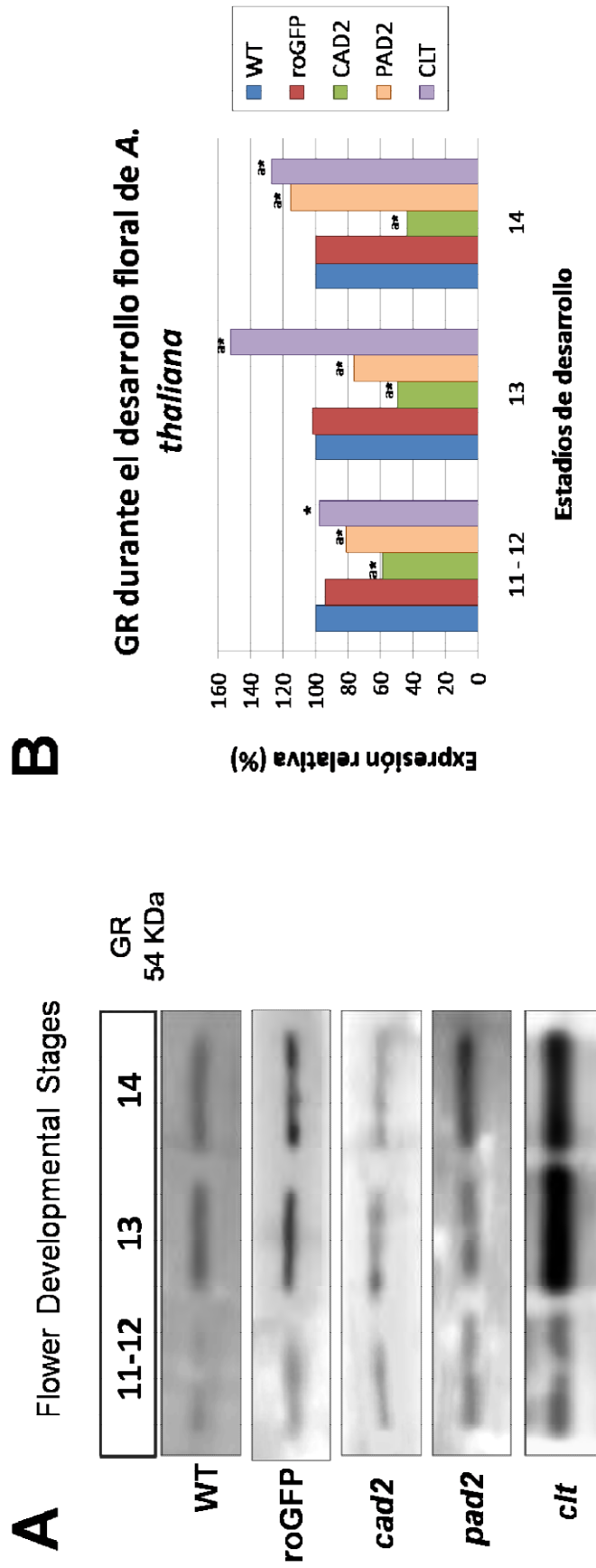
fenotipos silvestres en el estadio 11-12, pero alcanzó niveles de expresión de GR bastante superiores al WT en los estadios 13 y 14.



**Figura 66.** Análisis de expresión mediante qPCR de la GR1 durante el desarrollo floral en distintos mutantes deficientes en GSH de *Arabidopsis thaliana*.. "a" representa un significado estadístico con un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 67.** Análisis de expresión mediante qPCR de la GR2 durante el desarrollo floral en distintos mutantes deficientes en GSH de *Arabidopsis thaliana*.. "a" representa un significado estadístico con un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 68.** A. Análisis de expresión mediante Western blotting de la proteína GR durante el desarrollo floral de *Arabidopsis thaliana*. B. Cuantificación de los niveles de expresión de la proteína mediante densitometría a partir de las bandas de la figura 68. A. La expresión se relativizó respecto al WT. Los asteriscos indican un significado estadístico del 95% ( $P \leq 0,05$ ) entre las diferentes etapas de desarrollo. "a" representa un significado estadístico con un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ) entre diferentes tipos de plantas.

### **3.1.3. Análisis molecular de las enzimas encargadas de la detoxificación celular mediada por GSH (GPX y GST).**

Una de las principales enzimas de los sistemas antioxidantes es la GPX, que utiliza GSH como sustrato para reducir ROS (peróxidos). Por otro lado, la encargada de liberar a la célula de xenobióticos, usando GSH como sustrato, es la GST.

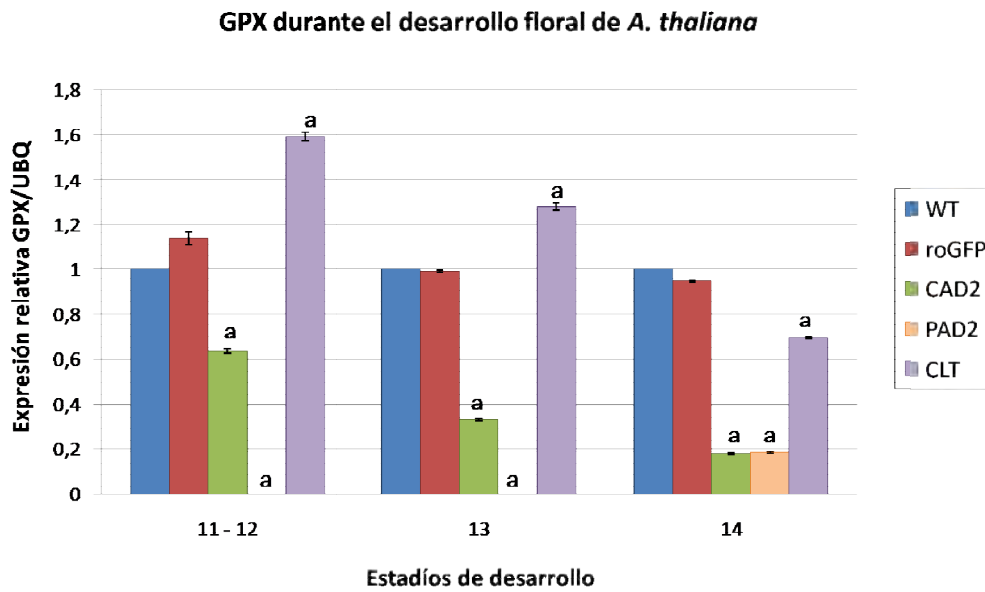
Las figuras 69 y 70 revelan diferencias muy significativas en los patrones de expresión de GPX y GST en los distintos tipos de plantas de *A. thaliana*.

Con respecto a los transcritos GPX (Figura 69), WT y roGFP poseían similares patrones de expresión. *cad2* y *pad2* expresaron niveles inferiores al WT de GPX en todos los estadios de estudio. GPX era casi inexistente en los estadios 11-12 y 13 de *pad2*. El mutante *clt* expresó niveles superiores al WT de GPX en los estadios 11-12 y 13, e inferiores respecto a los fenotipos silvestres en el estadio 14.

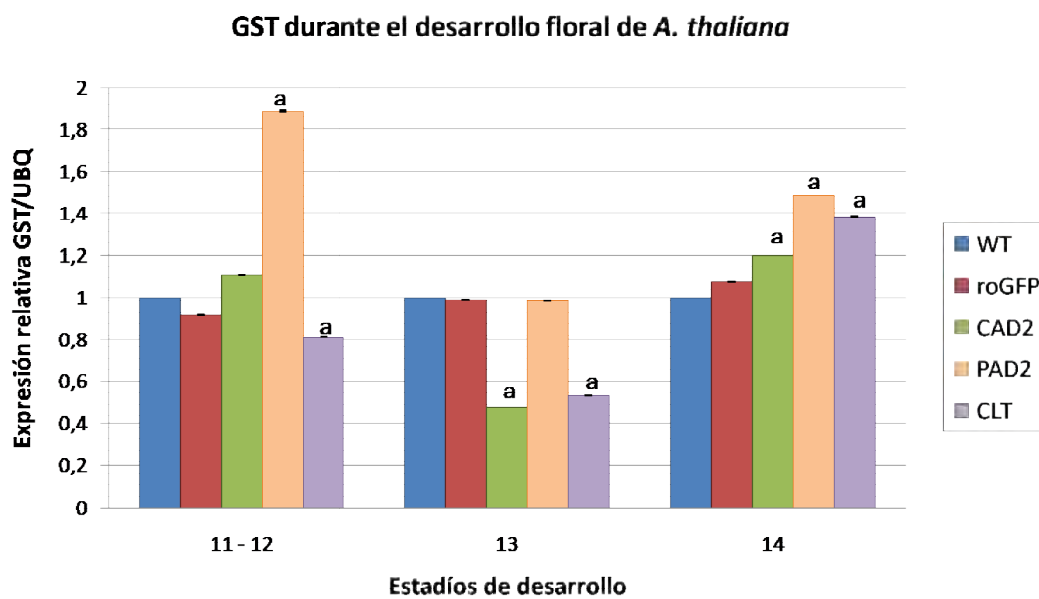
Por otro lado, WT y roGFP también presentaban patrones de expresión de los transcritos de GST similares (Figura 70). *cad2* expresó niveles superiores de GST a WT en los estadios 11-12, después disminuyen en el estadio 13 y finalmente se expresa en niveles ligeramente superiores a WT en el estadio 14. *pad 2* expresó niveles de GST superiores a los de los fenotipos silvestres en los estadios de desarrollo 11-12; sin embargo, en el estadio 13 sus niveles de expresión de GST fueron similares a los de WT, y finalmente, en el estadio 14 de *pad2* se expresaron niveles superiores de GST en comparación con los fenotipos silvestres. *clt* expresó niveles de GST inferiores a los de los fenotipos silvestres en los estadios 11-12 y 13, y superiores a los WT en el estadio 14.

La enzima GPX fue una de las dos candidatas elegidas para realizar el análisis de expresión protéica por Western blotting, debido a su implicación en la biología reproductiva de Angiospermas ya comprobada.

En la figura 71 puede apreciarse la diferencia existente en la expresión de GPX en los distintos mutantes de *A. thaliana* respecto al WT. Como ya se apreciaba en olivo (Figura 61), la tendencia general de la expresión de GPX es expresarse a lo largo de la microsporogénesis, teniendo un máximo en los primeros estadios, y también al comienzo de la germinación.

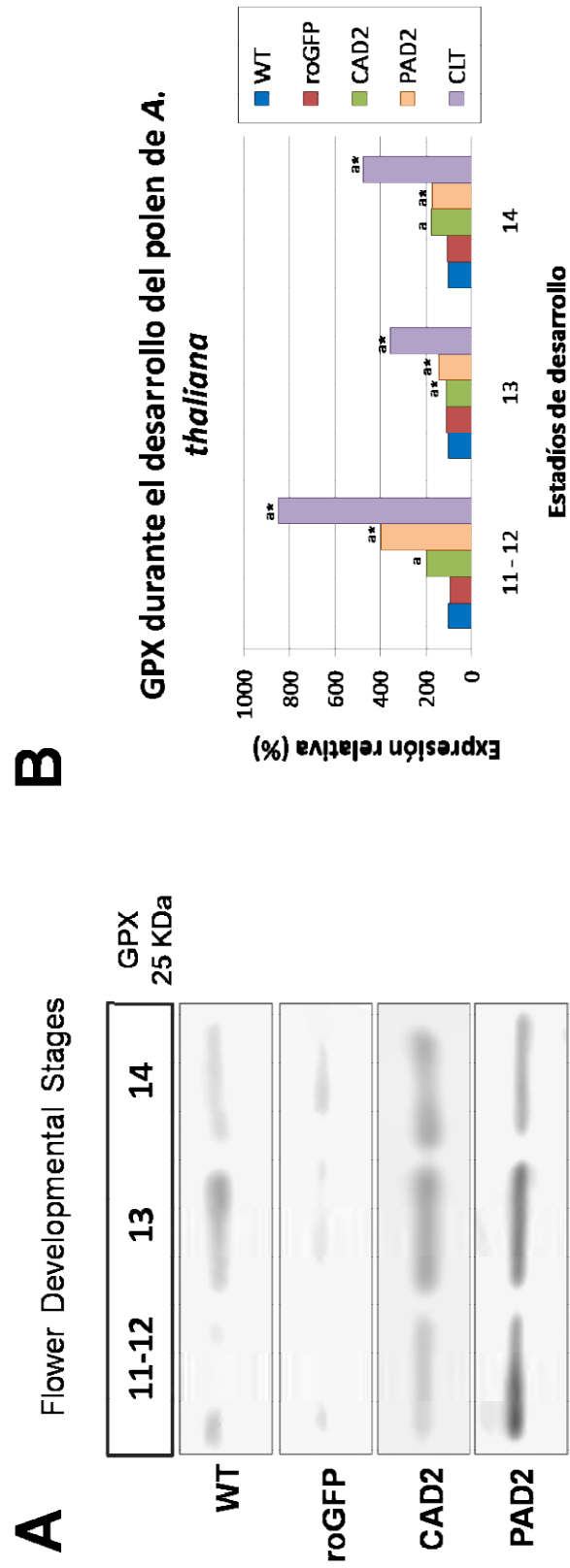


**Figura 69.** Análisis de expresión mediante qPCR de la GPX durante el desarrollo floral en distintos mutantes deficientes en GSH de *Arabidopsis thaliana*. "a" representa un significado estadístico con un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 70** Análisis de expresión mediante qPCR de la GST durante el desarrollo floral en distintos mutantes deficientes en GSH de *Arabidopsis thaliana*. "a" representa un significado estadístico con un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ).





**Figura 71.** A. Análisis de expresión mediante Western blot de la proteína GPX durante el desarrollo floral de *Arabidopsis thaliana*. B. Cuantificación de los niveles de expresión de la proteína mediante densitometría a partir de las bandas de la figura 4.58.A. La expresión se relativizó respecto al WT. Los asteriscos indican una significación estadística del 95% ( $P \leq 0,05$ ) entre las diferentes etapas de desarrollo. "a" representa una significación estadística con un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ) entre diferentes tipos de plantas.

roGFP expresó GPX con un patrón similar al del WT aunque algo menos intenso. El mutante *cad2* expresó una mayor cantidad de GPX que los fenotipos silvestres en los estadios iniciales (11-12) y finales (14) del desarrollo floral, siendo muy similar la expresión en el estadio 13 a la de WT. La expresión de GPX durante el desarrollo floral en *pad2* fue superior en todos los estadios con respecto a los fenotipos silvestres. El mutante *clt* expresó GPX en cantidades muy superiores a los fenotipos silvestres en todos los estadios.

La tendencia en todos los tipos de plantas de *Arabidopsis thaliana* (mutantes o silvestres) fue la de disminuir los niveles de la proteína GPX conforme avanzaba el desarrollo floral.



3.1. *Análisis bioquímico y molecular de los diferentes enzimas implicados en el metabolismo del glutati3n durante el desarrollo floral de Arabidopsis thaliana.*

3.2. ***Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour.***



El capítulo 3.2 (Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour.) ha sido publicado con la siguiente referencia:

**García-Quirós, E.,** Alché, J.D., Karpinska, B., Foyer, C.H. (2019) Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour, *Journal of Experimental Botany*, erz376. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz376>.

La versión publicada puede verse en el apartado Publicaciones.

---

## **Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour**

Estefanía García-Quirós<sup>1</sup>, Juan de Dios Alché<sup>1</sup>, Barbara Karpinska<sup>2</sup>& Christine H.  
Foyer<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Plant Reproductive Biology and Advanced Microscopy Laboratory, Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, Spain

<sup>2</sup>School of Biosciences, College of Life and Environmental Sciences University of Birmingham Edgbaston Birmingham, B15 2TT, UK

\*Corresponding Author

**Christine H. Foyer**

E-mail address: C.H.Foyer@bham.ac.uk

Running title: Redox regulation of pollen vigour

**Abstract**

The importance of the glutathione pool in the development of reproductive tissues and in pollen tube growth was investigated in wild type (WT) *Arabidopsis thaliana*, a reporter line expressing redox-sensitive green fluorescent protein (roGFP), and a glutathione-deficient *cad2-1* mutant (*cad2-1/roGFP2*). The *cad2-1/roGFP2* flowers had significantly less reduced glutathione (GSH) and more glutathione disulphide (GSSG) than the WT or roGFP flowers. The stigma, style, anther, germinated pollen grains and pollen tubes of the roGFP2 flowers had a low oxidation degree. However, these tissues were more oxidised in the *cad2-1/roGFP2* flowers than the roGFP2 controls. Crucially, the ungerminated pollen grains were significantly more oxidised than the germinated pollen grains in both roGFP2 lines, suggesting that redox state of the cell is adjusted to upon germination become more reduced. The germination percentage was lower in the *cad2-1/roGFP2* pollen and pollen tube growth arrested earlier than in the roGFP2 pollen, indicating that increased cellular reduction is essential for pollen tube growth. These findings demonstrate that ungerminated pollen grains reside in a relatively oxidised state compared to germinating pollen grains. Moreover, failure to accumulate glutathione and maintain high GSH/GSSG ratios has a strong negative effect on pollen germination,

Keywords: glutathione; flower development. pollen germination; oxidative stress, redox-sensitive green fluorescent protein (roGFP), redox regulation

---

**1. Introduction.**

The tripeptide thiol,  $\gamma$ -glutamylcystein glycine (glutathione, GSH) is the most abundant low molecular weight thiol in plants and animals (Noctor et al., 2011). GSH synthesis in the cytosol and plastids of plant cells (Wachter et al., 2005, Galant *et al.*, 2011)

occurs via the sequential action of two ATP-dependent enzymes:  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS) also called  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase (GCL), and glutathione synthase (GS) (Cairns *et al.*, 2006, Pasternak *et al.*, 2008, Galant *et al.*, 2011, Noctor *et al.*, 2011). In the first step,  $\gamma$ -glutamylcysteine ( $\gamma$ -EC) is produced from cysteine and glutamate by the action of  $\gamma$ -ECS. In the second step, glycine is added to  $\gamma$ -EC to form GSH by the action of GS (Noctor *et al.*, 2002, Sugiyama *et al.*, 2004, Wachter *et al.*, 2005; Galant *et al.*, 2011). GSH synthesis is regulated by the availability of cysteine or glycine and by the post-translational redox-activation of  $\gamma$ -ECS via the formation of an intramolecular disulfide bond [Cys186-Cys406 in *Arabidopsis*] (Noctor, *et al.*, 2002; Gromes, *et al.*, 2008). GSH synthesis is thus regulated by the redox environment of the chloroplasts allowing rapid responses to biotic and abiotic stresses.

Knockout  $\gamma$ -ECS mutants are lethal (Cairns *et al.*, 2006). However, there are a number of *Arabidopsis* mutants with defects in  $\gamma$ -ECS that allow a lower level of GSH synthesis (Ball *et al.*, 2004, Cobbett *et al.*, 1998). These mutants have significantly lower levels of GSH accumulation than the wild type, and have no marked shoot phenotypes but variable effects on root system development and architecture (Schnaubelt *et al.*, 2013). For example, very low levels of GSH are present in the *rm11* mutant, leading to arrest of the root apical meristem (Vernoux *et al.*, 2000; Schnaubelt *et al.*, 2013). In contrast, the *cad2-1* mutant, contains about 30% of the wild type GSH levels and has some effects on lateral root production (Schnaubelt *et al.*, 2013).

GSH and  $\gamma$ -glutamylcysteine are exported from the chloroplasts to the cytosol by CLT transporters, but the mechanisms of import of GSH into mitochondria and other cellular compartments are largely unknown (Zechmann, 2014, Gigolashvili and Kopriva, 2014). GSH is accumulated to high concentrations (5-10 mM) in plant cells and is directly involved in the maintenance of intracellular redox homeostasis, acting as a redox buffer (Meister *et al.*, 1983, Schafer *et al.*, 2001, Lopez-Mirabal *et al.*, 2008; Noctor *et al.*, 2011, 2016). Like ascorbate, GSH serves to limit the accumulation of reactive oxygen species (ROS), within plant cells (Mittler *et al.*, 2004, Foyer and Noctor, 2005, 2009, 2011, Noctor *et al.*, 2012, Mittler, 2017). As a result of interactions with ROS, GSH is oxidized to glutathione disulfide (GSSG). GSSG is reduced back to GSH by the action of glutathione reductase (GR) (Schwarzländer *et al.*, 2008, Marty *et al.*, 2009, García-



Quirós *et al.*, 2017). GSH and GSSG are key players in cellular redox regulation, governing the redox potential and ensuring a stable redox environment within the cell. GSH and GSSG are also involved in the control of gene expression (Foyer *et al.*, 2001, Maughan and Foyer, 2006). However, *in vivo* measurements of the glutathione pool have revealed that the cytosol, nuclei, and mitochondria contain very little GSSG and that oxidative challenges are rapidly counterbalanced by the network of other antioxidants (Queval, *et al.*, 2009; Noctor *et al.*, 2011, 2016; de Simone *et al.*, 2017). Moreover, GSSG can be rapidly sequestered in the vacuole (Noctor, *et al.*, 2014).

ROS and GSH are key regulators of plant development (Considine and Foyer, 2014), and are particularly important in the development of flowers and in pollen germination (Zechmann and Müller, 2010, Zechmann *et al.*, 2011a, b, Traverso *et al.*, 2013; Schippers *et al.*, 2016). GSH functions together with NADPH-thioredoxin (TRX)-Reductase NTR/TRX pathways to regulate auxin signalling during and after pollen germination (Traverso *et al.*, 2013; Zechmann *et al.*, 2011a, b). GSH depletion triggers alterations in auxin metabolism that lead to an inhibition of pollen germination. This observation is likely to be linked to changes in ROS accumulation that occur in the reproductive tissues during pollen and pistil development, pollen tube germination and pollen-pistil interactions (Zafra *et al.* 2010). However, the relevance of glutathione-dependent pathways remains poorly understood and too little is known about the compartment-specific changes in redox processes that occur during flower and pollen development. A combination of different techniques has been used to investigate the role of glutathione in fertilization and the germination of the pollen tube. Specific antibodies were used to characterise GSH abundance in flowers during development. In addition, the effects of low GSH in the cytosol and nuclei of *Arabidopsis thaliana* reproductive tissues were determined using *in vivo* redox-sensitive green fluorescent protein (roGFP) reporter lines (Meyer *et al.*, 2007, 2009). ro-GFP expressing wild type (roGFP2) and *cad2-1* mutant (*cad2-1/roGFP2*) reporter lines were used in the present study to estimate the redox state of the nuclei and cytosol of flower and pollen cells to provide some of the missing pieces required to decipher the role of glutathione in these key processes

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant material and growth conditions

Seeds of wild type (WT) *Arabidopsis* accession Columbia-0 (Col-0), Col-0 expressing roGFP2 (de Simone *et al.*, 2017) and *cad2-1* mutants expressing roGFP2 (*cad2-1/roGFP2*) were surface sterilized and washed twice with sterile water. After stratification for 2 days in the dark at 4 °C, seeds were sown on soil and grown in controlled environment chambers under 120-150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  irradiance with a 8/16 h day /night period, 22 °C day/18 °C night temperatures and a relative humidity of 60%. Six weeks after sowing samples were collected at different stages of flower development (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010), from a younger flower buds (flowering stage 6-7: sepals still enclose bud and anthers are at meiosis and tetrads) to more advanced stages of flowering in which the stigmatic papillae appear, petals level with stamens and pollen is at the bicellular-tricellular transition (flowering stage 11-12), through flowering stage 13 (stamens outstrip gynoecium and anther dehiscence) until flowering stage 14 (dehiscent anthers extend above stigma). Samples were from the growth chambers as indicated in the figure legends. Each experiment was repeated three times and results are the average of three independent experiments.

### 2.2. Pollen germination

25-30 freshly opened flowers (stage 14) of *Arabidopsis thaliana* were collected and allowed to dry at room temperature for 30 minutes in a 1.5 ml tube (lid opened). One ml of germination medium (Fan *et al.*, 2001) was added and the pollen was concentrated according to Li (2011). The pollen grains were germinated at 28 °C and in the dark during 1, 2 and 3 hours. Images of germinated pollen grains were taken in a Leica DMI600B or a Nikon Eclipse TE2000-U inverted epifluorescence microscope. Germinability of the pollen was measured by counting the germinated grains (pollen tube length higher than pollen diameter) at different germination times. Data are expressed as a percentage of the total number of pollen grains. The length of the pollen tube was calculated using the Straight tool of the ImageJ software. Data are the means

and standard deviation of a minimum of nine different samples of each one of three experimental replica.

### **2.3. Sample preparation for immunohistochemistry**

Samples were collected from the three development stages and immersed in a fixative solution composed of a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2). Further dehydration in ethanol series and embedding in Unicryl resin followed by polymerization using UV light, at -20 °C were performed. Thin sections (1 µm) were attached to 3-triethoxysilylpropylamine (TESPA) treated slides.

### **2.4. Immunolabeling of glutathione**

Thin sections were incubated in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) containing 2.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma–Aldrich) for 1h at room temperature and then treated with primary anti-GSH antibody (Agrisera prod. No. AS09 594) followed by secondary antibody (anti-rabbit IgG Alexa549-labelled secondary antibody - Molecular Probes). Negative controls were prepared by omitting the primary antibody. After washing three times, samples were mounted with citifluor (Ted Pella). Fluorescence microscopy (FM) observations were performed using a Nikon Eclipse TE2000-U inverted microscope, fitted with a ProgRes MF Cool CCD microscope camera (Jenoptik). Fluorescence intensity was quantified using the ImageJ software. Data are the average of a minimum of nine images obtained in three independent experiments.

### **2.5. Liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry**

Glutathione was determined according to Airaki et al. (2011). Samples of open flowers and floral buds (green and white) of WT, roGFP2 and *cad2-1* / roGFP2 plants were frozen in liquid nitrogen, ground and immediately homogenized in 1 ml of 0.1M HCl. After centrifugation, supernatants were extracted again. The supernatants then were

pooled and filtered through 0.45 mm polyvinylidene fluoride (PVDF) filters and analyzed by LCMS on a Triple quadrupole mass spectrometer (Quattro micro) coupled to a liquid chromatograph (Waters Alliance 2695) with dual wavelength detector.

### **2.6. Confocal laser scanning microscopy and image analysis**

Freshly opened flowers (Day 0 according to Boavida and McCormick2007) were incubated in 1 ml of germination medium (Fan et al., 2001) at 28 ° C for 1h in darkness. After the incubation, selected flowers were assembled on excavated slides containing a few drops of the germination medium. Immediately they were observed with a C-1 confocal microscope (Nikon) fitted on a Nikon Eclipse TE2000-U inverted microscope, using an image capture schedule equivalent to that described by de Simone *et al.* (2017). Briefly, the image of reduced roGFP (green) was calculated by subtracting the image after excitation with 405 nm from the image obtained after excitation with 488 nm, by using the ImageJ software. The final reduced roGFP/oxidised roGFP ratios were also determined with ImageJ by using a threshold of 10. Finally, to better illustrate the redox potential differences in the images evaluated, the grayscale was converted to a false colour scale image using the ImageJ 'Fire' query table. All measurements were taken with identical adjustments to be able to compare them in absolute terms (Meyer et al., 2007). The intensity per area was measured in each image by using the ImageJ software, and these data were used to determine the degree of oxidation and the redox potential in each tissue according to the Nernst equation (de Simone *et al.* 2017). A minimum of 10 samples per treatment were analysed.

### **2.7. Statistic analysis**

To analyze the statistical significance of our results, IBM SPSS Statistics software (version 21.0.0.0) has been used. To evaluate the normality of the data, the Shapiro-Wilks test combined with Kolmogórov-Smirnov was used. To verify the statistical significance of the data, a variance analysis (ANOVA one way) was performed in combination with a multiple range test (Duncan and Bonferroni post hoc).

### 3. Results

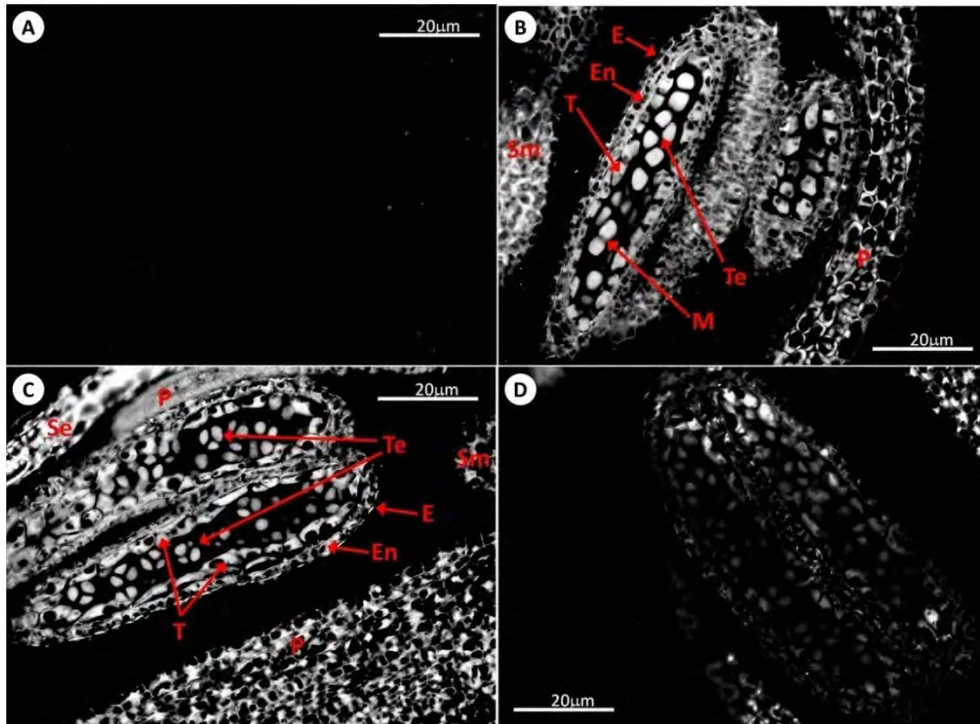
#### 3.1. Immunolocalization of GSH during flower development

GSH was detected in the microsporocytes, tetrads, pollen grains and the anther tissues (including the tapetum) of the WT, roGFP2 and *cad2-1/roGFP2* plants using anti-GSH antibody (Figures 72, 73, 74). GSH was also present in the gynoecium (including stigma), the embryo sacs and other tissues of the ovary (Figures 75, 76, 77) of the WT and roGFP2 plants.

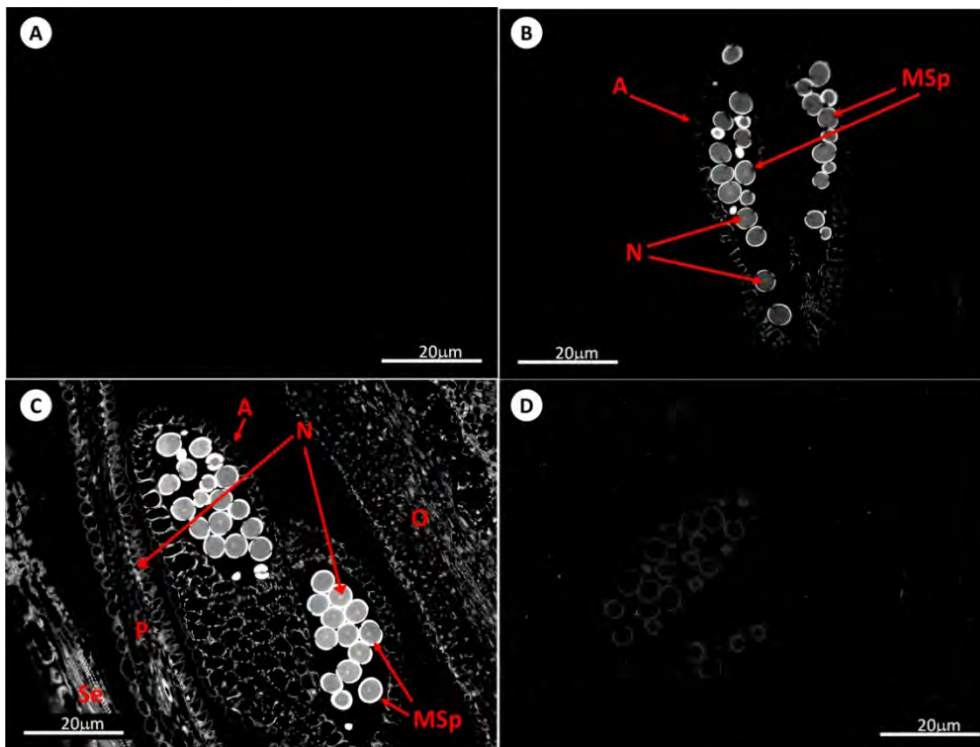
GSH was present in the nuclei, cytosol and the pollen wall, the tapetum and the embryo sacs of these lines. The detection of GSH in the cell wall of the pollen grain could suggest that glutathione is directly involved in pollen-stigma signalling, in the beginning of germination and in the reorientation during the elongation of the pollen tube towards the ovary. However, the intensity of the antibody-linked fluorescence was much less in all the tissues of the *cad2-1/roGFP2* plants than either the WT and roGFP2 plants. This reflects the lower levels of GSH present in the *cad2-1/roGFP2* plants than the other lines, which have similar levels of GSH during all developmental stages, but specially at the end of anther development (Figure 78).

#### 3.2. LC-MS determination of GSH and GSSG levels

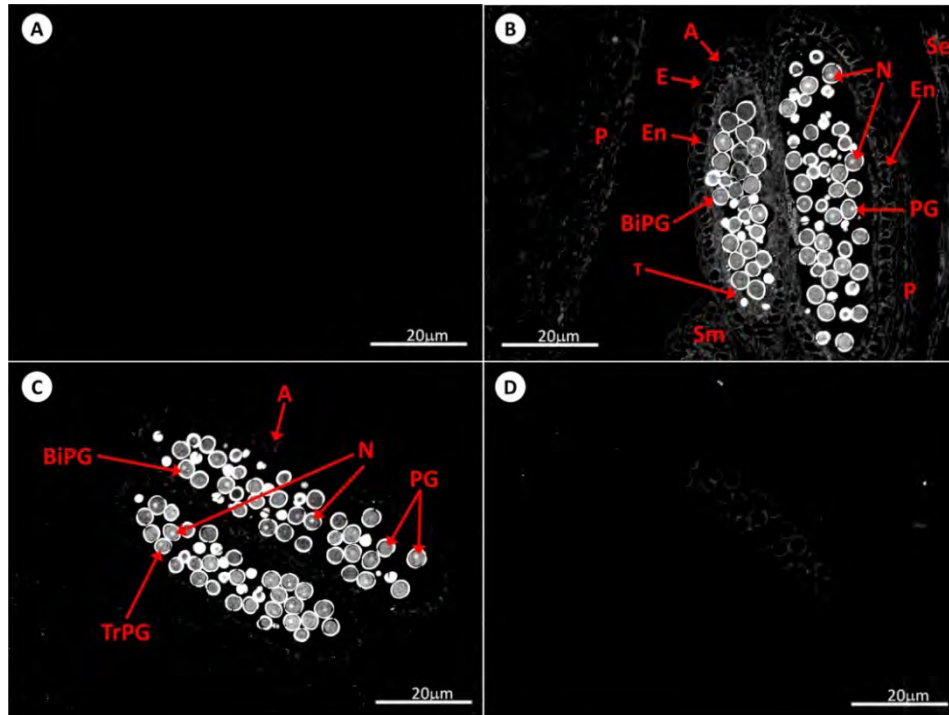
The levels of GSH and GSSG were similar in the WT (Fig. 79A) and roGFP2 (Fig. 79B) flowers at all stages of development. The highest levels of GSH were determined in the flowers at stage 14, with high GSH/GSSG ratios maintained throughout flower development in the WT (Fig. 79A) and roGFP2 (Fig. 79B) plants. In contrast, the flowers on the *cad2-1/roGFP2* plants had less than 50% of the GSH present in the WT or roGFP2 lines at equivalent stages of flower development. However, the levels of GSSG in the *cad2-1/roGFP2* flowers (Fig. 79C) were either similar or slightly higher than those detected in the WT (Fig. 79A) and roGFP2 (Fig. 79B).



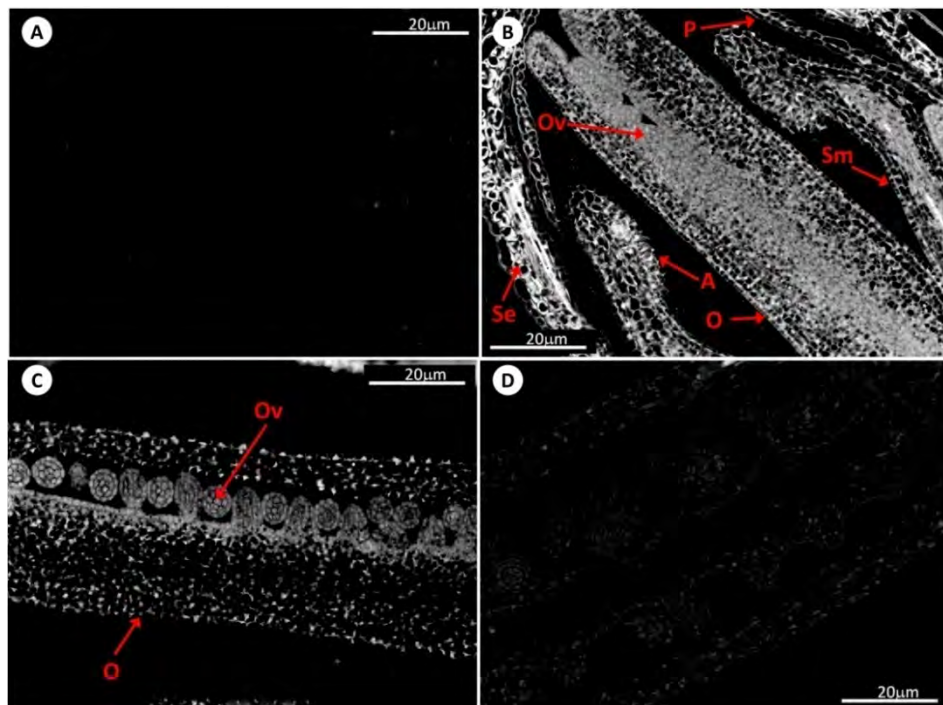
**Figure 72.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in the anthers at early stages of development. A) Negative control (meiocytes), B) WT (meiocytes), C) roGFP2 (tetrads) and D) *cad2-1*/roGFP2 (meiocytes) plants. E, epidermis; En, endothecium; M, meiosis; P, petal; Se, sepal; Sm, stamen; T, tapetal layer; Te, tetrad.



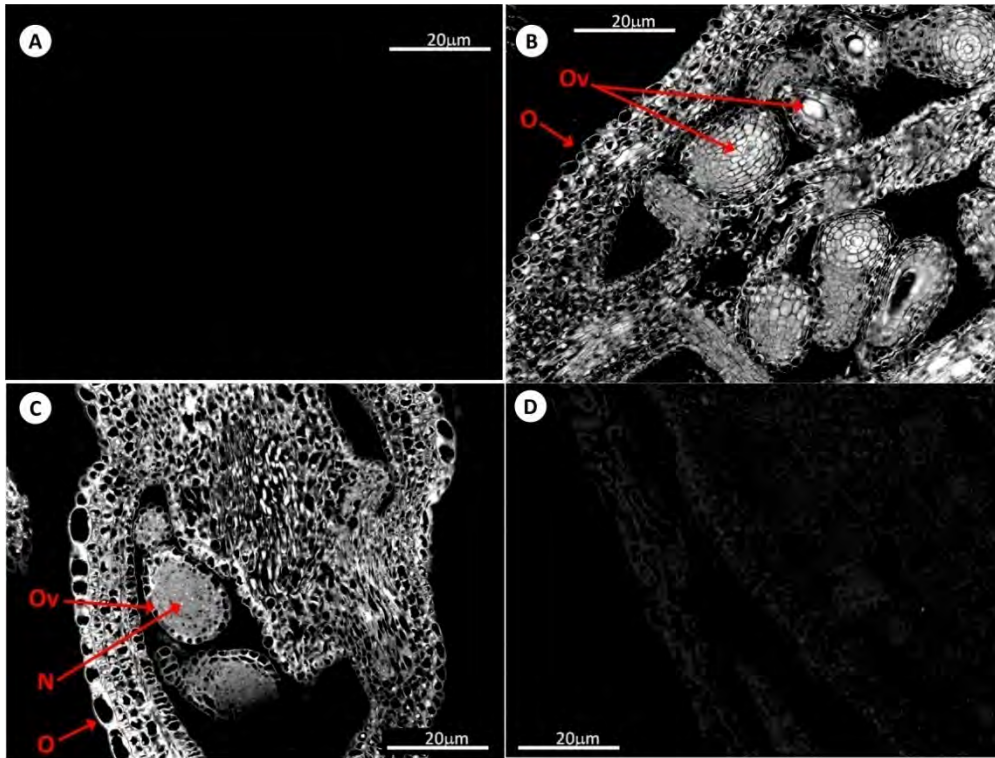
**Figure 73.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in anthers at stage 13. A) Negative control, B) WT, C) roGFP2 and D) *cad2-1*/roGFP2 plants. A, anther; MSp, microspores; N, nucleus; O, ovary; P, petal; Se, sepal.



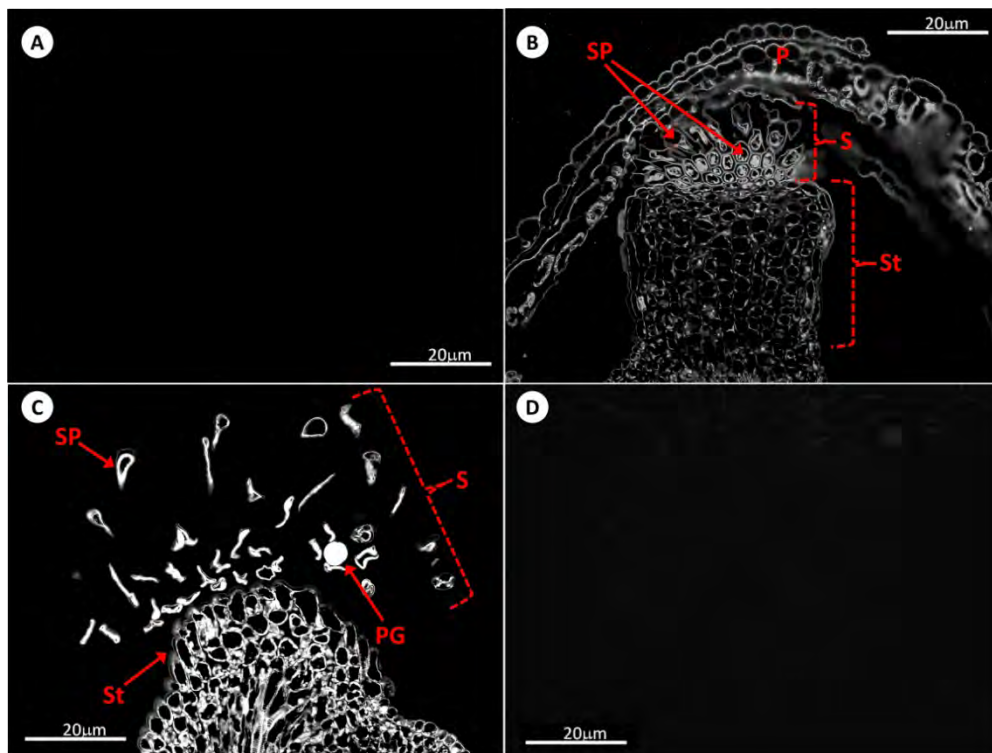
**Figure 74.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in *Arabidopsis* anthers at the stage 14. A) Negative control, B) WT, C) roGFP2 and D) *cad2-1/roGFP2* plants. A, anther; BiPG, bicellular pollen grain; E, epidermis; En, endothecium; N, nucleus; P, petal; PG, pollen grain; Se, sepal; Sm, stamen; T, tapetal layer; TrPG, tricellular pollen grain.



**Figure 75.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in flowers (pistils) at the stage 11-12. A) Negative control, B) WT, C) roGFP2 and D) *cad2-1/roGFP2* plants. A, anther; O, ovary; Ov, ovum; P, petal; Se, sepal; Sm, stamen.

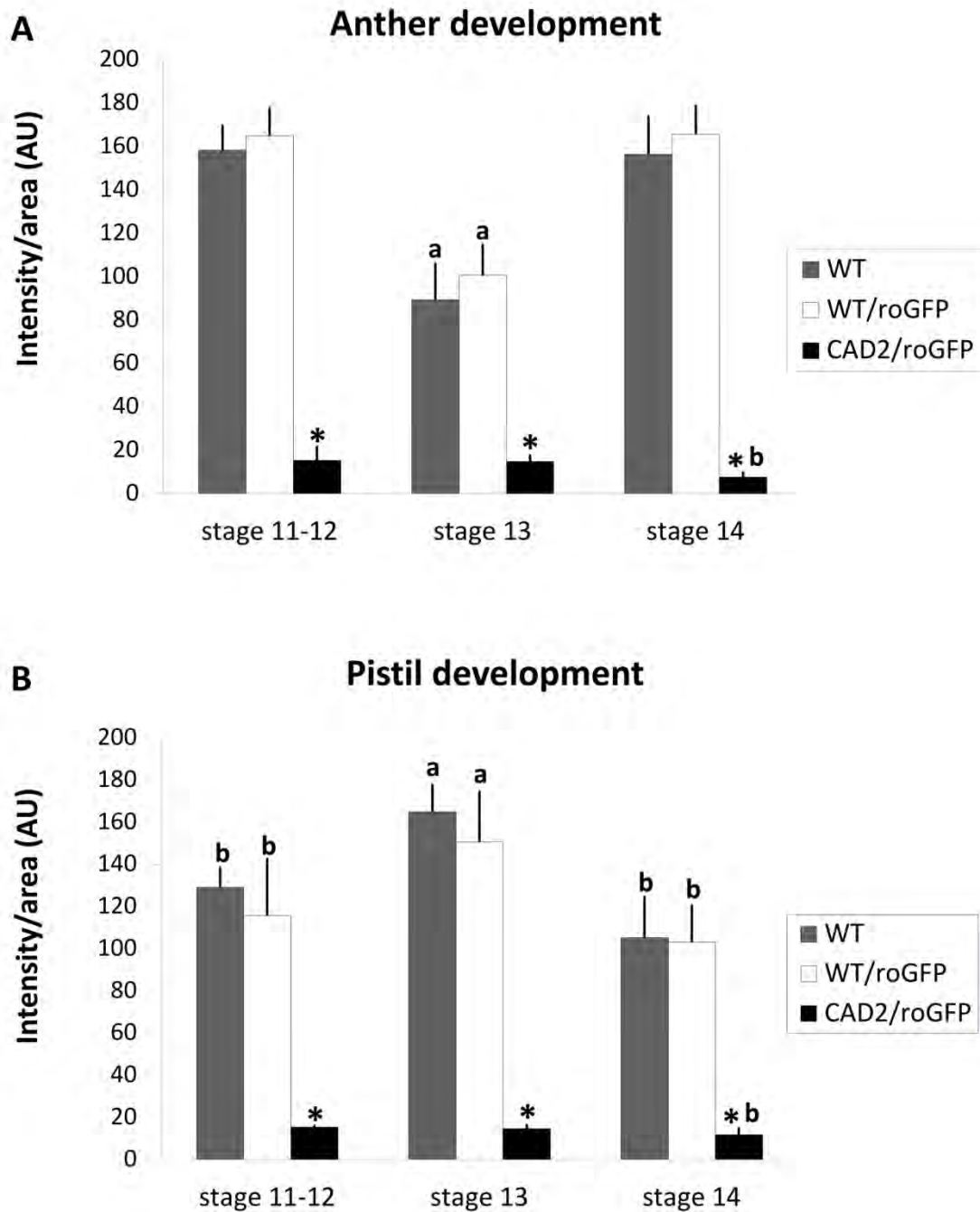


**Figure 76.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in *Arabidopsis* pistils at stage 13. A) Negative control, B) WT, C) roGFP2 and D) *cad2-1/roGFP2* plants. N, nucleus; O, ovary; Ov, ovum.



**Figure 77.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in pistils at the stage 14. A) Negative control, B) WT, C) roGFP2 and D) *cad2-1/roGFP2* plants. P, petal; PG, pollen grain; S, stigma; SP, stigmatic papillae; St, style.





**Figure 78.** Relative antibody-associated fluorescence in the different organs at different stages of flower development (11-12, 13, 14) in WT, roGFP2, *cad2-1*/roGFP2 plants: **A)** Development of anthers and **B)** Development of pistils. Asterisks indicate statistical significance at 95 % ( $P \leq 0,05$ ) among the different developmental stages within the same line (roGFP or *cad2-1*). "a" means a statistical significance with a confidence interval of 95% ( $P \leq 0,05$ ), between different lines (WT, roGFP or *cad2-1*).

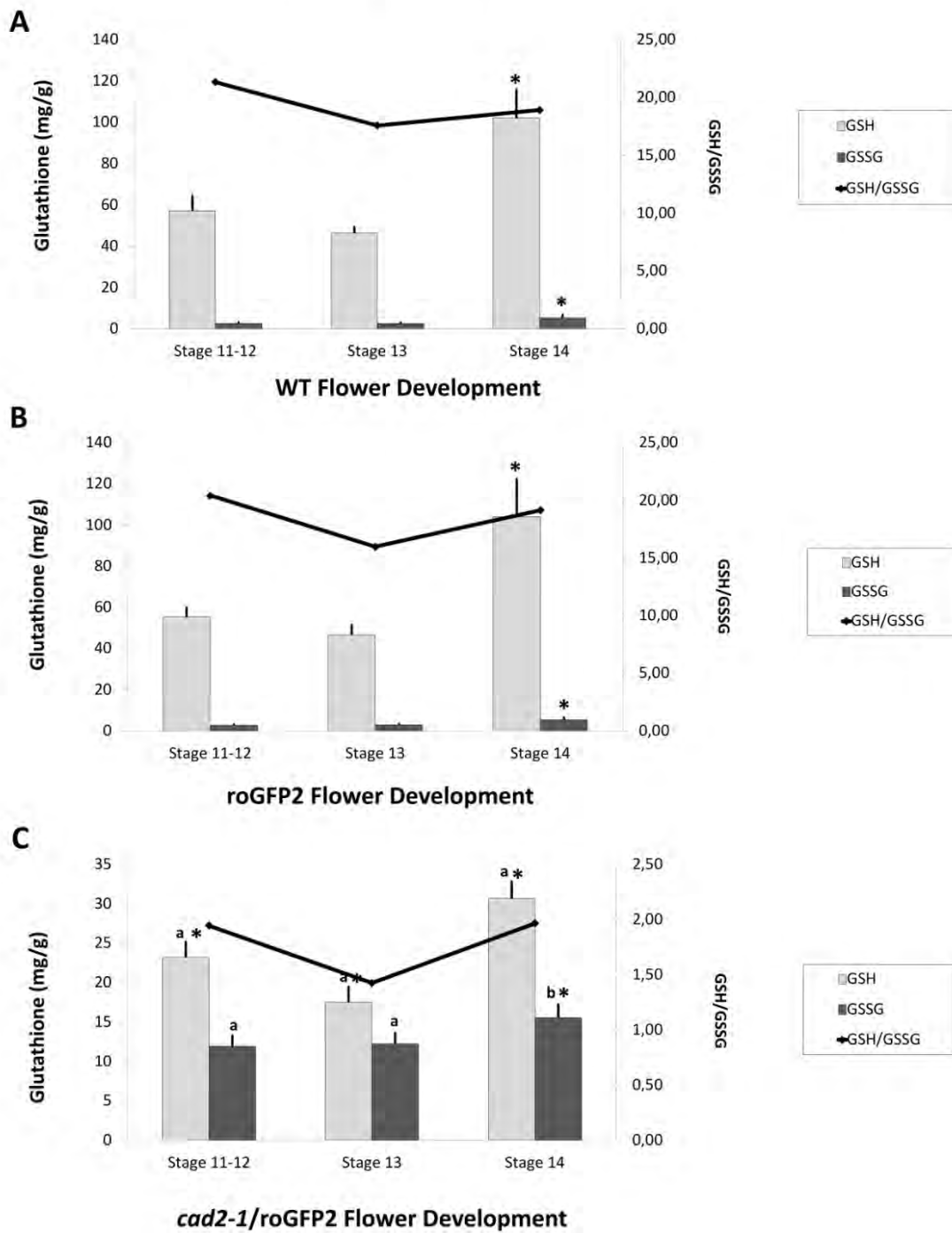
### **3.3. The redox state of the glutathione pool in vivo**

Ro-GFP fluorescence was detected in the anther, the pistil and the germinated pollen grains of the roGFP2 and the *cad2-1/roGFP2* plants (Fig. 80-82). As was observed in the GSH/GSSG ratio from biochemical analysis, the ratiometric analysis of the confocal images shows that the 405 (reduced)/488 (oxidized) ratio is much higher in the roGFP lines than in the *cad2-1/roGFP* mutant, this could be due to the lack of enzyme involved in the metabolism of GSH causes an imbalance of cellular concentrations of glutathione, and therefore in cellular redox balance (Fig.80-82). Another important fact is a greater signaling in the stigma which is also expressed in a greater pollen-stigma interrelation, in roGFP line (Fig. 81).

The oxidation degree was low in the stigma, style, anther, germinated pollen grains and pollen tubes of the roGFP2 flowers (Fig. 83), In marked contrast, the oxidation degree in the ungerminated pollen grains was significantly higher than that of the germinated pollen grains (Fig. 83). Similarly, the oxidation degree was also highest in the ungerminated pollen grains of the *cad2-1/roGFP2* flowers in comparison to the germinated pollen grains and other tissues of the *cad2-1/roGFP2* flowers (Fig. 83). The oxidation degree was higher in all samples (stigma, style, anther, mature and germinated pollen grains and pollen tubes) of the *cad2-1/roGFP2* flowers relative to the roGFP2 plants (Fig. 83), and these differences were statistically significant in the case of the stigma, anther and mature pollen.

The glutathione redox potentials were similar in the stigma, style, anther, germinated pollen grains and pollen tubes of the roGFP2 flowers (Fig. 84). However, the glutathione redox potentials of the ungerminated pollen grains were significantly lower than that of the germinated pollen grains (Fig. 84). The oxidation degree was lower in the stigma, style, anther, germinated pollen grains and pollen tubes of the *cad2-1/roGFP2* flowers than the roGFP2 plants (Fig. 84). The lowest redox potentials were determined in the ungerminated pollen grains of the *cad2-1/roGFP2* flowers and were significantly lower than the values calculated for the roGFP2 plants (Fig. 84).

### Glutathione Redox status



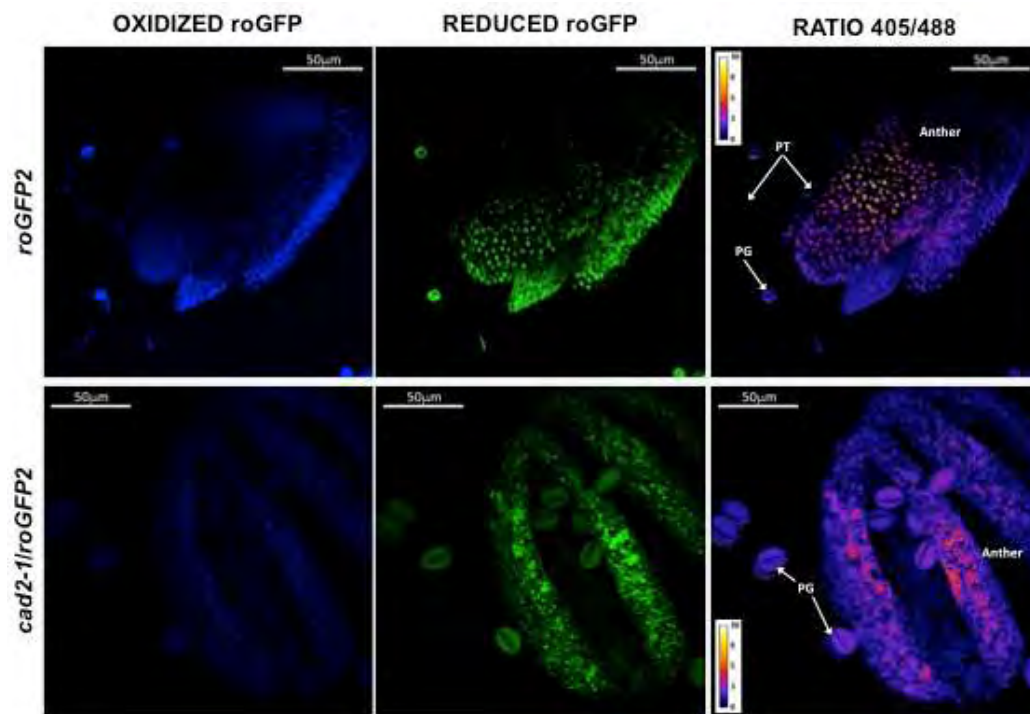
**Figure 79.** The GSH and GSSG contents and GSH/GSSG ratios of flowers at the different stages of development. A) WT, B) roGFP2 and C) *cad2-1/roGFP2*. Asterisks indicate statistical significance at 95 % ( $P \leq 0,05$ ) between different developmental stages. "a and b" mean a statistical significance with a confidence interval of 99 and 95%, respectively, between different kinds of plants.

Germination was significantly slower in the *cad2-1/roGFP2* pollen than that observed in the roGFP2 pollen (Fig. 85). In addition, the germination percentage was also lower in the *cad2-1/roGFP2* pollen. Pollen tube growth arrested earlier in the *cad2-1/roGFP2* pollen compared to the roGFP2 pollen (Fig. 85). Viability experiments demonstrated that non-germinated pollen grains were alive (data non-shown).

#### **4. Discussion**

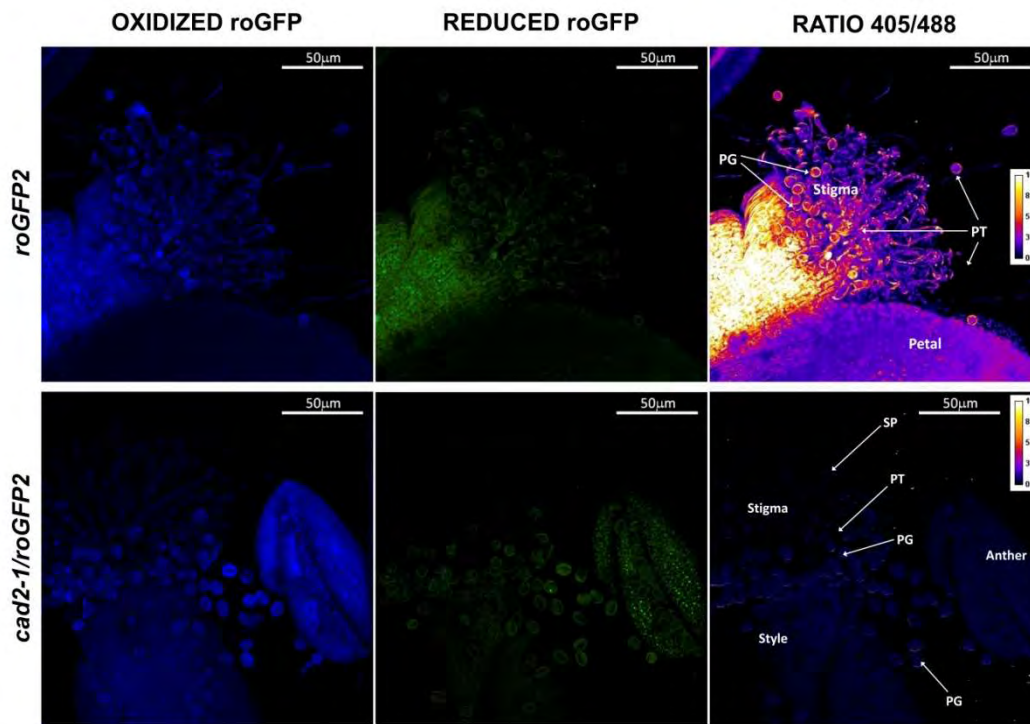
The redox state of cells is a crucial regulator of metabolism, signalling and function. While very few tools are available to measure the redox state of living cells, roGFP has proved to be a reliable and widely applicable monitoring system for the redox state of the glutathione pool. The applicability of these probes to confocal images has the promise of overcoming the limitations imposed by the irreversible oxidation of most other fluorescent probes used to monitor redox changes so far (Meyer et al., 2007; Schwarzlander et al., 2008, 2009; Aller et al., 2013). roGFP2 (Hanson et al., 2004) can be expressed with a high signal in plant cells and respond to artificially induced redox changes with ratiometric alterations in their fluorescence (Meyer et al., 2007). This probe needs GRX (glutaredoxin) so the fluorescent response of roGFP2 responds specifically to the cytosolic redox glutathione buffer (GSH / GSSG) (Fernandes et al., 2004; Gutscher et al., 2008; Meyer et al., 2007). Therefore, this data gives us information about the oxidation status of GSH *in situ* and *in vivo*. The confocal image of roGFP2 requires simultaneous excitation at 405 and 488 nm, thereby having a greater amplitude of the excitation peaks than other roGFP probes. This improvement results in a significant increase in excitation efficiency. Moreover, because the indicator is genetically encoded, it can be targeted to specific proteins or organelles of interest and expressed in a wide variety of cells and organisms (Dooley et al., 2004). The effectiveness of roGFP probes, and in particular of roGFP2, to measure the redox status of GSH, has been previously demonstrated in studies conducted in other species such as *Drosophila* (Tormos et al., 2011; Aller et al., 2013; Kasozi et al. al., 2013; Kolossov et al., 2014). The data presented here show that all the tissues of the *cad2-1/roGFP2* flowers have a lower GSH/GSSG ratio and a higher oxidation degree than the roGFP2 flowers. This finding contrasts with data on leaves, which show that although the level

of total glutathione is decreased in *cad2-1* mutants, the GSH/GSSG ratio remains similar to the wild type (Schnaubelt et al., 2015). Taken together, these findings would suggest that the flowers of the *cad2-1* mutants have a lower capacity to maintain their cellular GSH/GSSG ratios than the leaves.

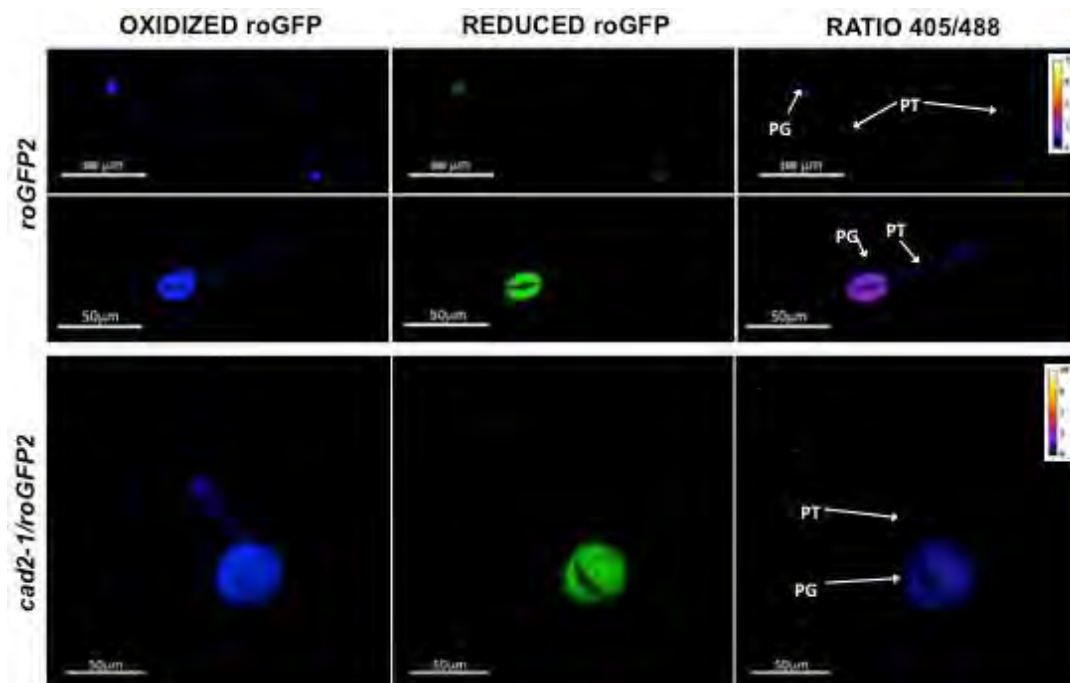


**Figure 80.**ro-GFP fluorescence in anthers with pollen grains at dehiscence (stage 14). The first column shows fluorescence resulting from the excitation at 405nm, the second shows fluorescence resulting from excitation at 488nm. The last column shows 405/488 ratio. (PG, pollen grain; PT, pollen tube).

There is a strong association between the extent of glutathione accumulation and flowering time (Ogawa et al., 2001; Yanagida et al. 2004). Flowering is accelerated in the *cad2-1/roGFP2* mutants compared to wild type (Kocsy et al., 2013). Moreover, glutathione is required for the initiation of floral meristem (Bashandy *et al.*, 2010, Kocsy et al., 2013) and also pollentube germination(Zechmann et al., 2011b). The data presented here builds on this firm foundation and reveals the presence of a low oxidation degree in all the flower parts (stigma, style, anther, germinated pollen grains and pollen tubes) except the ungerminated pollen. The ungerminated pollen resides in a highly oxidised state that is similar to that found in other quiescent cells (Schippers et al., 2016). In contrast to the ungerminated pollen, the germinated pollen grains and pollen tubes have a similar oxidation degree to the other flower parts. These findings



**Figure 81.**R0-GFP fluorescence in flowers (pistil, anther and germinated pollen) (stage 14) on germination medium. The first column shows fluorescence resulting from the excitation at 405nm, the second shows fluorescence resulting from excitation at 488nm. The last column shows 405/488 ratio. (PG, pollen grain; PT, pollen tube; SP, stigmatic papillae).



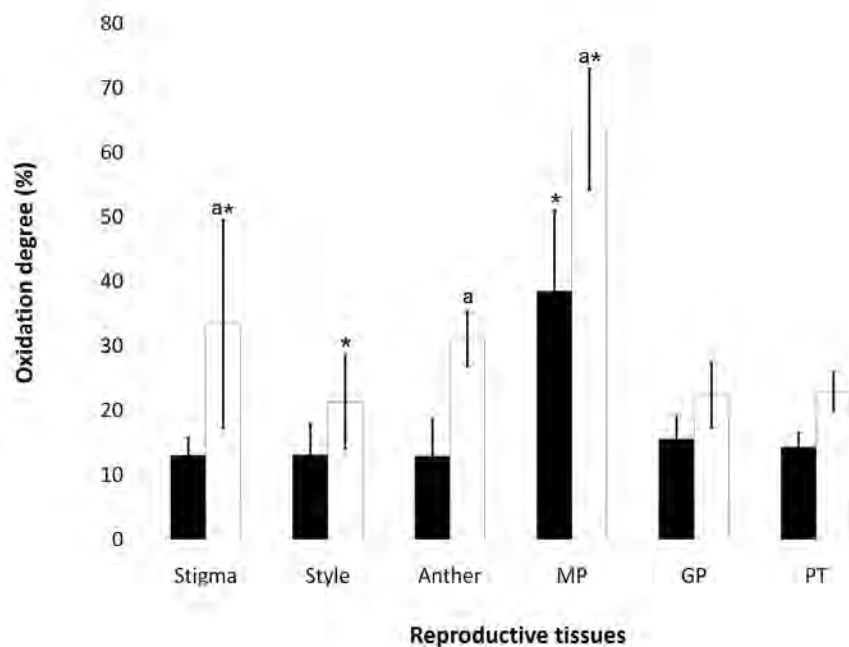
**Figure 82.**GFP fluorescence in germinated pollen (stage 14). The first column shows fluorescence resulting from the excitation at 405nm, the second shows fluorescence resulting from excitation at 488nm. The last column shows 405/488 ratio. (PG, pollen grain; PT, pollen tube).

suggest that the glutathione pool in the pollen is either increased or becomes more reduced (or both) once metabolism is triggered by germination. This process appears to be essential for germination/pollen tube growth because these processes are significantly impaired in the *cad2-1/roGFP2* pollen, which maintain a high degree of oxidation compared to the roGFP2 controls.

The pollen germination rates measured in the WT in the present study were comparable to those reported in the literature (around 71%; Boavida and McCormick 2007). This was decreased to ~ 15-20% in the pollen grains of the *cad2-1/roGFP2* mutants that are restricted in the capacity for glutathione synthesis (Aller et al., 2013, Cobbett et al., 1998, Maughan et al., 2010, Meyer et al., 2007, Zechmann et al., 2011a, b). In addition, the growth rates were much lower in the pollen grains of the mutants. Calculations of glutathione redox potentials based on the roGFP2 measurements confirm that all the flower parts apart from the ungerminated pollen are maintained in a highly reduced state, as is the case for the germinated pollen and pollen tubes. The highly reduced states measured in the germinated pollen shows that the endogenous antioxidant systems have a sufficient capacity to deal with the large amounts of ROS and RNS produced by the mitochondria (Traverso et al, 2013; Jiménez-Quesada et al., 2016, 2017; Zafra et al., 2018). Interestingly, the mitochondria in leaf cells were found to have the highest concentrations of glutathione of any of the intracellular compartments, even more than the chloroplasts (Zechmann et al, 2008). A roGFP probes targeted specifically to the mitochondria may be useful in future studies of the role of the glutathione pool in pollen tube mitochondria (Rosenwasser et al. 2010).

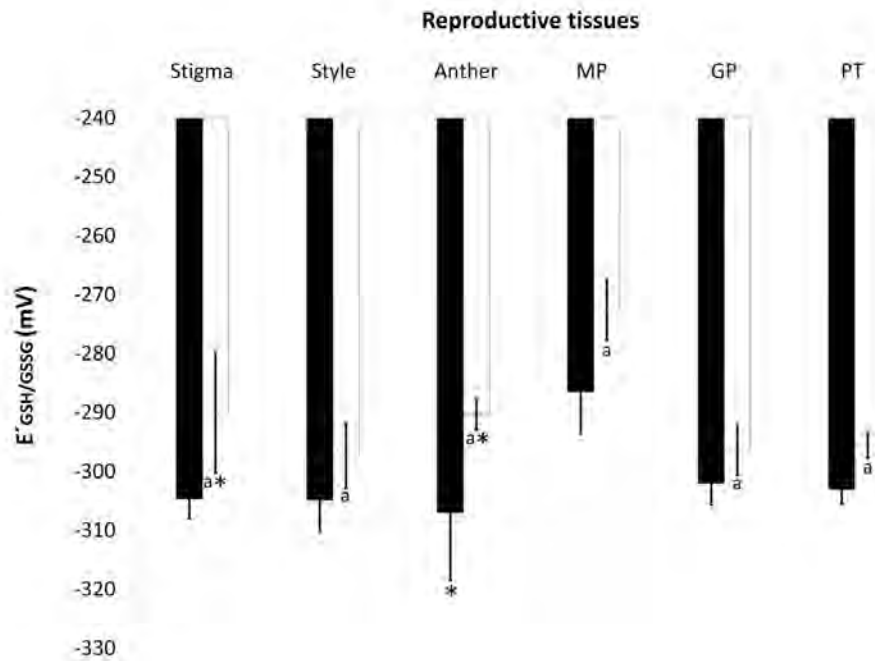
The finding that the glutathione levels were highest in mature flowers with a gradual increase in glutathione accumulation during flower development is interesting. This finding may be related to an increasing production of ROS during development. ROS accumulation may lead to the oxidative activation of  $\gamma$ -ECS resulting in increased glutathione synthesis (Gromes et al., 2008). ROS in aging cells due to mitochondrial dysfunction (Cui et al., 2012, Marí et al., 2010). The open flowers already contain mature pollen, which will have already interacted with the pistil to trigger the signalling cascade that results in germination of the pollen tube. Accumulation of GSSG (as observed in the *cad2-1/roGFP2* flowers) may be indicative of a high oxidised state,

which would have a negative impact on pollen-pistil signalling and pollen tube germination in the mature flowers. However, much of the GSSG accumulated in mutants such as the catalase deficient *cat2* mutants (Queval et al., 2011) is localised in the vacuole and not in the cytoplasm (Noctor et al., 2014). Mature flowers begin to degenerate undergoing processes of programmed cell death, which involves high concentrations of ROS (Marí et al., 2010; Ayer et al., 2010). The restriction of glutathione synthesis and accumulation in the *cad2-1/roGFP2* flowers may result in faster flower senescence.

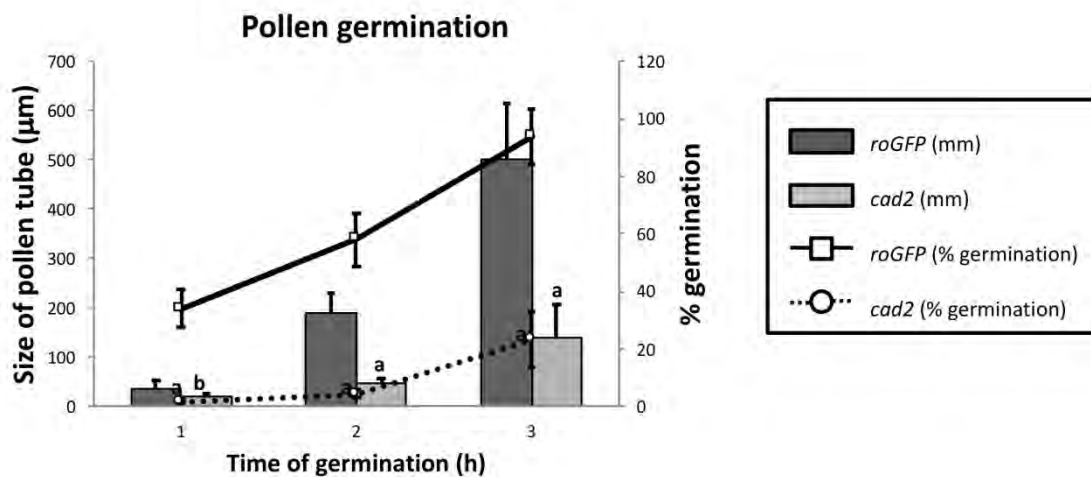


**Figure 83.** The oxidation degree of in the stigma, style, anther, ungerminated pollen grains (MP), germinated pollen grains (GP) and pollen tube (PT) in roGFP2 (black bars) and *cad2-1/roGFP2* (white bars) plants. Asterisks indicate statistical significance at 95 % ( $P \leq 0,05$ ) among the different tissues within the same line (roGFP or *cad2-1*). "a" means a statistical significance with a confidence interval of 95% ( $P \leq 0,05$ ), between different lines (roGFP and *cad2-1*).





**Figure 84.** The redox potential of in the stigma, style, anther, ungerminated pollen grains (MP), germinated pollen grains (GP) and pollen tube (PT) in roGFP2 (black bars) and *cad2-1/roGFP2* (white bars) plants. Asterisks indicate statistical significance at 95 % ( $P \leq 0,05$ ) among the different tissues within the same line (roGFP or *cad2-1*). "a" means a statistical significance with a confidence interval of 95% ( $P \leq 0,05$ ), between different lines (roGFP or *cad2-1*).



**Figure 85.** Differences in *in vitro* pollen germination between the roGFP2 and *cad2-1/roGFP2* phenotypes of freshly opened flowers: On the primary axis (on the left) is shown by bars the elongation of the pollen tube during *in vitro* pollen germination. The secondary axis (on the right and with lines) corresponds to the percentage of pollen germination measured at different times of germination. "a" and "b" mean a statistical significance with a confidence interval of 99 and 95%, respectively.

Taken together, the data presented here confirm that maintenance of a glutathione level is essential for pollen germination and tube growth (Zechmann et al., 2008). In addition, the data presented here show that the ability to regenerate GSH from GSSG is likely to be restricted in the *cad2-1/roGFP2* flowers, as well as synthesis of glutathione. While most of the organs of the *cad2-1/roGFP2* flowers have an increased oxidation degree compared to the ro-GFP controls, the redox potentials are not greatly changed. However, the redox potentials measured in the germinating the *cad2-1/roGFP2* pollen are supposedly little or not compatible with pollen viability. Further analysis of the redox potential of the pollen samples by roGFP2 imaging together with pollen viability assessment in a simultaneous way would help to elucidate this issue. For such simultaneous determination, the classical, widely-used fluorochromatic reaction of pollen with fluorescein diacetate (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970) could not be used straightforwardly as a pollen viability test, because of the spectral coincidence between fluorescein and roGFP2. Therefore, alternative methods should be used, as for example propidium iodide (Jiménez-Quesada et al., 2017). While ultrastructural changes were not been observed in the *cad2-1/roGFP2* pollen the altered redox state would be sufficient to cause an arrest of metabolism. Pollen grains are considered to have a robust antioxidant defence in order to germinate and penetrate through stigma (Creissen *et al.*, 1999, Zechmann 2008). The data presented here demonstrate that glutathione is an essential component of this antioxidant defence and perhaps also through pollen-stigma signaling through both free glutathione and glutathione/NO reservoirs such as GSNO (Corpas et al., 2013; Zafra et al., 2016).

In summary, the finding that the ungerminated pollen grains are significantly more oxidised than the germinated pollen shows that the cells become reduced during germination. The germination percentage was lower and pollen tube growth arrested earlier in the pollen that had both a lower level of glutathione and a lower GSH/GSSG ratio, demonstrating the importance of cellular redox control in pollen germination and tube growth, the failure to significantly increase the cellular reduction state during these processes leading to impaired pollen tube growth.

**Acknowledgements:** We thank the Scientific Instrumentation Service (Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada) for assistance in GC-MS analysis. We also thank Microscopy Service (Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada) for the help during confocal work. This work was supported by ERDF-co-funded projects BFU2016-77243-P, P2011-CVI7487, RTC2016-4824-2 and RTC2017-6654-2. Estefanía García-Quirós thanks the MINECO for FPI grant funding.

## References

Airaki M, Sánchez-Moreno L, Leterrier M, Barroso JB, Palma JM, Corpas FJ. (2011) Detection and quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant and Cell Physiology*, 52(11), 2006-2015.

Aller I, Rouhier N, Meyer AJ. (2013) Development of roGFP2-derived redox probes for measurement of the glutathione redox potential in the cytosol of severely glutathione-deficient *rml1* seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 4, 506.

Alvarez-Buylla ER, Benítez M, Corvera-Poiré A, Chaos Cador A, de Folter S, Gamboa de Buen A, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Jaimes-Miranda F, Pérez-Ruiz RV, Piñeyro-Nelson A, Sánchez-Corrales YE. (2010) Flower development. *The Arabidopsis Book*, 8, e0127.

Ayer A, Tan SX, Grant CM, Meyer AJ, Dawes IW, Perrone GG. (2010) The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(12), 1956-1968.

Ball L, Accotto G, Bechtold U *et al.* (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(9), 2448-2462.

Bashandy T, Guillemintot J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichheld JP. (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *The Plant Cell*, 22(2), 376-391.

Boavida LC, McCormick S. (2007) TECHNICAL ADVANCE: Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 52(3), 570-582.

Cairns NG, Pasternak M, Wachter A, Cobbett CS, Meyer AJ. (2006) Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiology*, 141, 446-455.

ConsidineMJ and FoyerCH(2014) Redox Regulation of Plant Development.*Antioxidants and Redox Signaling*.**21**: 1305-1326.

Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B. (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *The Plant Journal*, 16, 73-78.

Corpas FJ, Alché JD and Barroso J. (2013). Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, 4, 126.

Creissen G, Firmin J, Fryer M, Kular B, Leyland N, Reynolds H et al. (1999). Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *The Plant Cell*, 11(7), 1277-1291.

Cui H, Kong Y, Zhang H. (2012) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of signal transduction*, Article ID 646354.

de Simone A, Hubbard R, Viñegra de la Torre N, Velappan Y, Wilson M, Considine MJ, SoppeWJJ, & Foyer CH & (2017) Redox changes during the cell cycle in the embryonic root meristem of *Arabidopsis thaliana*". *Antioxidants and Redox Signaling*.**27**: 1505–1519.

Fan LM, Wang YF, Wang H, Wu W H. (2001) In vitro *Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts. *Journal of Experimental Botany*, 52(361), 1603-1614.

Fernandes AP, Holmgren A. (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(1), 63-74.

Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S. (2001) The functions of inter-and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in plant science*, 6 (10), 486-492.

Foyer CH, Noctor G. (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1056-1071.

Foyer CH, Noctor G. (2009) Redox regulation and photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4), 861-905.

Foyer CH, Noctor G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155, 2-18.

Galant A, Preuss ML, Cameron JC, Jez JM. (2011) Plant Glutathione Biosynthesis: Diversity in Biochemical Regulation and Reaction Products. *Front. Plant. Sci.*; 2:45.

García-Quirós E, Carmona R, Zafra D, Claros MG, Alché JD. (2017). Identification and *in silico* Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil. Springer. IWBBIO 2017, Part II, LNBI 10209, pp. 185–195, 2017.

Gigolashvili T and Kopriva S. (2014). Transporters in plant sulfur metabolism. *Front. Plant. Sci.* 5: 442.

Gromes, R., Hothorn, M., Lenherr, E.D., Rybin, V., Scheffzek, K. and Rausch, T. (2008) The redox switch of  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase via a reversible monomer–dimer transition is a mechanism unique to plants. *Plant J.* **54**, 1063-1075

Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP. (2008) Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nature methods*, 5(6), 553-559.

Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ. (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13044-13053.

Heslop-Harrison J and Heslop-Harrison Y. (1970) Evaluation of Pollen Viability by Enzymatically Induced Fluorescence; Intracellular Hydrolysis of Fluorescein Diacetate. *Stain Technology*, 45(3), 115-120.

Jiménez-Quesada MJ, Traverso JA and Alché JD.(2016). NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues. *Frontiers in Plant Science* 7, 359.

Jimenez-Quesada MJ, Carmona R, Lima-Cabello E, Traverso JA, Castro AJ, Claros MG and Alché JD. (2017). Generation of nitric oxide by olive (*Olea europaea* L.) pollen during in vitro germination and assessment of the S-nitroso- and nitro-proteomes by computational predictive methods. *Nitric Oxide*, 68, 23-37.

Kocsy G, Tari I, Vanková R, Zechmann B, Gulyás Z, Poór P, Galiba G. (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Science* 211, 77– 91

Li X. (2011) *Arabidopsis* Pollen Tube Germination. *Bio-protocol* Bio101: e73. DOI: 10.21769/BioProtoc.73.

Lopez-Mirabal HR, Winther JR. (2008) Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(4), 629-640.

Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa, JC. (2010) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2685-2700.

Marty L, Siala W, Schwarzländer M, Fricker M D, Wirtz M, Sweetlove L J *et al.* (2009) The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in *Arabidopsis*. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.* 106(22), 9109-9114.

Maughan S, Foyer CH. (2006) Engineering and genetic approaches to modulating the glutathione network in plants. *Physiologia Plantarum*, 126 (3), 382-397.

Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, Kiddle G, Brach T, Jarvis R *et al.* (2010). Plant homologs of the Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2331-2336.

Meister A, Anderson ME.(1983) Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.

Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R. (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *The Plant Journal*, 52(5), 973-986.

Meyer AJ, Brach T. (2009) Dynamic redox measurements with redox-sensitive GFP in plants by confocal laser scanning microscopy. *Plant Signal Transduction: Methods and Protocols*, 93-107.

Mittler R. (2017) ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. (2004) Reactive gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9, 490-498.

Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53, 1283-1304.

Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH (2011) Glutathione. The *Arabidopsis Book*. (Millar, H. Editor; American Society of Plant Biologists Rockville, MD) **9**, 1-32

Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 35, 454-484.

NoctorG, Mhamdi A, Queval G, FoyerCH (2014) Regulating the redox gatekeeper: vacuolar sequestration puts glutathione disulfide in its place. *Plant Physiology*.**163**, 665–671

Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH. (2016) Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, Cell & Environment*, 39, 1140-1160.

Ogawa K, Tasaka Y, Mino M, Tanaka Y, Iwabuchi M. (2001) Association of glutathione with flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell physiology*, 42, 524-530.

Pasternak M, Lim B, Wirtz M, Hell R, Cobbett CS, Meyer A. (2008) Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *The Plant Journal*, 53, 999-1012.

Queval G, Jaillard D, Zechmann B, Noctor G. (2011) Increased intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant, cell & environment*, 34, 21-32.

Queval G, Thominet T, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Gakiere B, Noctor G. (2009) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Molecular Plant*, 2, 344–356

Rosenwasser S, Rot I, Meyer AJ, Feldman L, Jiang K, Friedman H. (2010) A fluorometer-based method for monitoring oxidation of redox-sensitive GFP (roGFP) during development and extended dark stress. *Physiologia plantarum*, 138, 493-502.

Schafer FQ, Buettner GR. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 1191-1212.

Schnaubelt D, Dong Y, Queval G, Diaz-Vivancos P, Makgopa M E, Howell G, De Simone A, Bai J, Hannah M A & Foyer CH (2015) Low glutathione regulates gene expression and the redox potentials of the nucleus and cytosol in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment*. 38, 266-279.

Schnaubelt D, Schulz P, Hannah M A, Yocgo R E, Foyer CH (2013) A phenomics approach to the analysis of the influence of glutathione on leaf area and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Physiology*. 4, article 416.

Schippers J H M, Foyer C H, van Dongen J T (2016) Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Current Opinion in Plant Biology*. 29, 121-128.



Schwarzländer M, Fricker M, Müller C, Marty L, Brach T, Novak T. (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *Journal of microscopy*, 231, 299-316.

Schwarzländer M, Fricker MD, Sweetlove LJ. (2009) Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(5), 468-475.

de Simone A, Hubbard R, Viñegra de la Torre N, Velappan Y, Wilson M, Considine MJ *et al.* (2017). Redox changes during the cell cycle in the embryonic root meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants & Redox Signaling*.27, 1505–1519

Sugiyama A, Nishimura J, Mochizuki Y, Inagaki K, Sekiya J. (2004) Homoglutathione synthesis in transgenic tobacco plants expressing soybean homoglutathione synthetase. *Plant Biotechnology*, 21(1), 79-83.

Traverso JA, Pulido A, Rodríguez-García MI, Alché JD. (2013) Thiol-based redox regulation in sexual plant reproduction: new insights and perspectives. *Frontiers in Plant Science*.4, 465 62.

Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld JP *et al.* (2000) The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell*, 12(1), 97-109.

Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J., & Rausch, T. (2005). Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the *Brassicaceae*. *The Plant Journal*, 41(1), 15-30.

Yanagida M, Mino M, Iwabuchi M, Ogawa K. (2004) Reduced glutathione is a novel regulator of vernalization-induced bolting in the rosette plant *Eustoma grandiflorum*. *Plant and cell physiology*, 45(2), 129-137.

Zafra A, Rodríguez-García MI, Alché JD. (2010). Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biology*, 10(1), 36.

Zafra A, Rejón JD, Hiscock SJ, Alché Jde D. Patterns of ROS Accumulation in the Stigmas of Angiosperms and Visions into Their Multi-Functionality in Plant Reproduction. *Front Plant Sci.* 2016;7:1112. doi:10.3389/fpls.2016.01112

Zafra A, Castro AJ, Alché JD. (2018). Identification of novel superoxide dismutase isoenzymes in the olive (*Olea europaea* L.) pollen. *BMC Plant Biol*, 18(1):114. doi: 10.1186/s12870-018-1328-z.

Zechmann B, Mauch F, Sticher L, Muller M. (2008). Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 4017-4027.

Zechmann B, Müller M. (2010) Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma*, 246 (1-4), 15-24.

Zechmann B, Liou LC, Koffler BE, Horvat L, Tomasic A, Fulgosi H, Zhang Z. (2011a) Subcellular distribution of glutathione and its dynamic changes under oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 11(8), 631-642.

Zechmann B, Koffler BE, Russell S. (2011b) Glutathione synthesis is essential for pollen germination in vitro. *BMC plant biology*, 11 (1), 54.

Zechmann B. 2014. Compartment specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science - Plant Physiology*. 5: 566. doi: 10.3389/fpls.2014.00566.

# **DISCUSIÓN**



## 1. Los tejidos reproductivos del olivo contienen numerosos transcritos implicados en el metabolismo del GSH.

El desarrollo del polen y del pistilo viene condicionado por la expresión de diferentes genes. El conocimiento de la genética molecular que subyace a los procesos reproductivos ha experimentado un gran salto en los últimos años gracias al estudio de los transcriptomas reproductivos (incluidos los transcriptomas específicos de polen) de diferentes especies, recientemente disponibles (Carmona *et al.* 2015, Rutley y Twell 2015). Las limitaciones obvias de los tradicionales estudios gen por gen se han superado con los avances en la elaboración de perfiles transcriptómicos, que incluyen el análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y la tecnología de microarrays, lo que permite a los investigadores monitorear simultáneamente la expresión de miles de genes. De esta manera, ahora se puede acceder a datos de microarrays y/o RNA-seq para todas las fases y tipos de células de polen en desarrollo, de al menos 10 especies de angiospermas diferentes. Estos incipientes recursos han acelerado la investigación e indudablemente inspirarán nuevas directrices para el estudio de los mecanismos que rigen el desarrollo, la función y la evolución del polen en plantas con flores.

El transcriptoma del polen maduro se investigó por primera vez en tres estudios, que proporcionaron una visión general coherente de la expresión génica del polen, dos utilizando microarrays 8-K (Honys y Twell 2003, Becker *et al.* 2003) y la tercera mediante tecnología SAGE (Lee y Lee 2003). El transcriptoma de polen maduro mostró un perfil único y enriquecido en transcritos involucrados en la señalización, el metabolismo de la pared celular y el citoesqueleto, pero con poca representación para el metabolismo energético, el transporte, la transcripción y la traducción. Tras estos estudios previos se han generado transcriptomas casi completos para diferentes fases del desarrollo del polen, incluidas la célula germinal y la fase progámica, en especies como *A. thaliana*, *O. sativa*, *N. tabacum* y *L. longiflorum* (Scott *et al.* 2004, Okada *et al.* 2006, Hobo *et al.* 2008, Wei *et al.* 2010, Xin *et al.* 2011, Hafidh *et al.* 2012a, 2012b, Loraine *et al.* 2013, Bokvajet *et al.* 2015, Rutley y Twell 2015).

El reciente transcriptoma reproductivo de olivo generado en este grupo de investigación (Carmona *et al.* 2015) y utilizado en esta tesis doctoral, es aún incipiente y se espera obtener el transcriptoma completo de las distintas fases de desarrollo de los diferentes tejidos reproductivos del olivo con una mayor profundidad, gracias a la utilización de tecnologías de secuenciación de mayor rendimiento (i.e. Illumina). El transcriptoma de tejidos reproductivos de olivo engloba pistilo, polen y semilla; y difiere de su contraparte somática debido a la gran cantidad de transcripciones específicas que se producen durante el evento fisiológico que involucra la reproducción en las plantas (Carmona *et al.* 2015, García-Quirós *et al.* 2017, Lima-Cabello *et al.* 2019). Esto puede explicarse por el requisito de señalización que debe tener lugar durante la germinación del tubo polínico, la interacción polen-pistilo...etc., lo que desencadena un aumento en la transcripción durante estos procesos. De este modo, el uso de transcriptomas puede ser una forma útil de explorar los mecanismos moleculares que subyacen a las

diferentes fases del desarrollo de micro y macrosporocitos en angiospermas (Rutley y Twell 2015), así como dilucidar las redes enzimáticas de señalización involucradas en la germinación del tubo polínico y la interacción polen-pistilo en el momento de la fertilización (Dukowic-Schulze y Chen 2014). En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo un cribado bioinformático de secuencias de exoma de polen y pistilo maduros de olivo, mediante la integración de datos del transcriptoma reproductivo de olivo y el genoma de olivo (Cruz *et al.* 2016).

La transcriptómica de tejidos reproductivos se puede aplicar ampliamente para desarrollar herramientas importantes para el sector biotecnológico (Oo *et al.* 2014) y para abordar cuestiones agrónomicamente importantes como la tolerancia al estrés ambiental vinculado al cambio climático global (Bokszczanin 2013; Giorno *et al.* 2013; Loraine *et al.* 2015).

Las recientes metodologías ‘ómicas’ nos han permitido avanzar enormemente en la caracterización de genomas y transcriptomas, sin embargo, la importancia y el papel de las diferentes isoformas enzimáticas debe ser aún definido, con el fin de proveer una visión clara de su contribución en los procesos reproductivos, y por ello es esencial una posterior validación experimental de los resultados obtenidos, así como profundizar en el significado fisiológico de los cambios identificados en el transcriptoma.

### **1.1. Transcritos del polen y del pistilo relacionados con la síntesis de GSH en el olivo.**

Basándose en el análisis de secuencias de múltiples especies, se han identificado 3 familias de  $\gamma$ -ECS principales (May y Leaver 1994), el grupo de plantas y  $\gamma$ -protobacterias, el grupo de las  $\alpha$ -protobacterias y el grupo de los eucariotas no vegetales (mamíferos, levaduras y tripanosomas). A pesar de compartir un supuesto antecesor común lejano, motivos estructurales comunes y un mecanismo de acción catalítico muy similar, la homología de las secuencias es insignificante en estos tres grupos (Copley y Dhillon 2002). De este modo, la secuencia primaria de la  $\gamma$ -ECS no está conservada en los diferentes grupos de organismos, sugiriendo una adquisición de esta actividad en distintos momentos durante la evolución (Copley y Dhillon 2002, Sabetta *et al.* 2017). Sin embargo, nuestros resultados bioinformáticos sugieren una alta homología de secuencia dentro del grupo de las plantas, ya que no se encuentran diferencias significativas de secuencia incluso entre isoformas, lo cual nos da información de cuán conservada está esta enzima a lo largo de la evolución de los vegetales. Esto puede deberse seguramente al papel primordial que juega la enzima en la síntesis de GSH en el desarrollo de tejidos reproductivos así como en la fisiología reproductiva de los vegetales. Las  $\gamma$ -ECSs vegetales son, estructural y funcionalmente (ya que son diméricas), más parecidas a las  $\gamma$ -ECSs de levaduras que a las  $\gamma$ -ECSs heterodiméricas encontradas en varios eucariotas o a la  $\gamma$ -ECS monomérica de *Escherichia coli* (Biterova y Barycki 2009).

En las  $\gamma$ -ECSs de olivo, como en el resto de vegetales, se observan 2 iones magnesio en el sitio activo, lo que incrementa la reactividad del grupo  $\gamma$ -fosfato del ATP y favorece la correcta orientación del glutamato  $\gamma$ -carboxilato, estabilizando así el intermediario  $\gamma$ -glutamil-fosfato resultante. El sitio de unión a la cisteína, adyacente al sitio de unión al glutamato, sufre un cambio conformacional significativo al unirse al ligando, volviéndose reactivo para el ataque de la cisteína. Una arginina cercana, en una posición altamente conservada, proporciona el estado de transición de esta reacción y la formación final del enlace peptídico (Biterova y Barycki 2009, Sabetta et al. 2017). Se ha identificado un gen de  $\gamma$ -ECS en tejidos reproductivos de olivo. La secuencia obtenida por clonación de la  $\gamma$ -ECS de polen de olivo, comparte una alta homología con  $\gamma$ -ECS de tipo 2 de otras especies vegetales, y se localiza en el cloroplasto.

La secuencia primaria de la GS también difiere entre eucariotas y procariotas (Copley y Dhillon 2002, Sabetta et al. 2017). Un análisis filogenético de los miembros de la familia de las GS de varias especies permitió inferir la distancia genética y, por lo tanto, colocar a las GSs vegetales cerca de las GSs de levadura, compartiendo una homología de sus secuencias del 40% (Sabetta et al. 2017). En contraste con las GSs de bacterias que son homo-tetrámeros, las GSs de mamíferos, plantas y levaduras han sido identificadas como homodímeros, compuestas por dos subunidades idénticas unidas por puentes disulfuro (Sabetta et al. 2017).

Se ha identificado un gen de GS en tejidos reproductivos de olivo, cuya localización se ha predicho en el cloroplasto, en contraposición a lo observado en otras predicciones *in silico* realizadas *Arabidopsis thaliana*, en donde se ha visto que esta enzima se localiza en el citosol (Wachter et al. 2005), ya que es el lugar donde se da a cabo el segundo paso de la biosíntesis del GSH. La proteína GS heteróloga, obtenida por la clonación de una GS de polen de olivo, comparte una alta similitud de secuencia con GS de tipo 2 de otras especies, y está caracterizada por la presencia de un dominio rico en glicina, altamente conservado en la evolución vegetal (tal y como nuestros resultados sugieren), cercano a extremo carboxi-terminal, típico de las GSs eucarióticas (Galant et al. 2009, Sabetta et al. 2017). Una caracterización profunda de la estructura de la GS de *A. thaliana* reveló la presencia de 3 regiones específicas en el sitio activo, involucradas en los enlaces a ATP, magnesio y ambos,  $\gamma$ -EC y GSH (Herrera et al. 2007). Experimentos de mutagénesis dirigida han permitido identificar el papel de 15 aminoácidos específicos en el sitio activo de las GS, mostrando la sensibilidad de las GSs vegetales incluso a cambios menores de aminoácidos en el sitio activo y sugiriendo que la unión del ATP y el  $\gamma$ -EC pueden mejorarse recíprocamente (Herrera et al. 2007). El sitio activo de la GS en los tejidos reproductivos de olivo, al igual que en el resto de plantas, está compuesto estructuralmente por un dominio, que consiste en un bucle rico en glicina, que es crítico para la unión al ATP y es responsable de los principales cambios conformacionales, mientras que el bucle rico en alanina puede interactuar con la glicina (Galant et al. 2009).

Al igual que ocurre en Brassicáceas (Wachter et al. 2005), la  $\gamma$ -ECS de polen de olivo está codificada por un gen nuclear (*GSH1*) y es transportada a los plastidios. La GS de polen de olivo también está codificada por un gen nuclear (*GSH2*) y puede encontrarse tanto en plastidios como en el citosol.

La  $\gamma$ -ECS es esencial en la regulación de la síntesis de GSH. Existen evidencias de que la primera etapa de la síntesis de GSH, regulada por esta enzima, es esencial y limitante para obtener la concentración necesaria de GSH en la célula (Lu 2009). Los tejidos reproductivos no distan en este aspecto de los tejidos vegetativos, ya que diferentes trabajos con mutantes deficientes en  $\gamma$ -ECS reflejan anomalías sufridas en las funciones reproductoras (García-Quirós et al. 2019).

Aunque generalmente se cree que la GS no es importante en la regulación de la síntesis de GSH, con los años se han acumulado evidencias de que la GS es esencial para determinar la capacidad sintética global de GSH en ciertos tejidos y / o en condiciones estresantes (Lu 2009). Es posible que los tejidos reproductivos, por ser un tipo de tejidos especiales, con metabolismo distinto a los tejidos vegetativos, estén dentro de estas categorías.

## **1.2. GR en el transcriptoma del polen y del pistilo de olivo.**

Se ha podido detectar la existencia de al menos dos genes GR en los tejidos reproductivos del olivo, homólogos a otros genes GR descritos anteriormente en especies de plantas como *A. thaliana* o *T. cacao*. Mediante el uso de experimentos de PCR y RACE se ha confirmado la expresión de estos genes en el polen del olivo y se ha podido obtener la secuencia completa de los genes GR1 y GR2. La limpieza y el filtrado de todos los outputs del transcriptoma, que se identificaban con las once secuencias de GR seleccionadas, resultó altamente complicado debido a la alta homología entre los genes GR1 y GR2. El análisis filogenético realizado no agrupaba a GR1 y GR2 dentro de un grupo específico, por lo que no podemos sugerir características distintivas para estos homólogos de GR en los tejidos reproductivos. Sin embargo, al predecir la ubicación celular de estos genes, identificamos que la mayoría de los GR2 se expresan en el cloroplasto, confirmando así estudios previos que sugirieron que esta es la isoforma realmente involucrada en el adecuado desarrollo del polen (Marty et al. 2009).

El reciclado de GSH mediante la GR es esencial para el crecimiento adecuado del ápice del tubo polínico (Marty et al. 2009, Zechmann et al. 2008, 2011a) controlando de este modo tanto la velocidad como la reorientación durante la elongación del tubo polínico. Debido a la alta tasa metabólica que se experimenta en el polen de olivo, se generan grandes cantidades de ROS (lo que se puede detectar mediante microscopía confocal, según Zafra et al. 2010), por lo que se requerirán altas concentraciones de glutatión reducido en estos tejidos. Aún deben aclararse muchos aspectos, como la importancia



del GSH en la señalización polen-estigma, y la acción de éste y la actividad GR durante la hidratación del polen, entre otros.

### 1.3. Transcritos del polen y del pistilo relacionados con la desintoxicación dependiente de GSH en el olivo.

Las GPXs de las plantas parecen estar relacionadas a las peroxirredoxinas, ya que sus secuencias primarias son similares a las de glutarredoxinas animales (Passaia and Margis-Pinheiro 2015). Se han identificado 6 genes específicos de tejidos reproductivos que codifican GPXs en olivo, de los cuales 5 de ellos son homólogos a GPX de tipo 8 y el último es homólogo a una GPX de tipo 2. Este descubrimiento corrobora los datos obtenidos de estudios recientes que demuestran que de hecho, la isoforma involucrada en el desarrollo del polen, la anthesis y la polinización es GPX8. Se ha propuesto a esta isoforma como reguladora del crecimiento del tubo polínico y la formación de paredes, y parece jugar un papel importante en la interacción entre el polen y el pistilo (Zaidi et al. 2012). Diferentes estudios revelan, además, que la GPX8 está implicada en la supresión de los daños oxidativos en el núcleo y el citosol (Gaber *et al.* 2012, Fu 2014, Ganguli y Abhijit 2015). Por otro lado la, GPX2, junto con la mayoría de las GPX, se han identificado en el polen maduro de *Arabidopsis*, sin embargo, su expresión no es específica de polen (Holmes-Davis et al., 2005). Se ha demostrado que las GPXs se expresan en la germinación del polen de *Arabidopsis* y triticale, y se han clasificado como genes de defensa/respuesta al estrés (Zou et al. 2009, Zaidi et al. 2012). Estos datos sugieren que las GPXs de tejidos reproductivos de olivo protegen frente al estrés oxidativo, el estrés salino y el daño a membranas celulares, sugiriendo que ambas OeGPXs previenen contra la peroxidación lipídica y otros procesos oxidativos en diferentes compartimentos subcelulares.

Por otro lado, en trabajos anteriores se identificaron 6 genes que codificaban para GPX en el genoma de *L. japonicus*. Las diferentes isoformas LjGpx se localizan en el citoplasma, los plastidios y las mitocondrias de las células vegetales (Ramos et al. 2009), aunque en algunas estructuras especiales se expresan también en núcleos y en el retículo endoplasmático (Matamoros et al. 2015). En este trabajo se predijo que el gen GPX8 obtenido mediante clonación a partir de polen de olivo, se localiza en cloroplastos y mitocondrias, como ocurre con la ATGPX8 de *Arabidopsis thaliana* (Gaber *et al.* 2012, Gaber 2013, Attacha *et al.* 2017) y las GPXs de otras especies vegetales.

Por último, se han encontrado 16 genes GST en el transcriptoma reproductivo de olivo, de entre las cuales la GSTparC y la GSTF9 parecen ser las más prevalentes, en contraposición al genoma reproductivo de soja donde se han encontrado al menos 14 isoformas de GST donde la isoforma GST9 parece ser la más prevalente (Dalton *et al.* 2009, Boncompagni *et al.* 2017). Estas GSTs muestran una amplia gama de propiedades cinéticas, sugiriendo que la actividad GST podría tener relación con la flexibilidad

fisiológica frente a numerosos tipos de estrés. Además, los niveles de GST se incrementan con la edad, lo que sugiere un papel relacionado con la senescencia.

El gen GST, obtenido mediante clonación a partir de polen de olivo, se ha localizado en el citoplasma, como ocurre con la ATGST11 de polen *Arabidopsis thaliana* y otras GSTs de tejidos reproductivos de otras especies de plantas. Las enzimas con actividad GST en general, tienen un importante papel en el desarrollo del polen y la fertilidad (Bibi *et al.* 2014).

## **2. Implicación del glutatión en el desarrollo del microsporocito y durante la germinación del polen.**

La aparición de condiciones aeróbicas les otorgó a los organismos la oportunidad de usar oxígeno como un receptor de electrones y, al mismo tiempo, les permitió aprovechar sus propiedades reactivas para el metabolismo y la señalización (Schippers *et al.* 2012, Foyer and Noctor 2015). Por lo tanto, se esperaría que las plantas, que han evolucionado en un ambiente oxigenado, requieran la integración del metabolismo redox celular, la sensibilidad y la señalización mediante ROS en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas. De hecho, tanto en biología animal como vegetal, ya existen referencias con respecto a la relación de la hipoxia en el mantenimiento de las células madre, la generación dirigida mediante ROS, y la regulación y señalización redox durante el ciclo y la proliferación celular (Díaz-Vivancos *et al.* 2010a, 2015, Suzuki *et al.* 2011, García-Giménez *et al.* 2013, Schmidt y Schippers 2015). Un considerable número de investigadores ya ha demostrado que tanto la señalización ROS como el estado redox tienen la particularidad de realizar funciones cruciales en el desarrollo de brotes (Kocsy *et al.*, 2013, Considine y Foyer 2014, Schmidt y Schippers 2015, Rouhier *et al.* 2015, Schippers *et al.*, 2016). Sin embargo, todavía estamos comenzando la carrera en el descubrimiento de las vías de señalización redox involucradas en la regulación del desarrollo y la reproducción de las plantas. Aunque existe una gran cantidad de evidencias de que la homeostasis redox celular está involucrada en el desarrollo de la planta y que tanto las ROS como el glutatión juegan un papel clave en la regulación del desarrollo de ramas, raíces y brotes florales, así como en el crecimiento de el tubo de polen (Zechmann *et al.*, 2011a, Considine y Foyer 2014, Schmidt y Schippers 2015, Schippers *et al.*, 2016, García-Quirós *et al.*, 2019). Sin embargo, las funciones precisas de cada componente durante el crecimiento y el desarrollo siguen siendo un área desconocida e inexplorada en el campo de la biología vegetal.

Por otro lado, estudios recientes mostraron un aumento gradual en el contenido total de glutatión (GSH + GSSG), tanto en los cotiledones como en las plántulas, a lo largo de su desarrollo (Kaur y Bhatla, 2016). Además, el GSH parece tener un papel primordial en el desarrollo floral y durante la germinación del tubo polínico (García-Quirós *et al.*, 2019).

En este trabajo, el objetivo es arrojar luz sobre las funciones de GSH a lo largo del desarrollo del polen (microsporogénesis), así como durante el crecimiento del tubo de polen.

### 2.1. El glutatión durante el desarrollo del polen de olivo.

De forma similar a lo que sucede con el ciclo celular en otros tejidos vegetales, se espera que la microsporogénesis esté relacionada con el metabolismo redox. Ciertos datos bioinformáticos (Zechmann *et al.*, 2011a) cuestionan la importancia del metabolismo del glutatión en el desarrollo y la supervivencia del gametofito masculino, ya que tanto  $\gamma$ -ECS como GS se transcriben a niveles insignificantes en el polen y los núcleos espermáticos. Sin embargo, debido a la aparente sensibilidad de las microsporas al daño mitocondrial inducido por el estrés oxidativo crónico (Wan 2007), decidimos investigar la necesidad y la ubicación del glutatión en el gametofito masculino del olivo para revelar las estrategias del polen para hacer frente a las ROS producidas tanto durante su desarrollo como durante la germinación y la elongación del tubo polínico.

Del análisis LC-MS de la concentración de GSH y GSSG, y del balance entre ambas especies se observa que, durante la etapa de polen maduro, la concentración de GSH sufre un aumento bastante diferenciado. Además, las formas oxidada y reducida de glutatión se encuentran en equilibrio en el polen maduro. El significado de este resultado, puede darnos una idea de que, se produce una alta acumulación (y quizá síntesis) de glutatión en esta etapa, debido a que el polen maduro está preparando toda su maquinaria metabólica para la germinación del tubo polínico. Durante la germinación del polen, las tasas metabólicas son muy altas y se generan grandes concentraciones de ROS, para lo que se requieren unas cantidades de glutatión elevadas que luchen contra el posible daño oxidativo que se pueda ocasionar en estas delicadas etapas del proceso de fertilización. El hecho de que las concentraciones de GSH dentro de la célula sean más altas en las últimas etapas del desarrollo podría apoyar la teoría de que este metabolito desempeña un papel clave durante la señalización del polen-pistilo y durante la germinación del tubo polínico.

Los resultados de la inmunolocalización de GSH en las anteras en desarrollo revelan que este metabolito tiene una gran relevancia durante el desarrollo del polen del olivo, especialmente en las etapas donde se produce la división celular, como la etapa de la meiosis. En la célula madre del polen puede observarse una mayor intensidad de señal, así como una amplísima distribución de GSH, con respecto a los estadios más avanzados del desarrollo del polen. En cuanto a la distribución subcelular, nuestros datos revelan lo que ya se había descrito anteriormente en trabajos similares en tejidos somáticos de otras especies vegetales (Zechmann *et al.* 2008, Zechmann and Muller 2010, Queval *et al.* 2011). Esta localización incluye el citosol, orgánulos como mitocondrias y plastidios, y especialmente los núcleos donde se observa una remarcable concentración de GSH. Esta localización sugiere un papel clave del GSH en el metabolismo del polen, así como en su fisiología, tal como ya ha sido descrito para tejidos somáticos. Además, la presencia de GSH en la célula madre del polen, cuando se

lleva a cabo la meiosis, así como el hecho de que el GSH se localice principalmente en el núcleo (tanto de los microsporocitos como de las células del tapétum) sugiere un papel para el GSH en el control del ciclo celular, lo que puede deberse a la disminución en los niveles de auxina (Bashandy *et al.*, 2010, Díaz-Vivancos *et al.* 2010a, 2010b, García-Giménez *et al.* 2013). Estos resultados son consistentes con los hallazgos en estudios previos en los que se observa una importación elevada de GSH al núcleo durante la fase G1 del ciclo celular (Burhans y Heintz 2009, Díaz-Vivancos *et al.*, 2010b, Schippers *et al.* 2016), por lo que podemos aventurar que el GSH condiciona el ciclo celular mediante la regulación redox de varios factores de transcripción. Los factores de transcripción, NF-YC (subunidad gamma del factor de transcripción nuclear Y) y TCP (TEOSINTE BRANCHED1 / CYCLOIDEA / PROLIFERATING CELL FACTOR1), se inactivan a través de la oxidación de las cisteínas, por lo que el GSH podría reducir estas proteínas y restablecer su actividad, modulando así directamente el ciclo celular. Del mismo modo, TCP es un inhibidor de la síntesis de jasmonato (JA), que a su vez parece inducir potencialmente GSH (Li *et al.*, 2017), de modo que la actividad del factor de transcripción TCP podría causar el agotamiento celular de GSH, restaurando el estado oxidativo celular, que a su vez desactiva la expresión de TCP.

Hay estudios sobre enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo redox celular que han revelado un papel claro en el mantenimiento y el tamaño del meristemo apical en las raíces de las plantas. Estos estudios sugieren que la reducción de GSH es necesaria para el desarrollo de raíces, brotes y flores (Reichheld *et al.*, 2007, Bashandy *et al.*, 2010, Schippers *et al.*, 2016). Después de estas observaciones, es probable que la proliferación celular y el desarrollo de microsporocitos estén regulados por ROS a través de la unión de proteínas y enzimas reguladas por GSH que influyen en la progresión del ciclo celular y/o la maduración del microsporocito, como en los meristemas apicales (Burhans y Heintz 2009, Zechmann *et al.*, 2011b). El trabajo actual sobre el desarrollo reproductivo ha revelado un vínculo claro entre los procesos redox y el desarrollo del polen. Recientemente, otros investigadores han demostrado que mantener una condición reducida es esencial para la formación de células germinales (Kelliher y Walbot 2012), condición que se establece en parte a través del entorno hipóxico presente en otros tejidos. Nuestros resultados complementan estas investigaciones, ya que se puede observar una gran cantidad de GSH durante todo el desarrollo del microsporocito, especialmente en la etapa de polen maduro antes de la germinación del tubo de polen. Estas observaciones sugieren que el GSH es necesario para la formación de polen (Marty *et al.*, 2009, Zechmann *et al.*, 2011a). Pero no solo eso, también es esencial que el GSH se encuentre en su estado reducido, como puede derivarse de los datos de expresión de la enzima GR. Todo esto nos lleva a proponer que el GSH es esencial en el desarrollo del microsporocito, y que su participación es esencial en momentos tan cruciales como el comienzo del desarrollo del polen y justo antes de la germinación del mismo, manteniendo así su fertilidad (García-Quirós *et al.* 2019).

Desde hace relativamente poco tiempo, la floración y todos los eventos fisiológicos asociados a ella relacionados con la homeostasis redox, han atraído cada vez más atención. Los cambios redox pueden controlar varios procesos de desarrollo y crecimiento en las plantas, incluida la inducción floral y el desarrollo de órganos florales (Meyer y Hell 2005, Considine y Foyer 2014, Dietz 2014, García-Quirós *et al.* 2019). Se ha descubierto en estudios con mutantes de *Arabidopsis* que sobreexpresan los niveles de GSH y, por lo tanto, en los que la proporción redox de GSH es mayor, que una alta concentración de GSH retrasa la floración (Ogawa *et al.*, 2001, Ogawa 2005, Hatano-Iwasaki y Ogawa 2012). Lo mismo sucedió en los estudios en los que se agregó GSH artificialmente (Chin *et al.*, 2016). Se encontraron resultados similares en otras especies de plantas como *Eustoma grandiflorum*, trigo u orquídea (Yanagida *et al.*, 2004, Gulyás *et al.*, 2014, Chin *et al.*, 2016), lo que sugiere que el metabolismo del GSH está involucrado en la floración regulada por FLC (FLOWERING LOCUS C), de modo que un alto contenido de GSH retrasa la floración, mientras sostiene con bastante fuerza que el GSSG es un regulador clave al comienzo de la floración. En estudios en los que se aplicó GSSG a las plantas, éste ha sido considerado el factor clave en la regulación de la floración (Kocsy *et al.*, 2013, Chin *et al.*, 2016).

Nuestros datos demuestran la coordinación del GSH y su estado redox para regular la microsporogénesis en el olivo. Ahora surge la pregunta de cómo las fluctuaciones ambientales y fisiológicas pueden ajustar los niveles endógenos de GSH y su estado redox, determinado por la biosíntesis y el reciclaje de la forma oxidada de GSH, para desencadenar la inducción de la floración. Sería posible pensar que, para que tenga lugar la floración, se requiere un ambiente oxidado, y una vez que esto comience, las redes metabólicas de síntesis y reciclaje de GSH necesarias para el correcto desarrollo y viabilidad del polen comenzarán a activarse.

La localización de GSH en mutantes *cad2-1* sugiere un papel clave del GSH en el metabolismo y la fisiología del polen, como ya se ha determinado en los tejidos somáticos (García-Quirós *et al.* 2019). La presencia diferencial de GSH en el gametofito ubicándolo particularmente en los núcleos reafirma la idea de que el GSH participa en el control del ciclo celular.

## **2.2. Papel del GSH en la germinación y el crecimiento del tubo polínico del olivo.**

La germinación del polen y el crecimiento del tubo de polen son eventos clave en la reproducción sexual de las plantas. La interacción polen-pistilo es un proceso complejo que ha sido ampliamente estudiado en plantas con flores (Cheung *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2003; Palanivelu *et al.*, 2003).

A partir de estudios previos sobre el polen de kiwi (Speranza *et al.*, 2012), se puede afirmar que las ROS se producen como resultado de la rehidratación del polen y durante la fase de retraso que precede a la aparición del tubo polínico. Además, la producción de

ROS continuó durante las fases de emergencia y alargamiento del tubo de polen. Todo esto indica que las ROS está involucradas en la germinación del polen y está de acuerdo con los resultados que le dan a las ROS un papel en el crecimiento de los meristemas apicales (Potocky *et al.*, 2007, Speranza *et al.*, 2012). Es lógico pensar que en etapas como la rehidratación y la emergencia del tubo de polen (en el que el grano de polen reinicia su actividad metabólica, lo que se verifica por el aumento en el número de mitocondrias) y durante el alargamiento del tubo de polen (donde la tasa de el crecimiento es tan rápido que requiere un alto gasto de energía y, por lo tanto, un metabolismo intenso), la producción de ROS es masiva. Dadas estas deducciones, podemos plantear la hipótesis de que, siendo el GSH uno de los sistemas antioxidantes más importantes de la célula, en situaciones como las descritas anteriormente en las que hay una gran producción de especies ROS, el GSH también sería importante para mantener la homeostasis redox en los límites no peligrosos para la célula y como moléculas de señalización.

Los datos de LC-MS reflejan un decremento en las concentraciones de glutatión reducido frente al oxidado a lo largo del desarrollo del polen, debido seguramente a la alta producción de ROS que tienen lugar durante este proceso. Al llegar al estadio de polen maduro la concentración de glutatión sufre un incremento excepcional, donde las formas reducida y oxidada se encuentran en equilibrio, posiblemente a un aumento en la síntesis de glutatión, para poder hacer frente a los requerimientos energéticos que conlleva la germinación. Además, los resultados de inmunolocalización celular y subcelular de GSH, revelan que durante la germinación, en el tubo polínico vuelve a intensificarse la señal de fluorescencia, indicando una alta concentración de GSH en el tubo polínico durante este evento fisiológico. Es evidente también la intensa concentración de GSH en la región de apertura del grano de polen en las fases iniciales del desarrollo del tubo polínico, lo que proporciona evidencias de que, como ya se había afirmado en estudios similares durante la germinación del polen en otras especies (Zechmann *et al.* 2011a, 2011b, García-Quirós *et al.* 2019), el GSH es claramente esencial para el desarrollo y la orientación del tubo polínico.

Los resultados de nuestro estudio confirman esta teoría, ya que este metabolito está claramente presente y activo en el gametofito masculino (durante todo su desarrollo) así como en las aperturas y en el interior del tubo polínico. En estudios previos con mutantes *pad2-1* y *cad2-1* de *Arabidopsis thaliana* (Zechmann *et al.*, 2011a, García-Quirós *et al.* 2019), deficientes en glutatión debido a una mutación puntual en el gen GSH1 ( $\gamma$ -ECS), se observa una reducción de la germinación del polen correlacionada con una reducción en el contenido de GSH. La adición de inhibidores, como 1-cloro-2,4-dinitrobenceno o BSO, también indujo fuertes reducciones en el contenido de GSH, lo que se asoció con una reducción significativa en la capacidad de germinación del polen, incluso produciendo muerte celular severa (González-Párraga *et al.* 2005, Zechmann *et al.* 2011a). La adición de GSH en estos casos resultó en la restauración de la tasa de germinación del polen. Esto demuestra que la disponibilidad de GSH es esencial para que tenga lugar la germinación del tubo polínico, pero de manera

controlada y bien regulada, ya que las cantidades excesivas de GSH también pueden provocar aberraciones, que afectan negativamente la capacidad germinativa del polen (Zellnig *et al.* 2000, Zechmann *et al.* 2006, 2011). Además, estos estudios también demostraron que los bajos niveles de glutatión en los mutantes disminuyeron su capacidad de germinar, probablemente debido a alteraciones durante el desarrollo del polen (Zechmann *et al.* 2011, García-Quirós *et al.* 2019).

Por otro lado, no se observaron diferencias compartimentales en la localización de GSH durante la germinación del tubo polínico, como ocurre en los tejidos vegetativos. El GSH se distribuye ampliamente en todo el citoplasma del microsporocito de olivo como ya se observó en estudios anteriores (Zechmann *et al.* 2008, 2010) en el polen de otras especies, así como durante la germinación. El papel del GSH durante el crecimiento del tubo polínico aún no se ha establecido bien, y mucho menos su participación en la etapa de germinación temprana. La localización de GSH en las aperturas germinativas sugiere un papel importante del GSH en la activación del grano de polen (hidratación) y en la emergencia del tubo polínico. Por otro lado, el glutatión es crucial para la proliferación celular. Se observó que los núcleos mostraron la mayor intensidad de señal sobre todo en los estadios de desarrollo tempranos, lo que podría revelar una modulación de este metabolito en la expresión de genes que regulan el ciclo celular (Díaz-Vivancos *et al.* 2010a, b, Koffler *et al.* 2013, Locato *et al.* 2015, Schnaubelt *et al.* 2015). Mantener un alto nivel de GSH en los núcleos es importante para proteger al ADN y a las proteínas nucleares del daño oxidativo; pero también indica un papel en la regulación de la expresión génica en momentos en los que las concentraciones de ROS son elevadas, como durante el ataque por patógenos (Sabetta *et al.* 2017), así que postulamos un papel regulador similar durante los procesos reproductivos.

Los datos de LC-MS verificaron lo que se observó en la inmunolocalización, ya que se puede observar un pico de GSH en la etapa de polen maduro (antes de la germinación del tubo de polen) y durante la germinación, especialmente al principio, durante la aparición del polen tubo.

Además, el hecho de que las enzimas que regulan el metabolismo del GSH se expresen en las etapas de polen germinado, también sugiere el papel de este sistema antioxidante en el crecimiento y la reorientación del tubo polínico.

### **2.3. Papel del estado redox dependiente de glutatión en la reproducción.**

El estado redox celular es un regulador crucial del metabolismo, la señalización y la fisiología. Si bien hay muy pocas herramientas disponibles para medir el estado redox de las células vivas, las sondas roGFP han demostrado ser confiables y ampliamente aplicables (Meyer *et al.*, 2007; Schwarzländer *et al.*, 2008, 2009; Aller *et al.*, 2013), especialmente cuando incorporan una glutaredoxina (Fernandes *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2007; Gutscher *et al.*, 2008). Por lo tanto, los datos obtenidos de las sondas roGFP

proporcionan información confiable sobre el estado de abundancia y oxidación del glutatión *in situ* e *in vivo*. Además, las sondas roGFP se han expresado en una amplia variedad de células y organismos, donde pueden dirigirse a orgánulos específicos (Hanson *et al.*, 2004; Birk *et al.*, 2013). La eficacia de las sondas roGFP2 para medir el estado redox del glutatión se ha demostrado previamente en estudios en otras especies, como *Drosophila* (Liu *et al.*, 2012; Aller *et al.*, 2013). Los datos presentados en esta tesis doctoral muestran que todos los tejidos de las flores *cad2-1/roGFP2* tenían una relación GSH/GSSG más baja y un mayor grado de oxidación que las flores de genotipo silvestre roGFP2. Estos hallazgos contrastan con los datos obtenidos en hojas, donde el nivel de glutatión total disminuyó en las hojas de los mutantes *cad2-1*, pero las relaciones GSH/GSSG fueron similares a las del WT (Schnaubelt *et al.*, 2015). Tomados en conjunto, estos hallazgos sugieren que las flores de los mutantes *cad2-1* tienen una menor capacidad para mantener reducido el glutatión celular y mantener la relación GSH/GSSG en valores apropiados. Es probable que estas observaciones reflejen en los mutantes un contenido desequilibrado de las enzimas de la biosíntesis y el reciclado de GSH en comparación con el equilibrio mostrado por las plantas WT.

Como ya se ha comentado anteriormente, se ha demostrado una fuerte asociación entre el grado de acumulación de glutatión y el tiempo de floración (Ogawa *et al.*, 2001; Yanagida *et al.* 2004). En nuestros estudios, la floración se aceleró en los mutantes *cad2-1/roGFP2* en comparación con el WT (Kocsy *et al.*, 2013) (resultados no mostrados). Además, se requiere glutatión para el inicio del meristemo floral (Bashandy *et al.*, 2010, Kocsy *et al.*, 2013, García-Quirós *et al.* 2019) y también para la germinación del tubo polínico (Zechmann *et al.*, 2011b, García-Quirós *et al.* 2019). Los datos que presentamos se basan en esta base firme y revelan la presencia de un grado de oxidación bajo en todas las partes de las flores y tejidos reproductivos (estigma, estilo, anteras, granos de polen germinados y tubos de polen), excepto el polen no germinado. El polen no germinado existe en un estado altamente oxidado, con respecto a los tejidos vegetativos, lo que es similar al encontrado en otras células inactivas (Schippers *et al.*, 2016). A diferencia del polen no germinado, los granos de polen y los tubos de polen germinados tienen un grado de oxidación similar al de las otras partes de la flor. Estos hallazgos sugieren que el glutatión en el polen aumenta o se reduce (o ambos) una vez que se desencadena el activo metabolismo propio de la germinación. Este proceso parece ser esencial para la germinación y el crecimiento del tubo polínico porque estos procesos se ven significativamente afectados en el polen *cad2-1/roGFP2*, que mantuvo un alto grado de oxidación en comparación con los controles roGFP2.

Las tasas de germinación de polen medidas en el WT en el presente estudio fueron comparables a los valores descritos en la literatura (~ 71%; Boavida y McCormick 2007). Las tasas de germinación disminuyeron a ~ 5–20% en los granos de polen del mutante *cad2-1/roGFP2*, que tienen la capacidad para la síntesis de glutatión (Cobbett *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2007; Maughan *et al.*, 2010; Zechmann *et al.*, 2011a, b; Aller *et al.*, 2013). Además, las tasas de crecimiento fueron mucho más bajas en los granos de polen de los mutantes. Los cálculos de potenciales redox de glutatión basados en las



mediciones de roGFP2 confirmaron que todas las partes de la flor, aparte del polen no germinado, se mantienen en un estado muy reducido, como es el caso del polen germinado y los tubos de polen. Los estados altamente reducidos medidos en el polen germinado muestran que los sistemas antioxidantes endógenos tienen suficiente capacidad para lidiar con las grandes cantidades de ROS y especies reactivas de nitrógeno producidas por las mitocondrias (Traverso *et al.*, 2013; Jiménez-Quesada *et al.*, 2016, 2017; Zafra *et al.*, 2018). Curiosamente, se encontró que las mitocondrias en las células de la hoja tienen las concentraciones más altas de glutatión de cualquiera de los compartimentos intracelulares, incluso más que los cloroplastos (Zechmann *et al.*, 2008). Una sonda roGFP dirigida específicamente a las mitocondrias puede ser útil en futuros estudios sobre el papel del glutatión en las mitocondrias del tubo polínico (Rosenwasser *et al.*, 2010).

Es también interesante el hallazgo de que los niveles de glutatión eran más altos en las flores maduras, acumulándose gradualmente el glutatión durante el desarrollo de las flores. El aumento de la acumulación de ROS durante el desarrollo de la flor puede conducir a la activación oxidativa de  $\gamma$ -ECS en los plastidos, lo que resulta en una mayor síntesis y acumulación de glutatión (Gromes *et al.*, 2008). Las ROS se acumulan durante la senescencia de las hojas y durante la muerte celular programada debido a alteraciones en la expresión de enzimas involucradas en el sistema antioxidante y cambios en el metabolismo mitocondrial (Marí *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2012). Sin embargo, el concepto de que las ROS son señales pro-vida generadas por el metabolismo aeróbico es ampliamente aceptado (Foyer *et al.*, 2018). Además, las flores abiertas contienen polen maduro, que ya habrá interactuado con el pistilo para activar la cascada de señalización que resulta en la germinación del tubo polínico. Un enfoque de citometría de flujo para determinar la viabilidad del polen maduro de tomate y *Arabidopsis*, relacionado con la acumulación de ROS, reveló que se podían identificar dos tipos de polinizaciones, poblaciones de 'bajo-ROS' y 'alto-ROS', que representan actividad metabólica baja o alta, respectivamente (Luria *et al.*, 2019). El polen de alto contenido en ROS germinó con una frecuencia mucho más alta que el polen de bajo ROS (Luria *et al.*, 2019). El polen metabólicamente elevado de alto ROS requeriría altos niveles de actividad antioxidante, particularmente altas actividades de enzimas como la glutatión reductasa para mantener altas proporciones de GSH/GSSG. La exposición a altas temperaturas resultó en un aumento en los niveles de ROS en el polen y una disminución en la germinación (Luria *et al.*, 2019). Tales aumentos inducidos por el estrés en las señales ROS pueden modificar el metabolismo y la señalización celular, particularmente si no hay un aumento compensatorio en la capacidad antioxidante. La acumulación de GSSG que se observó en las flores *cad2-1/roGFP2* sugiere que las células de polen estaban en un estado oxidado, lo que tendría un impacto negativo en el metabolismo del polen-pistilo y la germinación del tubo polínico en las flores maduras. Los niveles de GSSG celular generalmente se mantienen en niveles muy bajos porque este metabolito no es compatible con un metabolismo adecuado. En mutantes como el *cat2* deficiente en catalasa, donde se acumula GSSG, el metabolito es secuestrado en las vacuolas (Queval *et al.*, 2011; Noctor *et al.*, 2013). Por lo tanto, es

probable que gran parte del GSSG acumulado en las flores *cad2-1/roGFP2* se localice en la vacuola y no en el citoplasma. Las flores maduras comienzan a degenerarse, pasando por procesos de muerte celular programada, que implican altas concentraciones de ROS (Marí *et al.*, 2009; Ayer *et al.*, 2010). Por lo tanto, la restricción de la acumulación de glutatión en las flores *cad2-1/roGFP2* y las relaciones GSH/GSSG más bajas observadas en éstas pueden dar como resultado una senescencia floral más rápida.

Tomados en conjunto, los datos presentados en esta tesis doctoral confirman que el mantenimiento de glutatión altamente reducido es esencial para la germinación del polen y el crecimiento del tubo (Zechmann *et al.*, 2008). La transición del estado de reposo oxidado al estado germinado metabólicamente activo que facilita el crecimiento del polen, por lo tanto, requiere un gran cambio en la homeostasis redox celular que implica tanto una mayor acumulación de glutatión como una reducción extensa del mismo. Nuestros datos muestran que la capacidad de regenerar GSH a partir de GSSG está restringida en las flores *cad2-1/roGFP2*, al igual que la capacidad de sintetizar glutatión. Estos hallazgos demuestran la importancia del control redox celular en la germinación del polen y el crecimiento del tubo. Se requiere más trabajo para demostrar la naturaleza de los mecanismos involucrados.

También se requieren estudios futuros que usen combinaciones de técnicas como roGFP2, métodos fluorocromáticos (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1970) y tinción con yoduro de propidio (Jimenez-Quesada *et al.*, 2017) para investigar los mecanismos involucrados en las pérdidas inducidas por oxidación de viabilidad y función. Sin embargo, los métodos actuales que pueden determinar la viabilidad de los granos de polen individuales son difíciles de usar simultáneamente con el análisis roGFP2 de las propiedades redox. Por ejemplo, la detección fluorocromática interfiere con la señal roGFP2 porque ambos métodos usan longitudes de onda de excitación y emisión similares.

Los granos de polen requieren un sistema antioxidante robusto para germinar y penetrar a través del estigma (Creissen *et al.*, 1999, Zechmann, 2008); lo que implicará más investigación futura para determinar qué parte de este mecanismo es constitutivo y cuánto es inducido. Nuestros datos demuestran que el glutatión es un componente esencial de los mecanismos de defensa antioxidante y quizás también de la señalización de polen-estigma a través de mecanismos de intercambio de moléculas tiol-disulfuro, glutatión, proteínas y procesos mediados por S-nitrosoglutatión (Corpas *et al.*, 2013; Zafra *et al.*, 2016). Se requieren más estudios con una gama de otros mutantes y marcadores de estrés oxidativo para dilucidar las diferencias redox entre el polen germinado y no germinado y para proporcionar una imagen más completa de la participación del metabolismo de GSH en la germinación del polen.

### 3. Metabolismo del glutatión durante el desarrollo y la germinación del polen.

#### 3.1. Enzimas implicadas en la biosíntesis de GSH.

Estudios previos (Lu *et al.* 2009) han demostrado que la enzima  $\gamma$ -ECS es esencial en la regulación de la síntesis de GSH, siendo limitante en el proceso de biosíntesis. Diferentes trabajos en tejidos reproductivos con mutantes deficiente en la enzima  $\gamma$ -ECS, reflejan anomalías en las funciones reproductoras, al igual que ocurre en la contraparte somática (García-Quirós *et al.* 2019). Cualquier disfunción de la enzima  $\gamma$ -ECS en alguna de las etapas de desarrollo del polen de olivo podría generar inconvenientes para la biología reproductiva del olivo. Por otro lado, aunque en principio se pensaba que la GS no era importante en la regulación de la síntesis de GSH, estudios posteriores revelaron que esta enzima, que regula la segunda etapa en la biosíntesis de GSH, es primordial en ciertos tipos de tejidos y/o en tejidos bajo condiciones estresantes (Lu *et al.* 2009). Los tejidos reproductivos corresponden a ese tipo de tejidos especiales con un metabolismo más alto que los tejidos vegetativos en condiciones normales.

A la vista de nuestros resultados de expresión génica y análisis de la presencia del enzima, la  $\gamma$ -ECS parece tener más importancia durante el desarrollo del polen de olivo, sobretodo en las primeras etapas del desarrollo. Por el contrario, la GS parece ser mucho más importante durante la germinación del tubo polínico, con especial interés entre las 6 primeras horas.

En cuanto a la información acerca de la localización celular de estas enzimas, cabe destacar la presencia de  $\gamma$ -ECS en el estadio de CMP, durante el cual, parece tener una función protectora de la cromatina durante la meiosis celular. Llama también la atención el hecho de que, durante la germinación del polen y la elongación del tubo polínico, estas dos enzimas ( $\gamma$ -ECS y GS) se localizan principalmente en el grano de polen. Esto deja claro que, la síntesis de GSH ocurre dentro del grano de polen principalmente. Por ello postulamos que podrían transportarse por corrientes citoplasmáticas desde el grano de polen hacia el tubo polínico. Estudios previos de inmunolocalización en hojas de *Arabidopsis* reflejan que la enzima  $\gamma$ -ECS se localiza en los cloroplastos, mientras que la GS se localiza en ambos, citoplasma y plastidios (Preuss *et al.* 2014). Sin embargo, nuestro análisis bioinformático en tejidos reproductivos predice una localización subcelular de ambas enzimas en el cloroplasto. Con esta premisa, sería muy oportuno continuar los estudios de localización de estas enzimas a nivel subcelular, para comprobar si, efectivamente la GS sólo se localiza en cloroplastos en el polen.

Después de analizar el estado redox celular en las diferentes muestras, éste fue mucho más reducido en los fenotipos silvestres que en los mutantes deficientes en GSH. Es probable que estas observaciones reflejen el contenido desequilibrado de GSH y GSSG en los mutantes deficientes en enzimas de la biosíntesis de GSH (García-Quirós *et al.*

2019). Observando los resultados obtenidos en la expresión génica de estas enzimas en mutantes deficientes de GSH se puede asumir que la deficiencia de GSH en *cad2* y *pad2* produce un aumento de la expresión de  $\gamma$ -ECS en momentos críticos del desarrollo floral, cuando el metabolismo del polen es mayor (divisiones meióticas y mitóticas, germinación del tubo polínico...) y como consecuencia se liberan grandes concentraciones de ROS. Esto también corrobora la hipótesis previa de que la primera etapa de la síntesis de GSH es la limitante. Sin embargo, en *clt* se observa un patrón de expresión contradictorio, lo que podría estar indicando un retraso en la microesporogénesis en este tipo de mutantes. Estos resultados también corroboran que aunque la GS es primordial en tejidos reproductivos, la segunda etapa de la biosíntesis de GSH no es tan limitante. Ya se ha demostrado en estudios previos que en mutantes knockout del gen  $\gamma$ -ECS son letales durante la embriogénesis, sin embargo los mutantes knockout del gen GS muestran un retraso en el desarrollo frente a los genotipos silvestres (Cairns *et al.* 2006, Pasternak *et al.* 2008).

### 3.2. Enzimas implicadas en el reciclado de GSH.

Los cambios redox pueden controlar varios procesos del desarrollo y del crecimiento en las plantas, incluida la inducción floral y el desarrollo de órganos florales (Meyer y Hell 2005, Considine y Foyer 2014, Dietz 2014). Se ha descrito que la GR y la glutarredoxina (GRX) ejercen un control redox sobre ciertos factores de transcripción que regulan los fenómenos del desarrollo floral, como la formación de pétalos primordiales o el desarrollo de anteras (Li *et al.* 2009, Murmu *et al.* 2010, Wuest *et al.* 2012, ÓMoileídigh *et al.* 2013). De esta forma podemos establecer las bases para definir una relación directa entre la GR el control del desarrollo floral. En los modelos de floración postulados hasta la fecha (Wuest *et al.* 2012, Schippers *et al.* 2013), el desarrollo de las anteras está regulado por los genes ROXY1 y ROXY2, que controlan este proceso a través de la regulación del estado redox de un residuo de cisteína clave de dos factores de transcripción (TGA9 y TGA10), los cuales se activan mediante su reducción, mediada por GRX, y controlan el desarrollo de anteras y tapetum. Con estas premisas y a la vista de los resultados de esta Tesis Doctoral, no podríamos descartar la participación de otros sistemas redox, como la enzima GR, en los procesos de desarrollo de polen. Sin embargo, se ha observado que en los estudios con mutantes de *Arabidopsis* que sobreexpresan los niveles de GSH, una alta concentración de GSH retrasa la floración por un desequilibrio en la relación GSH/GSSG, lo que sugiere que el GSSG es un regulador clave al comienzo de la floración. La baja expresión de GR durante la reproducción conduce a una disminución en la relación redox del glutatión y, por lo tanto, da lugar al inicio de la floración (Meyer *et al.* 2007, Kocsy *et al.* 2013, Chin *et al.* 2016). Sin embargo, los cambios observados en el contenido de GSH o GSSG no necesariamente tienen que correlacionarse con la actividad GR, ya que existe más de una vía bioquímica. Sería posible pensar que, para que tenga lugar la floración, se requiere un ambiente oxidado, y una vez que esta comienza, las redes metabólicas de

síntesis y reducción de GSH necesarias para el correcto desarrollo y viabilidad del polen comenzarán a activarse.

La proliferación celular y el desarrollo de los microsporocitos están probablemente regulados por la pareja de antioxidantes GSH - GR que regula la actividad de diversos enzimas redox e influye en la progresión del ciclo celular y/o la maduración del microsporocito, como se ha demostrado en los meristemos apicales (Burhans y Heintz 2009, Zechmann *et al.* 2011a,b). Trabajos actuales acerca del desarrollo de los tejidos reproductivos (García-Quirós *et al.* 2019) han revelado un claro vínculo entre los procesos redox y el desarrollo floral y la germinación del polen. El potencial redox del citoplasma, medido mediante roGFP, es más oxidado en mutantes deficientes en la enzima GR (*gr1*), en los cuales la ratio GSH/GSSG está disminuida a pesar de tener una adecuada concentración de glutatión (Marty *et al.* 2009), lo mismo ocurre en mutantes *cad2* (Meyer *et al.* 2007, Marty *et al.* 2009, García-Quirós *et al.* 2019). La fertilidad del polen se ve reducida en mutantes deficientes de la enzima GR, *gr1 ntra ntrb*, cuyo polen resulta ser estéril (Marty *et al.* 2009).

Nuestras observaciones sugieren que el glutatión es necesario para el desarrollo del polen, pero además, también es esencial que se encuentre en su estado reducido. Nuestros resultados sugieren que la GR está presente durante todo el desarrollo de manera acumulativa, con una mayor intensidad en estadio de microspora y en las aperturas del grano de polen maduro, donde probablemente las reservas de GSH se han agotado durante el desarrollo y se requiere un reciclado del GSSG producido. En cuanto a la actividad enzimática de la GR, se observa una gran actividad al comienzo del desarrollo del microsporocito (estadio de meiosis, donde se producen numerosas divisiones celulares que requieren un entorno reductor), solo comparable con la actividad del polen maduro, etapa en la que también se observa un pico de actividad de la enzima de acuerdo con lo establecido en los resultados anteriores y con la expresión génica del GR. Todo esto nos lleva a proponer que el GSH es esencial en el desarrollo del microsporocito, y que la participación del GR es esencial para que permanezca en su estado reducido en momentos tan cruciales como el comienzo del desarrollo del polen y justo antes de germinación, para mantener su fertilidad.

Tal y como se ha visto en estudios con dobles mutantes *cat2 gr1* de Arabidopsis, en los que se produce una acumulación masiva de GSSG, la actividad GR1 es necesaria bajo condiciones de estrés oxidativo (Mhamdi *et al.* 2010a).

De estudios previos en polen de kiwi (Speranza *et al.* 2012), se puede afirmar que las ROS se producen como resultado de la rehidratación del polen y durante la fase de retraso que precede a la aparición del tubo polínico. Además, la producción de ROS continúa durante las fases de emergencia y alargamiento del tubo polínico, indicando que están involucradas en la germinación del polen. Es lógico pensar que en etapas tales como la rehidratación y la emergencia del tubo polínico (en las que el grano de polen reinicia su actividad metabólica, lo que se verifica por el aumento en el número de mitocondrias) y durante la elongación del mismo (donde la tasa de crecimiento es tan

alta que se requiere un metabolismo intenso), la producción de ROS será masiva. Dadas estas premisas, podemos plantear la hipótesis de que, siendo el par GSH/GR el sistema antioxidante más importantes en la célula, en situaciones de alta producción de especies ROS, tanto GSH como GR también serán importantes para mantener la homeostasis redox en los límites no peligrosos para la célula y como moléculas de señalización.

La localización de la GR en las aperturas germinativas sugiere un papel importante, tanto de la enzima como del GSH, en la activación del grano de polen y en la emergencia del tubo polínico.

Si observamos los datos de expresión génica y de presencia del enzima, podemos deducir una alta expresión durante la germinación del polen. La misma información se obtiene de los resultados de actividad GR. Esto puede significar que la función de la GR sea controlar la acumulación explosiva de ROS, especialmente durante la emergencia y la elongación del tubo polínico (Gill *et al.* 2013). Además, el hecho de que la enzima también se exprese a altos niveles durante el resto de estadios de germinación, también sugiere el papel de este antioxidante enzimático en el crecimiento y la reorientación del tubo polínico. Esto concuerda con estudios sobre el desarrollo realizados con mutantes deficientes en GR2 cloroplastidial (*gr2*), que es la isoforma identificada en el polen de olivo (García-Quirós *et al.* 2017), los cuales fueron letales durante la embriogénesis (Marty *et al.* 2009).

Según nuestros datos de inmunolocalización de GR, en el polen germinado la enzima se encuentra en el tubo polínico y no en el citoplasma del grano de polen. Esto sugiere que la enzima se sintetiza *de novo* en el tubo polínico regulada por la concentración de ROS y la relación GSH/GSSG, y no se transporta desde el citoplasma del grano. Esto podría además apoyar que, la GR que se expresa en el polen es la isoforma cloroplastidial.

Al igual que ocurre en olivo, los resultados de expresión de la GR en mutantes de *Arabidopsis*, revelan que el enzima presenta una alta expresión en los estadios de polen maduro, hacia el final del desarrollo de la antera, donde las cantidades de ROS aumentan considerablemente debido al alto metabolismo y a la senescencia floral.

### 3.3. Enzimas implicadas en la detoxificación mediante GSH.

Estudios recientes proponen un papel regulador de la GPX en el desarrollo del polen, la anthesis, el crecimiento del tubo polínico, la formación de paredes y la interacción entre polen-pistilo (Zaidi *et al.*, 2012). Diferentes estudios revelan, además, que la GPX8 está directamente relacionada con la supresión de daño oxidativo en el núcleo y el citosol (Gaber *et al.*, 2012; Fu 2014; Ganguli y Abhijit 2015). Por otro lado, la GST parece tener un importante papel en el desarrollo del polen y la fertilidad (Bibi *et al.* 2014).

Nuestros datos de expresión génica y de presencia de los enzimas GPX y GST en el microsporocito, así como en la germinación del polen, revelan un papel primordial de

estas enzimas durante la germinación del tubo polínico en el olivo. El pico de expresión observado en la germinación tardía del polen, podría estar involucrado en un aumento de la expresión de GPX. Estos resultados podrían indicar la importancia de esta enzima en la prevención del daño oxidativo, particularmente aumentado a través de la senescencia del tubo polínico, o la activación de mecanismos particulares involucrados en la protección de los núcleos espermáticos, generados en esta etapa en el tubo polínico de olivo.

Según el patrón de presencia del enzima, la GPX parece tener más importancia durante el desarrollo del polen de olivo, sobretodo en las primeras etapas del desarrollo y al principio de la germinación. Por el contrario, la GST parece ser mucho más importante durante la germinación del tubo polínico, con especial interés entre las 3 primeras horas de la germinación.

Nuestros resultados de inmunohistoquímica detectan a la GPX en el estadio de CMP con un marcaje intenso tanto del nucleolo como de la cromatina, lo que sugiere una función protectora importante de esta enzima durante los fenómenos de división celular (meiótica) que necesariamente ocurrirán a lo largo del desarrollo del polen. Se encontraron niveles detectables de GPX a lo largo de todo el desarrollo tanto en el grano de polen como en el tubo polínico en crecimiento, lo que sugiere un papel clave para este componente en el metabolismo del polen y su fisiología, que ya ha sido determinado para los tejidos somáticos. La amplia localización de la enzima en los tejidos de la antera durante la microsporogénesis está en buena concordancia con los resultados obtenidos para la expresión del ARNm y su importancia putativa en la fisiología del polen. La enzima GPX8 se localiza en el citosol y en los núcleos de *Arabidopsis thaliana* (Gaber *et al.* 2012), sugiriendo que la enzima, no sólo actúa protegiendo del daño celular, si no que también posee un papel regulador en la transducción de señal nuclear durante el desarrollo (Bela *et al.* 2015). La detección de esta enzima en las paredes del tubo polínico y, lo que es más importante, en el extremo apical del mismo, también puede indicar que está directamente involucrada en la reorientación del tubo polínico, dirigiendo su elongación hacia el saco embrionario. La inmunolocalización de GST en los núcleos, especialmente en los núcleos espermáticos, sugiere que la enzima también actúa protegiendo los núcleos del daño oxidativo. El intenso marcaje de estas dos enzimas en los núcleos espermáticos que viajan a lo largo del tubo polínico, sugiere una importante función protectora contra el daño oxidativo generado durante el proceso de germinación del polen, para que así puedan llegar íntegros hasta el saco embrionario, y se produzca la fertilización exitosa.

Como ya se apreciaba en olivo, la tendencia general de la expresión de la GPX en mutantes de *Arabidopsis* es mantener unos ciertos niveles de presencia de transcritos a lo largo de la microsporogénesis, teniendo un máximo en los primeros estadios, y también al comienzo de la germinación, en donde se producen fenómenos de división meiótica y mitótica en los que parece estar implicada esta enzima, así como en la protección de los núcleos espermáticos y la reorientación del tubo polínico. Durante el

crecimiento del tubo polínico en *Arabidopsis thaliana*, la expresión de las enzimas GPX7 y GPX8 se incrementó en polen y estambres (Bela *et al.* 2015). Esta observación verifica nuestros resultados y justifica nuestra hipótesis acerca del papel regulador de esta enzima en el desarrollo y la germinación del polen.



# **C**ONCLUSIONES / **C**ONCLUSIONS



A la vista de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, a continuación se enumeran las conclusiones más importantes:

1. A partir de distintas bases de datos entre las que destaca ReprOlive han sido recuperadas numerosas secuencias completas correspondientes a transcritos de los enzimas de interés ( $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST). Su análisis bioinformático ha permitido agruparlas entre sí y con secuencias similares en otras especies vegetales previamente caracterizadas, identificar las isoformas reproductivas más predominantes y predecir su localización celular y sus posibles modificaciones postraduccionales.
2. Las secuencias seleccionadas han sido validadas experimentalmente y han sido utilizadas para generar modelos predictivos de la estructura secundaria y 3-D de estas enzimas, con una gran similitud con los modelos construidos en otras especies, lo que sugiere la conservación evolutiva de estos genes en plantas.
3. La determinación bioquímica de GSH y GSSG, y su localización celular demuestran que este tripéptido es esencial para el desarrollo y la germinación del polen. Los altos niveles de GSH en el gametofito masculino en meiosis y su localización nuclear sugieren la participación del GSH en el control del ciclo celular. La presencia de GSH en las regiones de apertura y el inicio de la germinación demuestran que la disponibilidad de GSH es esencial para la germinación.
4. El perfil de expresión de la  $\gamma$ -ECS muestra un aumento cuantitativo a lo largo del desarrollo del polen, especialmente durante las primeras etapas, sugiriendo un papel fundamental en la microsporogénesis. La GS sin embargo experimenta un incremento en su expresión a lo largo de la germinación, especialmente a las 6 horas. El análisis comparativo en mutantes de Arabidopsis deficientes en GSH muestra un aumento de la expresión de  $\gamma$ -ECS en los estadios del desarrollo floral analizados, afirmando que la primera etapa de la síntesis de GSH es limitante.
5. Se observa una expresión mantenida del enzima GR durante todo el desarrollo del polen, con un máximo en las microsporas, en las aperturas del grano de polen maduro y durante la germinación, lo que sugiere que la GR está involucrada en los procesos de activación del grano de polen y en la emergencia, elongación y reorientación del tubo polínico. El origen de la gametogénesis requiere GSSG, y una vez que ésta comienza, se necesita GSH para el correcto desarrollo y viabilidad del polen, por lo que es deducible un importante papel de la GR en este cambio.
6. Se propone un papel regulador de la GPX en el desarrollo del polen, la antesis y la germinación del polen. Su detección en el estadio de CMP con marcaje intenso en el nucleolo y la cromatina, sugiere una función protectora del enzima

durante la meiosis. Su detección en las paredes del extremo apical del tubo polínico también indica una relación directa con la reorientación del tubo polínico. El intenso marcaje de esta enzima en los núcleos espermáticos sugiere una función protectora contra el daño oxidativo, especialmente en los gametos, que debe ser estudiado más en detalle.

7. La GST parece tener un importante papel en el desarrollo del polen y los gametos, y en las etapas tempranas del crecimiento y desarrollo del tubo polínico. La inmunolocalización de GST en los núcleos, especialmente en los núcleos espermáticos, sugiere que la enzima también actúa protegiendo los núcleos del daño oxidativo.
8. Se han utilizado de forma pionera líneas de Arabidopsis que expresan una proteína fluorescente verde sensible al estado redox (roGFP) como marcador para estudiar el estado redox dependiente de la tasa GSH/GSSG en tejidos reproductivos. Los resultados obtenidos coinciden con los análisis realizados mediante LC-MS ofreciendo además información celular.
9. El uso de roGFP en los tejidos reproductivos ha permitido establecer que los mutantes de Arabidopsis deficientes en GSH mantienen niveles de oxidación superiores a los silvestres, lo que provoca deficiencias reproductivas. Los granos de polen sin germinar aparecen en un estado relativamente oxidado en comparación con los pólenes que germinan, y la no acumulación de GSH y el mantenimiento de una tasa GSH/GSSG tiene un importante efecto negativo sobre la germinación.

In view of the results obtained in this Doctoral Thesis, the most important conclusions are listed below:

1. Numerous complete sequences corresponding to the enzymes of interest ( $\gamma$ -ECS, GS, GR, GPX y GST) have been retrieved from different databases including ReprOlive. Their bioinformatic analysis allowed grouping of these sequences themselves, and with those similar, previously characterized sequences from other plant species, the identification of the predominant reproductive isoforms and the prediction of their cell localization and post-translational modifications.
2. Selected sequences were validated experimentally and used to generate predictive models of the secondary and 3-D structures of these enzymes, with a high similarity with the models constructed for other species, suggesting evolutive conservation of these genes in plants.
3. Biochemical determination and cell localization of GSH and GSSG demonstrate that this tripeptide is essential for pollen development and germination. High GSH levels in the male gametophyte through meiosis and nuclear localization suggest the participation of GSH in controlling cell cycle. The presence of GSH in the pollen aperture regions and the onset of germination demonstrate that GSH is essential for germination.
4. The expression profile of  $\gamma$ -ECS shows a quantitative increase along pollen development, particularly at early stages, suggesting a fundamental role in microsporogenesis. GS expression, however, experiments an increase along germination, particularly at 6h. Comparative analysis of Arabidopsis mutants deficient in GSH shows an increase in  $\gamma$ -ECS expression at the stages of flower development analyzed, suggesting the limiting character of this primary stage of GSH synthesis.
5. A continued expression of GR enzyme along pollen development, with a maximum at the microspore stage, in the mature pollen apertural regions, and during germination, suggesting that GR is involved in the activation processes of the pollen grain and in the emergence, elongation and reorientation of the pollen tube. The origin of gametogenesis requires GSSG, and once it has started, GSH is then needed for appropriate development and viability of pollen, thus an important role for GR in this switch is foreseeable.
6. A regulatory role for GPX is proposed along pollen development, anthesis and pollen germination. GPX detection at the PMC stage with intense labeling at the nucleolus and chromatin suggests a protective function of the enzyme along meiosis. Its detection in the cell wall of the pollen tube apex also indicates a direct relationship with pollen tube reorientation. Intense labeling of this enzyme in the sperm nuclei suggests a protective function against oxidative damage particularly in the gametes, which has to be further studied.

7. GST enzyme seems to play an important role in pollen and gametes development, and at the early stages of pollen tube growth and development. Immunolocalization of GST in nuclei, particularly the sperm nuclei, also suggests that the enzyme exerts a protective effect of these from oxidative damage.
8. Arabidopsis lines expressing a reporter redox-sensitive green fluorescent protein (roGFP) have been used in a pioneer manner to analyze the redox state dependent of the GSH/GSSG rate in reproductive tissues. The results obtained are coincidental with those performed by LC-MS, also offering additional cellular information.
9. The use of roGFP in the reproductive tissues allowed establishing that Arabidopsis lines deficient in GSH keep oxidation levels higher than those of wild type, provoking reproductive deficiencies. Ungerminated pollen grains appear in a relatively oxidized stage in comparison with the germinating pollen grains, and failing in the accumulation of GSH as well as the maintenance of a high GSH/GSSG have a negative impact on germination.

# **BIBLIOGRAFÍA**





- Airaki, M., Sánchez-Moreno, L., Leterrier, M., Barroso, J.B., Palma, J.M., Corpas, F.J. (2011) Detection and quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant and Cell Physiology*, 52(11), 2006-2015.
- Akter, S., Huang, J., Waszczak, C., Jacques, S., Gevaert, K., Van Breusegem, F., Messens, J. (2015) Cysteines under ROS attack in plants: a proteomics view. *J. Exp. Bot.* 66, 2935–2944 46.
- Allen, J.F. and Hall D.O. (1973) Superoxide reduction as a mechanism of ascorbate-stimulated oxygen uptake by isolated chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* 52: 856–862.
- Alvarez-Buylla, E.R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Chaos Cador, A., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Pérez-Ruiz, R.V., Piñeyro-Nelson, A., Sánchez-Corrales, Y.E. (2010). Flower development. *The Arabidopsis Book*.2010; 8:e0127. doi: 10.1199/tab.0127.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55, 373–399.
- Apostol, I., Heinstejn, P.F., Low, P.S. (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol* 99: 109–116.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Gubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S., Ricquier, D. (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26, 435–439 34.
- Asada K., Takahashi M., Nagate M. (1974) Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric. BioI. Chern.* 38: 471-473.
- Attacha, S. et al. (2017) Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*. DOI: 10.1111/pce.12919.
- Avery, A.M. et al. (2004) Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast gpx3 reveals its functional importance. *J. Biol. Chem.* 279: 46652–46658.
- Bahin, E. et al. (2011) Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant, Cell and Environment* (2011) 34, 980–993
- Ball, L., Accotto, G.P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S., Mullineaux, P.M. (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2448–2462.
- Barranco, D., Caballero, J.M., Martín, A., Rallo, L., Del Río, C., Tous, J., Trujillo, I. (2004) Variedades de olivo en España. Ediciones Paraninfo S.A. Editorial Mundi-Prensa. España. ISBN 13: 9788484761921. ISBN 10: 8484761924.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (2017) El cultivo del olivo. 7ª edición. Ediciones Paraninfo S.A. Editorial Mundi-Prensa. España. ISBN 13: 9788484767145. ISBN 10: 8484767140.
- Bartling, D., Radzio, R., Steiner, U., Weiler, E. W. (1993) A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 216: 579-586.
- Bashandy, T., Guillemot, J., Vernoux, T., Caparros-Ruiz, D., Ljung, K., Meyer, Y., Reichheld, J.P. (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *Plant Cell* 22: 376–391.
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N. (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65 (5): 1229–1240.
- Becker, J.D., Boavida, L.C., Carneiro, J., Haury, M., Feijo, J.A. (2003) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiol* 133: 713–725
- Becker, B., Holtgreffe, S., Jung, S., Wunrau, C., Kandlbinder, A., Baier, M., Dietz, K.J., Backhausen, J.E., Scheibe, R. (2006) Influence of the photoperiod on redox regulation and stress responses in *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) plants under long- and short-day conditions. *Planta* 224:380–93.

- Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., Csiszár, J. (2015) Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176 (2015) 192–201
- Bibi, N., Yuan, S., Zhu, Y., Wang, X. (2014) Improvements of Fertility Restoration in Cytoplasmic Male Sterile Cotton by Enhanced Expression of Glutathione S-Transferase (GST) Gene. *Journal of Plant Growth Regulation* 33(2).
- Biterova, E. I. and Barycki, J. J. (2009). Mechanistic details of glutathione biosynthesis revealed by crystal structures of *Saccharomyces cerevisiae* glutamate- cysteine ligase. *J. Biol. Chem.* 284, 32700–32708.
- Boavida, L.C. and McCormick, S. (2007) Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2007, 52:570-582.
- Bokvaj, P., Hafidh, S., Honys, D. (2015) Transcriptome profiling of male gametophyte development *Nicotiana tabacum*. *Genom Data* 3:106–111
- Bokszczanin, K.L. (2013) Solanaceae Pollen Thermotolerance Initial Training Network (SPOT-ITN) Consortium, Fragkostefanakis S. Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Front Plant Sci* 4:315
- Boncompagni, E. et al. (2017) Synthesis and Roles of Glutathione and Homoglutathione in the Nitrogen-Fixing Symbiosis. In *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. Springer International Publishing, 1: 29-58.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1–2): 248-254.
- Buchanan, B.B. and Balmer, Y. (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology* 56, 187–220.
- Burhans, W.C., Heintz, N.H. (2009) The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med*, 47, 1282-1293.
- Cairns, N.G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C.S., Meyer, A.J. (2006) Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol* 141: 446–455.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* 11, 85–95 27.
- Carmona, R., Zafra, A., Seoane, P., Castro, A.J., Guerrero-Fernández, D., Castillo-Castillo, T., Medina-García, A., Cánovas, F.M., Aldana-Montes, J.F., Navas-Delgado, I., Alché, J.D., Claros, M.G. (2015). ReprOlive: a database with linked data for the olive tree (*Olea europaea* L.) reproductive transcriptome. *Front Plant Sci.*; 6:625. doi: 10.3389/fpls.2015.00625. eCollection 2015.
- Chaouch, S. and Noctor, G. (2010) Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal hydrogen peroxide. *New Phytol* 188: 711–718.
- Chaouch, S., Queval, G., Vanderauwera, S., Mhamdi, A., Vandorpe, M., Langlois-Meurinne, M., Van Breusegem, F., Saindrenan, P., Noctor, G. (2010) Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by ISOCHORISMATE SYNTHASE1 in a daylength-related manner. *Plant Physiol* 153: 1692–1705.
- Chen, M., Li, K., Li, H., Song, C.P., Miao, Y. (2017) The glutathione peroxidase gene family in *Gossypium hirsutum*: genome-wide identification, classification, gene expression and functional analysis. *Sci Rep.*; 7:44743.
- Cheung, A.Y., Wang, H., Wu, H.M. (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82:383–393.
- Chin, D.C., Hsieh, C.C., Lin, H.Y., Yeh, K.W. (2016) A Low Glutathione Redox State Couples with a Decreased Ascorbate Redox Ratio to Accelerate Flowering in *Oncidium* Orchid. *Plant Cell Physiol*, 57(2):423-36.
- Chou, K.C. and Shen, H.B. (2010) Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS One* 5, e11335.

- Collinson, E.J. et al. (2002) The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 277(19):16712-7
- Colville, L. and Kranner, I. (2010) Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regulation* 62, 242–255.
- Conklin, P.L., Williams, E.H., Last, R.L. (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9970–9974.
- Conrad, M., Angeli, J.P., Vandenabeele, P., Stockwell, B.R. (2016) Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 348–366.
- Considine, M.J. and Foyer, C.H. (2014) Redox regulation of plant development. *Antioxid Redox Signal*, 21 (2014), pp. 1305-1326.
- Copley, S.D., and Dhillon, J.K.(2002) Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes. *Genome Biol.* 3 (5).
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., Mullineaux, P. (1995) Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *The Plant J* 8: 167–175.
- Cruz, F., Julca, I., Gómez-Garrido, J., Loska, D., Marcet-Houben, M., Cano, E., Galán, B., Frias, L., Ribeca, P., Derdak, S., Gut, M., Sánchez-Fernández, M., García, J.L., Gut, I.G., Vargas, P., Alioto, T.S., Gabaldón, T. (2016). Genome sequence of the olive tree, *Olea europaea*. *GigaScience* 5, 29.
- Olive genome and annotation files. <http://denovo.cnag.cat/genomes/olive/>.
- Csiszár, J., Horváth, E., Váry, Z., Gallé, Á., Bela, K., Brunner, S., Tari, I.(2014) Glutathione transferase supergene family in tomato: Salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. *Plant Physiol Biochem.*; 78: 15-26.
- Cummins, I., Dixon, D.P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M., Edwards, R. (2011) Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab Rev.* 2011; 43 (2):266–80.
- Dalton, D. A. et al. (2009) Physiological roles of glutathione S-transferases in soybean root nodules. *Plant Physiol*, 150 (2009), pp. 521-530.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Meth* 9, 772-772.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D.J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., Mittler, R. (2005) Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Is a Central Component of the Reactive Oxygen Gene Network of Arabidopsis. *The Plant Cell* 17 (1): 268 – 281.
- Delorme-Hinoux, V., Bangash, S.A., Meyer, A.J., Reichheld, J.P. (2016) Nuclear thiol redox systems in plants. *Plant Sci.* 243, 84–95 48.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Coffey, M.J., Neill, S.J. (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of Arabidopsis thaliana is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett.* 382: 213–217.
- Desikan, R., A.-H.-Mackerness, S., Hancock, J.T., Neill, S.J. (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127, 159–172.
- De Gara, L., and Foyer, C. H. (2017) Ying and Yang interplay between reactive oxygen and reactive nitrogen species controls cell functions. *Plant, Cell & Environment*, 40: 459– 461.
- De Simone, A., Dong, Y., Diaz-Vivancos, P., Foyer, C. H. (2015) GSH Partitioning Between the Nucleus and Cytosol in *Arabidopsis thaliana*. In: De Kok L., Hawkesford M., Rennenberg H., Saito K., Schnug E. (eds) *Molecular Physiology and Ecophysiology of Sulfur*. Proceedings of the International Plant Sulfur Workshop. Springer, Cham.
- de Simone, A., Hubbard, R., Viñegra de la Torre, N., Velappan, Y., Wilson, M., Considine, M.J. et al. (2017). Redox changes during the cell cycle in the embryonic root meristem of Arabidopsis thaliana. *Antioxidants & Redox Signaling*. 27, 1505–1519.
- Del Rio, L.A. and Lopez-Huertas, E. (2016) ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant Cell Physiol*. Published online April 14, 2016.
- Diaz-Vivancos, P., Dong, Y., Ziegler, K., Markovic, J., Pallardó, F.V., Pellny, T.K., Verrier, P.J., Foyer, C.H. (2010a) Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole

- cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *Plant J* 64:825–838.
- Díaz-Vivancos, P., Wolff, T., Markovic, J., Pallardó, F.V., Foyer, C.H. (2010b) A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J* 431:169–178.
- Díaz-Vivancos, P., de Simone, A., Kiddle, G., Foyer, C.H. (2015) Glutathione- linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 89, pp. 1154-1164.
- Diebold, L. and Chandel, N.S. (2016) Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic. Biol. Med.* In press 26.
- Dietz, K.J. (2011) Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Aug 15;15(4):1129-59.
- Dietz, K.J. (2014) Redox Regulation of Transcription Factors in Plant Stress Acclimation and Development. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9): 1356-1372.
- Dietz, K.J. (2016) Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast? *Mol. Cells* 39, 20–25 47.
- Dinnyen, J.R. et al. (2008) Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science* 320: 942–945
- Dixon, D.P., Davis, B.G., Edwards, R. (2002) Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277: 30859–30869.
- Dixon, D.P. et al. (2009) Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *J Exp Bot* 60: 1207–1218.
- Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., Smirnov, N. (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J* 52: 673–689
- D'Souza, A.D., Parish, I.A., Krause, D.S., Kaeck, S.M., Shadel, G.S. (2013) Reducing mitochondrial ROS improves disease-related pathology in a mouse model of ataxia-telangiectasia. *Mol. Ther.* 21, 42–48 37.
- Dukowicz-Schulze, S. and Chen, C. (2014) The meiotic transcriptome architecture of plants. *Frontiers Plant Sci.* 5, 220.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M. (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180 278-284.
- Edwards, R. et al. (2000) Plant glutathione *S*-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5, 5, 193–198.
- Edwards, R. and Dixon, D. P. (2005) Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol*, 401 (2005), pp. 169-186
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Ben-Hayyim, G. (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* 100: 234–240
- Fahnenstich, H., Scarpeci T.E., Valle, E.M., Flügge, U.I., Maurino, V.G. (2008) Generation of hydrogen peroxide in chloroplasts of *Arabidopsis* overexpressing glycolate oxidase as an inducible system to study oxidative stress. *Plant Physiol.* 148: 719–29.
- Feijó, J.A. (2010) The mathematics of sexual attraction. *J Biol.* 9(3): 18.
- Fontaine, O. et al. (1995) Effect of glutathione on dormancy breakage in barley seeds. *Plant Growth Regulation* 16, 55–58.
- Foreman, J. et al (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442–446
- Foyer, C.H. et al. (1990) The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynth Res* 25: 83–100
- Foyer, C.H., Theodoulou, F.L., Delrot, S. (2001) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci* 6:486-492.
- Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133 Issue 1 21-25.

- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2000) Oxygen Processing in Photosynthesis Regulation and Signaling. *New Phytologist*, 146, 359-388.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119: 355–364
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005a) Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 29: 1056–1071
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005b) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875
- Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., Noctor, G. (2009) Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009. 60:455–84.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* 11: 861–905
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2011) Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, January 2011, Vol. 155, pp. 2–18.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2013) Redox signaling in plants. *Antioxid.Redox Signal*. 18, 2087–2090
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2015) Stress-triggered redox signalling: What's in pROSpect?. *Plant Cell Environ*, 10.1111/pce.12621.
- Fraser, J. A., Saunders, R.D., McLellan, L.I. (2002). *Drosophila melanogaster* glutamate-cysteine ligase activity is regulated by a modifier subunit with a mechanism of action similar to that of the mammalian form. *J. Biol. Chem.* 277, 1158–1165.
- Fraser, J. A., Kansagra, P., Kotecki, C., Saunders, R.D., McLellan, L.I. (2003). The modifier subunit of *Drosophila* glutamate-cysteine ligase regulates catalytic activity by covalent and noncovalent interactions and influences glutathione homeostasis *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 278, 46369–46377.
- Frederickson, M. and Loake, G.J. (2014) Redox regulation in plant immune function. *Antioxid.Redox Signal*. 21, 1373–1388 63.
- Freeman, J.L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I.J., Salt, D.E. (2004) Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16:2176–2191
- Frendo, P., Mathieu, C., Van de Sype, G., Hérouart, D., Puppo, A. (1999). Characterisation of a cDNA encoding gamma-glutamylcysteine synthetase in *Medicago truncatula*. *Free Radic. Res.* 31, S213–S218.
- Frendo, P., Harrison, J., Norman, C., Hernández-Jiménez, M.J., Van de Sype, G., Gilabert, A., Puppo, A. (2005) Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 18: 254–259.
- Frottin, F., Espagne, C., Traverso, J.A., Mauve, C., Valot, B., Lelarge-Trouverie, C., Zivy, M., Noctor, G., Meinel, T., Giglione, C. (2009) Cotranslational proteolysis dominates glutathione homeostasis to support proper growth and development. *Plant Cell* 21: 3296–3314.
- Fu, J. Y. et al. (2014) Cloning of a new glutathione peroxidase gene from tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis under biotic and abiotic stresses. *Fu Botanical Studies* 2014, 55:7
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006). Cross talk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the point of convergence in the stress signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:1–7.
- Gaber, A. et al. (2012). The involvement of Arabidopsis glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damages in nucleus and cytosol. *Plant Cell Physiol.* 2012 Sep;53(9).
- Galant, A., Arkus, K.A.J., Zubieta, C., Cahoon, R.E., Jez, J.M. (2009). Structural basis for evolution of product diversity in soybean glutathione biosynthesis. *Plant Cell* 21, 3450–3458.
- Galant, A., Preuss, M.L., Cameron, J.C., Jez, J.M. (2011) Plant Glutathione Biosynthesis: Diversity in Biochemical Regulation and Reaction Products. *Front Plant Sci.* 2011; 2: 45.
- Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C. (1996) SeaView and Phylo\_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.*, 12, 543-548.

- Ganguli, S. et al. (2015). Residue Frequencies and Conserved Phylogenetic Signatures in Amino Acid Sequences of Plant Glutathione Peroxidases, Indicates Habitat Specific Adaptation and Dictates Interactions with Key Ligands. *American Journal of Bioinformatics Research* 2015, 5(1): 9-15
- García-Giménez, J.L., Markovic, J., Dasí, F., Queval, G., Schnaubelt, D., Foyer, C.H., Pallardó, F.V. (2013) Nuclear glutathione. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3304-3316.
- García-Quirós, E. et al. (2017). Identification and *in silico* Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil. *Springer. IWBBIO 2017, Part II, LNBI 10209*, pp. 185–195, 2017.
- García-Quirós, E., Alché, J.D., Karpinska, B., Foyer, C.H. (2019) Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour, *Journal of Experimental Botany*, erz376. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz376>.
- García-Quirós, E., Lima, E., Alaché, J.D. (In press). Involvement of glutathione and glutathione reductase in the development of the microsporocyte and during the germination of the olive pollen.
- Garrett, R. H. et al. (2005). *Biochemistry* (3rd ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. ISBN 0534490336.
- Gilroy, S., Białasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A.R., Karpiński, S., Mittler, R. (2016) ROS, calcium and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiol.* 171, 1606–1615.
- Gigolashvili, T. and Kopriva, S. (2014). Transporters in plant sulfur metabolism. *Front Plant Sci.* 2014; 5: 442.
- Gill, S. S. et al. (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70, 204–212.
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Mariani, C., Rieu, I. (2013) Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. *Plants* 2:489–506
- González, M. V. et al (1995) Stigmatic receptivity limits the effective pollination period in kiwifruit. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 120(2):199–202.
- González-Párraga, P., Marín, F.R., Argüelles, J.C., Hernández, J.A. (2005) Correlation between the intracellular content of glutathione and the formation of germ-tubes induced by human serum in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1722:324-330.
- Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W. (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 931–947 29.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. (2010) SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 27, 221-224.
- Green, M.R. and Sambrook, J. (2014) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Griebel T, and Zeier J. (2008) Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in *Arabidopsis*: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiol.* 147:790–801
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. (1985) Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science.* 230(4726):674-6.
- Gromes, R., Hothorn, M., Lenherr, E.D., Rybin, V., Scheffzek, K., Rausch, T. (2008). The redox switch of gamma-glutamylcysteine ligase via a reversible monomer-dimer transition is a mechanism unique to plants. *Plant J.* 54, 1063–1075.
- Gulyás, Z., Boldizsar, A., Novak, A., Szalai, G., Pal, M., Galiba, G., Kocsy, G. (2014) Central role of the flowering repressor ZCCT2 in the redox control of freezing tolerance and the initial development of flower primordia in wheat. *BMC Plant Biol* 14:91.
- Hafidh, S., Breznenova, K., Ruzicka, P., Fecikova, J., Capkova, V., Honys, D. (2012a) Comprehensive analysis of tobacco pollen transcriptome unveils common pathways in polar cell expansion and underlying heterochronic shift during spermatogenesis. *BMC Plant Biol* 12:24

- Hafidh, S., Breznenova, K., Honys, D. (2012b) De novo post-pollen mitosis II tobacco pollen tube transcriptome. *Plant Signal Behav* 7:918–921
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., eds (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th edn), Oxford university Press.
- Hatano-Iwasaki, A. and Ogawa, K. (2012) Overexpression of GSH1 gene mimics transcriptional response to low temperature during seed vernalization treatment of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 53:1195–1203.
- Heazlewood, J.L., Durek, P., Hummel, J., Selbig, J., Weckwerth, W., Walther, D., Schulze, W.X. (2008) PhosPhAt: a database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucleic acids research* 36, D1015-1021 (2008).
- Hekimi, S. et al. (2011) Taking a ‘good’ look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21, 569–576 69.
- Hell, R., and Bergmann, L. (1988). Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and localization. *Physiol. Plant.* 72, 70–76.
- Hell, R., and Bergmann, L. (1990). Gamma-glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 180, 603–612.
- Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J.L., Drevet, J.R., Roeckel-Drevet, P. (2002) Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur J Biochem* 269: 2414–2420
- Herrera, K., Cahoon, R.E., Kumaran, S., Jez, J.M. (2007). Reaction mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*: site-directed mutagenesis of active site residues. *J. Biol. Chem.* 282, 17157–17165.
- Heslop-Harrison, J. and Heslop-Harrison, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence. Intra cellular hydrolysis of fluorescein diacetatae. *Stain Technol.* 45(3):115-120.
- Heslop-Harrison, Y. and Shivanna, K.R. (1977) The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma. *Annals of Botany*, 41 (6), 1233–1258.
- Hibi, T., Nii, H., Nakatsu, T., Kimura, A., Kato, H., Hiratake, J., Oda J. (2004). Crystal structure of gamma-glutamylcysteine synthetase: insights into the mechanism of catalysis by a key enzyme for glutathione homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15052–15057.
- Hicks, L.M., Cahoon, R.E., Bonner, E.R., Rivard, R.S., Sheffield, J., Jez, J.M. Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19, 2653–2661.
- Hiscock, S.J. and Allen, A.M. (2008) Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol.* 179 (2): 286-317.
- Hobo, T. et al. (2008) Various spatiotemporal expression profiles of anther-expressed genes in rice. *Plant Cell Physiol* 49:1417–1428
- Holmes-Davis, R. (2005) Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 5:4864–4884.
- Honys, D., and Twell, D. (2003) Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. *Plant Physiol* 132:640–652
- Hossain, M.A., Bhattacharjee, S., Armin, S.M., Qian, P., Xin, W., Li, H.Y., Burritt, D.J., Fujita, M., Tran, L.S. (2015) Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Front. Plant.Sci.* 6, 420 53.
- Hothorn, M., Wachter, A., Gromes, R., Stuwe, T., Rausch, T., Scheffzek, K. (2006). Structural basis for the redox control of plant glutamate cysteine ligase. *J. Biol. Chem.* 281, 27557–27565.
- Iqbal, A., Yabuta, Y., Takeda, T., Nakano, Y., Shigeoka, S. (2006) Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* 273: 5589–5597.

- Jez, J. M., Cahoon, R.E., Chen, S. (2004). *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *J. Biol. Chem.* 279, 33463–33479.
- Jez, J. M., and Cahoon, R. E. (2004). Kinetic mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279, 42726–42731.
- Jiang, K. and Feldman, L.J. (2005) Regulation of root apical meristem development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 485–509
- Jiang, K. et al. (2006) A role for mitochondria in the establishment and maintenance of the maize root quiescent center. *Plant Physiol* 140: 1118–1125
- Jiménez, A., Hernandez, J.A., Del Rio, L.A., Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* 114 175–284.
- Jiménez-Quesada, M.J., Traverso, J.A. and Alché, J.D. (2016). NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues. *Frontiers in Plant Science* 7, 359.
- Jimenez-Quesada, M.J., Carmona, R., Lima-Cabello, E., Traverso, J.A., Castro, A.J., Claros, M.G. and Alché, J.D. (2017). Generation of nitric oxide by olive (*Olea europaea* L.) pollen during in vitro germination and assessment of the S-nitroso- and nitro-proteomes by computational predictive methods. *Nitric Oxide*, 68, 23-37.
- Julkowska, M.M. and Testerink, C. (2015) Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends Plant Sci.* 20, 586–594 56.
- Jung, B.G., Lee, K.O., Lee, S.S., Chi, Y.H., Jang, H.H., Kang, S.S., Lee, K., Lim, D., Yoon, S.C., Yun, D.J., et al. (2002) A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase. *J Biol Chem* 277: 12572–12578
- Juntilla, M.M., Patil, V.D., Calamito, M., Joshi, R.P., Birnbaum, M.J., Koretzky, G.A. (2010) AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. *Blood* 115, 4030–4038 38.
- Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Crowther, J.C. (2008) Olive oil history, production and by-product management. *Rev Environ Sci Biotechnol* 7 (1): 1-26.
- Kaiser, W. (1979) Carbon metabolism of chloroplasts in the dark. *Planta* 144: 193-200.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., Mullineaux, P. (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*. 284(5414): 654-7.
- Kaur, H. and Bhatla, S.C. (2016) Melatonin and nitric oxide modulate glutathione content and glutathione reductase activity in sunflower seedling cotyledons accompanying salt stress. *Nitric Oxide* 59: 42-53.
- Kelley, L.A. and Sternberg, M.J. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols* 4, 363-371
- Kelliher, T. and Walbot, V. (2012) Hypoxia triggers meiotic fate acquisition in maize. *Science* 2012, 337:345-348.
- Kelly, G.J. and Latzko, E. (1979) Soluble ascorbate peroxidase: detection in plants and use in vitamin C estimation. *Naturwissenschaften* 66 (12): 617-9.
- Kilian, J. et al. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50:347–63.
- Kim, S., Mollet, J.C., Dong, J., Zhang, K., Park, S.Y., Lord, E.M. (2003) Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:16125–16130
- Kinkema, M., Fan, W., Dong, X. (2001). Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of PR Gene Expression. *The Plant cell.* 12. 2339-2350.
- Kocsy, G., Tari, I., Vanková, R., Zechmann, B., Gulyás, Z., Poór, P., Galiba, G. (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Sci*, 211, 77-91.



- Koh, C.S., Didierjean, C., Navrot, N., Panjikar, S., Mulliert, G., Rouhier, N., Jacquot, J.P., Aubry, A., Shawkataly, O., Corbier, C. (2007) Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes. *J Mol Biol.*; 370(3): 512-29.
- Konig, J., Muthuramalingam, M., Dietz, K.J. (2012) Mechanisms and dynamics in the thiol/ disulfide redox regulatory network: transmitters, sensors and tar-gets. *Curr.Opin. Plant Biol.* 15, 261–268
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F.C., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* 147: 1358–1368.
- Kopriva, S. and Rennenberg, H. (2004) Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *J Exp Bot* 55:1831–1842.
- Koua, D., Cerutti, L., Falquet, L., Sigrist, C.J., Theiler, G., Hulo, N., Dunand, C. (2009) PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification. *Nucleic Acids Res.*; 37(Database issue): D261-6.
- Kranner, I., Birtić, S., Anderson, K.M., Pritchard, H.W. (2006) Glutathione halfcell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic Biol Med* 40: 2155–2165.
- Lallement, P. A. et al. (2014) The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Front. Pharmacol.*, 5, 192.
- Laloi, C. and Havaux, M. (2015) Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. *Front. Plant.Sci.* 6, 39 58.
- Laurindo, F.R., Araujo, T.L., Abrahão, T.B. (2014) Nox NADPH oxidases and the endo-plasmic reticulum. *Antioxid.Redox Signal.* 20, 2755–2775.
- Lee, J.Y., and Lee, D.H. (2003) Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress. *Plant Physiol* 132:517–529
- Lee, T.Y., Bretana, N., Lu, C.T. (2011) PlantPhos: using maximal dependence decomposition to identify plant phosphorylation sites with substrate site specificity. *BMC Bioinformatics* 12, 261.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.*; 79 (4): 583-93.
- Li, S. et al. (2009) Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:429–441.
- Li, X. (2011). *Arabidopsis* Pollen Tube Germination. *Bio-101*: e73.
- Li, L., Lu, X., Ma, H., Lyu, D. (2017) Jasmonic acid regulates the ascorbate–glutathione cycle in *Malus baccata* Borkh. roots under low root-zone temperature. *Acta Physiol Plant*, 39: 174.
- Liedschulte, V., Wachter, A., Zhigang, A., Rausch, T. (2010) Exploiting plants for glutathione (GSH) production: uncoupling GSH synthesis from cellular controls results in unprecedented GSH accumulation. *J Plant Biotechnol* 8: 807–820.
- Liere, K. and Link, G. (1997) Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state. *Nucleic Acids Research* 25(12):2403-8
- Lima-Cabello, E., Martínez-Beas, I., García-Quirós, E. et al. (2019). Structural and Functional Features of Glutathione Reductase Transcripts from Olive (*Olea europaea* L.) Seeds. In: Rojas I., Valenzuela O., Rojas F., Ortuño F. (eds) *Bioinformatics and Biomedical Engineering. IWBBIO 2019. Lecture Notes in Computer Science*, vol 11465. Springer, Cham.
- Lindermayr, C. et al. (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* 281: 4285–4291
- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., Durner, J. (2010) Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *The Plant Cell* 22, 2894–2907.
- Loraine, A.E., McCormick, S., Estrada, A., Patel, K., Qin, P. (2013) RNAseq of *Arabidopsis* pollen uncovers novel transcription and alternative splicing. *Plant Physiol* 162:1092–1109
- Loraine, A.E., Blakley, I.C., Jagadeesan, S., Harper, J., Miller, G., Firon, N. (2015) Analysis and visualization of RNA-seq expression data using RStudio, bioconductor and integrated genome

- browser, vol 1284. Plant functional genomics: methods and protocols. Springer, New York. doi:10.1007/978-1-4939-2444-8\_24
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265–275.
- Lu, S.C. (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30: 42–59.
- Lueder, D. V., and Phillips, M. A. (1996). Characterization of *Trypanosoma bru-cei*  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, an essential enzyme in the biosynthesis of trypanothione. *J. Biol. Chem.* 271, 17485–17490.
- Madamanchi, N.R. and Alscher, R.G. (1991) Metabolic bases for differences in sensitivity of two pea cultivars to sulfur dioxide. *Plant Physiol.* 97(1):88-93.
- Maiorino, M. et al. (1990) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 186: 448–457
- Markovic, J., Borrás, C., Ortega, A., Sastre, J., Viña, J., Pallardó, F.V. (2007) Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *J Biol Chem* 282: 20416–20424.
- Martinez, A., Traverso, J.A., Valot, B., Ferro, M., Espagne, C., Ephritikhine, G., Zivy, M., Giglione, C., Meinnel, T.: Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes. *Proteomics* 8, 2809-2831
- Martínez-Sarrasague, M., Barrado, D.A., Zubillaga, M., Hager, A., De Paoli, T., Boccio, J. (2006) Conceptos actuales del metabolismo del glutatión: Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2006; 40 (1): 45-51
- Marty, L., Siala, W., Schwarzländer, M., Fricker, M.D., Wirtz, M., Sweetlove, L.J., Meyer, Y., Meyer, A.J., Reichheld, J.P., Hell, R. (2009) The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9109–9114.
- Maryanovich, M., Oberkovitz, G., Niv, H., Vorobiyov, L., Zaltsman, Y., Brenner, O., Lapidot, T., Jung, S., Gross, A. (2012) The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 14, 535–541 39.
- Matamoros, M. A. et al. (2003). Molecular analysis of the pathway for the synthesis of thiol tripeptides in the model legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 1039–1046.
- Matamoros, M. A. et al. (2010) Function of antioxidant enzymes and metabolites during maturation of pea fruits. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 1, pp. 87–97.
- Matamoros, M.A., Saiz, A., Peñuelas, M., Bustos-Sanmamed, P., Mulet, J.M., Barja, M.V., Rouhier, N., Moore, M., James, E.K., Dietz, K.J., Becana, M. (2015) Function of glutathione peroxidases in legume root nodules. *Journal of Experimental Botany* 66(10): 2979-2990.
- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M., Karpinski, S. (2006) Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J Exp Bot* 57: 1795–1807.
- Maughan, S. C., Pasternak, M., Cairns, N., Kiddle, G., Brach, T., Jarvis, R., Haas, F., Nieuwland, J., Lim, B., Müller, C., Salcedo-Sora, E., Kruse, C., Orsel, M., Hell, R., Miller, A.J., Bray, P., Foyer, C.H., Murray, J.A., Meyer, A.J., Cobbett, C.S. (2010). Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloro-quine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2331–2336.
- May, M.J. and Leaver, C.J. (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in Arabidopsis thaliana suspension cultures. *Plant Physiol* 103: 621–627
- May, M. J. and Leaver, C. J. (1994). *Arabidopsis thaliana*  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and *Escherichia coli* homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10059–10063.
- May, M.J., Vernoux, T., Sánchez-Fernández, R., Van Montagu, M., Inzé, D. (1998). Evidence for post-transcriptional activation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12049–12054.
- McCormick, S. (2004) Control of Male Gametophyte Development. *The Plant Cell.* 16 (1): 142-153.

- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., Lopez, R. (2013) Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research* 41, 597-600.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-60.
- Menon, S.G., Sarsour, E.H., Spitz, D.R., Higashikubo, R., Sturm, M., Zhang, H., Goswami, P.C. (2003) Redox regulation of the G1 to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle. *Cancer Res* 63: 2109–2117.
- Meyer, A.J. (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol.* 165(13):1390-403.
- Meyer, A.J. and Fricker, M.D. (2000) Direct measurement of glutathione in epidermal cells of intact Arabidopsis roots by twophoton laser scanning microscopy. *J. Microsc. (Oxf.)* 198, 174–181.
- Meyer, A.J. and Hell, R. (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research*, 86, Issue 3, 435–457.
- Meyer, A.J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J.P., Hell, R. (2007) Redox-sensitive GFP in Arabidopsis thaliana is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* 52:973–986.
- Mhamdi, A. et al. (2010a) Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiol* 153: 1144–1160
- Mhamdi, A., Mauve, C., Gouia, H., Saindrenan, P., Hodges, M., Noctor, G. (2010b) Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in Arabidopsis leaves. *Plant Cell Environ* 33: 1112-1123.
- Mhamdi, A, et al. (2010c) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61: 4197–4220
- Mhamdi, A., Han, Y., Noctor, G. (2013) Glutathione-dependent phytohormone responses. Teasing apart signaling and antioxidant functions. *Plant Signal Behav.* 2013 May 1; 8(5): e24181.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., Lancelin, J.M., Trost, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G., Lemaire, S.D. (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(45):16478-83.
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoerberichts, F.A., Mühlenbock, P., Brosché, M., Van Breusegem, F., Kangasjärvi, J. (2016) Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *J. Exp. Bot.* 67, 3831–3844.
- Milla M. A. R., Maurer A., Huete A. R., Gustafson J. P. (2003). Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J.* 36 602–615.
- Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M. (2000) Activities of SOD and ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennelli*. *Physiol. Plant.* 110, 42-51.
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B. (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid.Redox Signal* 20.7 1126–1167 32.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16 (6): 300-309.
- Mittler, R. (2017) ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22, No. 1, 11-19.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58: 459–481.
- Moons, A. (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione-S-transferases (GSTs), *Vitam.Horm.* 72 (2005) 155-202.
- Moran, J. F. et al. (2000). Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiol.* 124, 1381–1392.

- Morimoto, H., Iwata, K., Ogonuki, N., Inoue, K., Atsuo, O., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, T., Yabe-Nishimura, C., Shinohara, T. (2013) ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 12, 774–786 36.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113:935–944.
- M'rani-Alaoui, M. (2000) Estudio a nivel celular de la germinación, emisión y elongación del tubo polínico en el olivo (*Olea europea* L.). Tesis doctoral. Universidad de Granada, España.
- Mullineaux, P.M., Karpinski, S., Jimenez, A., Cleary, S.P., Robinson, C., Creissen, G.P. (1998) Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase. *Plant J* 13: 375–379
- Navrot, N. (2006) Plant Glutathione Peroxidases Are Functional Peroxiredoxins Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiology*, December 2006, 142, 1364–1379.
- Ndamukong, I. et al. (2007) SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J* 50: 128–139
- Neuefeind, T. et al. (1997a) Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. *J. Mol. Biol.*, 274 (1997), pp. 446–453.
- Neuefeind, T. et al. (1997b) Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-transferase III from *Zea mays* var. mutin: a leading enzyme in detoxification of maize herbicides. *J. Mol. Biol.*, 274 (1997), pp. 577–587.
- Nikiforova, V. et al. (2003). Transcriptome analysis of sulfur depletion in Arabidopsis thaliana: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity, *Plant J* 33 (2003) 633–650.
- Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49: 249–279.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Foyer, C.H. (2000) Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Proc Biol Sci* 355: 1465–1475.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53, 1283–1304.
- Noctor, G. (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* 29: 409–425.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Foyer, C.H. (2011) Glutathione. In *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C.H. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 35(2):454–84.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C.H. (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiol.* 164, 1636–1648 61.
- Noctor, G. and Foyer, C.H. (2016) Intracellular Redox Compartmentation and ROS-Related Communication in Regulation and Signaling. *Plant Physiology*, 171 (3): 1581–1592.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C.H. (2016) Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, Cell and Environment* 39, 1140–1160.
- Noctor, G., Reichheld, J.P., Foyer, C.H. (2018) ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 80, 3–12.
- Ogawa, K. and Iwabuchi, M. (2001) A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant & Cell Physiology* 42, 286–291.
- Ogawa, K. (2005). Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxid.Redox Signal.* 7, 973–981.
- Okada, T., Bhalla, P.L., Singh, M.B. (2006) Expressed sequence tag analysis of *Lilium longiflorum* generative cells. *Plant Cell Physiol* 47:698–705
- Oo, M.M. et al. (2014) Evaluation of rice promoters conferring pollenspecific expression in a heterologous system, Arabidopsis. *Plant Reprod* 27:47–58

- Op den Camp, R.G.L., Przbyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Göbel, C., Feussner, I., Nater, M., and Apel, K. (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 2320–2332.
- Ozyigit, I. I., Filiz, E., Vatansever, R., Kurtoglu, K. Y., Koc, I., Öztürk, M. X., Anjum, N. A. (2016). Identification and Comparative Analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Scavenging Enzymes (Ascorbate Peroxidase and Glutathione Peroxidase) in Selected Plants Employing Bioinformatics Approaches. *Frontiers in plant science*, 7, 301.
- Owusu-Ansah, E. and Banerjee, U. (2009) Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537–541.
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F., Preuss, D. (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell* 114:47–59.
- Palomero, J., Galán, A.I., Muñoz, M.E., Tuñón, M.J., González-Gallego, J., Jiménez, R. (2001) Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. *Free Rad Biol Med* 2001; 30 (8): 836-45.
- Pandey, P., Singh, J., Achary, V.M.M., Reddy, M.K. (2015) Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Front. Environ. Sci.* 3:25.
- Passaia, G., Spagnolo-Fonini, L., Caverzan, A., Jardim-Messeder, D., Christoff, A.P., Gaeta, M.L., de Araujo-Mariath, J.E., Margis, R., Margis-Pinheiro, M. (2013) The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Science* 208, 93 – 101.
- Passaia, G. and Margis-Pinheiro, M. (2015) Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. *Plant Sci.* 234, 22–26.
- Pasternak, M., Lim, B., Wirtz, M., Hell, R., Cobbett, C.S., Meyer, A.J. (2008). Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *Plant J.* 53, 999–1012.
- Pastori, G.M and Foyer, C. H. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid mediated controls, *Plant Physiol.* 129 (2002) 460-468.
- Pastori, G.M., Kiddle, G., Antoniow, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P.J., Noctor, G., Foyer, C.H. (2003) Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell.* 15(4): 939-951.
- Patel, M.K., Pandey, S., Burritt, D.J., Tran, L.S.P. (2019) Plant responses to low-oxygen stress: Interplay between ROS and NO signaling pathways. *Environmental and Experimental Botany* 161, 134 – 142.
- Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J., Mauch, F. (2007) Identification of PAD2 as a γ-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant J* 49: 159–172
- Pellny, T.K., Locato, V., Vivancos, P.D., Markovic, J., De Gara, L., Pallardó, F.V., Foyer, C.H. (2009) Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to poly (ADP-ribose) polymerase activity and nuclear localization of glutathione during exponential growth of *Arabidopsis* cells in culture. *Mol Plant* 2: 442–456.
- Pinney, K. and V.S. Polito. (1990). Flower initiation in ‘Manzanillo’ olive. *Acts Hort.* 286:203–205.
- Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R., Boyer-Guittaut, M. (2015) Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* 4, 184–192.
- Polle, A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* 126, 445-462.
- Potocký, M., Pejchar, P., Gutkowska, M., Jiménez-Quesada, M.J., Potocká, A., Alché, J.D., Kost, B., Žárský, V. (2012) NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *J Plant Physiol.* 2012 Nov 1;169(16):1654-63.
- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., Horemans, N. (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem* 40: 537-548.

- Queval, G., Issakidis-Bourguet, E., Hoerberichts, F.A., Vadorpe, M., Gakière, B., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2007) Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *Plant J* 52: 640–657.
- Queval, G., Thominet, D., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Gakière, B., Noctor, G. (2009) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Mol Plant* 2: 344–356.
- Queval, G. et al. (2011) Increased intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ.* 2011 Jan; 34 (1): 21-32.
- Rallo, L. y Cuevas, J. (2001) Fructificación y producción. En: *El Cultivo del olivo*. Barranco, D., Fernández-Escobar, R. (Eds.). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa, España. Pp 121-151.
- Ramos, J., Matamoros, M.A., Naya, L., James, E.K., Rouhier, N., Sato, S., Tabata, S. and Becana, M. (2009) The glutathione peroxidase gene family of *Lotus japonicus*: characterization of genomic clones, expression analyses and immunolocalization in legumes. *New Phytologist*, 181: 103-114.
- Rao, A. C. and Reddy, A. R. (2008) Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells, in: N.A. Khan, S. Gill, S. Umar (Eds.), *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*, Springer, 2008, pp. 111-147.
- Rasmusson, A.G. and Møller, I.M. (1990). NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant Physiology* 94 1012–1018.
- Rawlins, M. R. et al. (1995). Characterisation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding glutathione synthetase. *FEBS Lett.* 376, 81–86.
- Reczek, C.R. and Chandel, N.S. (2015) ROS-dependent signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 8–13.
- Reichheld, J.P., Khaffif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G., Meyer, Y. (2007) Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 19: 1851–1865.
- Reinemer, P. et al. (1996) Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J. Mol. Biol.*, 255 (1996), pp. 289–309.
- Rentel, M.C. and Knight, M.R. (2004) Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*; 135 (3): 1471-9.
- Rezaei, M. K. et al. (2013) Glutathione S-transferase (GST) family in barley: Identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern. *Journal of Plant Physiology* 170 (2013) 1277–1284
- Ristow, M. and Schmeisser, S. (2011) Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 327–336 70.
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 130(3):1143-51
- Rodríguez-García, M.I., Alché, J.D., Castro, A.J., Suárez, C., Rejón, J.D. (2012) Pollen and pistil features involved in the reproductive biology of the olive (*Olea europaea L.*). *Acta horticulturae* 932 (932): 83-90.
- Rogers, H. J. (2012) Is there an important role for reactive oxygen species and redox regulation during floral senescence? *Plant, Cell and Environment* (2012) 35, 217–233.
- Romero-Puertas, M. C. et al. (2006). Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist* 170 43-52 (2006).
- Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P. (2002) Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J Biol Chem* 277: 13609–13614.
- Rouhier, N., Jacquot, J.P. (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, Issue 11, 1413-1421.

- Rouhier, N., Cerveau, D., Couturier, J., Reichheld, J.P., Rey, P. (2015) Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. *Biochim Biophys Acta*, 1850, 1479-1496.
- Rutley, N. and Twell, D. (2015) A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reprod.* 28, 73–89.
- Sabetta W., Paradiso A., Paciolla C., de Pinto M.C. (2017) Chemistry, Biosynthesis, and Antioxidative Function of Glutathione in Plants. In: Hossain M., Mostofa M., Diaz-Vivancos P., Burritt D., Fujita M., Tran L.S. (eds) *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance*. Springer, Cham. pp. 1-27. ISBN: 978-3-319-66681-5.
- Sanzol, J. and Herrero, M. (2001) The “effective pollination period” in fruit trees. *Scientia Horticulturae*, Volume 90, Issues 1–2, 29 October 2001, Pages 1-17
- Sanzol, J. et al. (2003) Stigmatic Receptivity Limits the Effective Pollination Period in ‘Agua de Aranjuez’ Pear. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128 (4): 458-462.
- Sart, S., Song, L., Li, Y. (2015) Controlling redox status for stem cell survival, expansion, and differentiation. *Oxid Med. Cell. Longev* 2015, 105135.
- Schieber, M. and Chandel, N.S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462 23.
- Schippers, J.H.M., Nguyen, H.M., Lu, D., Schmidt, R., Mueller-Roeber, B. (2012) ROS homeostasis during development: an evolutionary conserved strategy. *Cell Mol Life Sci*, 69, 3245-3257.
- Schippers, J. H. M. et al. (2016) Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Current Opinion in Plant Biology* 2016, 29:121–128.
- Schlaeppli, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F., Reymond, P. (2008) The glutathione-deficient mutant pad2-1 accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant J* 55: 774–786
- Schmidt, R. and Schippers, J.H. (2015) ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 1497–1508 59.
- Schwarzländer, M., Fricker, M.D., Müller, C., Marty, L., Brach, T., Novak, J., Sweetlove, L.J., Hell, R., Meyer, A.J. (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J. Microsc.* 231, 299–316.
- Scott, R.J., Spielman, M., Dickinson, H.G. (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell* 16:S46–S60
- Speranza, A., Crinelli, R., Scoccianti, V., Geitmann, A. (2012) Reactive oxygen species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit. *Plant Biology* 14, 64–76.
- Seelig, G. F., Simonsen, R.P., Meister, A. (1984). Reversible dissociation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J. Biol. Chem.* 259, 9345–9347.
- Sewelam, N., Kazan, K., Schenk, P.M. (2016) Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Front. Plant. Sci.* 7, 187 55.
- Shao, N., Beck, C.F., Lemaire, S.D., Krieger-Liszkay, A. (2008). Photosynthetic electron flow affects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling by inactivation of catalase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 228:1055–66
- Sirokmany, G., Donkó, Á., Geiszt, M. (2016) Nox/Duox family of NADPH oxidases: lessons from knockout mouse models. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 318–327.
- Skipsey, M. et al. (2005). Diversification in sub-strate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). *Biochem. J.* 391, 567–574.
- Smith I.K., Kendall A.C., Keys A.J., Turner J.C., Lea, P.J. (1984) Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley. *Plant Sci. Lett.* 37, 29–33.
- Smith, I.K. et al. (1985) The regulation of the biosynthesis of glutathione in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L). *Plant Sci* 41: 11–17
- Song, Y., Miao, Y., Song, C.P. (2014) Behind the scenes: the roles of reactive oxygen species in guard cells. *New Phytol.* 201, 1121–1140.
- Soranzo, N., Sari Gorla, M., Mizzi, L., De Toma, G., Frova C. (2004) Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol Genet Genomics.*; 271 (5): 511-21.
- Speranza, A. et al. (2012) Reactive oxygen species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit. *Plant Biol (Stuttg)*. 2012 Jan;14(1):64-76.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X., Pieterse, C.M. (2003) NPR1

- modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15: 760–770.
- Stevens, R.G. et al. (2000). Characterization of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta* 211 537–545.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J.P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.*; 35: 235-70.
- Sumimoto, H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* 275, 3249–3277.
- Sung D.Y., Lee D., Harris H., Raab A., Feldmann J., Meharg A., Kumabe B., Komives E.A., Schroeder J.I. (2007) Identification of an arsenic tolerant double mutant with a thiol-mediated component and increased arsenic tolerance in *phyA* mutants. *Plant J.*; 49: 1064–75.
- Sung D.Y., Kim T.H., Komives E.A., Mendoza-Cózatl D.G., Schroeder J.I. (2009) ARS5 is a component of the 26S proteasome complex, and negatively regulates thiol biosynthesis and arsenic tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.*; 59: 802–812.
- Suzuki, N. Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., Mittler, R. (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 691–699.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 35: 259-270.
- Szechynska-Hebda, M., Kruk, J., Górecka, M., Karpinska, B., Karpinski, S. (2010) Evidence for Light Wavelength-Specific Photoelectrophysiological Signaling and Memory of Excess Light Episodes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 22: 2201–2218.
- Takahashi, H., Chen, Z., Du, H., Liu, Y., Klessig, D.F. (1997) Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J.* 11(5): 993-1005.
- Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C., Le Maréchal, P., Rouhier, N., Lemaire, S.D., Rey, P. (2009) Regeneration mechanisms of *Arabidopsis thaliana* methionine sulfoxide reductases B by glutaredoxins and thioredoxins. *J Biol Chem* 284: 18963–18971.
- Toppo, S. et al. (2008) Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily, *Antioxid.Redox Signal.* 10 (2008) 1501–14.
- Tormos, K.V., Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Chandel, N.S. (2011) Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell.Metab.*14, 537–544 41.
- Traverso, J.A., Pulido, A., Rodríguez-García, M.I., Alché, J.D. (2013) Thiol-based redox regulation in sexual plant reproduction: new insights and perspectives. *Front. Plant.Sci.* 4, 465 62.
- Trivedi, D. K. et al (2013) Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from rice and *Arabidopsis*. *Plant signaling & Behavior*. Volume 8, 2013 - Issue 2
- Truong, T.H. and Carroll, K.S. (2013) Redox regulation of protein kinases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, 332–356 24.
- Tsukagoshi, H. et al. (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143: 606–616
- Ullmann, P. et al. (1996). Cloning of *Arabidopsis thaliana* glutathione syn-thetase (GSH2) by functional comple-mentation of a yeast *gsh2* mutant. *Eur. J. Biochem.* 236, 662–669.
- Vaahtera, L., Brosché, M., Wrzaczek, M., Kangasjärvi, J. (2014) Specificity in ROS signaling and transcript signatures. *Antioxid.Redox Signal.* 21 (9), 1422–1441.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W., Foyer, C.H. (2000) Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol* 123: 1289–1300.
- Vanden Berghe, T. Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P. (2014) Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 135–147.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene



- expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol* 139: 806–821.
- Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., van de Cotte, B., Morsa, S., Ravanat, J.L., Hegie, A., Triantaphylidès, C., Shulaev, V., Van Montagu, M.C., Van Breusegem, F., Mittler, R. (2011) Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1711–1716.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Van Montagu, M., Inzé, D., May, M.J., Sung, Z.R. (2000) The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12: 97–110.
- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J., Rausch, T. (2005). Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J.* 41, 15–30.
- Wan, C. et al (2007) Damage of oxidative stress on mitochondria during microspores development in Honglian CMS line of rice. *Plant Cell Rep* (2007) 26:373–382.
- Wang, C. L., and Oliver, D. J. (1997a). Identification of a putative flexible loop in *Arabidopsis* glutathione synthetase. *Biochem. J.* 322, 241–244.
- Wang, C. L., and Oliver, D. J. (1997b). Glutathione synthetase: similarities of the proteins from *Schizosaccharomyces pombe* and *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 326, 563–566.
- Wang, Z. et al. (2009) Conserved functions of *Arabidopsis* and rice CC-type glutaredoxins in flower development and pathogen response. *Mol Plant* 2: 323–335
- Wang, D., Malo, D., Hekimi, S. (2010) Elevated mitochondrial reactive oxygen species generation affects the immune response via hypoxia-inducible factor-1alpha in long-lived Mcl1+/\_ mouse mutants. *J. Immunol.* 184, 582–590.
- Waszczak, C. Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J., Van Breusegem, F. (2015) Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *J. Exp. Bot.* 66, 2923–2934 50.
- Wei, L.Q., Xu, W.Y., Deng, Z.Y., Su, Z., Xue, Y., Wang, T. (2010) Genomescale analysis and comparison of gene expression profiles in developing and germinated pollen in *Oryza sativa*. *BMC Plant Biol* 11:338
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R., Chandel, N.S. (2010) Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 8788–8793 28.
- Wendehenne, D., Gao, Q.M., Kachroo, A., Kachroo, P. (2014) Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 127–134 60.
- West, A.P., Shadel, G.S., Ghosh, S. (2011a) Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 389–402 31.
- West, A.P., Brodsky, I.E., Rahner, C., Woo, D.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M.C., Choi, Y., Shadel, G.S., Ghosh, S. (2011b) TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472, 476–480.
- Weydert, C.J. and Cullen, J.J. (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 5(1), 51–66.
- Wheeler, G.L., Jones, M.A., Smirnoff, N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393(6683): 365–9.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J* 16: 4806–4816.
- Wingate, V., Lawton, M.A., Lamb, C.J. (1988) Glutathione Causes a Massive and Selective Induction of Plant Defense Genes. *Plant physiology* 87(1):206–10.

- Wrzaczek, M., Brosché, M., Kangasjärvi, J. (2013) ROS signaling loops - production, perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 16 (5): 575-582.
- Wu, J., Qu, T., Chen, S., Zhao, Z., An, L. (2009). Molecular cloning and characterization of a gamma-glutamylcysteine synthetase gene from *Chorispora bungeana*. *Protoplasma* 235, 27–36.
- Xia, X.J., Zhou, Y.H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C.H., Yu, J.Q. (2015) Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 66, 2839–2856 57.
- Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., Kang, R., Tang, D. (2016) Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ.* 23, 369–379.
- Xin, H.P., Peng, X.B., Ning, J., Yan, T.T., Ma, L.G., Sun, M.X. (2011) Expressed sequence-tag analysis of tobacco sperm cells reveals a unique transcriptional profile and selective persistence of paternal transcripts after fertilization. *Sex Plant Reprod* 24:37–46
- Xu, J. et al. (2015) Transgenic *Arabidopsis* Plants Expressing Tomato Glutathione S-Transferase Showed Enhanced Resistance to Salt and Drought Stress. *PLOS ONE* 10(9): e0136960.
- Xue, Y., Liu, Z., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X., Ren, J. (2010) GPS-SNO: Computational Prediction of Protein S-Nitrosylation Sites with a Modified GPS Algorithm. *PLoS ONE* 5, e11290.
- Yamaguchi, H., Kato, H., Hata, Y., Nishioka, T., Kimura, A., Oda, J., Katsube, Y. (1993) Three-dimensional Structure of the Glutathione Synthetase from *Escherichia coli* B at 2.0 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 229(4), 1083-1100.
- Yanagida, M., Mino, M., Iwabuchi, M., Ogawa, K. (2004) Reduced Glutathione is a Novel Regulator of Vernalization-Induced Bolting in the Rosette Plant *Eustoma grandiflorum*. *Plant and Cell Physiology*, 45, Issue 2, 129–137.
- Yanes, O., Clark, J., Wong, D.M., Patti, G.J., Sánchez-Ruiz, A., Benton, H.P., Trauger, S.A., Despons, C., Ding, S., Siuzdak, G. (2010) Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol* 6: 411–417.
- Yeung, E.C., Belmonte, M.F., Tu, L.T.T., Stasolla, C. (2005) Glutathione modulation of *in vitro* development. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 41:584–590.
- Yousuf, P. Y. et al. (2012) Role of glutathione reductase in plant abiotic stress, in: P. Ahmad, M.N.V. Prasad (Eds.), *Abiotic Stress Responses in Plants*, Springer, 2012, pp. 149e158.
- Zafra, A., Rodríguez-García, M.I., Alché, J.D. (2010). Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biology*, 10(1), 36.
- Zafra, A., Rejón, J.D., Hiscock, S.J., Alché, J.D. (2016) Patterns of ROS Accumulation in the Stigmas of Angiosperms and Visions into Their Multi-Functionality in Plant Reproduction. *Front Plant Sci.* 2016;7:1112.
- Zafra, A., Castro, A.J., Alché, J.D. (2018). Identification of novel superoxide dismutase isoenzymes in the olive (*Olea europaea* L.) pollen. *BMC Plant Biol*, 18(1):114. doi: 10.1186/s12870-018-1328-z.
- Zaidi, M. A. et al (2012) A molecular and proteomic investigation of proteins rapidly released from triticale pollen upon hydration. *Plant Mol Biol* (2012) 79:101–121.
- Zechmann, B. et al. (2008) Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *J Exp Bot.* 2008; 59 (14): 4017-27.
- Zechmann, B. and Muller, M. (2010) Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma*. 2010 Oct;246(1-4):15-24.
- Zechmann, B. et al. (2011a) Glutathione synthesis is essential for pollen germination in vitro. *BMC Plant Biology* 2011, 11:54
- Zechmann, B et al. (2011b) Subcellular distribution of glutathione in the gametophyte. *Plant Signaling & Behavior* 6:9, 1259-1262; September 2011; ©2011 Landes Bioscience.
- Zellnig, G., Tausz, M., Pesec, B., Grill, D., Müller, M. (2000) Effects of glutathione on thiol redox systems, chromosomal aberrations, and the ultrastructure of meristematic root cells of *Picea abies* (L.)Karst. *Protoplasma*, 212:227-235.
- Zhou, Y., Hu, L., Ye, S., Jiang, L., Liu, S. (2018). Genome-wide identification of glutathione peroxidase (GPX) gene family and their response to abiotic stress in cucumber. *3 Biotech*, 8(3), 159.

- Ziemann, M. et al. (2009) Origin and diversification of land plant CC-type glutaredoxins. *Genome Biol Evol* 1: 265–277
- Zou, J. et al (2009) Comparative proteomic analysis of Arabidopsis mature pollen and germinated pollen. *J Integr Plant Biol* 51:438–455.
- Zuo, L. et al. (2015) Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol. (Oxf)* 214, 329–348.



**ANEXOS**

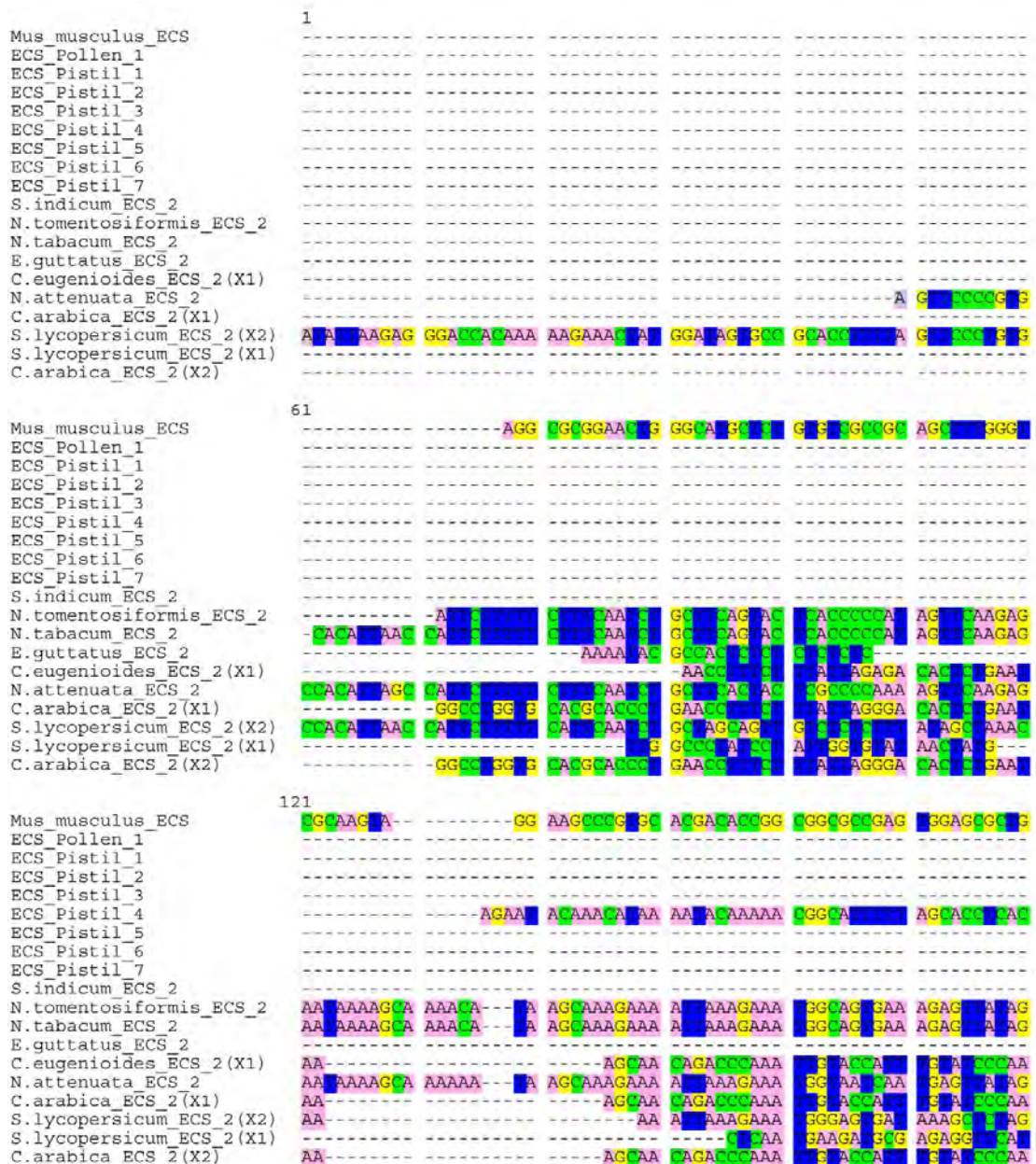


1. **Anexo 1: Alineamientos de secuencias nucleotídicas de los genes de interés.**
2. Anexo 2: Secuencias completas (nucleotídicas y aminoacídicas) de los genes de interés.
3. Anexo 3: Árbol filogenético de secuencias aminoacídicas de GR.
4. Anexo 4: Análisis LC-MS del contenido en glutatión y análisis ratiométrico de GSH/GSSG durante el desarrollo floral en mutantes *pad2* y *clt*.





# 1.1. Alineamiento de las secuencia nucleotídicas de la $\gamma$ -ECS de polen y pistilo de olivo junto con otras especies.



181

```

Mus_musculus_ECS      CCGGGGGGG
ECS_Pollen_1         -----
ECS_Pistil_1         -----
ECS_Pistil_2         -----
ECS_Pistil_3         -----
ECS_Pistil_4         CCAAGCAA
ECS_Pistil_5         -----
ECS_Pistil_6         -----
ECS_Pistil_7         -----
S.indicum_ECS_2      -----
N.tomentosiformis_ECS_2 CCGCCCAGC AATCCAAAA AATAAAGAAA CAAATTTGG GACAGCCAA TACTA
N.tabacum_ECS_2      CCGCCCAGC AATCCAAAA AATAAAGAAA CAAATTTGG GACAGCCAA TACTA
E.guttatus_ECS_2     -----
C.eugenoides_ECS_2(X1) GCACGTACC CCGGTAACA CCGTATTTG AGCTCAATC TATGACCCT GCGCAATCC
N.attenuata_ECS_2   CCGCCCAGC AATCCAAAA AATAAAGAAA CAAATTTGG GACAGCCAA TACTA
C.arabica_ECS_2(X1)  GCACGTACC CCGGTAACA CCGTATTTG AGCTCAATC TATGACCCT GCGCAATCC
S.lycopersicum_ECS_2(X2) CCGCCAGC ACACAAA --AATCCAA CATTGCTCG AATCCCAA TGTCTAAT
S.lycopersicum_ECS_2(X1) GCACGTACC CCA
C.arabica_ECS_2(X2)  GCACGTACC CCGGTAACA CCGTATTTG AGCTCAATC TATGACCCT GCGCAATCC

```

241

```

Mus_musculus_ECS      CAGGGGGGA GGGGGGGG GGGAGGGGA GAGGGGGGG GGGGAGAGA CCGCGACCG
ECS_Pollen_1         CAGGGGGGA GGGGGGGG GGGAGGGGA GAGGGGGGG GGGGAGAGA CCGCGACCG
ECS_Pistil_1         -----
ECS_Pistil_2         ---GAAATG GAAATGCG TCTGCTGGA TAAAAATCAC AGCTGAAAGG CCGTGGCA
ECS_Pistil_3         -----
ECS_Pistil_4         ---TCACTCTCA TCAAAATTC TCAAAATCAA AGTAGGCA
ECS_Pistil_5         -----
ECS_Pistil_6         -----
ECS_Pistil_7         -----
S.indicum_ECS_2      -----
N.tomentosiformis_ECS_2 -----
N.tabacum_ECS_2      -----
E.guttatus_ECS_2     -----
C.eugenoides_ECS_2(X1) AAGGGCGG GATCCGCGG TCACTCAA GCACTTAC TCCCGCAA CCGGAAAT
N.attenuata_ECS_2   -----
C.arabica_ECS_2(X1)  AAGGGCGG GATCCGCGG TCACTCAA GCACTTAC TCCCGCAA CCGGAAAT
S.lycopersicum_ECS_2(X2) AATAATGGA AGGTTCT TCAATCTA GCAATCTA TAGAACAAC CCAACAAG
S.lycopersicum_ECS_2(X1) AAAAAAGAC GATAACAT TATTAGTA TCTCTCTG TATATAA SCAAAA---
C.arabica_ECS_2(X2)  AAGGGCGG GATCCGCGG TCACTCAA GCACTTAC TCCCGCAA CCGGAAAT

```

301

```

Mus_musculus_ECS      GGGCTCAA CCGGGGGGG GGGGGGAGC GGAGGGGAA GGGAGGGAA GCGGGCGGG
ECS_Pollen_1         -----
ECS_Pistil_1         -----
ECS_Pistil_2         AAT
ECS_Pistil_3         -----
ECS_Pistil_4         AAT
ECS_Pistil_5         -----
ECS_Pistil_6         -----
ECS_Pistil_7         -----
S.indicum_ECS_2      -----
N.tomentosiformis_ECS_2 -----
N.tabacum_ECS_2      -----
E.guttatus_ECS_2     -----
C.eugenoides_ECS_2(X1) -----
N.attenuata_ECS_2   -----
C.arabica_ECS_2(X1)  -----
S.lycopersicum_ECS_2(X2) CTAATTTT CAGTTTAC GAGCCAAGCC TCTGGGTAG TGGGTGGC CCAATCTAT
S.lycopersicum_ECS_2(X1) -----
C.arabica_ECS_2(X2)  -----

```

361

Mus\_musculus\_ECS  
 ECS\_Pollen\_1  
 ECS\_Pistil\_1  
 ECS\_Pistil\_2  
 ECS\_Pistil\_3  
 ECS\_Pistil\_4  
 ECS\_Pistil\_5  
 ECS\_Pistil\_6  
 ECS\_Pistil\_7  
 S.indicum\_ECS\_2  
 N.tomentosiformis\_ECS\_2  
 N.tabacum\_ECS\_2  
 E.guttatus\_ECS\_2  
 C.eugenoides\_ECS\_2(X1)  
 N.attenuata\_ECS\_2  
 C.arabica\_ECS\_2(X1)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X2)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X1)  
 C.arabica\_ECS\_2(X2)

```

GGCCCAGG GGGCCCCAG AGCGGA  GGGGG  GGGAGGAGG
-----
AAGCGAGT TCCGCCAGC  TTAAG
-----
CTGATCTTAA CAACCTCAGC  TTTTAA
-----
-----
-----
AAAG GCGCTALCG  TTAAG
GGCTTACT GAGCCAAGG  ACAAG
GGTTCCTT GAGCCAAGG  ACAAG
TSCCAAG AATAAAGGG  CTAGG
GCTTACT GAGCCAAGG  ACAAG
TGTCCCAAG AATAAAGGG  CTAGG
GGCTTAA GATGCTCAA  TGAAGATCTG AGAGGCTCA  TGAAGCTTCT  CCA  CAAAAG
TSCCAAG AATAAAGGG  CTAGG
  
```

421

Mus\_musculus\_ECS  
 ECS\_Pollen\_1  
 ECS\_Pistil\_1  
 ECS\_Pistil\_2  
 ECS\_Pistil\_3  
 ECS\_Pistil\_4  
 ECS\_Pistil\_5  
 ECS\_Pistil\_6  
 ECS\_Pistil\_7  
 S.indicum\_ECS\_2  
 N.tomentosiformis\_ECS\_2  
 N.tabacum\_ECS\_2  
 E.guttatus\_ECS\_2  
 C.eugenoides\_ECS\_2(X1)  
 N.attenuata\_ECS\_2  
 C.arabica\_ECS\_2(X1)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X2)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X1)  
 C.arabica\_ECS\_2(X2)

```

AGGGGGCA GGGGCTGCTG  CCCAAGGT  GGCATGAG  CTG  GGAAGAGA
-----
----- GCCCT  TTAGAGCTG  GTTCATCACA  TTGCA  TCA  TCGACCAA
GAA  GGCTGGTGA  TCCAGGGCTG  GTTCATCACA  ATGCACTCA  TAAAAAAA
GGAT  GTTCACTGATG  CCCCAGATCT  GTTCATCACA  TTGCA  TCA  TCGACCAA
-----
GTA  GGCCCTGATG  CCCACCCTGA  GTTCATGCA  CTGGCTTCT  AT  CAAAACA
GAT  GGCCCTGATG  TCTAGGCTAG  GTTCATGCA  TTGCACTTAC  TCAAAAAGA
GAT  GGCCCTGATG  TCTAGGCTAG  GTTCATGCA  TTGCACTTAC  TCGAAAAGA
AGTAGCCAT  GGCCCTGATG  TCCCATCTTG  GTTCATCACC  TTGCACTTAC  ATGGAGGCTG
TAAAAAAA  GGCCCTGATG  TCCAGGGCTG  GTTCATCACA  CTGGCTTAC  CTGAGATCTG
----- GAT  GGCCCTGATG  CTGAGGCTAG  GTTCATGCA  TTGCACTTAC  TCGAAAAGA
TAAAAAAA  GGCCCTGATG  TCCAGGGCTG  GTTCATCACA  CTGGCTTAC  CTGAGATCTG
CAAAAACA  GGCCCTGATG  TCTAGGCTAG  GTTCATCACA  TTGCACTTAC  TCGAAAAGG
----- GAA  GGCCCTGATG  TCTAGGCTAG  GTTCATGCA  TTGCACTTAC  TCGAAAAGG
TAAAAAAA  GGCCCTGATG  TCCAGGGCTG  GTTCATGCA  CTGGCTTAC  CTGAGATCTG
  
```

481

Mus\_musculus\_ECS  
 ECS\_Pollen\_1  
 ECS\_Pistil\_1  
 ECS\_Pistil\_2  
 ECS\_Pistil\_3  
 ECS\_Pistil\_4  
 ECS\_Pistil\_5  
 ECS\_Pistil\_6  
 ECS\_Pistil\_7  
 S.indicum\_ECS\_2  
 N.tomentosiformis\_ECS\_2  
 N.tabacum\_ECS\_2  
 E.guttatus\_ECS\_2  
 C.eugenoides\_ECS\_2(X1)  
 N.attenuata\_ECS\_2  
 C.arabica\_ECS\_2(X1)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X2)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X1)  
 C.arabica\_ECS\_2(X2)

```

CCAGGGCA GCGGACCA  GCGGGAGG  ACGCACTC  CCAGCTCTG  CAACTTACC
-----
GAGCTTAA  AGCTAGACTC  AATGGGAA  CCA  ATAGCA  TGC  T
AAGAGCAA  AGCTAGACTC  AATGGGAA  CCA  ATAGCA  TGC  G
-----
GAGCTTAA  AGCTAGACTC  AATGGGAA  CCA  ATAGCA  TGC  T
-----
AAGCCAAA  AGCTAGACTC  AATGGGAA  CCA  ATAGCA  TGC  C
TAAAATTA  AAGTGGACAC  A  AAGCA  TAC  G
GAAAATTA  AAGTGGACAC  A  AAGCA  TAC  G
GAGCTTAA  AGCTAGAAA  TATGGGAA  CCA  ATAGCTTAC  A
AAGAGCAA  AGCTGGACAC  AGCTGGCT  AATAGCC  AAC  C
GAAAATTA  AAGTGGACAC  A  GAGCA  TAC  G
AAGAGCAA  AGCTGGACAC  AGCTGGCT  AATAGCC  AAC  C
AAGAGCAA  CAGTGGACAC  A  GAAGCA  TAC  T
AAGAGCAA  CAGTGGACAC  A  GAAGCA  TAC  T
AAGAGCAA  AGCTGGACAC  AGCTGGCT  AATAGCC  AAC  C
  
```

541

```

Mus_musculus_ECS      A G G A G C A A G G A C G G C A C A A G G A C G C G C A A A G C S G G G C A C G A G G C S G A G C A C A C
ECS_Pollen_1         -----
ECS_Pistil_1         -----
ECS_Pistil_2         -----
ECS_Pistil_3         -----
ECS_Pistil_4         -----
ECS_Pistil_5         -----
ECS_Pistil_6         -----
ECS_Pistil_7         -----
S.indicum_ECS_2      -----
N.tomentosiformis_ECS_2 -----
N.tabacum_ECS_2      -----
E.guttatus_ECS_2     -----
C.eugenioïdes_ECS_2(X1) -----
N.attenuata_ECS_2    -----
C.arabica_ECS_2(X1)  -----
S.lycopersicum_ECS_2(X2) -----
S.lycopersicum_ECS_2(X1) -----
C.arabica_ECS_2(X2)  -----

```

601

```

Mus_musculus_ECS      C G C C A C G C G A G A G A G A A A A A A G G A A A G C C A G C G T A G T S A A C G G A G G C G A T C
ECS_Pollen_1         -----
ECS_Pistil_1         C C G C A C G C G G A A C C C C A A A G C C A A C A A A G C T A N A A T T C G A A G C C C G A A G
ECS_Pistil_2         C G A C C C C G C G G A A C C C C G A A G C A A T C G A A A A A G A A T T C A G A G G C C C S T A
ECS_Pistil_3         -----
ECS_Pistil_4         C C G C A C G C G G A A C C C C A A A G C C A A C A A A G C T A N A A T T C G A A G C C C C A A G
ECS_Pistil_5         -----
ECS_Pistil_6         C G A C C C C G C G G A A C C C C G A A G C A A T C G A A A A A G A A T T C A G A G G C C C G T A
ECS_Pistil_7         -----
S.indicum_ECS_2      C S C G C C C C A G A C C C C C A A A G C C A G C C A A A G C C G A G A C C G G A C A C G A A G
N.tomentosiformis_ECS_2 A T T C C T C A C G G A A C C C C A A A A C G A A C C C A G G G G A C C A T T C C G A C C G C C C T A A
N.tabacum_ECS_2      A T T C C T C A C G G A A C C C C A A A A C G A A C C C A G G G G A C C A T T C C G A C C G C C T A A
E.guttatus_ECS_2     A C G C C C C G C G G A G C C A C C G A A G G C G G C C C A A A A A C G G A G T T C A G A C C G A A G
C.eugenioïdes_ECS_2(X1) A T T C C T C G G C A A A A C C C C G A A G C C A G C G A A G G A G T T C C A T G G C C C G G C
N.attenuata_ECS_2    A T T C C T C A C G G A A C C C C A A A A C C A A C C C A A G G G A C C A T T C C G A C C G C C G G A A
C.arabica_ECS_2(X1)  A T T C C T C G G C A A A C C C C G A A G C C A A G C C A A G C C A A G G A G T T C C A T G G C C C G G C
S.lycopersicum_ECS_2(X2) A T T C C T C A C G C A A C C C C C A A G A C G A C C C A A G G G A A T A T T C G A A C A C A T A G G A G
S.lycopersicum_ECS_2(X1) A T T C C T C A C G C A A C C C C C A A G A C G A C C C A A G G G A A T A T T C G A A C A C A T A G G A G
C.arabica_ECS_2(X2)  A T T C C T C G G C A A A C C C C G A A G C C A A G C C A A G C C A A G G A A G G A G T T C C A T G G C C C G G C

```

661

```

Mus_musculus_ECS      A G C C G A G A C C G C C A G G A G A A G G G G G A G A G G A A A A C C C C A A C C A C C C G A A C C C C G A
ECS_Pollen_1         -----
ECS_Pistil_1         -----
ECS_Pistil_2         -----
ECS_Pistil_3         -----
ECS_Pistil_4         -----
ECS_Pistil_5         -----
ECS_Pistil_6         -----
ECS_Pistil_7         -----
S.indicum_ECS_2      -----
N.tomentosiformis_ECS_2 -----
N.tabacum_ECS_2      -----
E.guttatus_ECS_2     -----
C.eugenioïdes_ECS_2(X1) -----
N.attenuata_ECS_2    -----
C.arabica_ECS_2(X1)  -----
S.lycopersicum_ECS_2(X2) -----
S.lycopersicum_ECS_2(X1) -----
C.arabica_ECS_2(X2)  -----

```

721

Mus_musculus_ECS	GACCAGAGTA	GGGAGTTAG	ATGATCGAAG	GAACGGCTGG	CCAGCCCAC	GGAGGAACTGA
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-AAGAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAAGCA
ECS_Pistil_2	-AAGAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	GGAAGA
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-AAGAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAAGCA
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-AAGAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	GGAAGA
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	-AAGAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAAGA
N.tomentosiformis_ECS_2	-GCCGGGAAA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAGGA
N.tabacum_ECS_2	-GCCGGGAAA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAGGA
E.guttatus_ECS_2	-AAGAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAGGA
C.eugenoides_ECS_2(X1)	-ACCAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAGGA
N.attenuata_ECS_2	-GCCGGGAAA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAGGA
C.arabica_ECS_2(X1)	-ACCAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAGGA
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-ACCAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAGGA
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-ACCAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAGGA
C.arabica_ECS_2(X2)	-ACCAGGCGA	ATGATCGAAG	AAGTCC	-----	CCCAAC	AGAGGA

781

Mus_musculus_ECS	GGTGGAGCTT	GAACAATCTG	GAGGCCAATA	GAGGAAAAG	CCGGAAGGAG	GCTACTTCTG
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	GGTGGAGCTT	GAACAATCTG	GAGGCC	ACTG	ACCGAAGAAG	AT
ECS_Pistil_2	GGTGGAGCTT	GAACAATCTG	GAGGCC	ACTG	ACGAAAGAAG	AT
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	GGTGGAGCTT	GAACAATCTG	GAGGCC	ACTG	ACCGAAGAAG	AT
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	GGTGGAGCTT	GAACAATCTG	GAGGCC	ACTG	ACGAAAGAAG	AT
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	GGTGGAGCTT	GAACAATCTG	GAGGCC	ACTG	ACAAAAGAAG	AT
N.tomentosiformis_ECS_2	GGCGGT	GGTGGAGCTT	GAGGCC	ACTG	ACAAAAGAAG	AT
N.tabacum_ECS_2	GGCGGT	GGTGGAGCTT	GAGGCC	ACTG	ACAAAAGAAG	AT
E.guttatus_ECS_2	GGCGGT	GGTGGAGCTT	GAGGCC	ACTG	ACGAAAGAAG	AT
C.eugenoides_ECS_2(X1)	GGTGGAGCTT	GGTGGAGCTT	GAGGCC	ACTG	ACAAAAGAAG	AT
N.attenuata_ECS_2	GGCGGT	GGTGGAGCTT	GAGGCC	ACTG	ACAAAAGAAG	AT
C.arabica_ECS_2(X1)	GGTGGAGCTT	GGTGGAGCTT	GAGGCC	ACTG	ACAAAAGAAG	AT
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	GGTGGAGCTT	GGTGGAGCTT	GAGGCC	ACTG	ACAAAAGAAG	AT
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	GGTGGAGCTT	GGTGGAGCTT	GAGGCC	ACTG	ACAAAAGAAG	AT
C.arabica_ECS_2(X2)	GGTGGAGCTT	GGTGGAGCTT	GAGGCC	ACTG	ACAAAAGAAG	AT

841

Mus_musculus_ECS	AAGTAGGAGA	GCAATAGGC	CTGTCAGCA	TACTTCAAT	CCCCAGAGTA	GGCTGTCTCTG
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
ECS_Pistil_2	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
N.tomentosiformis_ECS_2	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
N.tabacum_ECS_2	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
E.guttatus_ECS_2	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
C.eugenoides_ECS_2(X1)	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
N.attenuata_ECS_2	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
C.arabica_ECS_2(X1)	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG
C.arabica_ECS_2(X2)	CTGTAGG	CAACCTAGC	-----	-----	-----	CTCTG

901

Mus_musculus_ECS	GA	TACAG	GCCAGAAC	AGACCCAA	CC	CAGAGGAAGG	AGGCGGAA	CA	AAG	CCG	CG
ECS_Pollen_1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ECS_Pistil_1	GT	CCA	---	---	---	AGCC	AAGGAAAA	---	---	---	---
ECS_Pistil_2	GT	CCA	---	---	---	AGCC	AAGGAAAA	---	---	---	---
ECS_Pistil_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ECS_Pistil_4	GT	CCA	---	---	---	AGCC	AAGGAAAA	---	---	---	---
ECS_Pistil_5	---	---	---	---	---	CA	G	CA	AAAAAA	CGAAG	CG
ECS_Pistil_6	GT	CCA	---	---	---	AGCC	AAGGAAAA	---	---	---	---
ECS_Pistil_7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S.indicum_ECS_2	GT	CCA	---	---	---	AGCC	AAGG	CAAC	---	---	---
N.tomentosiformis_ECS_2	GA	GCA	---	---	---	AA	C	CAAAGAAAA	---	---	---
N.tabacum_ECS_2	GA	GCA	---	---	---	AA	C	CAAAGAAAA	---	---	---
E.guttatus_ECS_2	GC	GCA	---	---	---	AGCC	AAGG	CAAAA	---	---	---
C.eugenoides_ECS_2(X1)	GA	GCA	---	---	---	AGCC	AAGG	CAGAAA	---	---	---
N.attenuata_ECS_2	GA	GCA	---	---	---	AA	C	CAAAGAAAA	---	---	---
C.arabica_ECS_2(X1)	GA	GCA	---	---	---	AGCC	AAGG	CAGAAA	---	---	---
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	GA	GCA	---	---	---	AA	C	CAAAGAAAA	---	---	---
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	GA	GCA	---	---	---	AA	C	CAAAGAAAA	---	---	---
C.arabica_ECS_2(X2)	GA	GCA	---	---	---	AGCC	AAGG	CAGAAA	---	---	---

961

Mus_musculus_ECS	CTTCCAGA	GAAGCCAA	CA	AA	AAGCA	CC	CCCGC	CCGG	TACT	CAAA	CA	AGAAA	ATCC
ECS_Pollen_1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ECS_Pistil_1	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
ECS_Pistil_2	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
ECS_Pistil_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ECS_Pistil_4	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
ECS_Pistil_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ECS_Pistil_6	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
ECS_Pistil_7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S.indicum_ECS_2	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
N.tomentosiformis_ECS_2	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
N.tabacum_ECS_2	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
E.guttatus_ECS_2	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
C.eugenoides_ECS_2(X1)	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
N.attenuata_ECS_2	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
C.arabica_ECS_2(X1)	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG
C.arabica_ECS_2(X2)	---	---	---	---	---	---	---	---	AGG	GACT	GAA	CA	GAAAAG

1021

Mus_musculus_ECS	GG	AT	GGAG	AGGAGAAA	AG	G	GT	CA	CA	AT	G	CCAA	AT	CA	AGGGA	AAGAA	TAC
ECS_Pollen_1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ECS_Pistil_1	GGG	---	G	AG	TT	GGAAC	GT	TACAG	CCC	A	T	---	---	---	AAA	A	T
ECS_Pistil_2	GGG	---	G	AG	TT	GGAAC	GT	TACAG	CCC	A	T	---	---	---	AAA	A	T
ECS_Pistil_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ECS_Pistil_4	GGG	---	G	AG	TT	GGAAC	GT	TACAG	CCC	A	T	---	---	---	AAA	A	T
ECS_Pistil_5	GG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ECS_Pistil_6	GGG	---	G	AG	TT	GGAAC	GT	TACAG	CCC	A	T	---	---	---	AAA	A	T
ECS_Pistil_7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S.indicum_ECS_2	GGG	---	G	AAA	TT	GCAAC	AC	T	ACAG	CCC	A	T	---	---	AAA	A	T
N.tomentosiformis_ECS_2	GG	---	G	AG	TT	GGAAC	GT	T	CCGAC	CCC	A	T	---	---	AAA	A	T
N.tabacum_ECS_2	GG	---	G	AG	TT	GGAAC	GT	T	CCGAC	CCC	A	T	---	---	AAA	A	T
E.guttatus_ECS_2	GG	---	G	AAA	TT	GAAAAC	GT	T	ACGAC	CA	A	T	---	---	AAA	A	T
C.eugenoides_ECS_2(X1)	GG	---	G	AG	TT	GGGAC	TC	T	CCGAC	CA	A	T	---	---	AAA	A	T
N.attenuata_ECS_2	GG	---	G	AG	TT	GGAAC	GT	T	CCGAC	CCC	A	T	---	---	AAA	A	T
C.arabica_ECS_2(X1)	GG	---	G	AG	TT	GGGAC	TC	T	CCGAC	CA	A	T	---	---	AAA	A	T
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	GG	---	G	AG	TT	GGAAC	CC	T	CCGAC	CCC	A	T	---	---	AAA	A	T
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	GG	---	G	AG	TT	GGAAC	CC	T	CCGAC	CCC	A	T	---	---	AAA	A	T
C.arabica_ECS_2(X2)	GG	---	G	AG	TT	GGGAC	TC	T	CCGAC	CA	A	T	---	---	AAA	A	T

1081

Mus_musculus_ECS	CACTCCATG	GTAGAAACA	TTCCAGAAG	ATGGGAGGC	ATAAAGGC	CTGAGCCAG
ECS_Pollen_1	AGCAGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
ECS_Pistil_1	AGCAGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
ECS_Pistil_2	AGCAGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
ECS_Pistil_3	AGCAGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
ECS_Pistil_4	AGCAGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
ECS_Pistil_5	AGCAGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
ECS_Pistil_6	AGCAGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
ECS_Pistil_7	AGCAGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
S.indicum_ECS_2	CGGGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
N.tomentosiformis_ECS_2	AGCGAAATTA	CTAAAAGGTA	TTGGGAGAG	AT	---	---
N.tabacum_ECS_2	AGCGAAATTA	CTAAAAGGTA	TTGGGAGAG	AT	---	---
E.guttatus_ECS_2	ATTAGATGTT	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
C.eugenioides_ECS_2(X1)	CGGGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
N.attenuata_ECS_2	AGCGAAATTA	CTAAAAGGTA	TTGGGAGAG	AT	---	---
C.arabica_ECS_2(X1)	CGGGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	AGCGAGCTTG	CTAAAAGGTA	TTGGGAGAG	GT	---	---
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	AGCGAGCTTG	CTAAAAGGTA	TTGGGAGAG	GT	---	---
C.arabica_ECS_2(X2)	BCGGAGCCG	CTTAAAGGCA	TTCTGAGAG	AT	---	---

1141

Mus_musculus_ECS	ACCAATATTA	CATGGATCCG	ATGGGATTCG	GGAATGGCAA	CTGCTGCTCG	CAGGCTGATA
ECS_Pollen_1	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGA
ECS_Pistil_1	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAAA
ECS_Pistil_2	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGA
ECS_Pistil_3	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGA
ECS_Pistil_4	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGA
ECS_Pistil_5	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGA
ECS_Pistil_6	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGA
ECS_Pistil_7	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGA
S.indicum_ECS_2	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGA
N.tomentosiformis_ECS_2	---	GATGGG	AAAAAGTAA	GGAGGG	---	GACAAGAT
N.tabacum_ECS_2	---	GATGGG	AAAAAGTAA	GGAGGG	---	GACAAGAT
E.guttatus_ECS_2	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAAGG	---	GAAATAAT
C.eugenioides_ECS_2(X1)	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GAGAAAT
N.attenuata_ECS_2	---	GATGGG	AAAAAGTAA	GGAAGG	---	GACAAGAT
C.arabica_ECS_2(X1)	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGAT
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	---	GATGGG	AAAAAGTAA	GGAGGG	---	GACAAGAT
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	---	GATGGG	AAAAAGTAA	GGAGGG	---	GACAAGAT
C.arabica_ECS_2(X2)	---	GATGGG	AAAAAANA	GGAGGG	---	GACAAGAT

1201

Mus_musculus_ECS	CAAGCCCG	CAGCAATCC	GAGGCAAGA	ATCTATATGA	TAGCTGGCC	ACTATCTGCC
ECS_Pollen_1	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
ECS_Pistil_1	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
ECS_Pistil_2	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
ECS_Pistil_3	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
ECS_Pistil_4	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
ECS_Pistil_5	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
ECS_Pistil_6	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
ECS_Pistil_7	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
S.indicum_ECS_2	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
N.tomentosiformis_ECS_2	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
N.tabacum_ECS_2	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
E.guttatus_ECS_2	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
C.eugenioides_ECS_2(X1)	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
N.attenuata_ECS_2	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
C.arabica_ECS_2(X1)	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT
C.arabica_ECS_2(X2)	TATGGACTC	AAACAGGGAA	AGCAAAGCA	ATCAGGGAG	CCCGCGGCC	AACTTGGCT

1261

Mus_musculus_ECS	CAATGCTTA	GGCTTGAG	TGTCGAAAG	CCACTTACC	GAGGTAACT	GTCAGACA
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	AAGGGGCA	CCCTTGAGA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----
ECS_Pistil_2	AAGGGGCA	CCCTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CGC-----
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	AAGGGGCA	CCACTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----
N.tomentosiformis_ECS_2	AAGGGGCA	CCACTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----
N.tabacum_ECS_2	AAGGGGCA	CCACTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----
E.guttatus_ECS_2	AAGGGGGCA	CCCTTGAGA	CTCTGCAAG	GACTTGGCG	GAAGTAAAT	CTC-----
C.eugenioides_ECS_2(X1)	AAGGGGCA	CCACTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----
N.attenuata_ECS_2	AAGGGGCA	CCACTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----
C.arabica_ECS_2(X1)	AAGGGGCA	CCACTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	AAGGGGCA	CCACTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	AAGGGGCA	CCACTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----
C.arabica_ECS_2(X2)	AAGGGGCA	CCACTTGAAA	CTCTGCAAG	AACAATGCG	GAAGTAAAT	CAG-----

1321

Mus_musculus_ECS	GATCTGGG	GGGGAGTCA	TCTGCCAG	GTAGATGATA	GAAACGGGA	GGAGAGAGGC
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	AGA GGAGA GGGG
ECS_Pistil_2	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-GGA GGAGT AGGG
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-ATCTTACC	AACTAGACA	TGTTAGC	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-ATCTTACC	GGCAATGCG	TGTTAGC	-----	-----	-GAG ATAAA GGG
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-AGA GGAGA GGGG
N.tomentosiformis_ECS_2	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-GGA GGAGA GGGG
N.tabacum_ECS_2	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-AGA GGAAA GGGG
E.guttatus_ECS_2	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-AGA GGAGA GGGG
C.eugenioides_ECS_2(X1)	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-AGA GGAGA GGGG
N.attenuata_ECS_2	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-AGA GGAAA GGGG
C.arabica_ECS_2(X1)	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-AGA GGAGA GGGG
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-AGA AGAGA GGGG
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-AGA AGAGA GGGG
C.arabica_ECS_2(X2)	-ATCTTACC	AGGTAAAGGC	TGTTGCC	-----	-----	-AGA GGAGA GGGG

1381

Mus_musculus_ECS	CTGGAGCTC	GAAGAAATA	CGCTTAGG	ATGAGTAAG	CTGGTATGA	CTTAATAGA
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
ECS_Pistil_2	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---GGGAA
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	CTTAATAGA	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
S.indicum_ECS_2	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
N.tomentosiformis_ECS_2	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
N.tabacum_ECS_2	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
E.guttatus_ECS_2	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
C.eugenioides_ECS_2(X1)	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
N.attenuata_ECS_2	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
C.arabica_ECS_2(X1)	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA
C.arabica_ECS_2(X2)	ATGGGTC	-----	-----	-----	-----	---AGGAA





1621

Mus_musculus_ECS	GAG	GACC	AATTGAGAA	TATTCAGTC	AATAAGTGG	AGACAAAGAG	GTTTAAAGCC
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	AAAAGTGGG	TCAC	-----
ECS_Pistil_2	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	AAAAGTGGG	TCAC	-----
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	AAAAGTGGG	TCAC	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	AAAAGTGGG	TCAC	-----
S.indicum_ECS_2	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	ACAC	-----
N.tomentosiformis_ECS_2	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	TCAC	-----
N.tabacum_ECS_2	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	TCAC	-----
E.guttatus_ECS_2	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	TCAC	-----
C.eugenoides_ECS_2(X1)	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	TCAC	-----
N.attenuata_ECS_2	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	TCAC	-----
C.arabica_ECS_2(X1)	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	TCAC	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	TCAC	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	TCAC	-----
C.arabica_ECS_2(X2)	-----	-----	AATTGAGAA	AATTACAAGCC	GAAAGTGGG	TCAC	-----

1681

Mus_musculus_ECS	GC	GC	CCAA	ACTCAGATA	TGGATGGAGA	GTAGAGTCC	GACCAAAGGA	GC	CCAG	TGA
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	TGGACTGGAC	ATGATGATCC	GGACA	-----	-----	-----
ECS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	TGGACTGGAC	ATGATGATCC	GAACA	-----	-----	-----
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	TGGACTGGAC	ATGATGATCC	GGACA	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	TGGACTGGAC	ATGATGATCC	GGACA	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	TGGACTGGAC	ATGATGATCC	GAACA	-----	-----	-----
N.tomentosiformis_ECS_2	-----	-----	-----	-----	TGGACTGGAC	ATGATGATCC	GAACA	-----	-----	-----
N.tabacum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	TGGACTGGAC	ATGATGATCC	GAACA	-----	-----	-----
E.guttatus_ECS_2	-----	-----	-----	-----	TGGACTGGAC	ATGATGATCC	GAACA	-----	-----	-----
C.eugenoides_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	GGGGCTGGAC	ATGATGATCC	GAAAG	-----	-----	-----
N.attenuata_ECS_2	-----	-----	-----	-----	GGGGCTGGAC	ATGATGATCC	GAAAC	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	GGGGCTGGAC	ATGATGATCC	GAAAG	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	GGGGCTGGAC	ATGATGATCC	GAAAC	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	GGGGCTGGAC	ATGATGATCC	GAAAC	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	GGGGCTGGAC	ATGATGATCC	GAAAG	-----	-----	-----

1741

Mus_musculus_ECS	AAAGAC	CCG	AGAACTGG	CTATCTGGTA	TGGTGGTAC	TGCTCCTAG	GC	CA	CCCT
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	CTAC	TGTTCA	-----	-----
ECS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	CTAC	TGTTCA	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	CTAC	TGTTCA	-----	-----
S.indicum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
N.tomentosiformis_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
N.tabacum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
E.guttatus_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
C.eugenoides_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
N.attenuata_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	TGAC	TGTTCA	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	-----	CTAC	TGTTCA	-----	-----

1801

Mus_musculus_ECS	CAACAAAC	AGAGTCC	CAATCCGGTG	CCAAAGGTG	ACGAGAACTA	GAAAGGGCC
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.tomentosiformis_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.tabacum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E.guttatus_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C.eugenioides_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.attenuata_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1861

Mus_musculus_ECS	CAGAAGCGAG	ATGCTGT	GCAGGGGATG	CTTTAATCA	GGAAAGACTA	CTGCAAGGC
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.tomentosiformis_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.tabacum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E.guttatus_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C.eugenioides_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.attenuata_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1921

Mus_musculus_ECS	GGCAAGGTG	GGGGAGGG	GCGAGCAAG	GCCAGAGCA	GCTGAGCC	AGTGCAGAG
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_2	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
N.tomentosiformis_ECS_2	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
N.tabacum_ECS_2	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
E.guttatus_ECS_2	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
C.eugenioides_ECS_2(X1)	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
N.attenuata_ECS_2	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X1)	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X2)	-----	GGGAA	-----	-----	-----	-----



2161

```

Mus_musculus_ECS      GGCAGG GGA GAGAGAG GATGCAAAAC CATGCAG ACAAGCAAGA CAGCTAAATA
ECS_Pollen_1         -----
ECS_Pistil_1         -----GA AAGGAAA CAGGCCGG CT-----GCGTA CAGCCTA--
ECS_Pistil_2         -----GA AAGAAGG CAGGCCGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
ECS_Pistil_3         -----
ECS_Pistil_4         -----
ECS_Pistil_5         -----GA AAGGAAA CAGGCCGG CT-----GCGTA CAGCCTA--
ECS_Pistil_6         -----GA AAGGAAA CAGGCCGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
ECS_Pistil_7         -----GA AAGGAAA CAGGCCGG CT-----GCGTA CAGCCTA--
S.indicum_ECS_2      GA AAGGAAAG CCGGCGTGG CT-----GCGTA CAGCCTA--
N.tomentosiformis_ECS_2  GA AAGGAAAG CCGGCGTGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
N.tabacum_ECS_2      GA AAGGAAAG CCGGCGTGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
E.guttatus_ECS_2     GA AAGGAAAG CCGGCGTGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
C.eugenioïdes_ECS_2(X1)  GA AAGGAAA CAGGCCGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
N.attenuata_ECS_2    GA AAGGAAA CAGGCCGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
C.arabica_ECS_2(X1)  GA AAGGAAA CAGGCCGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
S.lycopersicum_ECS_2(X2)  GA AAGGAAAG CCGGCGTGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
S.lycopersicum_ECS_2(X1)  GA AAGGAAAG CCGGCGTGG CT-----GCCTA CAGCCTA--
C.arabica_ECS_2(X2)  GA AAGGAAA CAGGCCGG CT-----GCCTA CAGCCTA--

```

2221

```

Mus_musculus_ECS      AGTGAAGAAA GAATATAG CCAATGCG AAGCGAAC GAAATCGAG ATGAGCTSTG
ECS_Pollen_1         -----
ECS_Pistil_1         -----TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG AGAAGCCAAA
ECS_Pistil_2         -----TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG AGAAGCCAAA
ECS_Pistil_3         -----
ECS_Pistil_4         -----
ECS_Pistil_5         -----TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG AGAAGCCAAA
ECS_Pistil_6         -----TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG AGAAGCCAAA
ECS_Pistil_7         -----TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG AGAAGCCAAA
S.indicum_ECS_2      TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG AGAAGCCAAA
N.tomentosiformis_ECS_2  TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG GAAAACCAA
N.tabacum_ECS_2      TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG GAAAACCAA
E.guttatus_ECS_2     TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG GAAAACCAA
C.eugenioïdes_ECS_2(X1)  TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG GAAAACCAA
N.attenuata_ECS_2    TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG GAAAACCAA
C.arabica_ECS_2(X1)  TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG GAAAACCAA
S.lycopersicum_ECS_2(X2)  TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG GAAAACCAA
S.lycopersicum_ECS_2(X1)  TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG GAAAACCAA
C.arabica_ECS_2(X2)  TAGCTACAG CAGCTTGG CAAATACCA TTCACCGAAG GAAAACCAA

```

2281

```

Mus_musculus_ECS      GAACTGCA GAGTATGG GATGAGGA TAGAAAAGCG AAGTACAG GAGGAAAAG
ECS_Pollen_1         -----
ECS_Pistil_1         GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
ECS_Pistil_2         GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
ECS_Pistil_3         -----
ECS_Pistil_4         -----
ECS_Pistil_5         GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
ECS_Pistil_6         GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
ECS_Pistil_7         GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
S.indicum_ECS_2      GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
N.tomentosiformis_ECS_2  GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
N.tabacum_ECS_2      GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
E.guttatus_ECS_2     GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
C.eugenioïdes_ECS_2(X1)  GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
N.attenuata_ECS_2    GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
C.arabica_ECS_2(X1)  GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)  GGTATG-----TAGCAA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)  GGTATG-----TAGCAA--GAGAAGCC AAAATTGG-----
C.arabica_ECS_2(X2)  GGTATG-----TAGCA--GAGAAGCC AAAATTGG-----

```



2521

Mus_musculus_ECS	AGTTGAGCA	GGATAAAG	AAAGTAATG	TATGATTTAA	GAGGTATTT	TAAAAACA
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	AGTTGAGCA	-----	-----	CGCTTTTC	CAAAAAACA	-----
ECS_Pistil_2	GGTTGAGCA	AAATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CAAGTAAT	TG
ECS_Pistil_3	-----	ATG	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	GGTTGAGCA	GATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CGATGATTT	TG
ECS_Pistil_6	GGTTGAGCA	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	GGTTGAGCA	GATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CGATGATTT	TG
S.indicum_ECS_2	GGTTGAGCA	GATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CGATGATTT	TG
N.tomentosiformis_ECS_2	GGTTGAGCA	GATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CGATGATTT	TG
N.tabacum_ECS_2	GGTTGAGCA	GATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CGATGATTT	TG
E.guttatus_ECS_2	GGTTGAGCA	GATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CGATGATTT	TG
C.eugenioides_ECS_2(X1)	GGTTGAGCA	AAATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CAAGTAAT	TG
N.attenuata_ECS_2	GGTTGAGCA	GATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CGATGATTT	TG
C.arabica_ECS_2(X1)	GGTTGAGCA	AAATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CAAGTAAT	TG
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	GGTTGAGCA	AAATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CAAGTAAT	TG
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	GGTTGAGCA	AAATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CAAGTAAT	TG
C.arabica_ECS_2(X2)	GGTTGAGCA	AAATG	AGAAATAGC	GGAGTTTC	CAAGTAAT	TG

2581

Mus_musculus_ECS	CTATCGAAG	TAATAGTAA	CTGGCTGTA	CACTTGAA	TCTAGCTG	GAGCAATAC
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	AAAG	AAAAAACTA	CTG	-----	-----
ECS_Pistil_2	ATAACGGAAG	AAAAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	ATAACGGAAG	AAGAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	ATAACGGAAG	AAGAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	ATAACGGAAG	AAAAAGTAA	CTG	-----	-----	-----
N.tomentosiformis_ECS_2	CTATCGAAG	AAAAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
N.tabacum_ECS_2	CTATCGAAG	AAAAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
E.guttatus_ECS_2	ATAACGGAAG	AAAAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
C.eugenioides_ECS_2(X1)	ATAACGGAAG	AAGAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
N.attenuata_ECS_2	ATAACGGAAG	AAGAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X1)	ATAACGGAAG	AAGAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	ATAACGGAAG	AAGAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	ATAACGGAAG	AAGAAGTAA	TAG	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X2)	ATAACGGAAG	AAGAAGTAA	TAG	-----	-----	-----

2641

Mus_musculus_ECS	CTATCGAAG	CTATCGAAG	CTATCGAAG	CTATCGAAG	CTATCGAAG	CTATCGAAG
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.tomentosiformis_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.tabacum_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E.guttatus_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C.eugenioides_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.attenuata_ECS_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X2)	-----	-----	-----	-----	-----	-----

2701

Mus_musculus_ECS	GTTTACTGTA	AACTCTGGG	TAAACTAGC	GGG-AGCG	ATTCAGTAA	ATTAAGTAA
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----GG
ECS_Pistil_2	--GGCTGG	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AAC-----	-----GAA
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----TAA
ECS_Pistil_7	--GTCGGA	AACTTACCTT	GTCCTCGGA	GAAATAGCA	AC-----	-----CAA
S.indicum_ECS_2	--GGCTGGA	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AC-----	-----CAA
N.tomentosiformis_ECS_2	--GAAAGGA	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AC-----	-----CAA
N.tabacum_ECS_2	--GAAAGGA	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AC-----	-----CAA
E.guttatus_ECS_2	--GGCAGGG	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AA-----	-----CAA
C.eugenoides_ECS_2(X1)	--GGCAGGA	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AG-----	-----CAA
N.attenuata_ECS_2	--GAAAGGA	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AC-----	-----CAA
C.arabica_ECS_2(X1)	--GGCAGGA	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AG-----	-----CAA
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	--GAAAGGA	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AC-----	-----CAA
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	--GAAAGGA	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AC-----	-----CAA
C.arabica_ECS_2(X2)	--GGCAGGA	AAACTCTGGG	GCTCTGGG	GAAATAGCA	AG-----	-----CAA

2761

Mus_musculus_ECS	AAAAAAAAAA	AAGGGTGGC	GAGAGCTGT	CTGAGTCT	CCCTGATA	CTAGGTAAA
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_1	CGACTGGGAA	AACTCTGGG	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_2	GACTGGGAA	AACTCTGGG	AACTCTGGG	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
ECS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	GAAATAAA	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
S.indicum_ECS_2	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
N.tomentosiformis_ECS_2	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
N.tabacum_ECS_2	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
E.guttatus_ECS_2	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
C.eugenoides_ECS_2(X1)	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
N.attenuata_ECS_2	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
C.arabica_ECS_2(X1)	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA
C.arabica_ECS_2(X2)	GACTGGGAG	AACTCTGGG	CAAGAAATAT	CTGAGTCT	AGGGTAAAA	GATATGGGA

2821

Mus_musculus_ECS	GTTACTGGAC	GCAATGAGG	CCCTGGGCG	GTGAGGTACC	TACTCTGA	TATCTGCTTA
ECS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----GCCTGCGCCCT
ECS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----GCTCTCTCTCT
ECS_Pistil_2	GATGAGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	GAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT
ECS_Pistil_3	-----	-----AG	GACCTGGAG	GAG-----	-----	-----TATGCGGAT
ECS_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_ECS_2	GATGAGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	GAG-----	-----	-----GCCTGCGCCCT
N.tomentosiformis_ECS_2	AAAGGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	AAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT
N.tabacum_ECS_2	AAAGGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	AAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT
E.guttatus_ECS_2	GATGAGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	AAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT
C.eugenoides_ECS_2(X1)	GATGAGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	GAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT
N.attenuata_ECS_2	AAAGGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	AAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT
C.arabica_ECS_2(X1)	GATGAGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	GAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	AAAGGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	AAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	AAAGGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	AAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT
C.arabica_ECS_2(X2)	GATGAGAGGT	GCTGAGGGAG	GACCTGGAG	GAG-----	-----	-----GCTCTGCGCCCT







3241

```

Mus_musculus_ECS      AA GA GAAA  GAG CAA  CAG CAA  AGGACCGTAA  A-----
ECS_Pollen_1         GGC TGAACA  GGTG- TAACA  CCAGCCGAAA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GAGAA----
ECS_Pistil_1
ECS_Pistil_2         GGC TGAACA  GGTG- TAACA  CCAGCCGAAA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GAGAAG GGG
ECS_Pistil_3         GGC TGAACA  GGTG- TAACA  CCAGCCGAAA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GAGAAG GGG
ECS_Pistil_4
ECS_Pistil_5
ECS_Pistil_6         -----AGG AGCAAAAACA  G-----
ECS_Pistil_7
S.indicum_ECS_2      CC TAA ACC  GG T- TAA C  CCAGC GAAA  AGCTCCCGA  G T C T A  GG AAA GGG
N.tomentosiformis_ECS_2  AG TAAAACA  GGTG- TAACA  CCAGC GAGA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GGAAG GGG
N.tabacum_ECS_2      AG TAAAACA  GGTG- TAACA  CCAGC GAGA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GGAAG GGG
E.guttatus_ECS_2     GG TAAAACA  GGTG- TAACA  CCAGCCGAGA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GGAAG GGG
C.eugenioides_ECS_2(X1)  G TAAAACA  GGTG- TAACA  CCAGC GAGA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GGAAG GGG
N.attenuata_ECS_2    AG TGAACA  GGTG- TAACA  CCAGC GAGA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GGAAG GGG
C.arabica_ECS_2(X1)   G TAAAACA  GGTG- TAACA  CCAGC GAGA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GGAAG GGG
S.lycopersicum_ECS_2(X2)  G TAAAACA  GGTG- TAACA  CCAGC GAGA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GGAAG GGG
S.lycopersicum_ECS_2(X1)  G TAAAACA  GGTG- TAACA  CCAGC GAGA  AGCTCCCGA  ATG TACCA  GGAAG GGG
C.arabica_ECS_2(X2)   G TAAAACA  G-----

```

3301

```

Mus_musculus_ECS      C T TAA T C  AAA TAA T C  T T T A T A  G C T C  -----
ECS_Pollen_1
ECS_Pistil_1
ECS_Pistil_2         GGAGAA TNG  GGATCCG C  T T T AAGAGC  G C T T A C T  AGG T G T A
ECS_Pistil_3         GAG AAA G C C  GGA T C C G  T T T GAGGAGC  G C T T A C T  AGG A C C C
ECS_Pistil_4
ECS_Pistil_5
ECS_Pistil_6
ECS_Pistil_7
S.indicum_ECS_2      GAG AAA G C C  AGA T C C C  T T T GAGGAGC  G C T T A C T  AGG A C C C
N.tomentosiformis_ECS_2  GAG AAA G C C  GGATCCG C  T T T GAGGAGC  G C T T A T T  AAG T C T T  ---GAGAG
N.tabacum_ECS_2      GAG AAA G C C  GGATCCG C  T T T GAGGAGC  G C T T A T T  AAG T C T T  ---GAGAG
E.guttatus_ECS_2     GAG AAA G C A  AGA T C C C  T T T GAAGAAC  G C T T A C T  AAG A G A A  AAG A G G A A
C.eugenioides_ECS_2(X1)  GG AAA G C T  AGA T C C G  T T T GAGGAGC  G C T T A C T  AAG T C T T  ---GAGAG
N.attenuata_ECS_2    GAG AAA G C T  GGATCCG C  T T T GAAGAGC  G C T T A C T  AAG T C T T  ---GAGAG
C.arabica_ECS_2(X1)   GG AAA G C T  AGA T C C G  T T T GAGGAGC  G C T T A C T  AAG T C T T  ---GAGAG
S.lycopersicum_ECS_2(X2)  GAG AAA G C T  GGATCCG C  T T T GAGGAGC  G C T T A C T  AAG T C T T  ---GAGAG
S.lycopersicum_ECS_2(X1)  GAG AAA G C T  GGATCCG C  T T T GAGGAGC  G C T T A C T  AAG T C T T  ---GAGAG
C.arabica_ECS_2(X2)   GAG AAA G C T  GGATCCG C  T T T GAGGAGC  G C T T A C T  AAG T C T T  ---GAGAG

```

3361

```

Mus_musculus_ECS      -----  T A G C T T C  G T A T T T C  T A A T S T A A  C T A A A T T A C  T T T A A A A T A
ECS_Pollen_1
ECS_Pistil_1
ECS_Pistil_2         T T A C T T G A  G C T C C C T T  G A T G G T G A  G A-----
ECS_Pistil_3         -----  T A T T C  G T G A A T T C  A A A C T T A C  A G T T C T
ECS_Pistil_4
ECS_Pistil_5
ECS_Pistil_6
ECS_Pistil_7
S.indicum_ECS_2      -----  T A G A A C C  A T S T T T T G  A G G T A C A  G A A G C C G T  G G C T A T T G
N.tomentosiformis_ECS_2  G C A T T A A T  T A A G C A T T  C A T C T T G  A A A T G A T T C  C A A T T C T T  T T T G A G A G A
N.tabacum_ECS_2      G C A T T C A A  T A A G C A T T  C A A T T T T G  A A A T G A T T C  C A A T T C T T  T T T G A G A G A
E.guttatus_ECS_2     T A T G C G A T G  T C C C C C T C  C C G G G T A C T  A A G C T A T G G  T A T A A A A T A A  T G G T C G G A A
C.eugenioides_ECS_2(X1)  -----  C C A A A T T T T  C T G C A C T T A  T A A C C G T C  T G A T C T A C  T A A A G G A T
N.attenuata_ECS_2    G C A T T C A A  T A G A C C T T  C C A T C T T S  A A A T A T T C  C A A T T C T T  T T T G A G A G T
C.arabica_ECS_2(X1)   -----  C C A A T C T T  C T G C A C T T A  T A A C C C T C  T G A T C C T A C  T A A A G G A T T
S.lycopersicum_ECS_2(X2)  A A T T C A A T  C T S T T T T T  C C S T T T G  A A A T A T T C  C A A T T C A  T G A G A T A T
S.lycopersicum_ECS_2(X1)  A A T T C A A T  C T S T T T T T  C C S T T T G  A A A T A T T C  C A A T T C A  T G A G A T A T
C.arabica_ECS_2(X2)   A A T T C A A T  C T S T T T T T  C C S T T T G  A A A T A T T C  C A A T T C A  T G A G A T A T

```

3421

Mus\_musculus\_ECS  
 ECS\_Pollen\_1  
 ECS\_Pistil\_1  
 ECS\_Pistil\_2  
 ECS\_Pistil\_3  
 ECS\_Pistil\_4  
 ECS\_Pistil\_5  
 ECS\_Pistil\_6  
 ECS\_Pistil\_7  
 S.indicum\_ECS\_2  
 N.tomentosiformis\_ECS\_2  
 N.tabacum\_ECS\_2  
 E.guttatus\_ECS\_2  
 C.eugenioïdes\_ECS\_2(X1)  
 N.attenuata\_ECS\_2  
 C.arabica\_ECS\_2(X1)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X2)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X1)  
 C.arabica\_ECS\_2(X2)

```

ACACGAG AATAAGCAA GCTTTACA GATAAAAATA TTACACTS AATGGTAA
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
GGGGAAGSA SGCAGTA AGTATAA GCGCCGGGG TCAATAAA AGTGGATAT
AAGGGGAAAT TGTGATG ---ATA GAGACAAAATA ATCAGCTAG AATAAGATAT
AAGGGGAAAT TGTGATG ---ATCG GAGACAAAATA ATCAGCTAG AATAAGATAT
AAAGCTATGA TACAGACCA GATAGTAAG TAAACAGATA ATCGAAAATG ATTCGAAAGCT
CTAAATAGAA ATTTGCTTA GATATAGAGA TGAAGATA CTAAATATG CAGCTGCTTA
ATAATGGGA ATTTGCTTA ---ATCG GAGACAAAATA ATCAGCTAG AATAAGATAT
CTAAATAGAA ATTTGCTTA GATATAGAGA TGAAGATA CTAAATATG CAGCTGCTTA
ATGAGCCGAT ATTTGCTTA G ---ATA GAAAATAATC AGCTAGCTAG AATAAGATAT
ATGAGCCGAT ATTTGCTTA G ---ATA GAAAATAATC AGCTAGCTAG AATAAGATAT

```

3481

Mus\_musculus\_ECS  
 ECS\_Pollen\_1  
 ECS\_Pistil\_1  
 ECS\_Pistil\_2  
 ECS\_Pistil\_3  
 ECS\_Pistil\_4  
 ECS\_Pistil\_5  
 ECS\_Pistil\_6  
 ECS\_Pistil\_7  
 S.indicum\_ECS\_2  
 N.tomentosiformis\_ECS\_2  
 N.tabacum\_ECS\_2  
 E.guttatus\_ECS\_2  
 C.eugenioïdes\_ECS\_2(X1)  
 N.attenuata\_ECS\_2  
 C.arabica\_ECS\_2(X1)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X2)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X1)  
 C.arabica\_ECS\_2(X2)

```

TAAAGATG GCATAAAG CCGGTATA TATAAAGCT TCAATACTA GAAATGGCTC
-----
-----
AATATAGAT ATCGCTATGG TCGTATGTA TGTAAAAA ATAGATATAG TCCCGGATAT
-----
-----
TGGTAAAAA TGTATGCTG ACAATAAAGT GGTAAAAAG TCAAGCAATG TGTATAGGATAT
GATCTAATAA TGTATGATA TGGCA ---TGAAAAGCT AATAATAGCT CAGCTATGAT
GATCTAATAA TGTATGATA TGGCA ---TGAAAAGCT AATAATAGCT CAGCTATGAT
ATAATGGCTC ATTTGCTTA TGGCAAGTGA GAAATAATC ATCTAATACT AATAATGGCTC
CTG ---ATA TGGGAAAATA AATAGTCAAT GATATATGCT
GTAACAATAA TATAATGGCA TAAAAGCTA TATATAGTCT TCC ---CTATGAT
CTG ---ATA TGGGAAAATA AATAGTCAAT GATATATGCT TCC ---CTATGAT
GTAACAATAA TATAATGGCA TAAAAGCTA TATATAGTCT TCC ---CTATGAT
GTAACAATAA TATAATGGCA TAAAAGCTA TATATAGTCT TCC ---CTATGAT
GTAACAATAA TATAATGGCA TAAAAGCTA TATATAGTCT TCC ---CTATGAT

```

3541

Mus\_musculus\_ECS  
 ECS\_Pollen\_1  
 ECS\_Pistil\_1  
 ECS\_Pistil\_2  
 ECS\_Pistil\_3  
 ECS\_Pistil\_4  
 ECS\_Pistil\_5  
 ECS\_Pistil\_6  
 ECS\_Pistil\_7  
 S.indicum\_ECS\_2  
 N.tomentosiformis\_ECS\_2  
 N.tabacum\_ECS\_2  
 E.guttatus\_ECS\_2  
 C.eugenioïdes\_ECS\_2(X1)  
 N.attenuata\_ECS\_2  
 C.arabica\_ECS\_2(X1)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X2)  
 S.lycopersicum\_ECS\_2(X1)  
 C.arabica\_ECS\_2(X2)

```

ATACTTA TACTATGAGA AAGTATATAT TGTATAGATG CTCATATGTA AATATAGGATG
-----
-----
TGGGATATG TACTATGAGA TATAGGATAA TATGATGATC CTCATATGGA CA
-----
-----
ATAATAACC TGTATGGCT ACAATAGGCAG GGTATAAATC GATATAATAG TGTATAGAAAT
CTATCAATC TGTATCCAAA TATGATATATG ATACATGGG ACAATACATAT TCCATAGAATA
CTATCAATC TGTATCCAAA TATGATATATG ATACATGGG ACAATACATAT TCCATAGAATA
ATGAGATATG TGTATGGGCT TATGCTATG CCGTATGTA GATATAAATA TAAATC
TGTATAATG TATAAACA TCAATAGCTATG ATATATGGAGG ATGGAAATA
CTATCAATC TGTATGGAAA TATGATATATG ATACATGGG ACAATACATAT TCCATAGAATA
TGTATAATC TATAAACA TCAATAGCTATG ATATATGGAGG ATGGAAATA TCCATAGAATA
TGTATAATC TGTATCCAGA TATGATATATG ATACATGGG ACAATACATAT TCCATAGAATA
TGTATAATC TGTATCCAGA TATGATATATG ATACATGGG ACAATACATAT TCCATAGAATA

```



3781

Mus_musculus_ECS	-----	-----
ECS_Pollen_1	-----	-----
ECS_Pistil_1	-----	-----
ECS_Pistil_2	-----	-----
ECS_Pistil_3	-----	-----
ECS_Pistil_4	-----	-----
ECS_Pistil_5	-----	-----
ECS_Pistil_6	-----	-----
ECS_Pistil_7	-----	-----
S.indicum_ECS_2	GCCTTA	ACTGCA
N.tomentosiformis_ECS_2	-----	-----
N.tabacum_ECS_2	-----	-----
E.guttatus_ECS_2	-----	-----
C.eugenioides_ECS_2(X1)	-----	-----
N.attenuata_ECS_2	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X1)	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X2)	-----	-----
S.lycopersicum_ECS_2(X1)	-----	-----
C.arabica_ECS_2(X2)	-----	-----



241

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V.vinifera_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.cacao_GSchlo2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo2	TAGGTGGGGC	TGCAAGTTGG	GCCAAACCTA	A-----	--CCTAATTC	GAGCAAGTCT
T.cacao_GSchlo1	TCGATCGG-T	TGGAAAAAGA	GAGAGAAGGA	AGGAAAAGAA	AGGAAAAATG	GAGAGAAAAA
C.sinensis_GSchlo	-----	-----	-----	-----	--AATAATC	AACCAACTTT
G.max_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.truncatula_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R.communis_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.musculus_GS	-----	-----	-----	-----	-----	-----

301

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V.vinifera_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.cacao_GSchlo2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo2	GCTTGGCTTG	G-TGAGGTTG	AGGGGCGCAT	CTAAGAATCT	GAGAGTGAGG	TCCACGATCC
T.cacao_GSchlo1	AGGTACGATG	CCGGCGGGAA	AGAGGACGAA	GAAAGAAGAA	AAAAAAAAAGA	AA-----
C.sinensis_GSchlo	AGTTGG-----	-T-----	-----	-----	-----	-----
G.max_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.truncatula_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R.communis_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.musculus_GS	-----	-----	-----	-----	-----	-----

361

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
V.vinifera_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T.cacao_GSchlo2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo2	GTGATGCAGC	GTCGATCCTT	CACAGAGAAG	CCGT-GCACT	AAATTAATAA	CCTCGTAGGA
T.cacao_GSchlo1	--AAACAAG-	-----TAAAA	AAAGAACAAG	GTCTGCCCGA	CCAAGAAACA	AAGAGAAGAA
C.sinensis_GSchlo	--GAATGAAT	GAAATTGATA	AGAATAGAAT	A-----ATA	ATAATAATAA	TAAAGTAAAG
G.max_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.truncatula_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R.communis_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.musculus_GS	-----	-----	-----	-----	-----	-----

421

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	-----	-----CAA	ATGTTCCAAG	TACTTT-----	-----TTACA	A-----
V.vinifera_GSchlo	-----	-----AAAAGGA	AAAATAGAAG	AACAAATCAA	ACTTCTCTTC	T-----
N.nucifera_GSchlo1	-----	-----	-----	-----	-----GGGTC	GGGATGGCCC
T.cacao_GSchlo2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo2	AAATGAAGTC	AGATTATCGA	-GTCAGGCG-	CAACACTCGA	CCTC-TACGA	TGGCTGCTC-
T.cacao_GSchlo1	A--AAAAAG	AAAAAAAAAG	AGACATGAAA	AAAAAA----	ACAAATAGTG	GGCATAACCC
C.sinensis_GSchlo	G-ATCAAAATG	TGACTAAAAAT	ATTTGACCAA	TTCTAATCAA	AATGCTCAAT	TGCATAATGC
G.max_GSchlo	-----	-----	-----G	ACAGAG-----	-----	-----TA
M.truncatula_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R.communis_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.musculus_GS	-----	-----	-----	-----	-----	-----



481

```

GS_Pistil_1
GS_Pistil_2
GS_Pistil_3
GS_Pollen_1
S.indicum_GSchlo
V.vinifera_GSchlo
N.nucifera_GSchlo1
T.cacao_GSchlo2
N.nucifera_GSchlo2
T.cacao_GSchlo1
C.sinensis_GSchlo
G.max_GSchlo
M.truncatula_GSchlo
R.communis_GSchlo
M.musculus_GS

```

541

```

GS_Pistil_1
GS_Pistil_2
GS_Pistil_3
GS_Pollen_1
S.indicum_GSchlo
V.vinifera_GSchlo
N.nucifera_GSchlo1
T.cacao_GSchlo2
N.nucifera_GSchlo2
T.cacao_GSchlo1
C.sinensis_GSchlo
G.max_GSchlo
M.truncatula_GSchlo
R.communis_GSchlo
M.musculus_GS

```

601

```

GS_Pistil_1
GS_Pistil_2
GS_Pistil_3
GS_Pollen_1
S.indicum_GSchlo
V.vinifera_GSchlo
N.nucifera_GSchlo1
T.cacao_GSchlo2
N.nucifera_GSchlo2
T.cacao_GSchlo1
C.sinensis_GSchlo
G.max_GSchlo
M.truncatula_GSchlo
R.communis_GSchlo
M.musculus_GS

```

661

```

GS_Pistil_1
GS_Pistil_2
GS_Pistil_3
GS_Pollen_1
S.indicum_GSchlo
V.vinifera_GSchlo
N.nucifera_GSchlo1
T.cacao_GSchlo2
N.nucifera_GSchlo2
T.cacao_GSchlo1
C.sinensis_GSchlo
G.max_GSchlo
M.truncatula_GSchlo
R.communis_GSchlo
M.musculus_GS

```

721

```

GS_Pistil_1
GS_Pistil_2
GS_Pistil_3
GS_Pollen_1
S.indicum_GSchlo
V.vinifera_GSchlo
N.nucifera_GSchlo1
T.cacao_GSchlo2
N.nucifera_GSchlo2
T.cacao_GSchlo1
C.sinensis_GSchlo
G.max_GSchlo
M.truncatula_GSchlo
R.communis_GSchlo
M.musculus_GS

```

781

```

GS_Pistil_1
GS_Pistil_2
GS_Pistil_3
GS_Pollen_1
S.indicum_GSchlo
V.vinifera_GSchlo
N.nucifera_GSchlo1
T.cacao_GSchlo2
N.nucifera_GSchlo2
T.cacao_GSchlo1
C.sinensis_GSchlo
G.max_GSchlo
M.truncatula_GSchlo
R.communis_GSchlo
M.musculus_GS

```

841

```

GS_Pistil_1
GS_Pistil_2
GS_Pistil_3
GS_Pollen_1
S.indicum_GSchlo
V.vinifera_GSchlo
N.nucifera_GSchlo1
T.cacao_GSchlo2
N.nucifera_GSchlo2
T.cacao_GSchlo1
C.sinensis_GSchlo
G.max_GSchlo
M.truncatula_GSchlo
R.communis_GSchlo
M.musculus_GS

```

901

```

GS_Pistil_1
GS_Pistil_2
GS_Pistil_3
GS_Pollen_1
S.indicum_GSchlo
V.vinifera_GSchlo
N.nucifera_GSchlo1
T.cacao_GSchlo2
N.nucifera_GSchlo2
T.cacao_GSchlo1
C.sinensis_GSchlo
G.max_GSchlo
M.truncatula_GSchlo
R.communis_GSchlo
M.musculus_GS

```

961

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----			
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----			
GS_Pistil_3	TCAGT	GAGAT	CAGGAAGAGT	GCCTGGTGTG	GGCATGATTG	ATGCA	CCATT	TTCTTTGCTA
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	TTTCAGATGT	CAGGAAGGAT	ACCGGGTGTG	GGCCTGGTTG	ATGCGCCTAT	CTCC	TTGTTG	
V.vinifera_GSchlo	GTTAAGAGAG	CAGGGACAGT	TCCTGGTGTG	GGCATGGTTC	ATGCCCCATT	TGCC	TATTG	
N.nucifera_GSchlo1	GTCCAGAGGT	CAGGAATGAT	TCCTGGTGTG	GGTATGGTGG	ATGCTCCATT	TGCT	TATTG	
T.cacao_GSchlo2	TTTCAGAGAT	CTGGTCAAGT	ACCTGGTGTG	GGCATGGTGC	ATGCTCCAAAT	TGCT	TTGTTG	
N.nucifera_GSchlo2	GTTCAGAGGT	CAGGAACAGT	TCCGGGTGTA	GGTATGGTAC	ATGCTCCATT	TGCT	TATTG	
T.cacao_GSchlo1	TTTCAGAGAT	CTGGTCAAGT	ACCTGGTGTG	GGCATGGTGC	ATGCTCCAAAT	TGCT	TTGTTG	
C.sinensis_GSchlo	GTCCAGAGAT	CAGGAAAAGT	TCCTGGTGTG	GGATGGTGC	ATGCCCCATT	TGCC	TTGTTG	
G.max_GSchlo	TTTCAGAGAT	CAGGAACAGT	TCCTGGTGTG	GGCCTGGTGC	ATCTCCGGCT	TTCT	TATTA	
M.truncatula_GSchlo	TACCAGAAAT	CAGGAATGGT	TCCTGGTGTG	GGATTGATGC	ATGCCCCGTT	TTCA	TATTG	
R.communis_GSchlo	GTTCAGAGAT	CAGGAAAAGT	ACCTGGTGTG	GGCATGATAC	ATGCTCCATT	TTCT	TTGCTG	
M.musculus_GS	GCA-----T	CCCAGCTCC-	-----TCCGAC	GTGGTGACAT	ATGCCCCATT	GACG	TTTTTC	

1021

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	CCTATGCCAT	TTCCGTGAAAG	TCAATTGAAA	CAAGCTTGCC	AAATAGCTCC	GATTTTCAAT		
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	CCTATGTTGT	TTCCGTGAAAG	TCATTGAAA	CAAGCTTGCG	AAGTAGCTCC	AATATTCAAT		
V.vinifera_GSchlo	CCCATGTCTAT	TTCCGGAAAAG	TCATTGGCAG	CAAGCATGTG	AACTAACCCC	GATTTTCAAT		
N.nucifera_GSchlo1	CCCATGGTGT	TCCCTCAAAG	TCATTGGCAA	CAAGCTTGTG	AGTTAGCTCC	CCCTTTCAAT		
T.cacao_GSchlo2	CCCATGTCTGT	TTCCAAAATC	TCATTGGAAG	CAAGCATGTG	AACTAGCTCC	AATTTTCAAC		
N.nucifera_GSchlo2	CCCATGTCTGT	TCCCTGGGAG	TCATTGGCAA	CAAGCATGTG	AGTTAGCTCC	GCTCTTCAAT		
T.cacao_GSchlo1	CCCATGTCTGT	TTCCAAAATC	TCATTGGAAG	CAAGCATGTG	AACTAGCTCC	AATTTTCAAC		
C.sinensis_GSchlo	CCTGTGTCTAT	TCCCTGAAAAG	TCATTTGAGA	GAGGCATGTG	AGTTAGCCCC	GATTTTCAAT		
G.max_GSchlo	CCTGGGCCAT	TTCCGTGAAA	TCATTGGAAG	CAAGCTTGCC	AATTAGCTCC	TATATTCAAT		
M.truncatula_GSchlo	CCAACTGTCT	TTCCAGAAAAG	TAAATGGAAG	CAAGCTTGTG	ATTTGGCACC	TATATTCAAT		
R.communis_GSchlo	CCTGTAGCAT	TTCCGTGAAAAG	TCAATGGAAG	CTAGCATGTG	AGGTTGCACC	GATTTTCAAT		
M.musculus_GS	CCCTGGCCAG	TACCCAGTGC	TCTGTGGAG	GAGGCCTATG	CTGTGAGAT	GGACTTCAAC		

1081

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	GAACTCGTGG	ATCGCTGAG	-----	-----TT	TGGATGGAAA	ATTCCTACAG		
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GAGCTAGTTG	ACCGTCTGAG	-----	-----TT	TGGATGCCAA	ATTCCTGCAG		
V.vinifera_GSchlo	GAACTTGTAG	ATCGTCTGAG	-----	-----TT	TGGATGGAAA	ATTTCTACAG		
N.nucifera_GSchlo1	GAGCTTGTGG	ATCGTCTGAG	-----	-----CT	TGGATGGGAA	ATTCCTACAG		
T.cacao_GSchlo2	GAACTAATCG	ATCCTGTAAG	-----	-----TC	TAGATGGAAA	GTTTCTGCAA		
N.nucifera_GSchlo2	GAGCTGGTAG	ATCGTCTGAG	-----	-----CT	TAGATGGGAA	ATTCCTACAG		
T.cacao_GSchlo1	GAACTAATCG	ATCCTGTAAG	-----	-----TC	TAGATGGAAA	GTTTCTGCAA		
C.sinensis_GSchlo	GAACTCGTGG	ATCGTCTGAG	-----	-----TT	TGGATGGAAA	ATTTCTACAG		
G.max_GSchlo	GAACTTGTGG	ATCGGTGAG	-----	-----TT	TGGATGGGAA	ATTTCTGCAG		
M.truncatula_GSchlo	GAACTTGTGG	ACCGTCTTAG	-----	-----TT	TAGATGGTAA	ATTTCTCAA		
R.communis_GSchlo	GAACTGATCG	ATCGTCTTAG	TCNNNNNNNN	NNNNNNAGTC	TGGATGGAAA	ATTTCTGCAG		
M.musculus_GS	ATACTGGTGG	ATCGTCTGAG	-----	-----CC	AGAA	CCGAGC	GTTCTTGCAG	

1141

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	GACTCGCTAT	CCAGAACGAA	GAAAGTGGAT	CCCTTTACTT	CCAGACTCCT	GGAAATTCAT		
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GAACTACTCT	CCAGAACCAA	AAAAGTAGAG	GTTTTTACAT	CTAGACTTCT	AGATATTCAT		
V.vinifera_GSchlo	GAGGCACTAT	CCAGAACAAA	GAAAGTGGAT	TCTTTACCT	CTAGACTCCT	AGACTTCAT		
N.nucifera_GSchlo1	GACTCGCTTT	CCAGAACTAA	GAAAGTGGAT	ATCTTTACCA	GTAGACTCCT	GGATATTCAT		
T.cacao_GSchlo2	GACTCACTAT	CAAGGACAAA	AAAAGTAGAT	GCTTTACCT	CTAGACTTTT	AGATATTCAT		
N.nucifera_GSchlo2	GACTCACTGT	CCAGAACTAA	GAAAGTGGAT	GCCTTCACTG	ATAGACTTTT	GGATATTCAT		
T.cacao_GSchlo1	GACTCACTAT	CAAGGACAAA	AAAAGTAGAT	GCTTTTACCT	CTAGACTTTT	AGATATTCAT		
C.sinensis_GSchlo	GAGTCTCTAT	CCAGAACAAA	GAAAGTGGAT	GCTTTTACCT	CTAGGCTCCT	GGATATTCAT		
G.max_GSchlo	GAATCTCTCT	CCAGAACTAA	GAAAGCGGAC	GAAATTTACCT	CAAGACTTTT	AGATATTCAT		
M.truncatula_GSchlo	GAATCTCTCT	CAAGAACTAA	GCAAGTGGAC	GAAATTTACCT	CTAGACTTTT	AGATATTCAT		
R.communis_GSchlo	GACTGATTAT	CAAGAACAAA	GAAAGTAGAT	GTTTTTACAT	GAAGACTTCT	GGATATTCAT		
M.musculus_GS	CAAACTACTGT	CTAGAACCAT	CAAAAAGGAC	GACTATACTG	CCCGTCTCTT	TGATATTCAT		

1201

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	TCC AAGATGT	TAGATGCCAA	GAAAATAGAG	GAAATACGTT	TAGGAATACA	TCGTTGAGAC
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	CCC AAAATGA	TAGATATTGA	CAAGAAAAGAG	GAAATACGCT	TAGGATTTACA	TCCGTCGGAC
V.vinifera_GSchlo	TCC AAGATGC	AAGAAATGAA	TAAGAAAAGAG	GAAATACGCT	TGGGTTTACA	TCCGATGAGAT
N.nucifera_GSchlo1	TCC AAGATGT	TAGAAATCAA	TAAGAAAAGAG	GAAATACGTC	TGGGTTTGCA	TCCGTCGAGAT
T.cacao_GSchlo2	TCC AAGATGT	TAGAAATGAA	CAAGAAAAGAG	GAAATACGCT	TGGCTTTACA	TCCGAGGAGAT
N.nucifera_GSchlo2	TCAAAAATGT	TAGGAATCAA	TAAAAAAGAG	GAAATACGCT	TGGGCTTACA	TCCGATGAGAT
T.cacao_GSchlo1	TCC AAGATGT	TAGAAATGAA	CAAGAAAAGAG	GAAATACGCT	TGGCTTTACA	TCCGAGGAGAT
C.sinensis_GSchlo	TCAAAGATGC	TAGAAATCAA	TAAGAAAAGAG	GACATACGCT	TGGGTTTACA	TCCGTTGAGAT
G.max_GSchlo	TCTAAGATGC	TAGAGATTAA	CAAAAAAGAG	GACATACGCA	TGGGAATAGT	TCCGTTGAGAT
M.truncatula_GSchlo	TCC AAGATGC	TAGAGATTCAA	CAAAAAAGAG	GAAATAAGAT	TGGATTTACA	TCCGTTGAGAC
R.communis_GSchlo	TCC AAGATGC	TAGAAAAGAA	TAAGATGGAG	GAGATAAGCT	TGGGTTTACA	TCCGTCGAT
M.musculus_GS	AAA CAAGTCC	TGAAA GAGGG	CATTGCCAG	ACC GTGTTCC	TGGGCTGAA	TCCGTCGAT

1261

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	TACATGCTGG	ATGAAAGAAA	-----CT	AAATTACTTC	TCCAAATAGA	GCTCAACACA
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	---TTACTTC	TCCAAATAGA	GCTCAACACA
S.indicum_GSchlo	TATATGCTGG	ATGAAAGAAA	-----CT	AAATTGCTTC	TCCAAATAGA	GTTGAATACA
V.vinifera_GSchlo	TATATGCTCG	ATGAAAGAAA	-----CA	AAATTACTTC	TCCAAATAGA	GCTCAACACA
N.nucifera_GSchlo1	TATATGTTTG	ATGCTCAAAA	-----CT	AATCTACTAT	TCCAAATAGA	GCTCAACACT
T.cacao_GSchlo2	TACATGCTTG	ATGAGAAAA	-----CT	AAGTTACTCC	TCCAAATAGA	GTTGAACACA
N.nucifera_GSchlo2	TATATGCTTG	ATGCTCAAAA	-----CT	AACTACTAT	TGCAAAATAGA	GCTCAACACT
T.cacao_GSchlo1	TACATGCTTG	ATGAGAAAA	-----CT	AAGTTACTCC	TCCAAATAGA	GTTGAACACA
C.sinensis_GSchlo	TATATGCTTG	ATGAAAGAAA	-----CT	AAATCGCTCC	TCCAAATAGA	GGTTAAGACA
G.max_GSchlo	TATATGATTG	ATGAGAAGA	-----CT	AAATGACTTT	TGCAAAATAGA	GATGAACAG
M.truncatula_GSchlo	TATATGCTTG	ATGAAAGAAA	-----CC	AAATGACTTT	TGCAAAATAGA	GCTCAACACT
R.communis_GSchlo	TACATGCTTG	ATGAAAGAAA	-----CT	AAATGCTTC	TCCAAATAGA	ACTAAATACA
M.musculus_GS	TACATGTTCC	AGTGGGGCC	AGA GGGCTCC	AAAGCCCTGA	AACAGATCGA	GATCAACACT

1321

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	ATTTGATCTT	CATTTCCAGG	GCTGAGCAGT	CTTGTTAGTG	AACTTGACAG	TCTTCTTCC
GS_Pollen_1	ATTTGATCTT	CATTTCCAGG	GCTGAGCAGT	CTTGTTAGTG	AACTTGACAG	GAGCTTACTT
S.indicum_GSchlo	ATTTGATCAT	CATTTCCCTGG	CCTGAGCTGC	CTTGTTAGTG	AGCTTGACAG	GAGCTTGCTT
V.vinifera_GSchlo	ATTTGATCTT	CGTTTCCCTGG	CCTGAGTTGT	CTTGTTACCG	AGCTAGACAG	GAGCTTACTT
N.nucifera_GSchlo1	ATTTGATCTT	CATTTCCCTGG	TCTTAGTTGT	CTTGTCAGTG	AGCTTGACAG	GAACCTACTT
T.cacao_GSchlo2	ATTTGATCTT	CATTTCCCTGG	CTTGTTGTTGT	CTTGTCAGTG	AGCTTGACAG	GAGCTTACTT
N.nucifera_GSchlo2	ATTTGATCTT	CATTTCCCTGG	TCTTAGCTGT	CTTGTCAGTG	AGCTTGACAG	GTACTTACTT
T.cacao_GSchlo1	ATTTGATCTT	CATTTCCCTGG	TCTTGTTGT	CTTGTCAGTG	AGCTTGACAG	GAGCTTACTT
C.sinensis_GSchlo	ATTTGATCTT	CATTTCTCTGG	CCTGAGCTGT	CTTGTCAGTG	AGCTTGACAG	AAGCTTACTC
G.max_GSchlo	ATTTCCACTT	CATTTGCTTT	GATTGGTTGC	CTTATGACTG	GACTTCATAA	GAGCTTACTT
M.truncatula_GSchlo	ATTTGATCTT	CATTTGCTGG	TTTTAGTACT	CTTGTCAGTG	AACTTGACAG	GTAATACTT
R.communis_GSchlo	ATTTGAGCTT	CGTTTCCCTGG	CCTGAGCCCT	CTTATGACCA	ATCTTGACAG	GAGCTTGCTG
M.musculus_GS	ATCTCTGCCA	GCTTTGGGGG	CCTGGCCTCC	GGGATCCAG	CTGTGACCG	ACACTTCTC

1381

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	AAGTCCCTTG	AGCCATTCTT	GCAATTTTGG	AGGATTTTGG	AGAT-----	-----ATT
GS_Pollen_1	CATCAATATA	AAACAACACCT	CGCACTAAAT	CCAGAAAGGA	TTCCCGAAAA	CAGTGTGTT
S.indicum_GSchlo	CATGAGTTCA	AGCAACACCT	TGGTTTAGAT	CCAGAGAGGA	TTCCAGAAAA	CAATGTGTT
V.vinifera_GSchlo	AATGATTATG	GGAAACACCT	TGGATTAGAT	TCCAAAAGGA	TCCCTGGAAA	CAGTGTGTT
N.nucifera_GSchlo1	CGTACCATG	GAGAGCACCT	TGGATTAGAT	CCAAAGAGGA	TCCCTGGAAA	CAATGTGTT
T.cacao_GSchlo2	AATGAGTATG	GAGAAGACCT	TGGATTAGAT	TCTAAAAGGA	TTCCCTAGCAA	CAGTGTGTT
N.nucifera_GSchlo2	GATGACAAATG	GTAAGCACCT	AGGTTTGTAT	CCAAAAGGG	TCCCTGGAAA	TGATGTGTT
T.cacao_GSchlo1	AATGAGTATG	GAGAAGACCT	TGGATTAGAT	TCTAAAAGGA	TTCCCTAGCAA	CAGTGTGTT
C.sinensis_GSchlo	ATTTGACTATG	GGGAAACGCT	CGGATTAGAT	TCAAAAAGG	TCCCTGGCAA	CTCTGTGTT
G.max_GSchlo	TCTCAATATG	GAAAATTCCCT	TGGACTAGAT	TCCAAATAGGG	TTCCCTGCCAA	TAATGTGTT
M.truncatula_GSchlo	ACTTCCCATG	GAAAAATGGT	TGGTGTGGAT	TCAGAAAAGG	TTCCCTGCCAA	TAATGTGTT
R.communis_GSchlo	AAGGATCATG	GAAAAACACCT	CGGATTAGAT	CCCAAGAGG	TACCAACAA	CAATGTGTT
M.musculus_GS	AATGTCCTGA	ATAAGACC--	----AAAGAA	GCTTCAAGA	TCCTGTCCAA	TAAACCCAG

1441

GS_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	GCAGCCCTTGA	AATAGGAGCT	TACTTCATAC	TAGAGGCGTG	-----	-----
GS_Pollen_1	ACTAAGTTTG	CTGAAGCATT	GTCTAAAGCG	TGGAGTGAAT	ATAATAAACC	AAGGGCAGTA
S.indicum_GSchlo	GGTCATTTTG	CTGAAGCATT	GTATAAAGCC	TGGCTGAAT	ATAATAAACC	CAGGAGTGTG
V.vinifera_GSchlo	ACTCAGTTTG	CAGAAGCATT	GGCTCAAGCT	TGGAAGAGT	ATAATAAACC	CAGGGCTTTA
N.nucifera_GSchlo1	AATCAATATG	CAGATGCATT	AGCTAGAGCT	TGGAATCAGT	ATAATGATTG	AAGGGCTGTG
T.cacao_GSchlo2	GGTCAGTTTG	CTGAGGCATT	GGCTAAAGCT	TGGACTGAGT	ATAATAAACC	CAGGGCTGTA
N.nucifera_GSchlo2	AGTCAGTACG	CTGAGGCATT	GGCTAAAGCT	TGGAATCAGT	ATAATAATTG	AAGGGCTTTT
T.cacao_GSchlo1	GGTCAGTTTG	CTGAGGCATT	GGCTAAAGCT	TGGACTCAGT	ATAATAAACC	CAGGGCTGTA
C.sinensis_GSchlo	ATTGAGTTTG	CAGAGGCTAT	GGCTAAAGCT	TGGACTGAGT	ATAATAATGC	TAGGGCTTTG
G.max_GSchlo	GATCAGTCTG	CAGAGGCCCT	GGCTAAAGCT	TGGAGTGAAT	ATAACAATCC	CAGGGCTGCA
M.truncatula_GSchlo	AGCCAGAAATG	CCGAGGCCCT	GGCTAAAGCT	TGGAGTGAAT	ATAATAAACC	AAGGGCTGTG
R.communis_GSchlo	AATCAATTTG	CAGAGGCCCT	GGCTAAAGCT	TGGATGAGT	ATAATAGCCC	TAGGGCTGTA
M.musculus_GS	AAGGGACTGG	CCCTGGGGAT	CGCCAAAGCC	TGGGAGCTCT	ATGGCTCAGG	TAATGCGGTG

1501

GS_Pistil_1	-----GTTG	TGGTACAAAC	TGAAGAACGA	AATATGTATG	ATCAACACTG	GCTTTGTACA
GS_Pistil_2	-----	-----	-----ACGA	AATATGTATG	ATCAACACTG	GATTTGTACG
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	GTTATGGTTG	TGGTACAAAC	TGAAGAACGA	AATATGTATG	ATCAACACTG	GCTTTGTACA
S.indicum_GSchlo	GTTATGATCG	TGGTTCAAAC	TGAAGAACCT	AACATGTATG	ATCAACACTG	GCTTTTACCA
V.vinifera_GSchlo	GTTATGTTTG	TGGTTCAAAC	TGAAGAACGA	AACATGTATG	ATCAACACTG	GCTCAGCACA
N.nucifera_GSchlo1	ATTATGATTG	TGGTCCAAAC	TGAAGAACCT	AACATGTATG	ATCAACACTG	GCTTTGTTTG
T.cacao_GSchlo2	GCTTTGGTTG	TTGTTCAAAC	TGAAGAACCT	AATATGTATG	ATCAACACTG	GCTATGTACA
N.nucifera_GSchlo2	GTAATGATTG	TGGTCCAAAC	TGAAGAACCT	AACATGTATG	ATCAACACTG	GCTTTGTACC
T.cacao_GSchlo1	GCTTTGGTTG	TTGTTCAAAC	TGAAGAACCT	AATATAAAAA	TG-----	-----
C.sinensis_GSchlo	GTTCTGGTTG	TGGTTCAGAG	TGAAGAACAT	AATATGTATG	ATCAACACTG	GCTTAGTTCT
G.max_GSchlo	ATTCTGGTGG	TGGTTCAGT	TGAAGAACGA	AACATGTATG	ATCAACACTG	TATTTCTGCA
M.truncatula_GSchlo	ATTATGACTG	TGGTTCAGGC	TGAAGAACGA	AACATGTATG	ATCAACACTG	TCTTTCTGCT
R.communis_GSchlo	GTAATGGTTG	TTATTCAAAC	TGAGGAGCGG	AACATGTATG	ATCAACACTG	GCTTTCTGTT
M.musculus_GS	GTCCTACTGA	TTGCTCAAGA	GAAGGAAAGG	AACATATTTG	ATCAACACTG	GCTAGAGAAC

1561

GS_Pistil_1	ACGTTGTATG	AAAGATATGA	-----	-----	-----AGTTAC	AAGTATTAGA
GS_Pistil_2	ACGTTGAAGG	AAAGATATGA	-----	-----	-----AGTTAC	AAGTATTAGA
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	ACGTTGAAGG	AAAGATATGA	-----	-----	-----AGTTAC	AAGTATTAGA
S.indicum_GSchlo	GTATTGAAAAG	AAAGATATGA	-----	-----	-----AGTTAG	AAGTATTAGG
V.vinifera_GSchlo	GCAATGAAAAG	AAAGATATGA	-----	-----	-----TGTTAC	AACATTTCCG
N.nucifera_GSchlo1	ACGTTGAAGG	AGAAAATGA	-----	-----	-----TGTGAC	AGCTATTCCG
T.cacao_GSchlo2	ATGTTGAAAAG	AAAGACATAA	-----	-----	-----TGTGAG	AAGTATTAGG
N.nucifera_GSchlo2	ACATTGAAAAG	AGAGATATGA	-----	-----	-----TGTAAC	AACCATTCGG
T.cacao_GSchlo1	---CTTCATA	ACAAAATGA	-----	-----	-----TGTGAC	AACCTTTAGG
C.sinensis_GSchlo	GTAAGTAAAAG	AAAGACATAA	-----	-----	-----TGTTAC	AACATTTCCG
G.max_GSchlo	CTTCTAAGAG	AAAAAATGA	-----	-----	-----TATTAG	AAGCATACCG
M.truncatula_GSchlo	GTTCTAAGAG	ACAAAATTCG	TTATGACTCT	TTGAAACCGG	ATGGTATTAC	AATCTTTCCG
R.communis_GSchlo	ACTCTGAAGG	AAACAATTCG	T-----	-----	-----TTGATGTT	CACTATTCCG
M.musculus_GS	GAGCTGCTAG	ACAGGAA---	-----	-----	-----GATCCA	TGTCATCCCT

1621

GS_Pistil_1	AAGACATTGG	CGGAAATTGA	TGCGCTTGGG	GAGCTTCTGC	CAGATGGAAAC	ACTTGTGTG
GS_Pistil_2	AAGACATTGG	CAGAAATTGA	TGCGCTTGGG	GAGCTTCTGC	CAGATGGAAAC	ACTTGTGTG
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	AAGACATTGG	CGGAAATTGA	TGC-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	AAGACCTTGG	CAGAGATTGA	TGCAGAAAGG	GAGCTTCTGC	CTGATGGGAC	ACTTGTGTG
V.vinifera_GSchlo	AAAAATTGG	CAGAAATTGA	TGCAGAAAGG	AAGCTTCTGC	CAGATGGAAAC	ACTGACAGTA
N.nucifera_GSchlo1	AAAACTTTGA	CAGAAATTGA	TGCAGAAAGG	GAGCTTCTGC	CAGATGGAAAC	ACTTCTGTG
T.cacao_GSchlo2	AAAAATTGG	CTGAAATTGA	TAGAGAAGG	GAGCTTTTAC	CAGATGGCAC	ACTTCTGTG
N.nucifera_GSchlo2	AGAAATTGG	CAGAAATTGA	TGCAGAAAGG	GAGCTTTTGC	CAGATGGAAAC	ACTTCTGTG
T.cacao_GSchlo1	AAAAATTGG	CTGAAATTGA	TAGAGAAGG	GAGCTTTTAC	CAGATGGCAC	ACTTCTGTG
C.sinensis_GSchlo	AAGACATTGG	CTGAAATTGA	TGCAGAAAGG	GAACTACTCC	CTGATGGAAAC	ACTTCTGTG
G.max_GSchlo	AAAAATTGA	CAGAAATTGA	TGAGAAAGG	GAAATTTCTGC	CAGATGGAAAC	ACTTCTGTG
M.truncatula_GSchlo	AAAAGATGG	CAGAAATTGA	CCAAAGGGA	GAAATTTCTGC	CAGATGGAAAC	ACTTCTGTG
R.communis_GSchlo	AAAAATTGG	CAGAAATTGA	TGAGAAAGG	GAACTTCTGC	CAGATGGAAAC	ACTTCTGTG
M.musculus_GS	GGAAGATTGG	AAGATGCTCT	TGAAAGGGGT	TCTCTGGACC	AAAACTGAAAC	GCTGTTTATG

1681

GS_Pistil_1	GATGGTGAAG	CAGTTGCGGT	CGTATATTTT	AGAGGTGGGT	ATGCACCAAG	TGATTATCCT
GS_Pistil_2	GATGGTGAAG	CAGTTGCGGT	CATATATTTT	AGAGGTGGGT	ATGCACCAAG	TGATTATCCT
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GAGGTGAAG	CGTTGCTGT	GTTTACTTT	AGAGGTGGGT	ATGCACCAAG	TGATTATCCT
V.vinifera_GSchlo	GGTGGCCAAG	CAGTTGCTGT	CATTTATTTT	CGAGGTGGGT	ATGCACCAAG	TGATTATCCT
N.nucifera_GSchlo1	TGTGGCCAAG	CAGTTGCTGT	TATCTACTTC	AGAGGTGGGT	ATGCACCAAG	TGATTATCCT
T.cacao_GSchlo2	GATGGCCAAG	CAATTGCAGT	CATCTATTTT	AGAGCAGGGT	ATGCACCGAC	TGATTATCCT
N.nucifera_GSchlo2	GGTGGCCAAG	AAATTGCAGT	CATCTATTTT	AGAGGTGGGT	ATGCACCAAG	TGATTATCCT
T.cacao_GSchlo1	CATGGCCAAG	CAATTGCAGT	CATCTATTTT	AGAGCAGGGT	ATGCACCGAC	TGATTATCCT
C.sinensis_GSchlo	GGTGGCCAAG	TAATTGCAGT	TGTTTATTTT	AGAGGTGGGT	ATGCACCAAG	TGATTATCCT
G.max_GSchlo	GACGGACAAG	AAATTTTCAGT	TGTTTACTTC	CGGGGTGGGT	ATGCACCAAG	TGATTATCCT
M.truncatula_GSchlo	AATGGACAAG	CAGTTGCTGT	AAATTTACTTC	AGGGGTGGGT	ATGCACCGAC	TGATTATCCT
R.communis_GSchlo	GGTGGCCAAG	CAATTGCAGT	GGTTTATTTT	AGATCTGGAT	ATGCACCGAC	TGATTATCCT
M.musculus_GS	GATGACCAAG	AAGTTGCTGT	GGTGTACTTC	CGAGATGGGT	ACATGCCCCG	TCAGTATAAT

1741

GS_Pistil_1	TCAGAATCAG	AATGGAGAGC	TAGGCTACTG	ATGGAGCAGT	CATCGGCAAT	AAAGTGCCCT
GS_Pistil_2	TCAGAATCAG	AATGGAGAGC	TAGGCTACTG	ATGGAGCAGT	CATCGGCAAT	AAAGTGCCCT
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	TCAGAATCAG	AATGGAGTGC	TAGGCTACTG	ATTGAGCAAT	CATGTGCAAT	CAAAATGCCCT
V.vinifera_GSchlo	TCAGAATCAG	AATGGAGAGC	AAGGCTAATA	ATGGAGCAGT	CATCTGCTGT	CAAGTGCCCT
N.nucifera_GSchlo1	TCAGAATCAG	AATGGAGAGC	TAGGCTACTA	ATGGAGCAGT	CCTCTGCTAT	CAAGTGCCCA
T.cacao_GSchlo2	TCAGAATCAG	AGTGGAGAGC	TAGGTTGTTA	ATGGAGCAGT	CCTCAGCTAT	CAAGTGCCCA
N.nucifera_GSchlo2	TCAGAATCAG	AATGGAGAGC	TAGGCTACTA	GTGGAGCAAT	CCTCTGCTAT	CAAAATGCCCT
T.cacao_GSchlo1	TCAGAATCAG	AGTGGAGAGC	TAGGTTGTTA	ATGGAGCAGT	CCTCAGCTAT	CAAGTGCCCA
C.sinensis_GSchlo	TCAGAATCAG	AATGGAGAGC	TAGATTACTA	ATGGAGCAGT	CTTCTGCTGT	CAAGTGCCCA
G.max_GSchlo	TCAGAATCAG	AATGGAGAGC	TAGGCTACTG	ATGGAACAAT	CTTCTGCTAT	CAAAATGCCCT
M.truncatula_GSchlo	TCAGAATCAG	AATGGAGAGC	TAGGCTACTG	ATGGAACAAT	CTTCTGCTGT	CAAAATGCCCT
R.communis_GSchlo	TCAGAATCAG	AATGGAGAGC	TAGGTTACTA	ATGGAGCAGT	CTCTAGCAAT	CAAGTGCCCG
M.musculus_GS	TCAGAGAA--	-CTGGGAAGC	ACGCTGATG	CTAGAGAGAT	CTCTGCTGTC	CAAGTGCCCA

1801

GS_Pistil_1	TCAATTGCGT	ACCATTTAGC	TGGACCAAG	AAGATTC AAC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
GS_Pistil_2	TCAATTGCGT	ACCATTTAGC	TGGACCAAG	AAGATTC AAC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	TCAATTGCAI	ATCATTTAGC	TGGACCAAG	AAGATTC AAC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
V.vinifera_GSchlo	TCAATTTCTT	ATCATTTAGC	AGGTACCAAG	AAAATTCAGC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
N.nucifera_GSchlo1	TCTATTTCTT	ACCATTTAGC	AGGAACCAAG	AAGATTCAGC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
T.cacao_GSchlo2	TCAATATCAT	ATCATTTAGC	AGGAAGTAAG	AAGATTC AAC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
N.nucifera_GSchlo2	TCTATTTCTT	ACCATTTAGC	TGGAAC TAAG	AAGATTC AAC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
T.cacao_GSchlo1	TCAATATCAT	ATCATTTAGC	AGGAAGTAAG	AAGATTC AAC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
C.sinensis_GSchlo	TCAATATCTT	ATCATTTAGC	AGGACCAAG	AAAATTC AAC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
G.max_GSchlo	ACTATATCTT	ATCATTTAGC	TGGACCAAAA	AAGATTC AAC	AGGAAGTTGC	CAAAACCAAT
M.truncatula_GSchlo	TCAATATCTT	ATCATTTAGC	TGGACCAAG	AAGATTC AAC	AGGAAGTTGC	CAAAACCAAT
R.communis_GSchlo	TCAATATCTT	ATCATTTAGC	GGGAACCAAG	AAGATTCAGC	AAGAAGTTGC	CAAAACCAAT
M.musculus_GS	GACATTGCCA	TACAGCTGGC	TGGGACTAAG	AAGGTGCAGC	AGGAAGTTGC	CAGGCTGGCT

1861

GS_Pistil_1	GTAATTGAAA	GATATCTTGA	AAA AAAGAT	G---ATATTG	TCAAATTACG	AAAATGCTTT
GS_Pistil_2	GTAATTGAAA	GGTAAGTTAC	TTGTAAGAGT	G---TGTAAC	TCTTTCCCGA	AGGCTGATTA
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GAAATTGAAA	GGTTCTTGA	AAG AAAGAT	G---ACATTG	CTAAAGTACG	GAAATGCTTT
V.vinifera_GSchlo	GTAATTGAGA	GGTTCTTGA	GAA AAAGAT	G---ACATTG	CCAAAGTACG	GAAATGCTTT
N.nucifera_GSchlo1	GTAATTGAAA	GGTTCTTGA	GAA CAAGGAT	G---ATATTG	CCAAGTACG	TAAATGCTTT
T.cacao_GSchlo2	ATGCTTGA	GGTTCTTGA	GAATAAAGAA	G---ATATTG	TCAAATTGCG	GAAATGCTTT
N.nucifera_GSchlo2	GTAATTGAAA	GGTTCTTGA	GAA CAAGGAT	G---ACATTT	CCAAAGTACG	TAAATGCTTT
T.cacao_GSchlo1	ATGCTTGA	GGTTCTTGA	GAATAAAGAA	G---ATATTG	TCAAATGCG	GAAATGCTTT
C.sinensis_GSchlo	GTAATTGAGA	GGTTCTTGA	CAATAAAGAG	G---ATATTG	CCAAAGTACG	TAAATGCTTC
G.max_GSchlo	GTTCTTGA	GGTTCTTGA	AAA AAAGAT	G---ACATTG	CCAAATGCG	TGATGCTTT
M.truncatula_GSchlo	GTTCTTGA	GGTTCTTGA	AAA AAAGAG	G---ATATTG	CAAAAATGCG	TGATGCTTT
R.communis_GSchlo	GTTCTTGA	GGTTCTTGA	GAATAAAGAT	G---ACATTT	CCAAGTACG	GAAATGCTTT
M.musculus_GS	CTGCTGGAAG	CATGCTCCG	GGGCGAGCCC	GAGGTGCTGG	CCCGCTCCG	AGCCAGCTTT

1921

GS_Pistil_1	GCTGGGTTAT	--GGAGTC--	-----TG	GAGGACTCCA	ACATCGTTAA	TGATGGTATT
GS_Pistil_2	AGTTCAACTT	TTTTCGTG	-----CT	TAATCATAAC	ATAAGCTGGA	AGACGCATAG
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GCTGGGTTGT	--GGAGTT--	-----TG	GACGACTCGA	GCATTGTGAA	GGATCGAATC
V.vinifera_GSchlo	GCTGGGTTGT	--GGAGTT--	-----TA	GATGACTCAA	ACATCATCAA	GGAGGCGATT
N.nucifera_GSchlo1	GCTGGATTAT	--GGAGTT--	-----TG	GATGACTCCA	ATGCTGTGAA	GAATCGAATC
T.cacao_GSchlo2	GCCGGATTGT	--GGAGTT--	-----TG	GATGACTTGG	ACATTATTAG	AAAAGCAATA
N.nucifera_GSchlo2	GCTGGGTTGT	--GGAGTT--	-----TG	GATGACTCTA	GTGTTGTGAA	GAATGCCATT
T.cacao_GSchlo1	GCCGGATTGT	--GGAGTT--	-----TG	GATGACTTGG	ACATTATTAG	AAAAGCAATA
C.sinensis_GSchlo	GCAGGATTGT	--GGAGTT--	-----TG	GATGATTCTG	AGAATGTCAG	GAAAGCAATT
G.max_GSchlo	GCAGGATTGT	--GGAGTT--	-----TG	GAAGACTCGG	ATATTGCTAA	AAAAGCAATT
M.truncatula_GSchlo	GCAGGACTAT	--GGAGTT--	-----TG	GATGACTCAG	ATATTGTTAA	AAAAGCAATT
R.communis_GSchlo	GCTGGTCTTT	--GGAGTT--	-----TG	GATGACTTGG	ATATTATTAA	TAGAGCCATT
M.musculus_GS	GCTGCCTCT	ATTCACTGGA	CATGGGTGAA	GAAGGGGACC	AGGCCATTGC	TGAGGCCCTT

1981

GS_Pistil_1	GAGAAACCTG	GATTATATGT	GATGAAGCCC	CAAAGAGAAG	GAGGAGGGAA	CAATATCTAT
GS_Pistil_2	---AATGTT	GGTTTTGTGT	TTTTCAGT--	AATGGTGAAT	GAAC---TTT	CAATAAATT-
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GAGAGCCCG	GATTGTATGT	CATGAAGCCA	CAAAGAGAAG	GAGGAGGGAA	CAATATTTAT
V.vinifera_GSchlo	GAAAGACCTG	AGGTCTTTGT	TATGAAACCA	CAGAGAGAAG	GCCGAGGGAA	CAATATCTAT
N.nucifera_GSchlo1	AAGAGCCCTG	AGTTATTTGT	TCTCAAGCCC	CAAAGTGAAG	GAGGAGGGAA	CAATATCTAT
T.cacao_GSchlo2	GATAAACCCG	AGTTATTTGT	CATGAAGCCC	CAAAGAGAAG	GAGGAGGGAA	CAATATCTAT
N.nucifera_GSchlo2	GAGAGCCCTG	AATTATTTGT	TCTCAACCCG	CAAAGAGAAG	GAGGAGGGAA	TAATATCTAT
T.cacao_GSchlo1	GATAAACCCG	AGTTATTTGT	CATGAAGCCC	CAAAGAGAAG	GAGGAGGGAA	CAATATCTAT
C.sinensis_GSchlo	GAAAACCCAG	AGTTATATGT	CATGAAGCCC	CAAAGAGAAG	GCCGAGGGAA	CAATATTTAC
G.max_GSchlo	GAAAATCCAG	AGTTATTTGT	GATGAAGCCT	CAAAGAGAAG	GAGGAGGAAA	CAATATTTAT
M.truncatula_GSchlo	GAAAGACCCG	AATTATTTGT	GATGAAGCCC	CAGAGAGAAG	GAGGAGGAAA	CAATATTTAT
R.communis_GSchlo	GAAAGACCTG	AGTTATTTGT	GATGAAGCCT	CAAAGAGAAG	GCCGAGGGAA	CAATATCTAT
M.musculus_GS	GCTGCTCCTA	CCGACTTTGT	GCTGAAGCCC	CAGAGAGAGG	GTGGAGGTAA	CAACTTATAC

2041

GS_Pistil_1	GGTGATGATG	TGAGAGAGAC	TCTACTTAGA	ATAGAAAAGG	AAGGCTCAAA	CGAAAATCCA
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GGTGATGATG	TGAGGCTTGT	CTTGCAACGA	TTGGAGAAGG	AAGGCAATGA	GGAAGATGCA
V.vinifera_GSchlo	GGTGATGATG	TGAGGGAGAC	CCTACTAAGA	TTGAGAAAGG	AAGGAACTGA	AGAAGATGCT
N.nucifera_GSchlo1	GGTGACAATG	TGAGGGAAAC	TCTATTGAAA	CTGGAAAGGG	AAGGACTTGA	AGAACTTGCT
T.cacao_GSchlo2	GGTAATGATG	TGAAGGAAAC	CCTTCTACAA	TTAATAAAGG	AAGGCTCTGA	AGAAGATGCT
N.nucifera_GSchlo2	GGTGACAATG	TGAGGGAAAT	CCTATTGAAA	CTGGAGCAGG	AAGGAAAGGA	AGAACTAGCA
T.cacao_GSchlo1	GGTAATGATG	TGAAGGAAAC	CCTTCTACAA	TTAATAAAGG	AAGGCTCTGA	AGAAGATGCT
C.sinensis_GSchlo	GGTGAAGATG	TGAAGGAAAC	CCTTCTTAGA	TTGAAAAGG	ATGGGACTGA	GGAAGATGCT
G.max_GSchlo	GGTGATGAGT	TGAGGGAAAC	CCTCCTTAAA	TTAAGGAAG	CAGGTTCTGA	AGAAGATGCA
M.truncatula_GSchlo	GGTGATGAGT	TGAGGGAAAC	CCTCCTTAAA	TTAAGGAAG	CAGGTTCTGA	AGAAGATGCA
R.communis_GSchlo	GGTGATGATG	TGAGAAAAAA	CCTTTTCAGA	TTGAGAAAGG	AAGGAACTGA	AGAAGATGCA
M.musculus_GS	GGGAAGAAAA	TGGTACAAGC	TCTGGAGCAG	CTGAA-----	-GGACTGTGA	GGAGAGAGCC

2101

GS_Pistil_1	GCTTATATTG	TTATGCAGAG	AATTTTTCCG	ACTCTTTCTC	CTGCCATTCT	AATGCAGC--
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GCTTACATTC	TTATGCAGAG	AATTTTTCCA	ACCATTTCAC	CTGCAATTCT	GATACGAG--
V.vinifera_GSchlo	GCTTACATTC	TTATGCAAAAG	GATTTTTCCG	AAATGATCTC	CCAATTTCTC	GATGCGAG--
N.nucifera_GSchlo1	GCTTACATTC	TTATGCAAAAG	GATTTTTCCA	ACTGCTGCTT	CTGCATTTCT	GGTTCGGG--
T.cacao_GSchlo2	GCTTATATAA	TTATGCAGAG	GATTTTTCCG	ACTGTTTCTC	CCACAATTTT	GATGCGTG--
N.nucifera_GSchlo2	GCTTACATTC	TTATGCAAAAG	GATTTTTCCG	ACTGCTTCTT	CTGCATTTCT	GGTTCGAG--
T.cacao_GSchlo1	GCTTATATAA	TTATGCAGAG	GATTTTTCCG	ACTGTTTCTC	CCACAATTTT	GATGCGTG--
C.sinensis_GSchlo	GCTTACATTC	TTATGCAAAAG	GATTTTTCCG	AGTGTATCCC	TCACATTTTT	GATGCGTG--
G.max_GSchlo	GCATACATCC	TTATGCAGAG	GATTTTTCCA	GCCATTTCTC	CAGCAATTTT	GGTTCGCG--
M.truncatula_GSchlo	GCTTACATAC	TTATGCAGAG	GATTTTTCCA	AATATTTCTG	CTGCAGTTTT	GATGCGTA--
R.communis_GSchlo	GCTTACATAC	TCATGCAAGC	AATATTTCCA	TCTGTTTCCG	CTACTCTTTT	GGTTCGCG--
M.musculus_GS	TCTTACATCC	TCATGGAGAA	GATTGAACTT	GAGCCTTTTA	GGAATTGCTT	GCTACGGCCT

2161

GS_Pistil_1	-AAGGCATTT	CTCAAAAAGA	TAAAGTCATA	TCAGAACTTG	GCGTATATGG	AGCATATTTA
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	-AAGGACTTT	CTCATAAAGA	TCAGGTTATT	TCAGAACTTG	GCGTTTATGG	GGCATATTTA
V.vinifera_GSchlo	-AAGGCATTT	GTTAATAAGA	CCATGCCATA	TCAGAACTTG	GGATATATGG	GGCTTACTTA
N.nucifera_GSchlo1	-ATGGCATTT	GTCAACAAGA	CCATGCCATA	TCAGAACTTG	GGATATATGG	TGCTTATCTA
T.cacao_GSchlo2	-ATGGTATTT	GTCAATAAGA	ACATGCCATA	TCAGAGCTTG	GTATATACAG	TGCTTATTTA
N.nucifera_GSchlo2	-ATGGCATTT	ATCATCAAGA	AAATGCCATA	TCAGAACTTG	GGATATATAG	TGCTTATCTA
T.cacao_GSchlo1	-ATGGTATTT	GTCAATAAGA	ACATGCCATA	TCAGAGCTTG	GTATATACAG	TGCTTATTTA
C.sinensis_GSchlo	-ATGGCATTI	GTCAATAAGA	TCATGCCATA	TCTGAACTTG	GGATATATGG	TGCTTACTTA
G.max_GSchlo	-ATGGTAATT	GGGATATGGG	TCATGTCATT	TCAGAACTTG	GAGTATTTGG	TACTTATTTA
M.truncatula_GSchlo	-ATGGTGGTT	CCCACAAGGA	CCATGCCATC	TCAGAACTTG	GGATATTTGG	TACTTATTTA
R.communis_GSchlo	-AAGGCATTT	GTTATAGAGA	TCATGCAATC	TCAGAACTTG	GAGTGTATGG	TGCTTACTTG
M.musculus_GS	GGAGCCCTG	CCCAGGTGGT	CCAGTGTATC	TCGGAGCTGG	GTATTTTTGG	AGTCTATGTC

2221

GS_Pistil_1	AGGAAACAAG	CAAAAGTGAT	AATAAATGAG	GAATCTGGTT	ACTTGTTGGG	GACGAAGGTC
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	AGGAAACAAG	CAAAAGTGAT	CATTAATGGT	CAGTCTGGTT	ACTTAATGGG	GACGAAGGTC
V.vinifera_GSchlo	AGGAAACAAG	AGAAGGTGAT	CATAAATGAC	CAATGCGGTC	ACTTGATGAG	GACCAAGGTC
N.nucifera_GSchlo1	AGGAAACAAG	AGAAGGTGAT	AATAAATGAT	CAATCTGGTT	ATCTGATGGG	GACAAAAGTC
T.cacao_GSchlo2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo2	AGGAAACAAG	AGAAGGTTAT	AATGAATGAT	CAATCTGGTT	ACCTGGTGGG	TACAAAAGTC
T.cacao_GSchlo1	AGGAAACAATG	AGAAGGTTAT	CATGAATGAC	CAATCTGGTT	ACTTGATGGG	GACCAAGGTA
C.sinensis_GSchlo	AGGATCAAGG	AGAAGGTGAT	CATGAATGAA	CAAACTGGTT	ATTTGATGGG	GACGAAGGTT
G.max_GSchlo	AGGAATAAGG	ATAAGGTTAT	CATTAATAAC	CAAACTGGCT	ATATGGTGGG	TACAAAAATA
M.truncatula_GSchlo	AGGAATAAGG	ATAGGTTTGT	TATGAATAAT	CAAACTGGCT	ATTTGATGGG	TACGAAAATA
R.communis_GSchlo	AGGAAACAAG	ATAAGGTGAT	TATAAATGAC	CAAACTGGAT	ACTTGATGGG	AACAAAAGTA
M.musculus_GS	AGAGAGGGAA	CAAACTGGTT	GATGAAACAAG	CATCTGGGGG	ACCTGCTTGG	AACCAAGGCT

2281

GS_Pistil_1	TCTTCCTCAA	ATGAAGGCGG	AGTTGTTGCT	GGCTTCGGTG	TTATGGATAG	CATCTATTTA
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	TCTTCCTCAA	AGGAGGCTGG	GGTTCGAGCA	GGATTTCGCG	TTCTGGATAG	CATATATCTG
V.vinifera_GSchlo	TCTTCCTCAA	ATGAAGGTGG	TGTTCGAGCT	GGATTTCGAG	TTCTGGATAG	CATATATCTG
N.nucifera_GSchlo1	TCATCATCAA	ATGAAGGTGG	AGTTGCTGCT	GGTTATGCAG	TCCTGGATAG	TATATATTTG
T.cacao_GSchlo2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo2	TCATCATCAA	ATGAAGGTGG	AATTGCTGCT	GGTTATGCAG	TCCTGGATAG	TATATATTTG
T.cacao_GSchlo1	GCATCATCAA	ATGAAGTTTG	GGAAATCAAT	CAAGGCTCCT	CGACTGTACA	AACAACTTGA
C.sinensis_GSchlo	GCTTCTTCAA	ATGAAGGAGG	GGTAGAGCT	GGATTTCGGG	TCTTGGACAG	TTTATATTTA
G.max_GSchlo	TCATCATCTT	ATGAAGGTGG	AGTTTGCCT	GGTTTGGAG	TGGTAGATAC	TGTATACCTA
M.truncatula_GSchlo	TCATCATCTG	ATGAAGGTGG	GGTTGCGAGT	GGTTTTCGAG	TAATAGATAG	TGTATACCTC
R.communis_GSchlo	GCTTCTTCAA	ATGAAGGTGG	AGTTGCGGCT	GGATTTCGAG	TCTTGGATAG	CGTATACTTG
M.musculus_GS	CTGGAGCATG	CAGAGGGAGG	TGTGGCGGCA	GGAGTGGCAG	TCCTGGACAA	CCCCTACCCT

2341

GS_Pistil_1	GTATAATTTA	CATGATTGCA	TTTTGCACAT	CTCTGTGTTT	CTAAACTGTC	CACTAGTTTT
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GTATGACTG	TATAATTTGG	GCTGTTGAAT	--TGGCGATC	GTTTCAACCT	GTTCAATACA
V.vinifera_GSchlo	ACTTGATTGA	AGCACTAAC	CAAGTGACAC	--CAATGTGT	TAGGTATTAG	AC----TTGA
N.nucifera_GSchlo1	AATTGATTGA	GCGATTGTC	AAAGAAACCA	--AATTAATA	GGGTAGCCCA	GTCTAGAGG
T.cacao_GSchlo2	AGTGCTTTTC	AAGTCGTTAC	ACCAAAAAAA	TCTACAGATT	TCATTTCTTT	TCTCTGTTAC
N.nucifera_GSchlo2	AATTGATTGA	ACTGACGTAA	GAGAGGGTTC	--TGCCCCAA	GCAATGCGAT	GACCCAGTCA
T.cacao_GSchlo1	AGTGCTTTTC	AAGTCGTTAC	ACCAAAAAAA	TCTACAGATT	TCATTTCTTT	TCTCTGTTAC
C.sinensis_GSchlo	ACTTGATTAA	ACTAGCTTCC	TCCGTACTCC	--CACTGACC	CACATGATTC	ATGATATTAT
G.max_GSchlo	ACTTGATGGG	AGCCAAACCC	CAAGTTATCA	AAGCAATTCA	AAACATTATG	TATGCTTTAT
M.truncatula_GSchlo	ACTTGACGTA	GAGACCTCT	AACTTATCTG	GGTATATTAT	CAACA----C	ATTGTGTTTA
R.communis_GSchlo	AGATAA----	-----	-----	-----	-----	-----
M.musculus_GS	CTGTGAAGGC	CCCATCTGGA	CTTCACTCAG	GAGGCTTCT	ATCC-----C	CTGTACTTGG



2401

GS_Pistil_1	GGGTGGAGGG	CTAAAATTCC	TGCCTAGGGG	ACTTGGTG	--TC--TCCCT	TAGAGAAAGA
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GA--GGAAG	AAATATCTAA	AAGATTTTGG	CATTA-CTTG	GCATCGA-AG	AACAAGGGAA
V.vinifera_GSchlo	AA--GCAGT	TGATGATTGA	ATCATAGTTG	GTTTATGTTT	GTTTATACT	AAGATTCGAC
N.nucifera_GSchlo1	TG--CCTGC	CAAT-----	-----GCGGG	GTCTGGGGAG	GGACAGATGT	ACACAGCCTT
T.cacao_GSchlo2	TG--GCTAT	ATGGA-----	--AACACAGG	TCATCTCACA	GTTAGTTTTT	AGTCATCGGA
N.nucifera_GSchlo2	GC--TGAAG	GCCC-----	AGATTTCTGG	GTTGATGCTC	CTA-----CT	AGCCCTCAGG
T.cacao_GSchlo1	TG--GCTAT	ATGGA-----	--AACACAGG	TCATCTCACA	GTTAGTTTTT	AGTCATCGGA
C.sinensis_GSchlo	AT--CATAA	ACAACAACC	--ATTACATG	CTCTCTCACA	GGAT----CT	AAACGTTGAA
G.max_GSchlo	ATATTACCAC	TCAAGTCTCC	TGACTCCTGA	TTTTGTTT	-----GT	ATATCTCCGA
M.truncatula_GSchlo	GA--CATTG	CCAT--TTG	AGCCTCCTGT	TTATATTT	-----GT	GTGCCCTCCC
R.communis_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.musculus_GS	CAG--TCCTG	TTCTGAGGGG	TTGCCCTGT	CCCTATCTTA	GGGGAGCTTG	TCTCTTCCAT

2461

GS_Pistil_1	AGTGCCTTAA	AGAATTTGAT	TGGGTGA-GA	ATTGTAAATT	TCTGCTTCTA	T---ACCTCA
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	AGCG-G-AA	ACTAAGTAGA	AGGGG-G-AA	ACTATACATC	TGTAATCAT	TTCTTCCAA
V.vinifera_GSchlo	AGTT-A-CTG	AAAACTTAGC	TCCTG-G-TC	TATATTTATT	TCTTACGAT	TTTTTCCCT
N.nucifera_GSchlo1	ACCC-C-TGT	ACAAAAGAG	AGGTGT-TT	CCAAATTATT	TCC--ACCAA	GTGTTCCAT
T.cacao_GSchlo2	AAATAT-TTT	ATGTGATTAC	ATT-----	ATTAGTAATT	TTT--AATAT	TTTTTCTCT
N.nucifera_GSchlo2	TAT--C-AGC	ATTTGTATTA	ATAAA-G-AG	AAAATTTCTT	CATATAGCCA	TTGGTTGTC
T.cacao_GSchlo1	AAATAT-TTT	ATGTGATTAC	ATT-----	ATTAGTAATT	TTT--AATAT	TTTTTCTCT
C.sinensis_GSchlo	AGATTG-AGT	AAGAGCTCCC	AGCTT-G-G	TCAATTAATT	----GACAT	T-CAATCTAT
G.max_GSchlo	AAACAGTGAA	AGAAGAAAAG	AGG-----	CATTGTGTT	TCT--TTTAA	TTGTTCTAT
M.truncatula_GSchlo	AAAAAATTGA	AAGGGAGGCC	ACATT-G-CT	TATTTTACCT	TATCCCATAG	TGTGTGTAT
R.communis_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.musculus_GS	AGAG-C-TCC	AAAACTTAG	GGAAGGGAAA	ACCCAGGGTA	TCTTCCCTCA	GCAGCTTCC

2521

GS_Pistil_1	AGGCTCC-TA	ACAATG-TTC	AGTCGAGCA	ATGGTAGATT	TTTAGAGGGG	TTAAAATCCG
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	GTTCTTG-AG	TGTGTTGGA	AGT--G-CAC	TTGATACAT	TGTTTTCAT	TGTGTGTTG
V.vinifera_GSchlo	TT-CTTC-AT	ATTGACATTG	ACT--A-GTT	TTTGCTAAAT	TGGCAATACA	GTTGAATAA
N.nucifera_GSchlo1	TTTTATGGCA	ATAAAAAATA	ATA--ACAAA	ACTCTCCTGA	TGGTATACT	TTATTGTTA
T.cacao_GSchlo2	ATAACCTGGG	AAAA-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo2	AT-----	GTAAGGGGG	ATT--T-TAG	ACTCTTGTAT	TGCCATAAT	TTAAAG---
T.cacao_GSchlo1	ATAACCTGGG	AAAAACCTGC	CGTATAATTT	GTTATCTTT	TTTTTTCACC	TGAGCATCAC
C.sinensis_GSchlo	GGAAGGA-AG	AGATACACAG	AGA--A-GTT	TCTTCTATAA	AGACCATAA	TTT-----
G.max_GSchlo	GGGATGG-TG	TCTGTACTCA	ACGA-CCTGT	TTGATCTAA	CCAAATAAAA	TTG-----
M.truncatula_GSchlo	AGTTGCA---	-CAAAAATAA	CCT-----G	TTAAGCTTT	TTGCTGAAAA	AAAC-----
R.communis_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.musculus_GS	AGCCGA----	-GGACCAGAA	AA-----GCT	ATGATT----	-----	-----

2581

GS_Pistil_1	AAATGATTAT	TGAATCAAA	GTCTATGGAG	TCAAAAGGGG	GCTTAGTCTT	GGGATTAA--
GS_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GS_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GSchlo	ATCTATCTGT	CCCCATCTCC	CTCTCTCCCG	TCCCAGAAGA	GATTTTATAT	GAGATCGATT
V.vinifera_GSchlo	ATCGGCAGAG	TTCCATTGAT	CCCTCAGGAG	TTTATGAAGT	GGGTGGAGGT	GAAAAAGAGA
N.nucifera_GSchlo1	TTGTGAC---	-TC AAGCCTG	G---AAGCAA	GGAAAGTAAT	CATGGAAGAA	TAAATGAAA-
T.cacao_GSchlo2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
N.nucifera_GSchlo2	-----CTGGGA	TTTAAAAGAA	TAAGAAAGGA	TGTCTAGAAT	AATTGATTGG	GAAATTCCTC
T.cacao_GSchlo1	ATGAATGGAT	ATTGGTATTA	GAAGCTGAGA	ATAATGCTAA	TATTGGATGT	GTTGGAATAT
C.sinensis_GSchlo	-----	-TCCATTT--	-----	-TTACGAAAG	GATTGAATTT	GTAATGTGGG
G.max_GSchlo	ATGAACTG--	-TTCTTCTAA	-----	-----	-----	-----
M.truncatula_GSchlo	TTGTTAATG	TTCCGAAAAC	GTAATAAAGA	AGCCCATAAA	GATTGATGAT	GTGGGTAAA-
R.communis_GSchlo	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.musculus_GS	-----	-CCATTAGAA	GACTTCTGGA	GGTCCCCAGA	TCTTTGGAGT	GTGGGAAT--

2641

```

GS_Pistil_1      -----TTT ATTGTAAAGT TAA--TTTAT AGT-----CTTTTGAG-
GS_Pistil_2      -----
GS_Pistil_3      -----
GS_Pollen_1      -----
S.indicum_GSchlo TCTGTATG-T TTATGAGGT GTTTTCTTCT ACAGCGTTGT CCC-----
V.vinifera_GSchlo TTAAAAGG-A GT-GGAATCA G-TTTGAAGA AATTAATTGT GTG-----
N.nucifera_GSchlo1 -----
T.cacao_GSchlo2 -----
N.nucifera_GSchlo2 CTYACCAG-A ---AAAAAAA GTTTTATCA-----
T.cacao_GSchlo1 TTTAGACGGT AGGTGAATTA ATGTTTGCC AATATTTTGA TATTTGGAAG AGCTGTGTAA
C.sinensis_GSchlo TATCGT--- --GGCATGC GTTTTGTAAT TTT-----TTT-----
G.max_GSchlo -----
M.truncatula_GSchlo -----CCT G-TTGATTCT TAT-----
R.communis_GSchlo -----
M.musculus_GS    ---GGAAGGT GCTTTGAGG AAA-----GGCTCATAA

```

2701

```

GS_Pistil_1      ATTCTTGAAG TCCAAG--- ----GAAT CAATGCACTC CACCCGTGTC CTACAGAAAT
GS_Pistil_2      -----
GS_Pistil_3      -----
GS_Pollen_1      -----
S.indicum_GSchlo ---TTTACT ACTTAG----- --TATTGTCA CATTTCCTTG
V.vinifera_GSchlo --GTTAGAT TCTTTA----- --TATTTTGA TTCAGTAATA
N.nucifera_GSchlo1 --GTTGAGC AAGTGG----- --CAATTTCA TTA-----
T.cacao_GSchlo2 -----
N.nucifera_GSchlo2 -----
T.cacao_GSchlo1 ATACTTTGAA AATTGCCAAG CTTCTTTCAT CAATCATGTA AATGATTAGA TTTATCTTTT
C.sinensis_GSchlo ---TTGGGT AATAAA----- --TGATAGTG GTTTCGAGTG
G.max_GSchlo -----
M.truncatula_GSchlo -----
R.communis_GSchlo -----
M.musculus_GS    ACCCTGCAAG TCTTGATGGT CTT--CTCA CCAGCCTTTC CAGCAGGTTT TAGTGCCTT-

```

2761

```

GS_Pistil_1      TC-----
GS_Pistil_2      -----
GS_Pistil_3      -----
GS_Pollen_1      -----
S.indicum_GSchlo AACGAA--- -AT----- TGTGG GTGGTTAAA G-----TTTGCA
V.vinifera_GSchlo ATTGAAATAC TGT----- TGAAC ATGGATAACA AGCCCTCA AACAATATAGA
N.nucifera_GSchlo1 -----
T.cacao_GSchlo2 -----
N.nucifera_GSchlo2 -----
T.cacao_GSchlo1 AATGTCATTG TTTATAACTA GTGTCTCTCA CAGACCAACA AGACTATGCA GTCAATCCAT
C.sinensis_GSchlo TCTGAAGAAT ATT----- TGGAA -----CAGA AGC-----ACAATTTGA
G.max_GSchlo -----
M.truncatula_GSchlo -----
R.communis_GSchlo -----
M.musculus_GS    ---GACCTGG GCTAGCAC--- --CGACTG AAGG--AGGA ACAGGGTAAA AGGGTACAGA

```

2821

```

GS_Pistil_1      -----
GS_Pistil_2      -----
GS_Pistil_3      -----
GS_Pollen_1      -----
S.indicum_GSchlo TATC-----
V.vinifera_GSchlo AACCCACATA TTTGACACAT ATAAGA----- --TGATAC TTATGATAAA
N.nucifera_GSchlo1 -----
T.cacao_GSchlo2 -----
N.nucifera_GSchlo2 -----
T.cacao_GSchlo1 GGTCCCAGT TCTCACGTCT CTGTAGTACG ---GCTAAAT CAAGATGTAG ATTTGACCTT
C.sinensis_GSchlo GAT-----
G.max_GSchlo -----
M.truncatula_GSchlo -----
R.communis_GSchlo -----
M.musculus_GS    CTTCCCCAGC TCTGCCCTAA ATAAAATAAC AATGCTGATT CAAAAAATAA AAAAAA-----

```



1

```

GR_Pistil_1
GR_Pistil_2
GR_Pistil_3
GR_Pistil_4
GR_Pistil_5
GR_Pistil_6
GR_Pistil_7
GR_Pistil_8
GR_Pistil_9
GR_Pistil_10
GR_Pollen_1
V_vinifera_GR2_LOC100232842
S_indicum_GR2_LOC105163374
N_sylvestris_GR2_LOC104211049
N_tomentosiformis_GR_LOC104098
T_hassleriana_GR_LOC104824173
C_sativus_GR_LOC101217298
C_sinensis_GR_LOC102614323
E_grandis_GR_LOC104426615
E_grandis_GR_LOC104414377
T_cacao_GR2_TCM_046980
T_cacao_GR1_TCM_046980
P_mume_GR_LOC103334247
Mus_musculus_GR

```

51

```

GR_Pistil_1
GR_Pistil_2
GR_Pistil_3
GR_Pistil_4
GR_Pistil_5
GR_Pistil_6
GR_Pistil_7
GR_Pistil_8
GR_Pistil_9
GR_Pistil_10
GR_Pollen_1
V_vinifera_GR2_LOC100232842
S_indicum_GR2_LOC105163374
N_sylvestris_GR2_LOC104211049
N_tomentosiformis_GR_LOC104098
T_hassleriana_GR_LOC104824173
C_sativus_GR_LOC101217298
C_sinensis_GR_LOC102614323
E_grandis_GR_LOC104426615
E_grandis_GR_LOC104414377
T_cacao_GR2_TCM_046980
T_cacao_GR1_TCM_046980
P_mume_GR_LOC103334247
Mus_musculus_GR

```

101

GR\_Pistil\_1  
GR\_Pistil\_2  
GR\_Pistil\_3  
GR\_Pistil\_4  
GR\_Pistil\_5  
GR\_Pistil\_6  
GR\_Pistil\_7  
GR\_Pistil\_8  
GR\_Pistil\_9  
GR\_Pistil\_10  
GR\_Pollen\_1  
V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
P\_mume\_GR\_LOC103334247  
Mus\_musculus\_GR

```

-----
TATATATATA AGTGTATATT GTCC AAGTTA TAATAACAAT AACTACCACA
--ACATAAAC ATCTGTGATC
--AAGAAAAA ATCTGTGATC
TCTC-----ATT TTAATCGATT TTCCAGCATT
-----
GGGCGGACCC CACCCACCAG CCCAAGGATC TCAAAACAAGC ATAAGCTATA
GGGCGGACCC CACCCACCAG CCCAAGGATC TCAAAACAAGC ATAAGCTATA
AAATGATTTG GGCCTACTCA CTCATTATTC CAGCCTTTTT TTCTTCTTCA

```

151

GR\_Pistil\_1  
GR\_Pistil\_2  
GR\_Pistil\_3  
GR\_Pistil\_4  
GR\_Pistil\_5  
GR\_Pistil\_6  
GR\_Pistil\_7  
GR\_Pistil\_8  
GR\_Pistil\_9  
GR\_Pistil\_10  
GR\_Pollen\_1  
V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
P\_mume\_GR\_LOC103334247  
Mus\_musculus\_GR

```

-----
-----
-----
-----
GGAGTACTC TATTGTTAGA
GGAGTACTC TATTGTTAGA
-----TACAA
-----
-----
-----
AATT TATTGAAAAAT
-----
-----
AGGAAAAAGG AAT--ATGGC TCGCG--CA
ATCAAGTAAA ATT--TCAAT GCGCG--CG
ACCTAAAACAG ATTAGAAAAC AACTGTTAGA TTCCGCCAGC CATGG--CT
ACCAAAAACAG ATTAGAAAAC AACTGTTAGA TTCCGCCAGC CATGG--CT
--AAGTAGA AGAAGAGAGA AGAAAGCGAA CATGG--
GTTGAA--CA TGAGAAACAAA CCCAAAAAGA AAAAGCATAGA AAAGG--
AGGGAACCGG GCGAGCA--
-----
TTTACACCAA AGCCAGAGAC GGTGATAGGA AAAGAACAAA CATGGCCACT
TTTACACCAA AGCCAGAGAC GGTGATAGGA AAAGAACAAA CATGGCCACT
TTTACGAGT ACCAAGTGCC CTGAAAGCGG AAAGTAGGTT AAGGCTGCA

```

201

GR\_Pistil\_1  
GR\_Pistil\_2  
GR\_Pistil\_3  
GR\_Pistil\_4  
GR\_Pistil\_5  
GR\_Pistil\_6  
GR\_Pistil\_7  
GR\_Pistil\_8  
GR\_Pistil\_9  
GR\_Pistil\_10  
GR\_Pollen\_1  
V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
P\_mume\_GR\_LOC103334247  
Mus\_musculus\_GR

```

-----
ATAATTCTTG TTTATTTTTG CAGAATGTCA AAATCTCTTT CATTCCCAAG
ATAATTCTTG TTTATTTTTG CAGAATGTCA AAATCTCTTT CATTCCCAAG
GCAAACTGT ACATGCACAA AAGTGGATC ACACGATTCA GAGTATTGAT
-----GGGGCTCAT ACTGCGGGC ATCCACT--
-----C AGCTAGTTTT ATTCAATCATG
ATGTTCTCTC CAGATAACCA ATTTGACAT AACCAATCAC GTTCTTTGAT
-----
ACCCTCACTGT GAGCGCCAG GCTCA---- -CATTCTCT- --TCTCCAAA
AAATCTCTAA GCAAGCCAG GCTCGGCTCC TCCCTTTCT- --TCTCCGGG
ACATCTCTGA GCAACCCAAA GCTCAGCACT ACTCTTTCT- --TCTCCAAC
ACATCTCTGA GCAACCCAAA GCTCAGCACT ACTCTTTCT- --TCTCCAGC
-----CGT CTGCTCCTAA GCTCACTACT ACAATCACGT CTTCTCGATC
--CTTTTTG TAGAACCCAA AATGGCCACT TCTCTTTCTT CTTCAAAAAC
TCACTTTTG TGGTCTTTEG GCGATGGAT TCTTGTTTTT GCATTATATA
ACTTCCCTEG CCGGCCCAA GCTCACCGCC ACCCTGTCGG CCTGCGGTE
-----
ACTTCTTTTA CAGTCCCAA ACTC----- TCT--TCCCGAAC
ACTTCTTTTA CAGTCCCAA ACTC----- TCT--TCCCGAAC
-AATTTCTG CAATTTGTAA G-----T-----TCTCCCGAAC
GGAATCCGAG AAGCTGGGG TGGGAAAAA AAACCTGCAC GTTCTCGCC

```

251

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

301

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

351

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

401

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

451

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

501

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR





701

```

GR_Pistil_1      -----
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----GCAAAGC-----TTTGGATCTGAATTTGGAGGACGC
GR_Pistil_4      -----
GR_Pistil_5      -----GCATCC-----TTTGGATCTGAATTTGGAGGACGC
GR_Pistil_6      -----GCAAGC-----TTTGGATCTGAATTTGGAGGACGC
GR_Pistil_7      -----GCTTCC-----TTTGGGCTGAACTGGAGGACGC
GR_Pistil_8      -----TCCAAAC-----TATCTCATGAATTTGAGGAGAG
GR_Pistil_9      -----TCCAGCAGCAAGTTTCATAAATCTCTTTTCTTGGCTCCAGAAATG
GR_Pistil_10     -----TCAACAAAGCTTCATAAAGCTTTCTCTTGGAGCTCCAGAAAT
GR_Pollen_1      -----TCCAAAC-----TATCTCATGAATTTGAGGAGAG
V_vinifera_GR2_LOC100232842 -----TCCAAAC-----TTCCTCATGAATTTGATGAGAG
S_indicum_GR2_LOC105163374 -----TCCAAAC-----TTTCTCATGAATTTGAGGAGAG
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 -----TCCAAAC-----TATCTCATGAGTTGAGGAAAG
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 -----TCAAAAC-----TATCTCATGAGTTGAGGAAAG
T_hassleriana_GR_LOC104824173 -----TCCAAAC-----TTTCTCATGAGTTGATGAGAG
C_sativus_GR_LOC101217298 -----TCAAAAG-----TATGACATGAATTTGAGGAGAG
C_sinensis_GR_LOC102614323 -----GCATCC-----TTTGGAGGTGAACCTTGAGGATGC
E_grandis_GR_LOC104426615 -----TCCAAAC-----TACGCTCATGAATTTGAGGAGAG
E_grandis_GR_LOC104414377 -----GCAAGCT-----TTTGGGGTGAATTTGAGGATGC
T_cacao_GR2_TCM_046980 -----TCTAAAC-----TATCTCATGAATTTGATGAGAG
T_cacao_GR1_TCM_046980 -----TCTAAAC-----TATCTCATGAATTTGATGAGAG
P_mume_GR_LOC103334247 -----TCAAAAC-----TTTCTCATGAGTTGAGGAGAG
Mus_musculus_GR TGCACCTCCGAAC-----TTCATGCACGAA--TCACTCCGA

```

751

```

GR_Pistil_1      -----
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----GAGGAGTT--ACGGATGGGAATTGAATGAGAAAAATTGA--TTT
GR_Pistil_4      -----
GR_Pistil_5      -----AAGGGGTT--ATGGATGGGAACCTAATGAGAGAAATTGA--TTT
GR_Pistil_6      -----GAGGAGTT--ACGGATGGGAATTGAATGAGAAAAATTGA--TTT
GR_Pistil_7      -----GAGGAGTT--ATGGATGGGAACCTAATGAGAGAAATTGA--TTT
GR_Pistil_8      -----TTGTGGTT--TTGGATGGAAATATGACGCAGAACGAGA--ACA
GR_Pistil_9      -----GTGTTCTTGA--TTGGATTAAA--CGTTGATGTGAAAACTAAAA--TATCACCATT
GR_Pistil_10     -----GTGTTCTTGA--TTGGATTAAA--TGTTGATGTG--AAGAATAAAA--CATCAGCATT
GR_Pollen_1      -----TTGTGGTT--TTGGATGGAAATATGACGCAGAACGAGA--ACA
V_vinifera_GR2_LOC100232842 -----TTGTGGTT--TTGGATGGAAATTTGAAGCTGAAACCGAA--GCA
S_indicum_GR2_LOC105163374 -----TTGTGGTT--TTGGATGGAAATATGAAGCAGAACCTAA--ACA
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 -----TTGTGGTT--TTGGATGGAACTATGATGTGGAACCTAG--ATT
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 -----TTGTGGTT--TTGGATGGAACTATGAGCTGGAACCTAA--ATT
T_hassleriana_GR_LOC104824173 -----TAATGGCT--TTGGTTGGAAATATGAGACTGAGCCGAA--TCA
C_sativus_GR_LOC101217298 -----TCATGGCT--TTGGATGGAAATATGACACTGAAACGAA--ACA
C_sinensis_GR_LOC102614323 -----AAGGAGTT--ATGGATGGGA--GCTAACCGAGAAAAATTGA--CTT
E_grandis_GR_LOC104426615 -----TCATGGAT--TTGGATGGATCTATGATCTGAGGCTAA--GCA
E_grandis_GR_LOC104414377 -----AAGGAATT--ATGGATGGGAATTGAATGAGAAAGTTGA--CTT
T_cacao_GR2_TCM_046980 -----TAATGGTT--TTGGATGGAAATATGACCTGAAACCGAA--GCA
T_cacao_GR1_TCM_046980 -----TAATGGTT--TTGGATGGAAATATGACCTGAAACCGAA--GCA
P_mume_GR_LOC103334247 -----TAATGGGT--TTGGATGGAGATAAGAACTGAGCCGAA--GCA
Mus_musculus_GR TTAACGCT--TTCAAG--CTGTGAGGGTAA--ATT

```

801

```

GR_Pistil_1      -----
GR_Pistil_2      -----A--GCTCATTCTTTCTCTACCAAGTACG--
GR_Pistil_3      -----CAATTGG-----
GR_Pistil_4      -----
GR_Pistil_5      -----CAATTGG--AAGAAACTTTTACTCAAGAAGACAGAGGAAA--TAGTTAGATT
GR_Pistil_6      -----CAATTGG--AAGAAGCTTTTACA--AAAAAGACAGAGGAAA--TAGTTAGATT
GR_Pistil_7      -----CGATTGG--AAGAACTTTTCCAGAAAAAGACAGAGGAAA--TAGTACAGATT
GR_Pistil_8      -----TGATTGG--AGCACTTGATTGCAATAAAGAACCTGAAA--TTGAGGACT
GR_Pistil_9      -----TGCTTGGCTCTATAGCCTGTTCTTCACTGAGCCCAACTACA--GACAATGG--
GR_Pistil_10     -----TGCTTGGATCTATGGCCTGTTCTCTACTGAGACCAA--TACA--GACAGTGGC--
GR_Pollen_1      -----TGATTGG--AGCACTTGATTGCAATAAAGAACCTGAAA--TTGAGGACT
V_vinifera_GR2_LOC100232842 -----TGATTGG--AGCACTTGATGGCTAA--AAA--AACCTGAA--TTGAGGCT
S_indicum_GR2_LOC105163374 -----TGATTGG--AGCACTTGATTGCTAATAAAGAAATGGGAA--TTGCAAGCCT
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 -----TGATTGG--AGCACTTGATTGCAATAAAGAAATGGGAGTTGCAAGGCT
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 -----TGATTGG--AGCACTTGATTGCAATAAAGAAATGGGAGTTGCAAGGCT
T_hassleriana_GR_LOC104824173 -----TGATTGG--AGCACTTGATTGCAATAAAGAAATGGGAGTTGCAAGGCT
C_sativus_GR_LOC101217298 -----TGATTGG--AGCACTTGATTGCAATAAAGAAATGGGAGTTGCAAGGCT
C_sinensis_GR_LOC102614323 -----TGATTGG--AAGAACTTTTCCAAAGAAAGACAGATGAGA--TACTAGATT
E_grandis_GR_LOC104426615 -----TGATTGG--AGCACTTAATGGCTAATAAAGAAATGGGAGTTGCAAGGACT
E_grandis_GR_LOC104414377 -----TAACTGG--AAAAGCTTCTGCA--AAGAAGACAGAGGAAA--TCACTAGATT
T_cacao_GR2_TCM_046980 -----TGATTGG--AGCACTTGATGGCTAATAAAGAAATGGGAGTTGCAAGGCT
T_cacao_GR1_TCM_046980 -----TGATTGG--AGCACTTGATGGCTAATAAAGAAATGGGAGTTGCAAGGCT
P_mume_GR_LOC103334247 -----TGATTGG--AGCACTTAATGGCTAATAAAGAAATGGGAGTTGCAAGGCT
Mus_musculus_GR GAGTTGG--GATGCTATCAA--GAGAAAAGG--GATGCTATG--TGAGGCGCT

```

851

```

GR_Pistil_1 -----
GR_Pistil_2 -----AA CATGTTGTGA AATGCAACTG TCTTCTGAT
GR_Pistil_3 -----
GR_Pistil_4 -----
GR_Pistil_5 AAAATGGAATG TATAAG--CG GATGTTGCA AATGTTGGAG TTAAACTATT
GR_Pistil_6 AAAAGGAATG TATAAA--CG GTTACTTTCA AATGGGGGAG TTAAACTATT
GR_Pistil_7 GACTGGTATC TATAAG--CG ATTAATTGCA AATGGGGGAG TTAAACTATT
GR_Pistil_8 CACTGGTATA TATAAG--AG TACTCTGAAA AATGCTGGTG TGGAACTAAT
GR_Pistil_9 ---TGGTATA CAGAAGACAG CACAGGGAA CATTAGTATGA TCAGGTT---
GR_Pistil_10 ---GGTATG CAGAACACAG CACAAGGAA CTTGGTTGTAA TCAGGTT---
GR_Pollen_1 CACTGGTATA TATAAG--AG TACTCTGAAA AATGCTGGTG TGGAACTAAT
V_vinifera_GR2_LOC100232842 TACTGGTATA TACAAG--AA CATTCTGAAA AATGCTGGAG TCACATTAAT
S_indicum_GR2_LOC105163374 CACCGGTATT TACAAA--AA CATCTGAAA AATGCTGGTG TCGCACTAAT
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 CACGGGTATT TACAAG--AA TATTCTGAAG AATGCTGGTG TCACTCTGAT
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 CACGGGTATT TACAAG--AA TATTCTGAAG AATGCTGGTG TCACTCTGAT
T_hassleriana_GR_LOC104824173 GACTGGTATT TATAAG--AA CATACTGAA CATTGCTAATG TCACATTAAT
C_sativus_GR_LOC101217298 AACCTGGTATC TACAAA--AA CTTTTGAA CATTGCTAATG TCACATTAAT
C_sinensis_GR_LOC102614323 AAAATGGAATG TACAAG--CG ATTATTATCT AATGCTGGG TAAAAATTATA
E_grandis_GR_LOC104426615 CACTGGTATC TATAAG--AA TATACTAAAA AATGCCAATG TCACATTAAT
E_grandis_GR_LOC104414377 AAAATGGAATG TACAAG--CG ATTGTTGGCA AATGCTGGTG TCAAATTATT
T_cacao_GR2_TCM_046980 TACCGGTATT TACAAG--AA CATTCTCAAT AATGCTGGTG TCATATTAAAT
T_cacao_GR1_TCM_046980 TACCGGTATT TACAAG--AA CATTCTCAAT AATGCTGGTG TCATATTAAAT
P_mume_GR_LOC103334247 CACTGGGATT TACAAA--AA TGTCTTAAA AATGCTGGTG TCGCTTTAAT
Mus_musculus_GR GAATCCATC TATCAA--AA TAATTTAAC AAGCTTCACA TAGAATTAT

```

901

```

GR_Pistil_1 -----
GR_Pistil_2 T-----
GR_Pistil_3 -----
GR_Pistil_4 -----
GR_Pistil_5 TGAAGGAGAG GGAAGATTG TTGG----- TGCTAATGAA GTTGAAGTGA
GR_Pistil_6 TGAAGGAGAG GGAAGATTG TTGG----- TCCTAATGAA GTTGAAGTGA
GR_Pistil_7 TGAAGGAGAG GGAAGATTG TTGG----- TCCTAATGAA GTTGAAGTGG
GR_Pistil_8 TGAAGGGCGT GGAAGATTG TGGA----- TCCACACACA GTGGATG---
GR_Pistil_9 -----TTG TAGGTTCTCC GCCAAAAACG GTTTTGT---
GR_Pistil_10 -----TTG AGGGTTGTT GCCAAAAACA GTTTTAG---
GR_Pollen_1 TGGAGGGCGT GGAAGATTG TGGA----- TCCACACACA GTGGATG---
V_vinifera_GR2_LOC100232842 TGAAGGCCGT GGAAGATTG TGGA----- CCCCACACA GTTGAAG---
S_indicum_GR2_LOC105163374 TGAAGGCCGG GGAAGATTG TGGA----- TCCACACACA GTGGAAAG---
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 TGAAGGGAGA GGAAGATTG TGGA----- TCCTCATCCG GTGGATG---
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 TGAAGGGCGA GGAAGATTG TGGA----- TCCTCATACG GTGGATG---
T_hassleriana_GR_LOC104824173 TGAAGGACGA GGAAGTTTA TCGA----- TCCACACACA GTTGTAG---
C_sativus_GR_LOC101217298 TGAAGGCCGT GGAAGATTG TGGA----- TGAACACAG ATTGATG---
C_sinensis_GR_LOC102614323 TGAAGGGCGA GGAAGATAG TTGG----- TCCAAATGAA GTTGAAGTCA
E_grandis_GR_LOC104426615 TGAAGGCCGT GGAAGATTG TGGA----- TCCACACACA GTTGTAG---
E_grandis_GR_LOC104414377 CGAAGGAGAA GGAAGCTAG TTGG----- CCCCACACA GTTGAAGTGA
T_cacao_GR2_TCM_046980 TGAAGGCCGT GGAAGATTG TGGA----- TCCACACACT GTTGAAG---
T_cacao_GR1_TCM_046980 TGAAGGCCGT GGAAGATTG TGGA----- TCCACACACT GTTGAAG---
P_mume_GR_LOC103334247 CGAAGGCTG GGAAGATAG TGGA----- CCCCACACG GTTGTAG---
Mus_musculus_GR CCAAGGCTAT GCAAGATTG CAGATGGTCC TCGGCCACG GTGGAAAG---

```

951

```

GR_Pistil_1 -----
GR_Pistil_2 -----
GR_Pistil_3 -----
GR_Pistil_4 -----
GR_Pistil_5 ACCAATGGA TGGACCCAAA ATAAGCTATT CAGCAAAA CAATTCTGATT
GR_Pistil_6 TTCAATTGGA TGGACCCAAA ATAAGCTATT CAGCAAAA CAATTCTGATT
GR_Pistil_7 TCCAATTGGA TGGACCAAG ATTAGCTATT CAGCAAAA CAATTCTGATT
GR_Pistil_8 -----TGGA TGGAAA----- -ACTCTACT CAGCTAAAA CAATTCTTATT
GR_Pistil_9 -----CAAA ACAGCTCCCT TCCATTAAG CAACAGGAGT AAGATTGATT
GR_Pistil_10 -----CAAA ACAGGTTCCCT TCCATTAATG CAACAGGAGT AAGATTGATT
GR_Pollen_1 -----TGGA TGGAAA----- -ACTCTACT CAGCTAAAA CAATTCTTATT
V_vinifera_GR2_LOC100232842 -----TGGA TGGAAA----- -ACTATATA CAGCAAGGCA CATACTAATT
S_indicum_GR2_LOC105163374 -----TGAA TGGAAA----- -GCTCTACT CAGCAAGAA CAATTCTGATT
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 -----TGGA TGGAAA----- -ACTCTACT CGGCTAAGAA CATACTGATT
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 -----TGGA TGGAAA----- -ACTCTACT CGGCTAAGAA CATACTGATT
T_hassleriana_GR_LOC104824173 -----TTGA TGGTAA----- -AATCTATA CTGGAGAAA TATTCTGATT
C_sativus_GR_LOC101217298 -----TAGA TGGTAA----- -AATTTATT CGGCTAGACA CATTCTAGTG
C_sinensis_GR_LOC102614323 CAAAGCTAGA TGGACCTAAG TTAAGTTACT CAGCAAGCA CATATTGATC
E_grandis_GR_LOC104426615 -----TGGA TGGAAA----- -GCTCTATT CAGCTAGACA TATACTAGTT
E_grandis_GR_LOC104414377 CAAAGTTAGA TGGGACAAAG TTGTTGTTACT CTGCAAGCA CATACTTATT
T_cacao_GR2_TCM_046980 -----TAGA TGGAAA----- -ACTTTACA CTGGAGACA TATACTGATT
T_cacao_GR1_TCM_046980 -----TAGA TGGAAA----- -ACTTTACA CTGGAGACA TATACTGATT
P_mume_GR_LOC103334247 -----TAGA TGGGAA----- -GCTATATT CTGCAGACA TATACTAGTT
Mus_musculus_GR -----TCAA TGGGAA----- -AAAGTTTA CCGCTCCACA CATCTGATT

```

1001

```

GR_Pistil_1 -----
GR_Pistil_2 -----
GR_Pistil_3 -----
GR_Pistil_4 -----
GR_Pistil_5 GCAAATGGAA GTAGGGCTCA ACGTCCAGCT -----A TTCCCTGGACA
GR_Pistil_6 GCAAATGGAA GTAGGGCTCA ACGAGCATCT -----A TTCCCTGGACA
GR_Pistil_7 GCAAATGGAA GTAGGGCTCA ACGTGTAGCT -----A TTCCCTGGACA
GR_Pistil_8 TCTGTGGTG GACGGCCTTT CATTCTGAT -----A TTCCCTGGAAAG
GR_Pistil_9 GCGGTTGCTA ACATCACCTA TAGCCGATAC GGTAGGTAGG TT--TGTTCC
GR_Pistil_10 -CGGTTTGTG ACGTCAACAA TGGTCCATAT GCTAGGTAAG TTGGTG--CG
GR_Pollen_1 TCTGTGGTG GACGGCCTTT TATTCTGAT -----A TTCCCTGGAAAG
V_vinifera_GR2_LOC100232842 GCAGTTGGGG GCGGCCCTTT CATTCTGAA -----A TTCCCTGGAAAG
S_indicum_GR2_LOC105163374 TCAGTTGGTG GGGCTCCTTT CATTCCAGAT -----A TTCCCTGGAAAG
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 TCAGTTGGGG GACGGCCATT TATCCGAGAC -----A TTCCCTGGTAG
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 TCAGTTGGGG GACGGCCATT TATCCGAGAC -----A TTCCCTGGTAG
T_hassleriana_GR_LOC104824173 GCTGTCCGTG GACGGCCCTT CATTCTGAG -----A TTCCCTGGAAAG
C_sativus_GR_LOC101217298 TCAGTTGGGG GCGGCCCTTT CATAGGTGAG -----A TTCCCTGGTAG
C_sinensis_GR_LOC102614323 GCAAATGGAA GTAGGGCTCA ACGTGTCCCT -----A TTCCCTGGCAA
E_grandis_GR_LOC104426615 TCAGTTGGGG GACGGCCTTT TATTCTGAA -----A TTCCCTGGAAAG
E_grandis_GR_LOC104414377 GCAAATGGAA GCAGAGCTCA ACGTCCAAAT -----A TTCCCTGGCAA
T_cacao_GR2_TCM_046980 TCAGTTGGTG GACGTCCATT TATTCTGAG -----A TTACAGGAAG
T_cacao_GR1_TCM_046980 TCAGTTGGTG GACGTCCATT TATTCTGAG -----A TTACAGGAAG
P_mume_GR_LOC103334247 TCAGTTGGGG GCGGACCATT CATTCTGAA -----A TTCCCTGGAAAT
Mus_musculus_GR GCGTAGGAG GCGTGCCAC AGTTCCTCAC GAGAGCCAGA TTCCCTGGCCG

```

1051

```

GR_Pistil_1 -----
GR_Pistil_2 -----
GR_Pistil_3 -----
GR_Pistil_4 -----
GR_Pistil_5 GGAAATGGGT ATAAATCTG ATGAGGCATT GAGCTTGAA GAGTTGCTA
GR_Pistil_6 GGAATTGGGT ATAAATCTG ATGAGGCATT GAGCTTGAA GAGTTACCTA
GR_Pistil_7 GGAATTGGGT ATAAATCTG ATGAGGCATT GAGCTTAGAA GAGTTACCTA
GR_Pistil_8 TGAATATGTA ATAGATTCTG ATGGGCCCT TGATTTGCC TCAAAACTA
GR_Pistil_9 AGAGTATTGA TCAACCTTAA CAGTCCAAAT CTTATGAAG TCAAACCTA
GR_Pistil_10 AGAGTATTGG TCAACCTTCA CAGTCCAGT CTTATGAAG TCAAACCTA
GR_Pollen_1 TGAATATGTA ATAGATTCTG ATGGGCCCT TGATTTGCC TC-----
V_vinifera_GR2_LOC100232842 TGAAGATGCG ATAGATTCTG ATGTTGCACT TGATTTGCC TCAAAACTA
S_indicum_GR2_LOC105163374 TGAATATGTA ATAGATTCTG ATGTTGCTCT AGATTTACCT TCGAAACCTA
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 CGAATATGCT ATAGATTCTG ATGTTGCCCT TGATTTGCC ACGAAGCCTA
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 CGAGTATGCT ATAGATTCTG ATGTTGCCCT TGATTTGCC ACGAAGCCTA
T_hassleriana_GR_LOC104824173 AGAGTATTGT ATGATTTCAG ATGTTGCTCT TGATTTGCC TCGAAGCCAG
C_sativus_GR_LOC101217298 TGAGTATGCT ATAGATTCTG ATGTTGCCCT TGAATTGCC TCGAAACCTG
C_sinensis_GR_LOC102614323 GGAGTATGCT ATAACTCTG ACGAGGCATT GAGCTTGAA GAATTACCCA
E_grandis_GR_LOC104426615 AGAATATGCA ATTAGCTCAG ATTTAGCCCT TGATTTGCC TCGAAGCCG
E_grandis_GR_LOC104414377 GGAGTATGCT ATAACTCTG ATGAAGCATT GAGCTTGAG GAGTTACCAA
T_cacao_GR2_TCM_046980 TGAATACGGA ATAGATTCTG ATGTTGCCCT TGATTTGCC TCAAAACTAG
T_cacao_GR1_TCM_046980 TGAATACGGA ATAGATTCTG ATGTTGCCCT TGATTTGCC TCAAAACTAG
P_mume_GR_LOC103334247 TGAATATGTA ATAGATTCTG ATGTTGCCCT TGATTTGCC TCGAAGCCTA
Mus_musculus_GR CAGCTTGGGG ATCAACAGTG ATGGTTCTT TCAGTTGGAG GACTTGCCTA

```

1101

```

GR_Pistil_1 -----
GR_Pistil_2 -----
GR_Pistil_3 -----
GR_Pistil_4 -----
GR_Pistil_5 AG----CGA GCTGTATAG TTGGGGGAGG GTACATAGCT GTTGA----
GR_Pistil_6 AG----CGA GCCGTATAG TTGGGGGAGG GTACATTGCT GTTGA----
GR_Pistil_7 AG----CGA GCTGTGTAT TTGGGGGGG GTACATTGCT GTTGA----
GR_Pistil_8 AG----AAA ATTGCCATAG TTGGGGGGG TTAATTGCT GTTGA----
GR_Pistil_9 CAGCTTCGAG ATTCAATCTT TTTGTGTTGG GGGCCCTACC AGTAGAAAAG
GR_Pistil_10 CAGCTTCGAG ATTCAACCTC TTTGTGTTAG GTGCCCTACC AGTGGAAAAG
GR_Pollen_1 -----
V_vinifera_GR2_LOC100232842 AG----AAA ATTTGGAATAG TTGGGGGTGG GTACATTGCT TTGGA----
S_indicum_GR2_LOC105163374 CG----AAA ATTTGATAG TTGGGGGTGG TTACATTGCA CTTGA----
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 AC----AAA ATTTGCATAG TCGGAGGCGG TTAATTGCA CTTGA----
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 AC----AAA ATTTGCATAG TCGGAGGCGG TTAATTGCA CTTGA----
T_hassleriana_GR_LOC104824173 AG----AAA ATTTGGAATAG TTGGTGGTGG GTACATAGCC TTGGA----
C_sativus_GR_LOC101217298 TG----AAG ATTTGCATAG TTGGAGGTGG ATATATTGCT CTAGA----
C_sinensis_GR_LOC102614323 AG----GGT GCTGTGGTG TTGGTGGAGG GTACATTGCT GTTGA----
E_grandis_GR_LOC104426615 AG----AAA ATTTGGAATAG TCGGGGTGG GTACATTGCT CTTGA----
E_grandis_GR_LOC104414377 AG----GCT GCTGTGGTG TTGGAGGAGG GTACATTGCA GTGGA----
T_cacao_GR2_TCM_046980 AG----AAA GTTTGGAATAG TTGGTGGTGG ATACATAGCT TTGGA----
T_cacao_GR1_TCM_046980 AG----AAA GTTTGGAATAG TTGGTGGTGG ATACATAGCT TTGGA----
P_mume_GR_LOC103334247 AG----AAA ATAGGAATAG TTGGTGGTGG GTACATTGCC GTGGA----
Mus_musculus_GR GC----CGG AGCGTATAG TTGGGGGGG GTACATTGCT GTGGA----

```

1151

```

GR_Pistil_1 -----
GR_Pistil_2 -----
GR_Pistil_3 -----
GR_Pistil_4 -----
GR_Pistil_5 -----GT TTGCTTCAA -TATGGCGGG GGATGGGTGG ATCAGTGGAT
GR_Pistil_6 -----GT TTGCTTCAA -TATGGCGTG GGATGGGTGG AACAGTGGAT
GR_Pistil_7 -----GT TTGCTTCAA -TATGGCGTG GGATGGGTGG AACAGTTGAT
GR_Pistil_8 -----GT TTGCTGGCA -TCTTCAATG GCTTGAAAAG TGATGTCCAT
GR_Pistil_9 AGTACCACAT CAGCGATCAA TTCTTCACCA TGATCAGTGG AAACTTTTAT
GR_Pistil_10 AGTACCACAT CTGCCAGCAA TTCTTCACCA TGCTTGGTGG GTACTTTTAT
GR_Pollen_1 -----
V_vinifera_GR2_LOC100232842 -----GT TTGCTGGTA -TCTTCAATG GTTTGAATAA TCAAGTCCAT
S_indicum_GR2_LOC105163374 -----GT TTGCTGGCA -TCTTCAATG GCTTGA CAAG CAGTGTCCAC
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 -----AT TTGCTGGAA -TCTTCAATG GCTTGAAAAG TGAGGTCCAT
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 -----AT TTGCTGGAA -TCTTCAATG GCTTGAAAAG TGAGGTCCAT
T_hassleriana_GR_LOC104824173 -----GT TTGCTGGTA -TCTTCAATG GCTTGA CAAG TGAAGTCCAT
C_sativus_GR_LOC101217298 -----AT TTGCTGGCA -TCTTCAATG GTTTGA AAAAG TGAGGTCCAC
C_sinensis_GR_LOC102614323 -----GT TTGCTTCCA -TATGGCGAG GGATGGGTGG TACTGTGGAT
E_grandis_GR_LOC104426615 -----AT TTGCTGGTA -TCTTCAATG GTTTGT CAAG CGACTGTCCAC
E_grandis_GR_LOC104414377 -----AT TTGCTTCAA -TATGGCGTG GATTGGGTGG CACTGTGGAT
T_cacao_GR2_TCM_046980 -----AT TTGCTGGCA -TTTTC AATG GATTGACAAG TCAGGTTCAC
T_cacao_GR1_TCM_046980 -----AT TTGCTGGCA -TTTTC AATG GATTGACAAG TGAGGTTCAC
P_mume_GR_LOC103334247 -----AT TTGCTGGCA -TCTTCAATG GTTTGA CGAC TGAGGTTCAT
Mus_musculus_GR -----GA TCGGGGCGA -TCTTCTCTG CCTGGGCTG CAAGAATATCT

```

1201

```

GR_Pistil_1 -----
GR_Pistil_2 -----
GR_Pistil_3 -----AAGA AGCTTTTAC-----
GR_Pistil_4 -----
GR_Pistil_5 TTGTCGTTTA GAAAGGAGGT TCCTTAAAGA GGTTTTGATG ACGAAATGGG
GR_Pistil_6 TTGTCGTTTA GAAAGGAGGT CCTTAAAGA GGTTTTGATG ACGAAATGGG
GR_Pistil_7 TTATTTTATA GAAAGGAACT CCTTAAAGA GGATTTGATG ATGAAATGGG
GR_Pistil_8 GTATTCATAA GACAGAAGAA GGTGTAAGA GGCTTGATG AAGAGATCAG
GR_Pistil_9 ACCATTTTCT G-----TTCTCACG AGCTCAGTTA AGTTTCTTGT
GR_Pistil_10 ACCATCTTCT G-----TTTAACT AGCTGAGTTA AGGTTGTCCG
GR_Pollen_1 -----
V_vinifera_GR2_LOC100232842 GTATTTATAA GGCAGAAAAA GGTTTTAAAGA GGTTTTGATG AAGATGTCAG
S_indicum_GR2_LOC105163374 GTATTCATAA GGCAGAAAAA GGTTTGAGA GGTTTGATG AAGAGATCAG
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 GTTTTATAA GACAAAAGAA GGTTTTGAGA GGATTTGATG AAGAAATTAG
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 GTTTTATAA GACAAAAGAA GGTTTTGAGA GGATTTGATG AAGAAATTAG
T_hassleriana_GR_LOC104824173 GTATTTATAA GGCAAAAGAA GGTGTAAGG GGATTTGATG AAGAGATCAG
C_sativus_GR_LOC101217298 GTATTTATAA GACAGAAAAA AGTGTGAGA GGCTTGATG AAGAGATTAG
C_sinensis_GR_LOC102614323 GTATTTATAA GAAAGGAACT TCCATTAAGA GGTTTTGATG ATCAAAATGG
E_grandis_GR_LOC104426615 GTATTTATAA GGCAAAAGAA GGTTTTGAGA GGTTTGATG AAGAGATCAG
E_grandis_GR_LOC104414377 CTGTTTTTAA GAAAAGAGCT CCCACTGAGA GGTTTTGACG ACGAAATGAG
T_cacao_GR2_TCM_046980 ATATTTATAA GTCAGAAAAA AGTTTAAAGG GGTTTTGACG AAGAGATCAG
T_cacao_GR1_TCM_046980 ATATTTATAA GTCAGAAAAA AGTTTAAAGG GGTTTTGACG AAGAGATCAG
P_mume_GR_LOC103334247 GTGTTTATAA GGCAAAAGAA AGTTTGAAGG GGTTTTGATG AAGAGGTTAG
Mus_musculus_GR CTTATGATTA GGCATGATAA GGTAATGAGA AATTTTGATT CACTATCAG

```

1251

```

GR_Pistil_1 -----
GR_Pistil_2 -----
GR_Pistil_3 -----
GR_Pistil_4 -----
GR_Pistil_5 AGCAGTGGTT GCAAGAAATC TAGA-----AGGAGGG GAGTTAATAT
GR_Pistil_6 AGCAGTGGTT GCAAGAAATC TTGA-----AGGAGGG GAATTAATAT
GR_Pistil_7 AGCAGTGGTT GCAAGAAATC TAGA-----AGGAGGG GTATTAATAT
GR_Pistil_8 GGAATTGTTT GGAGAAACAA TGTT-----ATTGAGGG GAATGAGAT
GR_Pistil_9 AGGATGCAAT TTAATACCCC TGCC-----TTCTAGATT
GR_Pistil_10 AGGATGCATA GTAATCCCC TGCC-----TTCAAGAG TTCTTGA--
GR_Pollen_1 -----
V_vinifera_GR2_LOC100232842 AGATTTTGTG GCAGAACAGA TGTC-----TCTAAGAG GAATTGAGTT
S_indicum_GR2_LOC105163374 GGAATTTGTT GGAGAAACAA TGTC-----ACTAAGGG GAATTGAGTT
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 GGATTTTGTG GGTGAACAGA TGTC-----ACTGAGAG GAATTGAGTT
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 GGATTTTGTG GGTGAACAGA TGTC-----ACTGAGAG GAATTGAGTT
T_hassleriana_GR_LOC104824173 AGATTTTGTG GGAGAGCAGA TGTC-----TTTGAAGG GTATTGAGTT
C_sativus_GR_LOC101217298 AGATTTTGTG GCGGAACAGA TGTC-----ACTAAGAG GAGTTGAGTT
C_sinensis_GR_LOC102614323 GGAAGTAGTT GCAAGAAATC TGGG-----AGGGAGGG GAATTAATTT
E_grandis_GR_LOC104426615 GGATTTTGTG CCTGAGCAGA TGTC-----CTACGAG GAATTGAGTT
E_grandis_GR_LOC104414377 GGAAGTAGTT GCAAGAAATC TTGA-----AGGAGGG GAATTAATTT
T_cacao_GR2_TCM_046980 AGATTTTGTG GGAGAAACAA TGTC-----TCTAAGGG GAATTGAGTT
T_cacao_GR1_TCM_046980 AGATTTTGTG GGAGAAACAA TGTC-----TCTAAGGG GAATTGAGTT
P_mume_GR_LOC103334247 AGATTTTGTG GAAAGACATA TGTC-----TTTGCAG GAATTGAGTT
Mus_musculus_GR TTCAACTGAG ACCGAGGAA GGGAGAAATG GGGCTGGAC GTGTTGAAGT

```

1301

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

GCATCCTA--GGACAACCTTAACTGAGCTAGTTAAAAACA GAAGAT----  
 GCATCCTG--GGACAACCTTAACTGAGCTAGTTAAAAACA GAAGAT----  
 GCATCCTA--CAAGAAACTTAACTGAGCTGGTGAGAAACA GAAAAAT----  
 TCACACAG--AGCAGTCCCTCAGGCTATATCAAATCA TCAGAT----  
 TCCTTGA--ACCACTGGTGGCATTTCATGATCAAATCC TCCTAA--  
 -----ACCACTGGTGGCATTTCCTGATCAAATCC TCCTAA--  
 CCATACAG--AAGAGTCCGCTCAGGCTATTCCAAATCA GCTGAT----  
 TCATACTG--AGGAGACACCTCAGGCTATAGTCAAATCA TCAGAT----  
 CCATACTG--AGGAGTCCGCTCAGGCTATGTAAAGTCA GGGGAT----  
 CCATACTG--AGGAGTCCGCTCAGGCTATATAAAGTCA GGGGAT----  
 TCATACCG--AAGAATCACCTCAAGCTGTGCTCAAATCT GCAGAT----  
 CCATACAG--AGGAGGTACGACAGGCTATGCTTAAATCA GCAGAT----  
 GCACCCGA--GGACTACCA TAAAGGAGTTGATTAAGTCA GAGGAG----  
 CCATACTG--AGGAGTCCCTCAGGCTATCCAAAAGTTG CCTGAT----  
 GCATCCAA--GGACAAAT TGAAGAGTTGATTAAGTCA GAGGAT----  
 TCATACAG--AGGAGTCCCTCAGGCTATTCCTAAGTCA GCTGAT----  
 TCATACAG--AGGAGTCCCTCAGGCTATGTTAAGTCA GCTGAT----  
 CCATGCAG--AGGAGTCCGCTCAGGCTATGCTTAAAGTCA GCTGAT----  
 TCATACAGGT TAAAGGAGTA AAAAAAGACATCATCAGGCTT GGAGTTCCAA

1351

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 GGTAT-----AAAAGTA GGCATGATC ATGGTGAAGA  
 GGTAT-----AAAAGTA GGCACCAACC ATGGTGAAGA  
 GGTAT-----AAAAGT TGCATGATC ATGGTGAAGA  
 GGTTCGCTTTCTTT--GAAGACT AACAAAGGAA CCATTGATGG  
 AGGGAGTTCCTTCT--GAAA AATAAATCAA CTGTTCGACC  
 AGGGAGTTCCTTCT--GAAG--CACAAATCAA CTGTTCGACC  
 GGTTCCTCTGCTTT--AAAGACT AACAAAGGAA CAGTTGAAGG  
 GGCATGCTGTCTTT--GAAAAT AACAAAGGCA CAGTTGATGG  
 GGCTCACTGTCTTT--AAAGACT AGCAGAGGAA CAGTTGAAGG  
 GGCTCACTGTCTTT--AAAGACT AGCAGAGGAA CAGTTGAAGG  
 GGCTCACTGTCTTT--AAAGACT AACAAAGGAA CAGTTGAAGG  
 GGGTCACTGTCTTT--AAAGACT AACAAAGGAA CAGTTGAAGG  
 GGTGT-----AAAAGTT ATTAAGATC ATGGTGAAGA  
 GGTTCATCTGTCTTT--TAAGACC AATAAAGGAA CAGTTGAAGG  
 GG-----CAT--GAAAGTT ATCAAGACC ATGGGGAAGA  
 GGTTCATCTGTCTTT--GAAGACC AACAAAGGAA CAGTTGAAGG  
 GGTTCATCTGTCTTT--GAAGACC AACAAAGGAA CAGTTGAAGG  
 GGTTCATCTGTCTTT--GAAGACT AACAAAGGAA CAGTTGAAGG  
 GGTTCATCTGTCTTT--GAAGACT AACAAAGGAA CAGTTGAAGG  
 GTGGTGACTTCCGTGCTGG TAGGAAGCCC ACCAAGACCA TGATTGACGA

1401

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 ATTGCTGGCA GATGTTGTAC TCTTTGCCAC TGGTAGGACA CCTAAC-ACA  
 ATTGCTGGCA GATGTTGTAC TTTTGGCCAC TGGTAGGACA CCTAAC-ACA  
 ATTGATGGCT GATGTTGTAC TCTTTGGTAC TGGTAGGGCC CCCAAC-ACA  
 GTTTCTCA-----TATTA TGTTCGGA AGGAAGCAAAA CCCAAT-ACA  
 CATCCCA-----GGCCA TATT-----GAAGCAAAA CTCAAAGCA  
 CATCCCA-----GGCCA TATT-----GAAGCAAAA CTCAAAGCA  
 TTTTCCCCA-----TATCA TGTTCGCAAC AGGAAGGAGG CCTAAT-ACA  
 GTTTCTCA-----TGTAA TGTTCGCAAC GGGACGAAGA CCAAAT-ACA  
 TTTCTCTCA-----TATCA TGTTCGCAAC GGGAAAGAAGA CCTAAT-ACA  
 TTTCTCTCA-----TATCA TGTTCGCAAC GGGAAAGAAGA CCTAAT-ACA  
 CTTTTCACA-----AATTA TGTTCGTAAC TGGTCTGAGG GCCAAC-ACA  
 CTTCTCACA-----TGTTA TGTTCGCAAC AGGGCTGAGG CCTAAT-ACA  
 GATTGTTGCA GATGTTGTAC TCTTTGCCAC TGGTAGGACA CCTAAT-ACA  
 TTTCTCGCA-----TATCA TGTTCGTAAC AGGAAGACGG CCCAAT-ACA  
 GCTGCATGCA GATGTTGTAC TCTTTGCCAC TGGTAGAATT CCCAAT-ACC  
 CTTTTCACA-----TATAA TGTTCGTAAC TGGTGAAGG CCTAAT-ACA  
 CTTTTCACA-----TATAA TGTTCGTAAC TGGTGAAGG CCTAAT-ACA  
 GTTTTCACA-----CATTATGTTCGCAAC AGGAAGTAGA CCTAAT-ACA  
 TGTGACTG-----CCTGC TCTGGGCAAT TCGACGGGAC CCAAAT-TCT

1451

GR_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_2	AAAAG----	-ATTGAATCT	CGAAGCTGTA	GGTGTTGAACT	TTGATAAG--
GR_Pistil_3	AAAA-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_4	TAGAC-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_5	AAGAG----	-ATTGAATCT	GGAAGCTGTA	GGCATCGAACT	TTGATAAG--
GR_Pistil_6	AAGAG----	-GTTGAATCT	GGAAGCTGTA	GGTGTTGAACT	TTGATAAG--
GR_Pistil_7	AAAAG----	-ATTGAATCT	CGAAGCTGTA	GGTGTTGAACT	TTGATAAG--
GR_Pistil_8	AAGAA----	-TTTAGGATT	GGAGTCAAGTT	GGAGTAAACT	TGAAGAA---
GR_Pistil_9	ATGTACCCCG	CCCCAAATAC	AACAGCTCGC	TTAGGTAACT	CTTCTAAGCT
GR_Pistil_10	ATGTACCCCTG	CCCCAAGTAT	AACGGCTCTC	TTAGGTAACT	CTTCTAAGCT
GR_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
V_vinifera GR2 LOC100232842	AAGAA----	-CTTAGGATT	GGAGACAGTA	GGAGTAAAAA	TCACCAAG--
S_indicum GR2 LOC105163374	AAGAA----	-TTTAGGTTT	GGAAGCCGTC	GGAGTGAAGT	TGTCAAAA--
N_sylvestris GR2 LOC104211049	AAGAA----	-TTTAGGATT	AGAGACAGTG	GGAGTAAAAA	TGACAAAG--
N_tomentosiformis GR LOC104098	AAGAA----	-TTTAGGATT	AGAGACAGTG	GGAGTAAAAA	TGACAAAG--
T_hassleriana GR LOC104824173	AAGAA----	-CTTAGGATT	GGAGGATATT	GGTGTAAAAA	TGACCAAG--
C_sativus GR LOC101217298	AAGAA----	-TTTAGGATT	AGAAGAAGTA	GGTGTAAAAA	TGACCAAG--
C_sinensis GR LOC102614323	AAAAG----	-GTTGAATTT	GAAAGCTGTT	GGTGTGGAAG	TTGATCAA--
E_grandis GR LOC104426615	AAGAA----	-TTTAGGATT	GGAGACTGTT	GGAGTAAAGA	TGACCAAG--
E_grandis GR LOC104414377	AAGAA----	-GTTGAATTT	GGCTTCTGCG	GGGTTGAAA	CTGATGCA--
T_cacao GR2 TCM 046980	AAGAA----	-CTTAGGATT	GGAGTCAAGT	GGGGTAAAAA	TGAACAAG--
T_cacao GR1 TCM 046980	AAGAA----	-CTTAGGATT	GGAGTCAAGT	GGGGTAAAAA	TGAACAAG--
P_mume GR LOC103334247	AAGAA----	-TTTAGGATT	GGAGGAAGTA	GGCGTAAAAA	TGACCAAG--
Mus_musculus GR	AAAGG----	-CCTGAATCT	GAATAAAGTG	GGCATTCAGA	GGGATGAA--

1501

GR_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_2	-ATTGGAGCT	GTTAAGGTTG	ATGAATACTC	TGG-----	-----
GR_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_5	-AATGGAGCG	GTGAAGGTTG	ATGAATACTC	TCGTACGAACT	ATACCTAGCA
GR_Pistil_6	-ACTGGAGCT	GTGAAGGTTG	ACGAATACTC	TCCGACCAACT	TTACCTAGCA
GR_Pistil_7	-ATTGGAGCT	GTTAAGGTTG	ATGAATACTC	TCCGAAGAACT	CTACCTAGCA
GR_Pistil_8	-AATGGAGCA	ATAGAGGTTG	ATGAATATTC	TCAGACATCT	GTTCTATCGA
GR_Pistil_9	CAATGCCTCA	TCAGATGTTA	TAGCCAAATTC	CTGCCCTGGG	ATAGCTACAC
GR_Pistil_10	CAATGCCTCA	TCAGATGTTA	TAGCCAAATTC	CTGTCTGGGA	ATAGATGGTC
GR_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
V_vinifera GR2 LOC100232842	-ACTGGAGCA	ATAGAGGTTG	ATGAATTTCT	CCGTACATCA	GTTCTTTCCA
S_indicum GR2 LOC105163374	-AATGGAGCG	GTGAAGGTTG	ACGAATACTC	TCCGACTTCT	GTTCCGTCAA
N_sylvestris GR2 LOC104211049	-AATGGAGCG	ATAGAGGTTG	ATGAGTATTC	TCGTACATCA	GTACCATCAA
N_tomentosiformis GR LOC104098	-AATGGAGCG	ATAGAGGTTG	ATGAGTATTC	TCGTACATCA	GTACCATCAA
T_hassleriana GR LOC104824173	-AATGGAGCG	ATAGAGGTTG	ATGAATATTC	ACGGACATCC	GTTCTTTCCA
C_sativus GR LOC101217298	-AATGGAGCA	ATTGAGGTTG	ATGAATACTC	CCGTACATCA	GTTCTTTCCA
C_sinensis GR LOC102614323	-ACAGGAGCT	GTGAAGCTGG	ACGGAAGCTC	ACCGAAGAACT	GTACCATGTA
E_grandis GR LOC104426615	-AATGGAGCT	ATAGAGGTTG	ATGAATTTTC	CCGTACATCA	GTTCTTTCCA
E_grandis GR LOC104414377	-ATGGCTGCT	GTGAAGCTGG	ATGAGTACTC	CTGCACTAAT	GTTCTTAGCA
T_cacao GR2 TCM 046980	-AATGGAGCA	ATAGAGGTTG	ATGAATACTC	ACGTACTACA	GTACCTTTCA
T_cacao GR1 TCM 046980	-AATGGAGCA	ATAGAGGTTG	ATGAATACTC	ACGTACTACA	GTACCTTTCA
P_mume GR LOC103334247	-ACTGGAGCA	ATAGAGGTTG	ATGAATTTTC	TCCGTACTACA	GTTCTTTCCA
Mus_musculus GR	-AAGGCCCA	ATCTAGTAG	ACGAATTTCA	GAATACCAAT	GTCAAAGGCC

1551

GR_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_5	TATGGGCCAT	TGGCGACGTT	ACAGACCGAA	TGAATCTTAC	-----
GR_Pistil_6	TATGGGCCAT	TGGTGACGTT	ACAAACCGAA	TGAATCTTAC	-----
GR_Pistil_7	TATGGGCTAT	AGGTGATGTT	ACGAACCGCA	TGAATCTTAC	-----
GR_Pistil_8	TTTGGGCTGT	TGGAGATGTT	ACTGATAGAA	TAAATTTGAC	-----
GR_Pistil_9	GTTGAGCCCT	ACTTCCCGTT	GCAATCAGAA	TGTTTTTTGC	TGAATAGCTA
GR_Pistil_10	GTTGAGCCCT	ACTTCCCGTT	GCAATCAGAA	TGTGTTTTGC	GGAATAGCTT
GR_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
V_vinifera GR2 LOC100232842	TTTGGGCTGT	TGGAGATGTT	ACAGATAGAA	TAAATTTGAC	-----
S_indicum GR2 LOC105163374	TTTGGGCTGT	TGGAGATGTT	ACCGATAGGA	TAAATTTGAC	-----
N_sylvestris GR2 LOC104211049	TTTGGGCTGT	TGGAGATGTT	ACTGATAGAA	TAAATTTAAC	-----
N_tomentosiformis GR LOC104098	TTTGGGCTGT	TGGAGATGTT	ACTGATAGAA	TAAATTTAAC	-----
T_hassleriana GR LOC104824173	TCTGGGCTAT	TGGGGATGTA	ACTGACAGAA	TCAACTTGAC	-----
C_sativus GR LOC101217298	TTTGGGCTGT	TGGAGATGTT	ACAGATAGAA	TAAACTTTAC	-----
C_sinensis GR LOC102614323	TATGGGCTGT	TGGTATGTTA	ACTAATCGAA	TGAATCTTAC	-----
E_grandis GR LOC104426615	TCTGGGCTGT	TGGGGATGTT	ACTGACAGAA	TAAACTTTAC	-----
E_grandis GR LOC104414377	TATGGGCTGT	TGGGATGTTT	ACCAATCGGA	TGAATCTTAC	-----
T_cacao GR2 TCM 046980	TTTGGGCTGT	AGGGATGTTG	ACAGATAGAA	TAAATTTGAC	-----
T_cacao GR1 TCM 046980	TTTGGGCTGT	AGGGATGTTG	ACAGATAGAA	TAAATTTGAC	-----
P_mume GR LOC103334247	TCTGGGCTGT	AGGAGATGTT	ACAGACAGAG	TGAACCTGAC	-----
Mus_musculus GR	TCTATGCTGT	GGGAGACGTC	TGTGGGAAAG	GGCTTCTCAC	-----



1751

```

GR_Pistil_1      -----
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      -----
GR_Pistil_5      --CGGCCACTGTCTGTAGTTGGTCTCAGTGAGGAAAGGGCATAGATCAA
GR_Pistil_6      --CGGCCACTGTCTGTAGTTGGTCTCAGTGAGGAAAGGGCATAGATCAA
GR_Pistil_7      --CGACCAATGTCTGTAGTTGGGTCAGTGAAAGAAAGGGTATAGAGCAA
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      TTCTTCCAATCGAAATCAATTCTCTCATTAGTTCGCCAGCATAAATCCT
GR_Pistil_10     TTCTTCCAATTGAAATCAATTTTCTCATTCAATTCGCATAAATCCT
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2_LOC100232842 --CGACCTATGGGCAAGTTGGTCTTACTGAAGAAAGGGTATAAAAA
S_indicum_GR2_LOC105163374  --CGACCTATGGGCAAGTTGGTCTTACTGAAGAAAGGGAAATTAAGAA
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 --CGACCTATGGGCAAGTTGGTCTTACTGAAGAAAGGGCATCAAAGAA
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 --CGGCCTATGGGCAAGTTGGTCTTACTGAAGAAAGGGCATCAAAGAA
T_hassleriana_GR_LOC104824173 --CGACCTATGGGCAAGTTGGTCTTACTGAAGAAAGGGCATAGAAACA
C_sativus_GR_LOC101217298    --CGACCAATGGGCAAGTTGGACTTAAAGAAAGAAAGGGCATAAAGAA
C_sinensis_GR_LOC102614323   --CTTCCTCTCTGTAGTGGTCTCAGTGAGGAAAGGGCATAGAGCAA
E_grandis_GR_LOC104426615    --CTTCCAATGGGCAAGTTGGTCTTACTGAAGAAAGGGTATTAAAGAA
E_grandis_GR_LOC104414377    --CGACCTATATCTGTGGTTGGACTGAGTGAAGAAAGGGAAATAGAGCAA
T_cacao_GR2_TCM_046980      --CGGCCAATGGGCAAGTTGGTCTTACTGAAGAAAGGGTATAAAAGAA
T_cacao_GR1_TCM_046980     --CGGCCAATGGGCAAGTTGGTCTTACTGAAGAAAGGGTATAAAAGAA
P_mume_GR_LOC103334247     --CGACCAATGGGCAAGTTGGTCTTACTGAAGAAAGGGTATCGAACAA
Mus_musculus_GR          --CGCCCTATGGGCAAGTTGGGTCAGTGAAGAAAGGGTGTTTATAAG

```

1801

```

GR_Pistil_1      T---ATGG---TGATGT  TGATGTTTAT  ACAGAAAAC  TCAGGCCCTT
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      -----
GR_Pistil_5      GCAAATGG---TGATGT  TTTAGTCTTC  ACATCAACAT  TTAATCGAAT
GR_Pistil_6      GCAAATGG---TGATGT  TTTAGTCTTC  ACATCAACAT  TTAATCGAAT
GR_Pistil_7      GCAAATGG---TGATAT  TTTGGTTTTC  ACATCAACGT  TTAATCGAAT
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      CGCGTCTCTG  AGTTCAGGTC  CAAAGGAAGC  ACCATAGACC  AAAATCTTTT
GR_Pistil_10     CGCGTCTCTG  AATTGAGATC  CAAAGGTTGC  ACCGTAGACC  AAAATCTTTT
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2_LOC100232842 T---ATGG---AGACAT  TGATGTCTAC  ACAGAAAAC  TCAGGCCCTT
S_indicum_GR2_LOC105163374  T---ATGG---GGACAT  TGATGTTTAT  ACAGAAAAC  TCAGGCCCTT
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 T---TTGG---TGACCT  TGATGTTTAT  ACAGAAAAT  TTAGGCCCTT
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 T---TTGG---TGACCT  TGATGTTTAT  ACAGAAAAT  TTAGGCCCTT
T_hassleriana_GR_LOC104824173 T---AGGG---TGATAT  AGATGTTTTC  ACAGAAAAT  TCAGGCCCTT
C_sativus_GR_LOC101217298    C---ATGG---TGATGT  TGAATCTAC  ACAGAAAAC  TTCGGCCCTT
C_sinensis_GR_LOC102614323   GGAAAGGG---TGATAT  CCTTCTTTTC  ACATCAAGCT  TCAATCCAT
E_grandis_GR_LOC104426615    T---ATGG---GGAGCT  TGAATATTTC  ACAGAAAAT  TCAGGCCCTT
E_grandis_GR_LOC104414377    CCTAATGG---AGATAT  TTTGGTTTTC  ACATCTACAT  TCAATCCAT
T_cacao_GR2_TCM_046980      T---ATGG---TGATAT  TGATGTCTAC  ACAGAAAAC  TCAGGCCCTT
T_cacao_GR1_TCM_046980     T---ATGG---TGATAT  TGATGTCTAC  ACAGAAAAC  TCAGGCCCTT
P_mume_GR_LOC103334247     T---ATGG---TGATGT  TGATATCTAC  ACATCAACAT  TCAGGCCCTT
Mus_musculus_GR          T---ATGGGA  AAGAATATGT  GAAAATCTAC  TCGATGCGCT  TTCAGGCCAT

```

1851

```

GR_Pistil_1      AAAGGCTACT  CTCTCAGG---TCTTCC  AGATCGAATT  TTTATGAAAC
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      GAAGAACACG  ATTTCTGG---ACGTCA  GGAGAAAAAC  GTTATGAAGC
GR_Pistil_5      GAAGAACACA  ATTTCTGG---ACGTCA  AGAGAAAAAC  GTTATGAAGC
GR_Pistil_6      GAAGAACACA  ATTTCTGG---ACGTCA  AGAGAAAAAC  GTTATGAAGC
GR_Pistil_7      GAAGAACACG  ATTTCTGG---ACGGCA  AGAAAAGACA  TTTATGAAAC
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      TGGGAACA  ACCAAGAATT  ACAACGTT  GCGCAACTCC  TCCAATAACT
GR_Pistil_10     TAGGAACA  ACCAAGAATG  ACAACGTT  GCGCAACTCC  TCCAATAACT
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2_LOC100232842 AAAGGCTACT  CTTTCTGG---ACTCCG  AGACGGGTT  TTCATGAAAC
S_indicum_GR2_LOC105163374  GAAGGCTACT  CTTTCTGG---CTTCCG  CGATCGGTC  TTCATGAAAC
N_sylvestris_GR2_LOC104211049 AAAGGCTACT  ATTTCTGG---TCTTCC  AGATCGGTT  TTCATGAAAC
N_tomentosiformis_GR_LOC104098 AAAGGCTACT  ATTTCTGG---TCTTCC  AGATCGGTT  TTCATGAAAC
T_hassleriana_GR_LOC104824173 AAAGGCAACT  CTTTCTGG---GCTCCG  AGACGGGTC  TTTATGAAAC
C_sativus_GR_LOC101217298    GAAGGCAACA  CTCTCAGG---GCTTCC  AGACCGAGT  TTTATGAAGC
C_sinensis_GR_LOC102614323   GAGGAACA  ATCTCTGG---ACGGCA  AGAGAAACA  GTAATGAAGC
E_grandis_GR_LOC104426615    GAAGGCAACT  CTCTCTGG---GCTCCG  TGAAGGTT  TTTATGAAGG
E_grandis_GR_LOC104414377    GAAGAACACA  GTCTCTGG---GCGGCA  AGAAAAACA  GCCATGAAGC
T_cacao_GR2_TCM_046980      GAAGGCAACT  CTCTCAGG---GCTTCC  TGATCGGTT  TTCATGAAAC
T_cacao_GR1_TCM_046980     GAAGGCCACT  CTCTCAGG---GCTTCC  TGATCGGTT  TTCATGAAAC
P_mume_GR_LOC103334247     AAAGGCTACT  CTCTCAGG---CTTCCG  AGATCGAGT  TTCATGAAAC
Mus_musculus_GR          GTATCAGGCT  GTGACACG---GAGGAA  GACGAAATGC  GTCATGAAG-

```



1901

GR_Pistil_1	TAATAGCATG	TGCAAGACA	---GACAAAG	TTCTTGGTTT	GCACATGTGT
GR_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_4	TTGTGTTGA	TGGTGAGACT	---GATAAAG	TTCTTGGAGC	ATCCATGTGT
GR_Pistil_5	TTGTGTTGA	TGGTGAGACT	---GATAAAG	TTCTTGGAGC	ATCCATGTGT
GR_Pistil_6	TTGTGTTGA	TGGTGAGACT	---GATAAAG	TTCTTGGAGC	ATCCATGTGT
GR_Pistil_7	TTGTGTTGA	TGGTGAGACT	---GATAAAG	TTCTTGGAGC	ATCCATGTGT
GR_Pistil_8	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_9	TCAGAGCTTA	TAGGATGAAA	-----	---TGGGAGC	TCACATATCC
GR_Pistil_10	TCAGTGCTGA	TAGGATGAAA	-----	---TGGGAGC	TCACATATCC
GR_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
V_vinifera_GR2_LOC100232842	TTTACTCTG	TGCAAGACT	---AACAAAG	TACTGGGATT	GCATATGTGT
S_indicum_GR2_LOC105163374	TTATGTATG	TGCAAGACA	---AACAAAG	TCCTTGGTGT	GCATATGTGT
N_sylvestris_GR2_LOC104211049	TTATAGTCTG	TGCAAGACA	---AGCAAAG	TTCTGGGCTT	GCATATGTGT
N_tomentosiformis_GR_LOC104098	TTATAGTCTG	TGCAAGACA	---AGCAAAG	TTCTGGGCTT	GCATATGTGT
T_hassleriana_GR_LOC104824173	TCATGTTTG	TGCGAAGACA	---AACAAAG	TTCTTGGTAT	CCACATGTGT
C_sativus_GR_LOC101217298	TTGTAGTCTG	TGCAAGACA	---AATAAGG	TTTTAGGACT	GCACATGTGT
C_sinensis_GR_LOC102614323	TAGTGGTGA	TGCGAGAGC	---GAAAAAG	TTCTTGGAGC	ATCAATGTGT
E_grandis_GR_LOC104426615	TCATGTTTG	TGCAAAAAA	---AAGAGAG	TCCTTGGGTT	GCATATGTGT
E_grandis_GR_LOC104414377	TGCTTGTGA	TGCAGAGACA	---GATAAGG	TTGTTGGCGC	TTCCATGTGT
T_cacao_GR2_TCM_046980	TTGTAGTCTG	TGCAGAAAA	---AACAAAG	TTCTTGGTCT	GCACATGTGT
T_cacao_GR1_TCM_046980	TTGTAGTCTG	TGCAGAAAA	---AACAAAG	TTCTTGGTCT	GCACATGTGT
P_mume_GR_LOC103334247	TTTTAGTCTG	TGCAAGACA	---AACAAAG	TTCTGGGCTT	GCACATGTGT
Mus_musculus_GR	--ATGGTTTG	TGCCAACAAA	GAGGAAAAG	TGGTTGGCAT	TCACATGCAG

1951

GR_Pistil_1	GGTGAAGA	-----CTC	ACCAGAAATT	ATGAGGTTG	GTTCTCTCG
GR_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_4	GGGCTCA	-----TGC	TCCTGAGATC	ATG	-----
GR_Pistil_5	GGGCCAGA	-----TGC	AGCTGAGATC	ATA	-----
GR_Pistil_6	GGGCCAGA	-----TGC	AGCTGAGATC	ATA	-----
GR_Pistil_7	GGGCCAGA	-----TGC	ACCTGAGATC	ATG	-----
GR_Pistil_8	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_9	CAACCTTAGC	TCCATACTGT	GCTGAAAATC	GCG	-----
GR_Pistil_10	CAACCTTAGC	TCCATATTGT	GCTGAAAATC	GTG	-----
GR_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
V_vinifera_GR2_LOC100232842	GGAGAAGA	-----TTC	ACCAGAAATT	GTG	-----
S_indicum_GR2_LOC105163374	GGAGAAGA	-----TTC	GCCAGAAATT	ATC	-----
N_sylvestris_GR2_LOC104211049	GGAGATGA	-----TGC	ACCAGAAATT	GTA	-----
N_tomentosiformis_GR_LOC104098	GGAGATGA	-----TGC	ACCAGAAATT	GTA	-----
T_hassleriana_GR_LOC104824173	GGAGAGGA	-----TTC	ACCTGAAATC	ATC	-----
C_sativus_GR_LOC101217298	GGTGACGA	-----TTC	ACCAGAAATC	GTG	-----
C_sinensis_GR_LOC102614323	GGGCCAGA	-----AGC	ACCTGAGATA	ATC	-----
E_grandis_GR_LOC104426615	GGGGAAGA	-----TTC	TGCAGAAATT	GTA	-----
E_grandis_GR_LOC104414377	GGGCCAGA	-----TGC	ACCTGAAATC	GTG	-----
T_cacao_GR2_TCM_046980	GGAGAAGA	-----TTC	GGCTGAAATC	GTG	-----
T_cacao_GR1_TCM_046980	GGAGAAGA	-----TTC	GGCTGAAATC	GTG	-----
P_mume_GR_LOC103334247	GGGGAAGA	-----TTC	GCCAGAAATT	GTG	-----
Mus_musculus_GR	GGGATTGG	-----CTG	TCATGAGATG	GTG	-----

2001

GR_Pistil_1	TCATTATTTT	CCATGAAATG	ATTTGATGT	GATATGGCAT	ATTAGAATA
GR_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_8	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_9	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pistil_10	-----	-----	-----	-----	-----
GR_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
V_vinifera_GR2_LOC100232842	-----	-----	-----	-----	-----
S_indicum_GR2_LOC105163374	-----	-----	-----	-----	-----
N_sylvestris_GR2_LOC104211049	-----	-----	-----	-----	-----
N_tomentosiformis_GR_LOC104098	-----	-----	-----	-----	-----
T_hassleriana_GR_LOC104824173	-----	-----	-----	-----	-----
C_sativus_GR_LOC101217298	-----	-----	-----	-----	-----
C_sinensis_GR_LOC102614323	-----	-----	-----	-----	-----
E_grandis_GR_LOC104426615	-----	-----	-----	-----	-----
E_grandis_GR_LOC104414377	-----	-----	-----	-----	-----
T_cacao_GR2_TCM_046980	-----	-----	-----	-----	-----
T_cacao_GR1_TCM_046980	-----	-----	-----	-----	-----
P_mume_GR_LOC103334247	-----	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GR	-----	-----	-----	-----	-----

2051

```

GR_Pistil_1      TGGATATCCA GGGATTGCG GTTGTGTAA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      -----CA GGGCTTGGT GTTGCCTCA AATGTGGAGC AACCAAGCA
GR_Pistil_5      -----CA GGGATTGGT GTTGCCTTA AATGTGGAGC AACCAAGCA
GR_Pistil_6      -----CA GGGATTGGT GTTGCCTTA AATGTGGAGC AACCAAGCA
GR_Pistil_7      -----CA GGGATTGGT GTTGCCTTA AATGTGGAGC AACCAAGCA
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      -----AGGCAG GGACTCCACC ACTGC----- -AGCTC GAATAGAAA
GR_Pistil_10     -----AAGCAG GAAATCCGCC ACTGC----- -AGCACC AATCAACAAA
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2  LOC100232842 -----CA GGGCTTGGT GTTGTGTGA GAGCTGGCTT GACAAAGCA
S_indicum_GR2   LOC105163374 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTAA AAGCTGGCTT GACTAAGCG
N_sylvestris_GR2 LOC104211049 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
N_tomentosiformis GR LOC104098 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
T_hassleriana_GR LOC104824173 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTAA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
C_sativus_GR    LOC101217298 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
C_sinensis_GR   LOC102614323 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
E_grandis_GR    LOC104426615 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
E_grandis_GR    LOC104414377 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
T_cacao_GR2    TCM_046980 -----CA -GGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
T_cacao_GR1    TCM_046980 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
P_mume_GR      LOC103334247 -----CA GGGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA
Mus_musculus_GR -----CA GGGATTGGT GTTGTGTGA AAGCTGGCTT GACCAAGCA

```

2101

```

GR_Pistil_1      GACTTTGATG CCACTGTGGG TATTACCCCT ACAGTAGCGG AGGAAATTGT
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      CAATTTGATA GCACGGTTGG TATACCCCT TCTGTGCAG AAGAGTTTGT
GR_Pistil_5      CAATTTGATA GCACGGTTGG TATACCCCT TCTGTGCAG AAGAGTTTGT
GR_Pistil_6      CAATTTGATA GCACGGTTGG TATACCCCT TCTGTGCAG AAGAGTTTGT
GR_Pistil_7      CAATTTGATA GCACGGTTGG TATACCCCT TCTGTGCAG AAGAGTTTGT
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      CAAATCAAAG TCATAGTGAA TCTCCTCTCC ATTGGGATTG CCTAGCTTCC
GR_Pistil_10     CAAATCAAAG TCATAGTGAA TCTCCTCTCC ATTGGGATTG CCTAGCTTCC
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2  LOC100232842 GACTTTGATG CCACTGTGGG AATCACCCCT ACTGAGCAG AGGAGTTTGT
S_indicum_GR2   LOC105163374 GACTTTGATG CCACTGTGGG TATCACCCCT ACAGTAGCGG AGGAGTTTGT
N_sylvestris_GR2 LOC104211049 GACTTTGATG CCACTGTGGG AATCACCCCT ACATAGCAG AGGAGTTTGT
N_tomentosiformis GR LOC104098 GACTTTGATG CCACTGTGGG AATCACCCCT ACATAGCAG AGGAGTTTGT
T_hassleriana_GR LOC104824173 GACTTTGATA GTACGGTGGG TGTTATCCA ACAGTAGCAG AAGAGTTTGT
C_sativus_GR    LOC101217298 GACTTTGATG CTACGGTGGG TGTTATCCT ACAGTAGCAG AAGAGTTTGT
C_sinensis_GR   LOC102614323 CAATTTGATA GCACGGTGGG AATACATCCT TCTGTGCAG AGGAAATTGT
E_grandis_GR    LOC104426615 GACTTTGATG CCACTGTGGG GATTAGCGG ACTACTGCTG AGGAAATTGT
E_grandis_GR    LOC104414377 CAATTTGATA GCACGGTGGG AATCACCCCT TCTGTGCAG AGGAAATTGT
T_cacao_GR2    TCM_046980 GACTTTGATG CCACTGTGGG TGTTATCCA ACATAGCAG AGGAGTTTGT
T_cacao_GR1    TCM_046980 GACTTTGATG CCACTGTGGG TGTTATCCA ACATAGCAG AGGAGTTTGT
P_mume_GR      LOC103334247 GACTTTAGAT CCACTGTGGG TATTACCCG ACAGTAGCAG AAGAGTTTGT
Mus_musculus_GR GACTTCGACA ACACTGTGGG GATTATCCT ACCTTTTCAG AGGAGTTTGT

```

2151

```

GR_Pistil_1      CACCATGAGG ACACCTACGA GAAA----- -----GC TTCGGAGGA-
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      GACCATGCGG TCGATGAGTA GGCG----- -GA TCACGGGTG-
GR_Pistil_5      GACCATGCGA TCTGTGAGTA GGCG----- -----GAT
GR_Pistil_6      GACCATGCGA TCTGTGAGTA GGCG----- -----GAT
GR_Pistil_7      GACAATGCGG TCTATGAGTA GACG----- -----AAT
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      CATCAATAAG CATCTTCTTT GCCA----- -----
GR_Pistil_10     CATCAATCAA CATCTTCTTT GCCA----- -TGGCCAC
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2  LOC100232842 CACAATGAGG ACTCCTACTC GGAA----- -GA TTCGAAACAG
S_indicum_GR2   LOC105163374 CACCATGAGG ACACCTACGA GGAA----- -GA TTCGAAGTA-
N_sylvestris_GR2 LOC104211049 CACCATGCGT ACCCTACAAA GGAA----- -GG TTCGAAGCA-
N_tomentosiformis GR LOC104098 CACCATGCGT ACCCTACAAA GGAA----- -GG TTCGAAGCA-
T_hassleriana_GR LOC104824173 TACTATGAGG ACTCCTACTC GAAA----- -GA TTCGGAGAGA
C_sativus_GR    LOC101217298 CACCATGCGA ACTCCTACAAA GGAA----- -GA TTAGGAGAAA
C_sinensis_GR   LOC102614323 GACCATGCGG TCTGTGAGTA GACG----- -TCTGTGTG-
E_grandis_GR    LOC104426615 TAGATGAGG ACGCCACTA GGAA----- -GA TACGGAGGGG
E_grandis_GR    LOC104414377 AACCATGAGG TCAGTACAAA GACG----- -GG TTAGTCCC-
T_cacao_GR2    TCM_046980 CACAATGAGG ACTCCTACTC GGAA----- -GA TACGAGAAA
T_cacao_GR1    TCM_046980 CACAATGAGG ACTCCTACTC GGAA----- -GA TACGAGAAA
P_mume_GR      LOC103334247 CACAATGAGG ACTCCTACTC GGAA----- -GA TTCGAAA-
Mus_musculus_GR CACCCTGCGG TGAGAGCTG GGGACCCAGG TGGCTAGCGG TCGGACGAG

```

2201

```

GR_Pistil_1      --CTCCATCT  GAGGGAAAAA  CCGATTCTGA  GTTCAAAGC  -----
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      -----GT  AACCCGAAGA  CCAA CCTATA  GACATTCAT  -----
GR_Pistil_5      CGCGGCTGGT  AAACCGAAGA  CCAACCTATA  GGCATGAACG  CGAAAAAG--
GR_Pistil_6      CGCGGCTGGT  AAACCGAAGA  CCAA CCTATA  GGCATGAACG  CGAAAAAG--
GR_Pistil_7      AGCTGCCGGT  AAAACGAAGA  CAAACCTATA  GACATTAATA  GCGATTTA--
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      -----T  AATGATAATA  CTC-----
GR_Pistil_10     AATGCTATAA  ACAATAAATA  TAATCCATGA  ACAAGTAATA  TTAGATCCA
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2  LOC100232842  CTCCTCACCG  GAGGGAAAGA  CCGATCCCGA  GGTAAAGC  -----
S_indicum_GR2   LOC105163374  --CTCCATCG  GAGGGAAAAA  CCGATTCTGA  TGTCAAAGC  -----
N_sylvestris_GR2 LOC104211049  --GTCCATCT  GAGGGAAAGG  CAGAGCACGA  TATTAAGC  -----
N_tomentosiformis GR LOC104098  --GTCCATCT  GAGGGAAAGG  CAGAGCACGA  TATTAAGC  -----
T_hassleriana_GR LOC104824173  TTCTG---CT  GAGGGAAAGA  CGAATCCCGA  GGCTAAAGC  -----
C_sativus_GR    LOC101217298  TCCT-----  GAGGAAAAGT  CAGAATCTGA  GGCTAAAGC  -----
C_sinensis_GR  LOC102614323  CGCAAGCAGC  AATCGAAGA  CAAATCTGTA  AGGTTCAATC  AAATATCAGA
E_grandis_GR    LOC104426615  TCCTTCATCA  GAGGGAAAGA  AGGATCTCTGA  TGCTAAAGC  -----
E_grandis_GR    LOC104414377  -----
T_cacao_GR2    TCM_046980    GCCTGATTCT  GAGGGAAAGA  CGGGTCTCGA  GGCAAAAGC  -----
T_cacao_GR1    TCM_046980    GCCTGATTCT  GAGGGAAAGA  CGGGTCTCGA  GGCAAAAGC  -----
P_mume_GR      LOC103334247  -----CCATCT  GAGGGGAAGA  CAGATTCCTGA  TGTAAAGC  -----
Mus_musculus_GR  AGGCTCTCCG  GAGGAACCGA  TCGATTTA  GCCCAGCTT  TACAGATCT

```

2251

```

GR_Pistil_1      -----
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      -----TTT  CAATAAAAAA  ATCATACTGA  GTA-----
GR_Pistil_5      -----TT  GTACTTTATT  ATGA-----
GR_Pistil_6      -----TT  GTA TTTATT  ATGA-----
GR_Pistil_7      -----TG  GAGTATTGTT  TCAAAGATGT  -----
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      -----TT  ATGATTAGGA  ATAA-----
GR_Pistil_10     AAAAATAAAA  TACGGAGTCA  TTAATAGAA  ATAA-----
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2  LOC100232842  -----TG  CAGCAGGGGT  TTAGCATGA  GTTCAATC
S_indicum_GR2   LOC105163374  -----TG  CTGTGGTGT  TTGA-TGTCA  GGA-ATGAAG
N_sylvestris_GR2 LOC104211049  -----TG  CAGCTGGACT  TTGA-TGTG  TCC-A-----
N_tomentosiformis GR LOC104098  -----TG  CAGCTGGACT  TTGA-TGTG  TCC-A-----
T_hassleriana_GR LOC104824173  -----TG  CTGAGGGGT  TTGA-AAGAG  GTT-GTAAAA
C_sativus_GR    LOC101217298  -----TG  CAGCAGGGGT  ATAA-AAAGG  -----
C_sinensis_GR  LOC102614323  CAGAAGCCGG  TTTGATATTT  ATATATCTT  GGAA-----
E_grandis_GR    LOC104426615  -----TG  CAGCTGGGT  TTAGCATG  -----
E_grandis_GR    LOC104414377  -----TC  TTA CAGACA  ATAC-----
T_cacao_GR2    TCM_046980    -----TG  CAGCAGGGGT  TTAGCAAGA  GTA-ATTAAT
T_cacao_GR1    TCM_046980    -----TG  CAGCAGGGGT  TTAG-----
P_mume_GR      LOC103334247  -----TG  CCGTGGTGT  TTGATCTGG  TTG-ACCAAT
Mus_musculus_GR  TGTATTTTAA  TCAGGAATTT  CTGGTGGTGT  AAATTCACG  CTATAGACAC

```

2301

```

GR_Pistil_1      -----
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      -----
GR_Pistil_5      -----
GR_Pistil_6      -----
GR_Pistil_7      -----
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      -----
GR_Pistil_10     -----
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2  LOC100232842  TATCTGATGG  GC-----AT  GATAGCAC-T  CCCA-----
S_indicum_GR2   LOC105163374  CATGAAGTA  GCTAGATTGA  AGGAAAATAT  GATGGGGC-T  CTC-----
N_sylvestris_GR2 LOC104211049  -----AT  AAAGGCTCAT  TTTG-----
N_tomentosiformis GR LOC104098  -----AT  AAAGGCTCAA  TTTG-----
T_hassleriana_GR LOC104824173  CAATCAGGGT  TCATGGAGTA  GGAATCTCT  GACAAAGGTGA  TCCTTGT--
C_sativus_GR    LOC101217298  -----AT  GAAAGCTTAA  TCAA-----
C_sinensis_GR  LOC102614323  -----
E_grandis_GR    LOC104426615  TATAGGACTG  CTGGGATAAG  TAAACAGAG  GTGGGCTCC  TTTAAAGG--
E_grandis_GR    LOC104414377  -----
T_cacao_GR2    TCM_046980    TAGCTGGACA  CC-----GT  GGGAGTTCCA  TTTAAGGTGC
T_cacao_GR1    TCM_046980    --CAAGAGTA  ATTAATTAGC  TGGACACCGT  GGGAGTTCCA  TTTAAGGTTG
P_mume_GR      LOC103334247  CTGCTG-----  A-----  GACATGGCTC  CTGAA-----
Mus_musculus_GR  GCAACAGAAG  ACTTATGTAT  GTAATCAGAA  GGTGTTTTC  TTAATCCGGG

```

2351

GR\_Pistil\_1  
GR\_Pistil\_2  
GR\_Pistil\_3  
GR\_Pistil\_4  
GR\_Pistil\_5  
GR\_Pistil\_6  
GR\_Pistil\_7  
GR\_Pistil\_8  
GR\_Pistil\_9  
GR\_Pistil\_10  
GR\_Pollen\_1  
V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
P\_mume\_GR\_LOC103334247  
Mus\_musculus\_GR

```

-----AAGA ATCTACCTGC TCCTTTAAAA TTGATTTTTG
-----
-----TGA TTTTGAGAAA TTATATTTAC ACGATAGAGC ATGTTGGAGA
-----TCGTGGGAAA TTAGATTCAC TTTGAGAAAG CCTATTGTAG
-----TTAG AGCTGGAAGA GTGAAATAAG AAGTTGAAAT TTAGTTTATG
-----AGCAC GTTTATTTAT TCCTTTTCAA TTTGATCGTG
-----AGCAAA CTCTCTTGGT GCAGAGAAAT GATCTAAAAG
-----CT-----TTTGGAAA CTGAGGTATG
-----TTGA CCGGCCTGTC ATCCAGAGAC AGCTTGGAAAG CTG-----G
-----TTGA ATGAGATAAA ATAGATGTAC AACTTTGCAA GAGGTTTTGG
-----TTGA ATGAGATAAA ATAGATGTAC AACTTTGCAA GAGGTTTTGG
-----TTGG CTGTTAGAAA ATGCCCTTCT CCTTCCGCTT CTGGAGATCT
-----TTTG TAAATCAAAA ACTCAGTCAG TCCTTTCAGG TTGATATGA
-----CATT ATTTGCTTGA ATATAGGTAT TTCGCGTTTA CCAAAACACAG
-----TTGT ATTTTGTACT ATGGACTGGT AATATGCCTT TTTGATGGG
-----ATGCGGTTAC CAATACTTGA TTGGAATGCA TTCATTGTGC
CAAATTTTTG ATAT-----G CTGTTCTTAT TACTTGGGCA AAATGATTGG
-----GGTA CTAGTGGAAAG TCCATCTTGT GTATAGTTGA TGGATCTCAG
-----GTTT GTAATGAAA ATCC-----TTTTGAAA CAGGTGCTGG
GTTGGTTTTG ATTTGATAAT ATTTATAATT AATATTTTGA TTTTTTTGTT

```

2401

GR\_Pistil\_1  
GR\_Pistil\_2  
GR\_Pistil\_3  
GR\_Pistil\_4  
GR\_Pistil\_5  
GR\_Pistil\_6  
GR\_Pistil\_7  
GR\_Pistil\_8  
GR\_Pistil\_9  
GR\_Pistil\_10  
GR\_Pollen\_1  
V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
P\_mume\_GR\_LOC103334247  
Mus\_musculus\_GR

```

-----G-----TGGGAAGG TA-----TTTT
-----
AACTACTGTG GACATG----CCTTCTGG GA-----TTTCAGT
AAGCACTGA TTAT-----CCTTCTGG GA-----TTTCATT
AAGCACTGA TTAT-----CCTTCTGG GA-----TTTCATT
CAATTGGTT GTAGTGTGT ATTTGGAAAA GA-----
TAGGTG-----TCTAGATTG AA-----TTTGAGT
GAAAAAGAAG ATCCGAAGTA AACTAAATGA AG-----TTTGACT
AACTATCGAG-----CGGAAATGG AG-----CTTACT
AATGAGTTT-----CGGAGATGG GA-----TATGATG
ACTGATAGG-----AGCATATGG AA-----CATCAGT
ACTGATGGG-----AGCATATGG AA-----CTTCAGT
GATAGATGGA TAT-----CTCTGTGA TG-----ATTTGA
AAGGTACAGG AACGGACAGC CCTGACATCG AA-----TTTGATT
CAAAAAGGGG GGA AAAATC-----CTGTATAG CAGGAGTAGC CCAGTTTTCT
AGCGTTGCG-----TTCGTTTGA TA-----GAGGCGG
ACGTGG-----GT AGAATGC-----GGTGTGGG AA-----TACGCTT
-----TTGCTTTG AG-----TTCTTGT
ATTGACTCTT GATGAATGAT GACCATATGG AGCAAAAGGCG TCCTTTGGAT
AAAAGGCAAG AT-----CTGACATAG AA-----GACTTGA
GTTCTTTAAT TAAAGCCTT GTCTTGTG TG-----TTTTCT

```

2451

GR\_Pistil\_1  
GR\_Pistil\_2  
GR\_Pistil\_3  
GR\_Pistil\_4  
GR\_Pistil\_5  
GR\_Pistil\_6  
GR\_Pistil\_7  
GR\_Pistil\_8  
GR\_Pistil\_9  
GR\_Pistil\_10  
GR\_Pollen\_1  
V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
P\_mume\_GR\_LOC103334247  
Mus\_musculus\_GR

```

-----TGAAAG-----
GAGAGACTTT-----
GAGAGACTTT-----
-----
CCTTGATGGA GAAGATTGCC ACGATCAATA CTCTGAA---
TGTGAAAAAA ACCT-----
AGAG--GAG-----
AGTA--TTGG CTCAAAAAAG CCGGGATATG-----
TGTG--GACT CACAATAAGC AAAAAGCTTT CTTGAA-----
TGTG--GACT CACAATAAGC AAAAAGCTTT CTGGA-----
TGTTCAAAG TAAACTCAAG CAAATACCCA GATGGGT-----
AATGGCGATG ATAAQAATGA TGAAGAGCTT GTTGAAA-----
GGTTTTTAT TTACCTAAA TAAAAGTTT ATCTTGGAAA A-----
GGAT--TGTT TTTCTATTG GAAGGGATT CTGGGAG-----
TATT--TTT TCTAAGATGA GGAAAAATG ---GGAA---
GGCACTCATG AATGCAAGGC ACAGGAGGTG TTTAAAAAGG AATG-----
GCTT-----
TGTCTTGGGC CCATTCGAAG TTTAAATCTA GATGACATA ACTCAAGTTA

```

2501

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

----- TGGATGAATA TTGTTGGCTA ATTTCTTTTA TTTTTTATTT  
 GTGTACCTGA TGGATGAATA TTGTTGGCTA ATTTCTTTTA TTTTTTATTT

2551

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

----- CTCTA  
 ----- CTCTA  
 ----- TGAGG TGGTGGTGGC TGGCGGCCGA  
 ----- GA-CCGACT CACTGATACT TGTGGAAACC  
 ----- AACCCGACT CACTGATACT TGTGGAAACC  
 ----- AAATCATT GATTCGAGG TG-----  
 ----- CTGGTCGT AGAAAACCAT TAAGTTTACA  
 ----- GAGAAATTT GAAAGGCA -----GGTTCT  
 ----- GTACTGAA GAATATT-GA TAGCAATCCT  
 ----- C TGGAGAGCAT  
 TTTTCTTTT TTTATGCAGC CCAAGGTGGC CTCAAAGAAC TCAGAATCCT

2601

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

GGAGTTCAA -TACAGTTGA TG-----T-----  
 ----- TGAGATCC TG-----CT GGGGGCCAAG G-----  
 GGCACGCTA -CTCGGATCT CC-----TG AAGGAATGTC G-----  
 AGGGCTAAC -TTCACTGCT TG-----AA AAGGGCTTTA AAGGTGCT--  
 AGGGCTAAC -TTCACTGCT TG-----AA AAGGGCTTGA AAGGTGCT--  
 AGGACCCGAA TTTCAAAAT TGCAGCTTTG AAGAACAATG AATTCACTAT  
 GAGGACCAG -CGCAAAAT T-----TG GCATAAAATG ATGTTACTGT  
 AGATAATTG -CTGAGCTCT TG-----CT GGATAAAGTG GCTTTCTT--  
 GGATGCTGA AGTTCTCTCT CGAGGCCAGC GAGGAACTTG A-----  
 CGAGCTATAG CCTCATGGGT GCTGGAATTC TAGGCCTGCA TGGCTCTCC

2651

```

GR_Pistil_1
GR_Pistil_2
GR_Pistil_3
GR_Pistil_4
GR_Pistil_5
GR_Pistil_6
GR_Pistil_7
GR_Pistil_8
GR_Pistil_9
GR_Pistil_10
GR_Pollen_1
V_vinifera_GR2_LOC100232842
S_indicum_GR2_LOC105163374
N_sylvestris_GR2_LOC104211049
N_tomentosiformis_GR_LOC104098
T_hassleriana_GR_LOC104824173
C_sativus_GR_LOC101217298
C_sinensis_GR_LOC102614323
E_grandis_GR_LOC104426615
E_grandis_GR_LOC104414377
T_cacao_GR2_TCM_046980
T_cacao_GR1_TCM_046980
P_mume_GR_LOC103334247
Mus_musculus_GR

```

2701

```

GR_Pistil_1
GR_Pistil_2
GR_Pistil_3
GR_Pistil_4
GR_Pistil_5
GR_Pistil_6
GR_Pistil_7
GR_Pistil_8
GR_Pistil_9
GR_Pistil_10
GR_Pollen_1
V_vinifera_GR2_LOC100232842
S_indicum_GR2_LOC105163374
N_sylvestris_GR2_LOC104211049
N_tomentosiformis_GR_LOC104098
T_hassleriana_GR_LOC104824173
C_sativus_GR_LOC101217298
C_sinensis_GR_LOC102614323
E_grandis_GR_LOC104426615
E_grandis_GR_LOC104414377
T_cacao_GR2_TCM_046980
T_cacao_GR1_TCM_046980
P_mume_GR_LOC103334247
Mus_musculus_GR

```

2751

```

GR_Pistil_1
GR_Pistil_2
GR_Pistil_3
GR_Pistil_4
GR_Pistil_5
GR_Pistil_6
GR_Pistil_7
GR_Pistil_8
GR_Pistil_9
GR_Pistil_10
GR_Pollen_1
V_vinifera_GR2_LOC100232842
S_indicum_GR2_LOC105163374
N_sylvestris_GR2_LOC104211049
N_tomentosiformis_GR_LOC104098
T_hassleriana_GR_LOC104824173
C_sativus_GR_LOC101217298
C_sinensis_GR_LOC102614323
E_grandis_GR_LOC104426615
E_grandis_GR_LOC104414377
T_cacao_GR2_TCM_046980
T_cacao_GR1_TCM_046980
P_mume_GR_LOC103334247
Mus_musculus_GR

```

2801

GR\_Pistil\_1 TT  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5 TC  
 GR\_Pistil\_6 TC  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842 TT  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374 TT  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049 TT  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098 CT  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173 TT  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298 TC  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323 CA  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615 TC  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377 GC  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980 TG  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980 TT  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247 TT  
 Mus\_musculus\_GR TT CATGGAAC AAAGTGCATT AAAGTTAGAC TTGAGGCTGG TTAGGTAAAG

2851

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

CTT TGACTAATT  
 CCT TTATAGGAAT  
 GGG GAAGGGGTCC  
 CTT AGGGAAGTCC  
 CTT AGGGAAGTCC  
 CTT AAAGGGG--  
 ATT GAGTGGATTG  
 TTT TGGCTAGCTA  
 ATC GC  
 ACC ATGTAAACTT  
 ATT CTGAGAACCA  
 GCT GTATGAGCTA  
 GAGAAATGAC AGTACATGCA AGACGGAAGG CTGAGGCACT GGGGAGCCCT

2901

GR\_Pistil\_1  
 GR\_Pistil\_2  
 GR\_Pistil\_3  
 GR\_Pistil\_4  
 GR\_Pistil\_5  
 GR\_Pistil\_6  
 GR\_Pistil\_7  
 GR\_Pistil\_8  
 GR\_Pistil\_9  
 GR\_Pistil\_10  
 GR\_Pollen\_1  
 V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842  
 S\_indicum\_GR2\_LOC105163374  
 N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049  
 N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098  
 T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173  
 C\_sativus\_GR\_LOC101217298  
 C\_sinensis\_GR\_LOC102614323  
 E\_grandis\_GR\_LOC104426615  
 E\_grandis\_GR\_LOC104414377  
 T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980  
 T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980  
 P\_mume\_GR\_LOC103334247  
 Mus\_musculus\_GR

CGTGTTT GCATCTGCAT GGGAAATATG TGCTATGGAC  
 TTCTTTT ACTTCAATAT GTTTACGCTG CAATAGTTGA  
 AAGGA ACGTGAATTG TTAAGTGCAA ATTGGTTATC TGGAGACAAA  
 AAGGA ACGTGAATTG TTATGTGCAA ATTGTTATC TGACTIONCC  
 --ACTGCACT CTTAATTTTG CAATGACTTT  
 AATTCT CCAAAAATAA ACAAGAATTA TTCTAAGAAT  
 TTGAG---- TAACTTA AAATTGCCC ----TTTCA TCATTTTCAT  
 ATGGA---- TTCTTCG CCCCAGCCG ----TAATA TGATGTCTAG  
 AGAGA---- GAAGTTA TTATTAATA CCGGATGATG TTTTCTCTA  
 AGAGA---- GAAGTTA TTATTAATAT CCTGTGATG TTTTCTCTA  
 ----AAATCTT TCATGATTCT TCTGATTAGG GTTTTCTCCA  
 TCTTAATGGT ----TGGTCT TCATGTACAT TTTTCTATT TAATG---GG  
 ----TATCTTT TTATTGAAAT AATATCTATA GTGTCTTCC  
 CTTTA---- GACGTGT TTATTCTCGG CTCGCTTGT TATCACTCTA  
 ----TGTGTAC ATCTTGCCA AAAGTGCACA GTATTATGAG  
 TAAAA---- TCAAGTG AAATTACTGT TGTATTCTGG CTTTGTATG  
 TGAGATAGGA TCTCGTTTG AAAGAATTTT TCCATTTTTG CGCTAAATGA  
 TGCTCTGGCT --CACTTC ACATATTTTT GACGTTAAACA TCGATGGATA  
 TTCTCTTCT GAGTATTCCT GGTTGATTCA GTCATTTCTG TATCTCTGGC

2951

GR\_Pistil\_1 TTTTATTG --- --- --- --- TGGAGGC

GR\_Pistil\_2

GR\_Pistil\_3

GR\_Pistil\_4 TGAAAAAAT TG

GR\_Pistil\_5 CATATTTTA AT

GR\_Pistil\_6 ATATTTCAA TA

GR\_Pistil\_7 TGTGTCAAAA CT

GR\_Pistil\_8

GR\_Pistil\_9

GR\_Pistil\_10 AGAGTACTCC

GR\_Pollen\_1

V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842 TGACATTTG

S\_indicum\_GR2\_LOC105163374 TATCATTTGA AC --- A GT --- TCC AAGTTT GATTTTGAAC

N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049 TTTTATATTA --- --- --- --- TCC TTTTGG GGTGGGGGC

N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098 TTTTATATTA TA --- G TT --- TCC TTTTGG GGGTGGGGC

T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173 TCTTTGTTTT TT --- C TTA TATTCT GTCAAGTTT TGCTTGAAG

C\_sativus\_GR\_LOC101217298 TGGGTATTTG GG --- T TT --- CTGTTTCTT CTGTTTCCA

C\_sinensis\_GR\_LOC102614323 AA

E\_grandis\_GR\_LOC104426615 TAGTCATTTA --- --- --- --- TGA AAT

E\_grandis\_GR\_LOC104414377 TCTGAATGAG TG --- G TTTATTCTTA TTTGTGCAG TACATCGGGC

T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980 TCCCTCTCTG GG --- T TT --- TT

T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980 TGCAATTTTT TGAACTCTT TTTT TTTTTT GTTTTATACA GTATAAATGA

P\_mume\_GR\_LOC103334247 AATGCGTATT TG --- G TT --- TCC TTGAGG TTCTCTGTAG

Mus\_musculus\_GR TTTGTTTTTT TT --- T TTTTGTTTTT GTTTTTTATG AAAAA TGTTT

3001

GR\_Pistil\_1 AGGGTTGCTG CAGTCTACCA TGCA

GR\_Pistil\_2

GR\_Pistil\_3

GR\_Pistil\_4

GR\_Pistil\_5

GR\_Pistil\_6

GR\_Pistil\_7

GR\_Pistil\_8

GR\_Pistil\_9

GR\_Pistil\_10

GR\_Pollen\_1

V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842 --- GTTCAGG AAA A AAT

S\_indicum\_GR2\_LOC105163374 GGAATCAAA GACGAAA

N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049 ACAATCAGGT GGTGTTATTA TAAATTGCT TATTAGATAT TGTTCCTGTC

N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098 ACAATCAGGT GGTGTAATTA TAATATTCT TATTATATAT TGTTCCTGTC

T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173 AGAATCCGAA TAA TGAC --- GAACG GTTTGGATTT

C\_sativus\_GR\_LOC101217298 AAATTTTAT GCGCTAACTG TATATTGTT CCTTCTCTTG TGTGTGAA

C\_sinensis\_GR\_LOC102614323

E\_grandis\_GR\_LOC104426615 AGCAAGGAA GAGGGAATTG TTAA

E\_grandis\_GR\_LOC104414377 GTAATGTTTT CATTGGATTG AACTCCGCAT GTATTGCTCA AGCATCTTGA

T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980 --- GTATAT AAGCCAACTG TTC

T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980 CTACTTCTTA TAGTAATTT ATCTAAAA

P\_mume\_GR\_LOC103334247 AACATATTAT ATATACACTA TAAAGAGC --- ACGA TGTTAAATA

Mus\_musculus\_GR CAAATTTTTG AAATTCACTG CATT

3051

GR\_Pistil\_1 --- --- TTTATGAT TTTTCAACT CACCAAC --- TT TGAAT

GR\_Pistil\_2

GR\_Pistil\_3

GR\_Pistil\_4 --- A ATAGTATTGT AATTTCAACA ATTTGATATA AAGGAGG ---

GR\_Pistil\_5 --- AA ATTTTATGAT TTTTA --- GGC CAAG AGTGAAC TTG

GR\_Pistil\_6

GR\_Pistil\_7 --- AT TATTGATGAT CAATAAAAGT AGCTG ---

GR\_Pistil\_8

GR\_Pistil\_9

GR\_Pistil\_10

GR\_Pollen\_1

V\_vinifera\_GR2\_LOC100232842 --- AA ATCGTCTGAT ATGCGTCTTT GATTTCGA --- T

S\_indicum\_GR2\_LOC105163374 --- AA TTTTCTTCAT AGGATCTGGC GATTGCC --- G

N\_sylvestris\_GR2\_LOC104211049 TAAATATAAC ATTATGTGAT ATTTGCAAC AATAGCAA --- T

N\_tomentosiformis\_GR\_LOC104098 TAAATATAAC ATTATTTGAT ATTTGCAAT AATATGAG --- T

T\_hassleriana\_GR\_LOC104824173 TTTTTTTAAA TTAGACCGAT ATATACTGTA AATCCGAT --- G

C\_sativus\_GR\_LOC101217298 --- AA CTTCCTGTTGT AAATATTGAT ATCGATGC --- A

C\_sinensis\_GR\_LOC102614323

E\_grandis\_GR\_LOC104426615 --- GA GTGGTGACAT TTTGTTAGAT GAATTTAC --- T

E\_grandis\_GR\_LOC104414377 TGCAGGTATG GTTCTATGGC AATGTCACAG ACATCTTAGA ACTTTTCACT

T\_cacao\_GR2\_TCM\_046980 --- AC ATTGTCTAAT GATCTGAGC AATTTGCCAG GTTGGGTACT

T\_cacao\_GR1\_TCM\_046980

P\_mume\_GR\_LOC103334247 AATGCTGATA GATTTCTGAT TTTTATCACT AA --- A

Mus\_musculus\_GR GTCTTATAAA ATTTATTAGG AACTAAAAA AAAAAAAAAA



3101

```

GR_Pistil_1      TAGGCATGTT  -----
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      -----
GR_Pistil_5      AATGGAGATT  CC-----
GR_Pistil_6      -----
GR_Pistil_7      -----
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      -----
GR_Pistil_10     -----
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2_LOC100232842  AATGAAGGGT  TTACCGTTTT  TTTGTTCCAN
S_indicum_GR2_LOC105163374    AGGAAAAAGA
N_sylvestris_GR2_LOC104211049  TATGCAGATT  GCTCATGGTG  TTTATATACA  GTAATATAAA  GCAGTATGG
N_tomentosiformis_GR_LOC104098  TATGCAGATT  GCT-----
T_hassleriana_GR_LOC104824173  AAATAAGATG  CGTCTGTATG  TATGTTTTCA
C_sativus_GR_LOC101217298     TACATTGAGT  TCTCTTTTT  AGG-----
C_sinensis_GR_LOC102614323    AGTAGAAGGT  TT-----
E_grandis_GR_LOC104426615     CA-----
T_cacao_GR2_TCM_046980        ACTGGAAG  --TCCATCTT  GT-----
T_cacao_GR1_TCM_046980
P_mume_GR_LOC103334247       TAAATGAGTT  TTTTTT-----
Mus_musculus_GR      AAAAAAAAAA  AA-----

```

3151

```

GR_Pistil_1      -----
GR_Pistil_2      -----
GR_Pistil_3      -----
GR_Pistil_4      -----
GR_Pistil_5      -----
GR_Pistil_6      -----
GR_Pistil_7      -----
GR_Pistil_8      -----
GR_Pistil_9      -----
GR_Pistil_10     -----
GR_Pollen_1      -----
V_vinifera_GR2_LOC100232842
S_indicum_GR2_LOC105163374
N_sylvestris_GR2_LOC104211049  GAAACCTTGA  TCATTGGTGA  CCTTACAGAT  G--
N_tomentosiformis_GR_LOC104098
T_hassleriana_GR_LOC104824173
C_sativus_GR_LOC101217298
C_sinensis_GR_LOC102614323
E_grandis_GR_LOC104426615
E_grandis_GR_LOC104414377
T_cacao_GR2_TCM_046980
T_cacao_GR1_TCM_046980
P_mume_GR_LOC103334247
Mus_musculus_GR

```



101

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 -----TA ----AAATA  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 CATAAAAGAA TCAATTTAA CTTCTACATT TCCTAAGTTA ----ATGGGT  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 TAAAAAATT A-----ATGGGT  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 CCTAAGATTG TTGTCTTAA AGATCGCACC CTAGAGCTGC ----AGAGTT  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 CCTAAGATTG TTGTCTTAA AGATCGCACC CTAGAGCTGC ----AGAGTT  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 ACAGGCAGGT CCGATGTGAG AATAGAATCT GCAAAAGTCA ----AAACTC  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 -----GT  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 -----GT  
A.thaliana\_GPx\_chlo ACGGAACATT CTCTAGAGTC GTCAAAGTT CTAGACCTAA TTCCTGAGCA  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 -----  
A.thaliana\_GPx\_cito -----  
GPx\_Pistil\_1 -----  
GPx\_Pistil\_2 ATCCATTTCC TTGCTTTTT AAATTAC -----  
GPx\_Pistil\_3 TCTAAGACTA ACCGATTTTT AATTAC -----T  
GPx\_Pistil\_4 AATTATAAGA CAAGCCCAT TTAATTCAGT GCCTATTTTA TCAATTTCTT  
GPx\_Pistil\_5 CCCCAAATTT GATGTGATTA AGCGAAGAAA TTTTCTCGCG TCCTCCGTTT  
GPx\_Pistil\_6 AGCAAAGCTT TGAATTTATA TACCG -----AAGTTG  
GPx\_Pistil\_7 GCCAAACTGC AGTCTAGTAG AGGTCTTTAT TTTATGCCTA TTCTAAAAGC  
GPx\_Pollen\_1 AAATTTGATG TGATTAAGCG AAGAAATTTT CTCGCGTCCG ----CGTTTT  
GPx\_Pollen\_2 -----G GAAAAGACTA  
GPx\_Pistil\_8 -----  
GPx\_Pistil\_9 -----  
GPx\_Pollen\_3 -----  
GPx\_Pollen\_4 -----  
GPx\_Pollen\_5 -----  
GPx\_Pollen\_6 -----  
GPx\_Pistil\_10 -----  
GPx\_Pistil\_11 ATCCATTTCC TTGCTTTTT AAATTAC -----  
GPx\_Pollen\_7 -----  
GPx\_Pollen\_8 -----GCCTCTC TTCCCGCGAT ----CGCTGT  
Mus\_musculus\_GPx8 -----

151

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 ATGATCCACT TTAGTCAGCG TATCGCATTI TT-----  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 CAATGCCTGG TTGGATATTT TGTGTTTTGG GG-----  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 CAATGCCTGG TTGGATATTT TTGATTTGAG AC-----  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 GAAATCCAAA TTGAATTCGG AGAAAACACA GC-----  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 GAAATCCAAA TTGAATTCGG ACAAAACACA GC-----  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 AAAAGAGGTG TTGATGATTC CATCTGATTT AC-----  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 -----CAGATATTT TCTAATTTCA CT-----  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 GGATGTCTGG TTGGATATTT TGTAGTTTGG GT-----  
A.thaliana\_GPx\_chlo ACCTTTCTCG TCCCTTCCTT GAAATCTCC AC-----  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 -----TCATGCTT TTTAGGTTTT TC-----  
A.thaliana\_GPx\_cito -----  
GPx\_Pistil\_1 -----  
GPx\_Pistil\_2 -----TGAAA CAAGATATTT AAATTATTGG GC-----  
GPx\_Pistil\_3 GCATATTTCT TCGATTTCTT TAATTTCTCG GCGGATGAAA AAGCTTTTTG  
GPx\_Pistil\_4 TGATTTCTCG GTCGATTGAA AAAGGTTTT TG-----  
GPx\_Pistil\_5 ACACTTCAAT CCAGAAAATT CAGACCTTTA CC-----  
GPx\_Pistil\_6 AATATAAAT TCTCGAGTTT TATAATCTTG GA-----  
GPx\_Pistil\_7 TTCATCCAAA TTTGGTCCCT GCAAACTGCG AT-----  
GPx\_Pollen\_1 ACACTTCAAT CCAGAAAATT CAGACCTTTA CC-----  
GPx\_Pollen\_2 GTATTTGAAA AATGATTTCA AGGACTCCAA GA-----  
GPx\_Pistil\_8 -----  
GPx\_Pistil\_9 -----  
GPx\_Pollen\_3 -----  
GPx\_Pollen\_4 -----  
GPx\_Pollen\_5 -----  
GPx\_Pollen\_6 -----  
GPx\_Pistil\_10 -----GGTCTTT AGTATTTTGG AC-----  
GPx\_Pistil\_11 -----TGAAA CAAGATATTT AAATTATTGG GC-----  
GPx\_Pollen\_7 -----  
GPx\_Pollen\_8 GTTTCCTGGC TACTGCTGCT TCACTTCCTT AC-----  
Mus\_musculus\_GPx8 -AGGATCCTC CAAAATGGAG CCTTTCGCTG CC-----

201

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306  
A.thaliana\_GPx\_chlo  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277  
A.thaliana\_GPx\_cito  
GPx\_Pistil\_1  
GPx\_Pistil\_2  
GPx\_Pistil\_3  
GPx\_Pistil\_4  
GPx\_Pistil\_5  
GPx\_Pistil\_6  
GPx\_Pistil\_7  
GPx\_Pollen\_1  
GPx\_Pollen\_2  
GPx\_Pistil\_8  
GPx\_Pistil\_9  
GPx\_Pollen\_3  
GPx\_Pollen\_4  
GPx\_Pollen\_5  
GPx\_Pollen\_6  
GPx\_Pistil\_10  
GPx\_Pistil\_11  
GPx\_Pollen\_7  
GPx\_Pollen\_8  
Mus\_musculus\_GPx8

251

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306  
A.thaliana\_GPx\_chlo  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277  
A.thaliana\_GPx\_cito  
GPx\_Pistil\_1  
GPx\_Pistil\_2  
GPx\_Pistil\_3  
GPx\_Pistil\_4  
GPx\_Pistil\_5  
GPx\_Pistil\_6  
GPx\_Pistil\_7  
GPx\_Pollen\_1  
GPx\_Pollen\_2  
GPx\_Pistil\_8  
GPx\_Pistil\_9  
GPx\_Pollen\_3  
GPx\_Pollen\_4  
GPx\_Pollen\_5  
GPx\_Pollen\_6  
GPx\_Pistil\_10  
GPx\_Pistil\_11  
GPx\_Pollen\_7  
GPx\_Pollen\_8  
Mus\_musculus\_GPx8

301

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 TCAAATGC --- AGTCGCC GCAA ---  
 N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 ATCAGAGA --- AGAAACC AGAA ---  
 N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 ATCAGAGA --- AGAAACC AGAA ---  
 V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 AATACAGC --- AGGGCCC AGAA ---  
 V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 AATACAGC --- AGGGCCC AGAA ---  
 P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 AACCTCAA --- AGCACCC AGAA ---  
 S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 ACCGGAGA --- AGAAGCC AGAA ---  
 S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 ACCGGAGA --- AGAAGCC AGAA ---  
 A.thaliana\_GPx\_chlo AGAGTTCG --- TCGAGAA AAAA ---  
 B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 --- CGA --- AAGAAC AGTA ---  
 A.thaliana\_GPx\_cito ---  
 GPx\_Pistil\_1 ---  
 GPx\_Pistil\_2 ATCTGCCA --- AGCC ACAA ---  
 GPx\_Pistil\_3 TTCAGCTA --- AACC ACAA ---  
 GPx\_Pistil\_4 TTCA --- A --- ATAACCC ACAA ---  
 GPx\_Pistil\_5 TCCATCTG --- TCCATCA AAAA ---  
 GPx\_Pistil\_6 AGAAG --- AAGCCCC AAAA ---  
 GPx\_Pistil\_7 GCCACTGA --- GAAG ---  
 GPx\_Pollen\_1 TCCATCTG --- TCCATCA AAAA ---  
 GPx\_Pollen\_2 CTTGACCATC CTTGTGCACT AGAA ---  
 GPx\_Pistil\_8 ---  
 GPx\_Pistil\_9 ---  
 GPx\_Pollen\_3 ---  
 GPx\_Pollen\_4 TTCA --- A --- ATAACCC ACAA ---  
 GPx\_Pollen\_5 ---  
 GPx\_Pollen\_6 ---  
 GPx\_Pistil\_10 ---  
 GPx\_Pistil\_11 CTTAACGA --- AACAC AGAA ---  
 GPx\_Pollen\_7 ATCTGCCA --- AGCC ACAA ---  
 GPx\_Pollen\_8 TTCA --- A --- ATAACCC ACAA ---  
 GPx\_Pollen\_8 AGCAACAA --- CACACC ACAACTTCA CCGACCATGT CTTCTGCTAC  
 Mus\_musculus\_GPx8 TGAAGCCG --- AGAACCA ACAG ---

351

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 -TCTGTATTG GATTT --- CA CCGTCA ---  
 N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 -TCTGTTTTT GACTT --- CA CTGTAA ---  
 N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 -TCTGTTTTT GACTT --- CA CTGTAA ---  
 V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 -TCAATCTAT GACTT --- CA CCGTTA ---  
 V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 -TCAATCTAT GACTT --- CA CCGTTAAGGT TCATGTTTCA TGCTGTCTAT  
 P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 -TCAGTCTAT GACTT --- CA CTATCA ---  
 S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 -TCTGTCTAT GACTT --- TA CTCTAA ---  
 S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 -TCTGTCTAT GACTT --- TA CTCTAA ---  
 A.thaliana\_GPx\_chlo -CCGTTCCG GATTT --- CA CCGTTA ---  
 B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 -TCTGTTTAC GAGAT --- AA GCATTG ---  
 A.thaliana\_GPx\_cito ---  
 GPx\_Pistil\_1 ---  
 GPx\_Pistil\_2 TCGGTTCCAT GAATT --- CA CCGTCA ---  
 GPx\_Pistil\_3 TCAGTTCAT GATTT --- CG CTGTTA ---  
 GPx\_Pistil\_4 TCAGTTCAT GATTT --- CA CTGTTA ---  
 GPx\_Pistil\_5 TCAATCCAC GATTT --- CA CTGTTA ---  
 GPx\_Pistil\_6 TCCATTTAC GATTT --- CA CTGTCA ---  
 GPx\_Pistil\_7 TCTATTCCAT GAATT --- CA CCGTAA ---  
 GPx\_Pollen\_1 TCAATCCAC GATTT --- CA CTGTTA ---  
 GPx\_Pollen\_2 ACTTTGTGA AGTTG --- CA C ---  
 GPx\_Pistil\_8 ---  
 GPx\_Pistil\_9 --- GTCA ---  
 GPx\_Pollen\_3 ---  
 GPx\_Pollen\_4 TCAGTTCAT GATTT --- CA CTGTTA ---  
 GPx\_Pollen\_5 TCGGTTCCAC GACCT --- AA CAGTCA ---  
 GPx\_Pollen\_6 --- GTTT --- CA G ---  
 GPx\_Pistil\_10 --- TGGAA GTTTTGAACA CAATAA ---  
 GPx\_Pistil\_11 TCGGTTCCAT GAATT --- CT CTGTTA ---  
 GPx\_Pollen\_7 TCAGTTCAT GATTT --- CA CTGTTA ---  
 GPx\_Pollen\_8 CTTCTTCCAC GAGTT --- CA AGCCCC ---  
 Mus\_musculus\_GPx8 --- CTTCTAC TCCTT --- TG AAGTAA ---

401

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 -----  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 -----  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 -----  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 -----  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 **GTAACATTG** **AAGAGTATT** **TAGCTGAATA** **TTTCTCTTTG** **GAATCAGATG**  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 -----  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 -----  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 -----  
A.thaliana\_GPx\_chlo -----  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 -----  
A.thaliana\_GPx\_cito -----  
GPx\_Pistil\_1 -----  
GPx\_Pistil\_2 -----  
GPx\_Pistil\_3 -----  
GPx\_Pistil\_4 -----  
GPx\_Pistil\_5 -----  
GPx\_Pistil\_6 -----  
GPx\_Pistil\_7 -----  
GPx\_Pollen\_1 -----  
GPx\_Pollen\_2 -----  
GPx\_Pistil\_8 -----  
GPx\_Pistil\_9 -----  
GPx\_Pollen\_3 -----  
GPx\_Pollen\_4 -----  
GPx\_Pollen\_5 -----  
GPx\_Pollen\_6 -----  
GPx\_Pistil\_10 -----  
GPx\_Pistil\_11 -----  
GPx\_Pollen\_7 -----  
GPx\_Pollen\_8 -----  
Mus\_musculus\_GPx8 -----

451

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 -----  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 -----  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 -----  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 -----  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 **TATCGATCTA** **TTTCTATTG** **TGTTTTCTTT** **TGCTTCAGG** **ATGCTG**  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 -----  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 -----  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 -----  
A.thaliana\_GPx\_chlo -----  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 -----  
A.thaliana\_GPx\_cito -----  
GPx\_Pistil\_1 -----  
GPx\_Pistil\_2 -----  
GPx\_Pistil\_3 -----  
GPx\_Pistil\_4 -----  
GPx\_Pistil\_5 -----  
GPx\_Pistil\_6 -----  
GPx\_Pistil\_7 -----  
GPx\_Pollen\_1 -----  
GPx\_Pollen\_2 -----  
GPx\_Pistil\_8 -----  
GPx\_Pistil\_9 -----  
GPx\_Pollen\_3 -----  
GPx\_Pollen\_4 -----  
GPx\_Pollen\_5 -----  
GPx\_Pollen\_6 -----  
GPx\_Pistil\_10 -----  
GPx\_Pistil\_11 -----  
GPx\_Pollen\_7 -----  
GPx\_Pollen\_8 -----  
Mus\_musculus\_GPx8 -----

501

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 -AAGGAAATG ATGTGGGGCT -----AA GTATTTA-CA GAGGAAAAGT  
 N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 -AGGGAAATG ATATAGATCT -----TA GTAGGTA-CA AAGGAAAGGT  
 N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 -AGGGAAATG ATATATATCT -----TA GTAGGTA-CA AAGGAAAGGT  
 V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 -AGGGAAAGA GTGTGAATCT -----GA GCATTTA-CA AGGGGAAAAGT  
 V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 -AGGGAAAGA GTGTGAATCT -----GA GCATTTA-CA AGGGGAAAAGT  
 P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 -ACGAAAATG ATGTGGATCT -----TA GCATTTT-CA AGGGAAAAGT  
 S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 -AGGGAAATG ATGTTGATCT -----TA GTAAGTA-CA AGGGAAAGGT  
 S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 -AGGGAAATG ATGTTGATCT -----TA GTATGTA-CA AAGGAAAGGT  
 A.thaliana\_GPx\_chlo -ATGGGAAGG ATGTTGCTTT -----GA ACAAATT-CA AGGGGAAAAGT  
 B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 -ATGGAAAAG GCTTAGAACT -----CA GTCGAATA-CA AAGAATAAAGT  
 A.thaliana\_GPx\_cito -----  
 GPx\_Pistil\_1 -----  
 GPx\_Pistil\_2 -AGGGAAATG ATGTTAACTT -----GG GCATGTA-CA AGGGAAAGGT  
 GPx\_Pistil\_3 -AAGGGAATG ACGTTGATTT -----AA GCATTTA-CA AGGGAAAGGT  
 GPx\_Pistil\_4 -AAGGGAATG ACGTTGATTT -----GA GCATTTA-CA AAGGAAAGGT  
 GPx\_Pistil\_5 -AGGGTAAAG ATGCGGACTT -----GA CTGTATA-CA AAGGGAAAAGT  
 GPx\_Pistil\_6 -TTGGAGAGC ATGTGGGGCT -----GA GCTGTTA-GG AGGGGAAAGGT  
 GPx\_Pistil\_7 -ATGGTAAAG ACATGTCCTT -----GA GCAAATT-CA AGGGAAAGGT  
 GPx\_Pollen\_1 -AGGGTAAAG ATGCGGACTT -----GA GTATATA-CA AAGGGAAAAGC  
 GPx\_Pollen\_2 GCGAGAAAACG ACCTTTACTT GCGCTGAGGA ACTTGTA-GA GTGGAGCGGC  
 GPx\_Pistil\_8 -----  
 GPx\_Pistil\_9 -AAGGGGACA ATGTTGATCT -----CA GCATTTA-CA AGGGAAAGGT  
 GPx\_Pollen\_3 -----  
 GPx\_Pollen\_4 -AAGGGAATG ACGTTGATTT -----GA GCATTTA-CA AAGGAAAGGT  
 GPx\_Pollen\_5 -GGGTAAATG ACGTGGATCT -----CA GCGTATA-CA GAGGAAAGGT  
 GPx\_Pollen\_6 -AAGGGTATA GTATGTTCTT ----- -TCTTAA-CA GAATCAAGCA  
 GPx\_Pistil\_10 -ATGGAAAAA ATGATGATTT -----TA ATACTTATTG ATGTAGAAAAT  
 GPx\_Pistil\_11 -AGGGAAATG ATGTTAACTT -----GG GCATGTA-CA AAGGGAAAAGT  
 GPx\_Pollen\_7 -AAGGGAATG ACGTTGATTT -----GA GCATTTA-CA AAGGAAAGGT  
 GPx\_Pollen\_8 -AGGGCAACG TCTAGGACCT -----GT CCAAGCT-CA AGGGCAAGGT  
 Mus\_musculus\_GPx8 -AAGGAAGGA CCGTGTCTCT -----GG AAAAGTT-CA AAGGCAAAAGC

551

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 ATTGTAA-- ----- ---TCGTCA ATGTTGC--C TCGAAATCTG  
 N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 CCTACTTA-- ----- ---TCGTGA ATGTTGC--T TCCAAAGTGG  
 N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 CCTACTTA-- ----- ---TCGTGA ATGTTGC--T TCCAAAGTGG  
 V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 CCTACTGA-- ----- ---TTGTCA ATGTTGC--C TCCAAATCTG  
 V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 CCTACTGA-- ----- ---TTGTCA ATGTTGC--G TCCAAATCTG  
 P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 GTTGTGA-- ----- ---TTGTTA ATGTTGC--T TCCAAATCTG  
 S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 CCTACTGA-- ----- ---TCGTGA ATGTTGC--G TCCAAATCTG  
 S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 CCTACTTA-- ----- ---TCGTGA ATGTTGC--G TCCAAATCTG  
 A.thaliana\_GPx\_chlo TATGTTGA-- ----- ---TTGTCA ATGTTGC--T TCAAGATGTG  
 B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 TCTTGTAA-- ----- ---TTGTCA ATGTTGC--T TCCAAATCTG  
 A.thaliana\_GPx\_cito -----  
 GPx\_Pistil\_1 CCTACTGA-- ----- ---TTGTCA ATGTTGC--T TCTAAATGTG  
 GPx\_Pistil\_2 CTTGCTGA-- ----- ---TAGTGA ATGTTGC--A TCCAGTGTG  
 GPx\_Pistil\_3 CCTGTGA-- ----- ---TTGTCA ATGTTGC--A TCCAGTGTG  
 GPx\_Pistil\_4 CCTATTAA-- ----- ---TCGTCA ATGTTGC--A TCCAGTGTG  
 GPx\_Pistil\_5 TCTGCTG-- ----- ---TCGTCA ATGTTGC--T TCCAAATCTG  
 GPx\_Pistil\_6 TCTTGTCA-- ----- ---TAGTGA ACGTTGC--T TCTAAATGTG  
 GPx\_Pistil\_7 TCTGCTAA-- ----- ---TTGTGA ATGTTGC--T TCCAAATCTG  
 GPx\_Pollen\_1 TCTGCTG-- ----- ---TCGTCA ATGTTGC--T TCCAAATCTG  
 GPx\_Pollen\_2 ATCTTTAC-- ----- ---GATTCA CTTTTACCTT TTGAAAGATG  
 GPx\_Pistil\_8 -----  
 GPx\_Pistil\_9 TCTGCTGA-- ----- ---TTGTCA ATGTTGC--A TCAATCTGTG  
 GPx\_Pollen\_3 -----  
 GPx\_Pollen\_4 CCTATTAA-- ----- ---TCGTCA ATGTTGC--A TCCAGTGTG  
 GPx\_Pollen\_5 TTTACTCA-- ----- ---TTGTCA ATGTTGC--C TCTCAATCTG  
 GPx\_Pollen\_6 ATTCTGACA AACTTCTTCA GTGTTTCTCA ATGTTGA--A TGGAGAGTA  
 GPx\_Pistil\_10 CCTCATCA-- ----- ---GG ATGTTTATTA CTATTA--A CCGAAAGGCA  
 GPx\_Pistil\_11 CTTGCTGA-- ----- ---TAGTGA ATGTTGC--A TCCAGTGTG  
 GPx\_Pollen\_7 CCTATTAA-- ----- ---TCGTCA ATGTTGC--A TCCAGTGTG  
 GPx\_Pollen\_8 CGTCTCG-- ----- ---TCGTCA ACAAGCG--C AGCAAGTGG  
 Mus\_musculus\_GPx8 TTCCCTGG-- ----- ---TTGTAA ACGTGGC--T AGTCACTGGC

601

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 GAATGA --- -- CCAATT --- --- CAAA TA --- ---  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 GGATGA --- -- CTAAC --- --- CAAA TA --- ---  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 GGATGA --- -- CTAACC --- --- CAAA TA --- ---  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 GATTAA --- -- CCAACT --- --- CAAA TA --- ---  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 GATTAA --- -- CCAACT --- --- CAAA TA --- ---  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 GGATGA --- -- CCAATT --- --- CAAA TA --- ---  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 GTTTGA --- -- CTGATT --- --- CAAA TA --- ---  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 GTTTGA --- -- CTGATT --- --- CAAA TA --- ---  
A.thaliana\_GPx\_chlo GTTTGA --- -- CATCAT --- --- CAAA TA --- ---  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 GGATGA --- -- CAAACT --- --- CAAA TA --- ---  
A.thaliana\_GPx\_cito GGATGA --- -- CAAACT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pistil\_1 GGATGA --- -- CCAACT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pistil\_2 GTCTGG --- -- CCAATT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pistil\_3 GCCTTA --- -- CCAATT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pistil\_4 GTCTCA --- -- CCAATT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pistil\_5 GATACA --- -- CGAATT --- --- TGA TA --- ---  
GPx\_Pistil\_6 GTTTAA --- -- CAGAGT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pistil\_7 GTTTAA --- -- CATCAT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pollen\_1 GATACA --- -- CGAATT --- --- TGA TA --- ---  
GPx\_Pollen\_2 GGATAT --- -- TGAGCCT TAAATCTGT ACAAG CAAAC TGTTCTGCAT  
GPx\_Pistil\_8 --- --- --- --- TAGA TA --- ---  
GPx\_Pistil\_9 GTC TCG --- -- CCAATT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pollen\_3 --- --- --- --- --- --- --- ---  
GPx\_Pollen\_4 GTCTCA --- -- CCAATT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pollen\_5 GGT TGA --- -- CTAAC --- --- CTAAC TA --- ---  
GPx\_Pollen\_6 GTTGGC --- -- GCATAT --- --- CTTT AA --- ---  
GPx\_Pistil\_10 CAATAAGATG ACTCTAATT TCAAGCCTTT TCAAG CAGCT TCTTTATATC  
GPx\_Pistil\_11 GTCTGG --- -- CCAATT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pollen\_7 GTCTCA --- -- CCAATT --- --- CAAA TA --- ---  
GPx\_Pollen\_8 GTTTCA --- -- CC --- C --- --- CTTCA TT --- ---  
Mus\_musculus\_GPx8 GCTTGA --- -- CAGACA --- --- AGAGT TA --- ---

651

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 --- -- CACTGAG TTAAA-TCAG CTGTATGAAA --- -- AATACA GAG --- ---  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 --- -- CCGAGAA CTCAA-CCAA TTATATGAGA --- -- AGTACA AAG --- ---  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 --- -- CCGAGAA CTCAA-CCAA TTATATGAGA --- -- AGTACA AAG --- ---  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 --- -- CACAGAG CTGAA-TCAG TTATAGGAGA --- -- AGTACA AAG --- ---  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 --- -- CACAGAG CTGAA-TCAG TTATAGGAGA --- -- AGTACA AAG --- ---  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 --- -- CGCTGAA TTGAA-TCAA TTATATGAGA --- -- AGTACA AAG --- ---  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 --- -- CAAAGAT CTCAA-CCAC TTACATGAGA --- -- AGTACA AAG --- ---  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 --- -- CAAAGAT CTCAA-CCAT TTACATGAGA --- -- AGTACA AAG --- ---  
A.thaliana\_GPx\_chlo --- -- CTCAGAG CTTTC-ACAT CTGTAGGAGA --- -- AATACA AAA --- ---  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 --- -- CACCGAA TTGAA-TGAG CTTTACAAACA --- -- AGTACA AAG --- ---  
A.thaliana\_GPx\_cito --- -- CACTGAA TTGAA-TGAG CTTTACAAACA --- -- GGTATA AAG --- ---  
GPx\_Pistil\_1 --- -- CACCGAG CTAAA-TCAA CTATATGAAA --- -- AGT-CA AAG --- ---  
GPx\_Pistil\_2 --- -- CACAGAG TTGAC-AGAT TTATATGAGA --- -- AGTACA AGG --- ---  
GPx\_Pistil\_3 --- -- CACCGAT CTAAC-AAAG CTTTATGAGA --- -- AGTACA AGG --- ---  
GPx\_Pistil\_4 --- -- CACGGAA TTGAC-AAAG GTGTATGAGA --- -- AGTACA AGG --- ---  
GPx\_Pistil\_5 --- -- CACCCAG TTGAC-AGAA CTTTACAGCA --- -- AGTATA AGG --- ---  
GPx\_Pistil\_6 --- -- CAAAGAA TTGAA-CATT TTGTAGGAGA --- -- AGTACA GGG --- ---  
GPx\_Pistil\_7 --- -- CTCAGAG CTTTC-TCAT GTTTATGAGA --- -- AGTACA AAA --- ---  
GPx\_Pollen\_1 --- -- CACCCAG TTGAC-AGAA CTTTACAGCA --- -- AGTATA AGG --- ---  
GPx\_Pollen\_2 CCTCACTCGA CCCAGGTTCT TGATACAAGA ATTGATTGCA AGG --- -- GA  
GPx\_Pistil\_8 --- --- --- --- CA --- -- AGCACA AGG --- ---  
GPx\_Pistil\_9 --- -- CACCGAG TTGTC-CGAA ATATATGAGA --- -- AGCACA AGG --- ---  
GPx\_Pollen\_3 --- --- --- --- --- --- --- ---  
GPx\_Pollen\_4 --- -- CACGGAA TTGAC-AAAG CTGTATGAGA --- -- AGTACA AGG --- ---  
GPx\_Pollen\_5 --- -- TACTGAG TTGAA-TGAA GTGTATGCAA --- -- AGTATA AGG --- ---  
GPx\_Pollen\_6 --- -- CAAATT TCCATACTTT GTCCAGCAGA --- -- AACTTA GTG --- ---  
GPx\_Pistil\_10 CTTCTCGATG CTAAGGGGAG ATGTGGTGGG --- -- AGCATA ACG --- ---  
GPx\_Pistil\_11 --- -- CACAGAG TTGAC-AGAT TTATATGAGA --- -- AGTACA AGG --- ---  
GPx\_Pollen\_7 --- -- CACGGAA TTGAC-AAAG CTGTATGAGA --- -- AGTACA AGG --- ---  
GPx\_Pollen\_8 --- -- CGAAGGC CTCGA-GAAG CTCTACAAGG --- -- AACTCA AGG CCGCCCA  
Mus\_musculus\_GPx8 --- -- CAGACT CTCAG-GGAG CTACAACAAG --- -- AGTTCC GGC --- ---



701

S.indicum_GPx8_LOC105157765	--ATCA	----	----	----	--AGGCCTTG	AGA	----	T
N.sylvestris_GPx8_LOC104242771	--ATCA	----	----	----	--AGGCCTGG	AAA	----	T
N.tomentosiformis_GPx8_LOC1040	--ATCA	----	----	----	--AGGCCTGG	AAA	----	T
V.vinifera_GPx8X1_LOC100254672	--ATCA	----	----	----	--AGGCCTAG	AGA	----	T
V.vinifera_GPx8X2_LOC100254672	--ATCA	----	----	----	--AGGCCTAG	AGA	----	T
P.euphratica_GPx8_LOC105129046	--ATGA	----	----	----	--AGGACTGG	AGA	----	T
S.lycopersicum_GPx8_LOC1012670	--ATCA	----	----	----	--AGGCCTGG	AAA	----	T
S.tuberosum_GPx8_LOC102600306	--ATCA	----	----	----	--AGGTCTGG	AAA	----	T
A.thaliana_GPx_chlo	--CTCA	----	----	----	--AGGATTTC	AGA	----	T
B.rapa_GPx8_LOC103838277	--ACAA	----	----	----	--AGGTCTGG	AGA	----	T
A.thaliana_GPx_cito	--ATAA	----	----	----	--AGGTCTGG	AGA	----	T
GPx_Pistil_1	--ATCA	----	----	----	--AGGCCTGG	AGA	----	T
GPx_Pistil_2	--ATCA	----	----	----	--AGGTTTAG	AGA	----	T
GPx_Pistil_3	--ATCA	----	----	----	--AGGTTTTC	AGA	----	T
GPx_Pistil_4	--ATCA	----	----	----	--AGGTTTGG	AGA	----	T
GPx_Pistil_5	--ATAA	----	----	----	--TGTTTTCG	AGA	----	T
GPx_Pistil_6	--ACCA	----	----	----	--AGGTTTTC	AAA	----	T
GPx_Pistil_7	--CTCA	----	----	----	--AGGATTTC	AGA	----	T
GPx_Pollen_1	--ATAA	----	----	----	--TGTTTTCG	AGA	----	T
GPx_Pollen_2	ATGCCA	----	----	----	--AGATCTCG	AAA	----	T
GPx_Pistil_8	--ATCA	----	----	----	--AGGTTTGG	AGA	----	T
GPx_Pistil_9	--ATCA	----	----	----	--AGGTTTGG	AGA	----	T
GPx_Pollen_3	----	----	----	----	----	----	----	T
GPx_Pollen_4	--ATCA	----	----	----	--AGGTTTGG	AGA	----	T
GPx_Pollen_5	--ATCA	----	----	----	--AGGATTAG	AAA	----	T
GPx_Pollen_6	----	----	----	----	--AAGTTTCC	ACT	----	T
GPx_Pistil_10	--ATCAACAA	CACACCCCTC	TTTGTGACA	AGAAATTTGG	AGAAGTTCCA	----	----	T
GPx_Pistil_11	--ATCA	----	----	----	--AGGTTTAG	AGA	----	T
GPx_Pollen_7	--ATCA	----	----	----	--AGGTTTGG	AGA	----	T
GPx_Pollen_8	SCCCAA	----	----	----	--CGAGCTTG	AAT	----	T
Mus_musculus_GPx8	--CGTA	----	----	----	--TCAGTTCA	ACG	----	T

751

S.indicum_GPx8_LOC105157765	TTTGGCTTTT	TCCATGCAAT	CAGT	----	TG	--GTGAA	GAAGAACCTG	----
N.sylvestris_GPx8_LOC104242771	ATTGGCATT	TCCTTGCAAT	CAAT	----	TG	--GCGAG	GAAGAACCCAG	----
N.tomentosiformis_GPx8_LOC1040	ATTGGCATT	TCCTTGCAAT	CAAT	----	TG	--GCGAG	GAAGAACCCAG	----
V.vinifera_GPx8X1_LOC100254672	ATTGGCATT	TCCATGCAAT	CAAT	----	TG	--GAGAG	GAGGAACCCG	----
V.vinifera_GPx8X2_LOC100254672	ATTGGCATT	TCCATGCAAT	CAAT	----	TG	--GAGAG	GAGGAACCCG	----
P.euphratica_GPx8_LOC105129046	ACTGGCATT	TCCATGCAAT	CAGT	----	TG	--GTGAG	GAGGAACCCAG	----
S.lycopersicum_GPx8_LOC1012670	TTTGGCATT	TCCTTGCAAT	CAAT	----	TG	--GTGCA	CAAGAACCCAG	----
S.tuberosum_GPx8_LOC102600306	ATTGGCATT	TCCTTGCAAT	CAAT	----	TG	--GTGCG	CAAGAACCCAG	----
A.thaliana_GPx_chlo	TCTAGCTTTT	TCCCTGCAAT	CAGT	----	TG	--GTTTT	CAAGAGCCCG	----
B.rapa_GPx8_LOC103838277	TCTAGCATT	TCCCTGTAA	CAGT	----	TG	--GTGAA	GAGGAACCTG	----
A.thaliana_GPx_cito	TCTAGCATT	TCCTTGTAAC	CAGT	----	TG	--TGAC	GAGGAACCCG	----
GPx_Pistil_1	CCTGGCATT	TCCGTGCAAT	CAGT	----	TG	--GTGAA	GAAGAACCCAG	----
GPx_Pistil_2	ACTGGCATT	TCCATGCAAC	CAGT	----	TG	--GCTCT	CAAGAGCCCTG	----
GPx_Pistil_3	TCTGGCATT	TCCATGCAAT	CAGT	----	TG	--GCTCA	CAAGAACCTG	----
GPx_Pistil_4	TCTGGCATT	TCCATGCAAT	CAGT	----	TG	--GCTCA	CAAGAACCTG	----
GPx_Pistil_5	CTTGGCATT	CCCTTGCAAT	CAAT	----	TG	--TAT	CAAGAACCTG	----
GPx_Pistil_6	TCTAGCATT	TCCTTGCAAT	CAGT	----	TG	--CTTGG	CAAGAACCTG	----
GPx_Pistil_7	TCTAGCTTTT	TCCCTGTAA	CAGT	----	TG	--GTGGC	CAAGAGCCAG	----
GPx_Pollen_1	CTTGGCATT	CCCTTGCAAT	CAAT	----	CT	--TGAT	CAAGAACCTG	----
GPx_Pollen_2	----	CCATT	TCCTTATACT	TGCT	----	----	TAAAGTCTG	----
GPx_Pistil_8	ATTGGCATT	TCCTTGTAAT	CAGT	----	TG	--GCTCT	CAAGAACCTG	----
GPx_Pistil_9	ATTGGCATT	TCCTTGTAAT	CAGT	----	TG	--GCTCT	CAAGAACCTG	----
GPx_Pollen_3	----	----	----	----	----	----	----	----
GPx_Pollen_4	TCTGGCATT	TCCATGCAAT	CAGT	----	TG	--GCTCA	CAAGAACCTG	----
GPx_Pollen_5	ACTGGCTTTT	TCCATGCAAT	CAGT	----	TG	--GTGGA	GAGGAACCCAG	----
GPx_Pollen_6	TATGTCTTC	TCCAAAAATC	CCACCTTTAC	----	TG	--GACTT	CAAGAACCTG	----
GPx_Pistil_10	TTTGACACT	GTCACCCAA	AAACCCCTT	TGCT	----	----	CAGGAACCTG	----
GPx_Pistil_11	ACTGGCATT	TCCATGCAAC	CAGT	----	TG	--GCTCT	CAAGAACCTG	----
GPx_Pollen_7	TCTGGCATT	TCCATGCAAT	CAGT	----	TG	--GCTCA	CAAGAACCTG	----
GPx_Pollen_8	CCTGGCTTT	CCCTTGCAAC	CAGT	----	CG	--GCTCC	CAAGATCCCG	----
Mus_musculus_GPx8	CCTGCCTTT	TCCTTGCAAT	CAGT	----	TG	--GAGAA	TCCGAGCCCA	----

801

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 -GAAGCAATG ACCAAATTC T AGACTTTGTC TGCACTCGAT TCAAGTCAGA  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 -GGAGCAATG ATCAGATCTT AGACTTCGTT TGTACACGTT TCAAGTCAGA  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 -GGAGCAATG ATCAGATCTT AGACTTCGTT TGTACACGTT TCAAGTCAGA  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 -GAAGTAATG AACAGATCTT AGACTTTGTG TGCACTCGCT TCAAATCAGA  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 -GAAGTAATG AACAGATCTT AGACTTTGTG TGCACTCGCT TCAAATCAGA  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 -GAACTAATG ATCAGATCAC AGACTTTGTC TGCACTCGCT TCAAATCAGA  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 -GGAGCAACG ATGAGATCGT AGAATTTGCT TGTACACGTT TCAAGTCAGA  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 -GGAGCAACG ATGAGATTCT AGAATTTGCT TGTACACGTT TCAAGTCAGA  
A.thaliana\_GPx\_chlo -GGTCAAACT CCGAGATCAA ACAATTCGCT TGCACCCGCT TTAAGGCAGA  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 -GAACTACTG ACCAAATTA C AGACTTTGTT TGTACTAAGT TCAAATCTGA  
A.thaliana\_GPx\_cito -GAACTAATG ACCAAATTA C TGACTTTGTT TGTACTCGCT TCAAATCTGA  
GPx\_Pistil\_1 -GAAGCAATG AACAGATTCT AGACTTTGTC TGCACCCGCT TTAAGTCCGA  
GPx\_Pistil\_2 -GCACCAATG AAGAAATTC A ACAGTTTGCT TGCACCCGCT TTAAGTCCGA  
GPx\_Pistil\_3 -GCACCAATG AAGAAATTC A ACAGTTTGCT TGCACCCGCT TTAAGTCCGA  
GPx\_Pistil\_4 -GCACCAATG AAGAAATTC A ACAGTTTGCT TGCACCCGCT TTAAGTCCGA  
GPx\_Pistil\_5 -GGTCCGATG AGGATCCAGA ACAGTTTGCT TGTACTAAGT TTAAGGCAGA  
GPx\_Pistil\_6 -GAACTAATG AGGAAATTC A GGAAATGCA TGCACCT ---  
GPx\_Pistil\_7 -GATCAAACT CAGATATTA A GCAGTTTGCT TGCACCAAGT TTAAGGCAGA  
GPx\_Pollen\_1 -GGTCCGATG AGGATCCAGA ACAGTTTGCT TGTACTAAGT TTAAGGCAGA  
GPx\_Pollen\_2 --- TCAAC TGGGTCTAGT TCAAATTCGT  
GPx\_Pistil\_8 -GCACCAATG AAGAGATTCA AGACTTTGTC TGCACCCGCT TTAAGGCAGA  
GPx\_Pistil\_9 -GCACCAATG AAGAGATTCA AGACTTTGTC TGCACCCGCT TTAAGGCAGA  
GPx\_Pollen\_3 ---  
GPx\_Pollen\_4 -GCACCAATG AAGAGATTCA ACAGTTTGCT TGCACCCGCT TTAAGGCAGA  
GPx\_Pollen\_5 -GTGATAATG CACAGATTG C AGAAGTGGCC TGCACTCGTT TTAAGGCAGA  
GPx\_Pollen\_6 TACACAGGAG CTGCACTGCT CCCATTAAC TCCACCTTGT CAAATATAGG  
GPx\_Pistil\_10 TACAGTGGAG CAGATTGGA ACCATTTACA TCCACCTTGT CAAATATAGG  
GPx\_Pistil\_11 -GCACCAATG AAGAAATTC A ACAGTTTGCT TGCACCCGCT TTAAGGCAGA  
GPx\_Pollen\_7 -GCACCAATG AAGAGATTCA ACAGTTTGCT TGCACCCGCT TTAAGGCAGA  
GPx\_Pollen\_8 -GCACCAACG ACAAGATCCA AGACTTCGCT CAGCTCAACT ACCGGCTCTC  
Mus\_musculus\_GPx8 -AGTCCAGCA AGGAGGTAGA ATCTTTTGG AGACAGAACT ACCGAGTCA

851

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 TTTTCCCAT TTTGG--TAA GATCGAAGTG AATGGCGATG GTGCTGATCC  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 GTTCCCTATA TTTGA--CAA GATTGAAGTG AATGGCGAAA ATGCATCTCC  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 GTTCCCTATA TTTGA--CAA GATTGAAGTG AATGGCGAAA ATGCATCTCC  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 ATTCCCGGTC TTTGA--CAA GATTGACGTA AATGGCGAAA ATGCTGCTCC  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 ATTCCCGGTC TTTGA--CAA GATTGACGTA AATGGCGAAA ATGCTGCTCC  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 ATTTCCCAT TTTGA--CAA GATTGATGTA AATGGTGAGA ATGCTTCTCC  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 GTTCCCCATC TTTGA--CAA GATTGAAGTG AACGGCGAAA ACACATCTCC  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 GTTCCCCATC TTTGA--CAA GATTGAAGTG AATGGCGAAA ACACATCTCC  
A.thaliana\_GPx\_chlo GTTCCCTATA TTTGA--TAA GGTTGACGTG AATGGACCAA GCACAGCGCC  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 GTTCCCCATT TTTCA--CAA GATTGAAGTG AATGGAGAGA ATGCTTCTCC  
A.thaliana\_GPx\_cito ATTCCCCATT TTTCA--CAA GATTGAAGTG AATGGAGAGA ATGCTTCTCC  
GPx\_Pistil\_1 ATTTCCCGTC TTTGG--TAA GATTGAAGTG AATGGGGATA ATGCTGCTCC  
GPx\_Pistil\_2 GTATCCCAT TTTGA--CAA GGTCCGATGTA AATGGTTCCA ATTCTGCTCC  
GPx\_Pistil\_3 GTATCCCAT TTTGA--CAA GGTCCGATGTA AATGGTTCCA ATGCTGCTCC  
GPx\_Pistil\_4 GTATCCCAT TTTGA--CAA GGTCCGATGTA AATGGTTCCA ATGCTGCTCC  
GPx\_Pistil\_5 ATATCCCAT TTTCA--AAA GGTAAAAGTG AATGGTAAAG ATGCCGCTCC  
GPx\_Pistil\_6 ---  
GPx\_Pistil\_7 GTTCCCGATC TTTGA--CAA GGTTGATGTC AATGGAAGCA GTACAGGACC  
GPx\_Pollen\_1 ATATCCCAT TTTCA--AAA GGTAAAAGTG AATGGTAAAG ATGCCGCTCC  
GPx\_Pollen\_2 GTATCCCGAT TTTGAAGCAA CATTGACGAC AA----GCA GAGCTTTCCC  
GPx\_Pistil\_8 ATATCCCTGTA TTTGA--CAA GGTTGATGTA AATGGTTCCA ATGCTTCTCC  
GPx\_Pistil\_9 ATATCCCTGTA TTTGA--CAA GGTTGATGTA AATGGTTCCA ATGCTTCTCC  
GPx\_Pollen\_3 ---  
GPx\_Pollen\_4 GTATCCCAT TTTGA--CAA GGTCCGATGTA AATGGTTCCA ATGCTGCTCC  
GPx\_Pollen\_5 TTTTCCCTATA TTTGA--CAA GGTGGAAGTT AATGGGAGCA GTCCAGCTCC  
GPx\_Pollen\_6 AAAATCTGCT TTTAA--AC GAGTCAAGGC CACTTTGCA ATCTGTGATC  
GPx\_Pistil\_10 ATATCCCGCC TTTAA--TCG GGTGCAAGCA AATTTGTTGAA TTTCTTCATT  
GPx\_Pistil\_11 GTATCCCAT TTTGA--CAA GGTCCGATGTA AATGGTTCCA ATGCTGCTCC  
GPx\_Pollen\_7 GTATCCCAT TTTGA--CAA GGTCCGATGTA AATGGTTCCA ATGCTGCTCC  
GPx\_Pollen\_8 GTTCCCGGTC CTTGG--CAA AACCGACGTC AACGGCGACA AGGCCGAGCC  
Mus\_musculus\_GPx8 ATTTCCCAT TTTCA--CAA GATTAAGATT TTAGGCCCGG AAGCAGAACC

901

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 ATTGTACAAG TTCTTG --- --AAGCTTGG CAACTGGG ---  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 TCTTTATAAG TTCTTG --- --AAATCGGG AAAGTGGG ---  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 TCTTTATAAG TTCTTG --- --AAATCGGG AAAGTGGG ---  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 ACTGTACAAG TTCTTA --- --AAGTCAGG AAAATGGG ---  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 ACTGTACAAG TTCTTA --- --AAGTCAGG AAAATGGG ---  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 ACTGTACAAG TTCTTG --- --AAGTTGGG AAAATGGG ---  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 TCTTTATAAG TTCTTG --- --AAATCAGC CAACTGGG ---  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 CTTTATAAG TTCTTG --- --AAATCAGC AAAGTGGG ---  
A.thaliana\_GPx\_chlo GATGTACGAG TTCTTG --- --AAATCAA GCGAGGAG ---  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 TCTTTATAAG TTTCTA --- --AAGAAAAG CAAATGGG ---  
A.thaliana\_GPx\_cito TCTGTATAAG TTCTTG --- --AAGAAAAG CAAATGGG ---  
GPx\_Pistil\_1 ACTTTACAAG TTCTTG --- --AAGCTGGG AAAGTGGG ---  
GPx\_Pistil\_2 AATATACAAG TTTCTG --- --AAGTCAAG CAAGGGTA ---  
GPx\_Pistil\_3 ACTGTACAAG TTCTTG --- --AAGTCGAG CAAAGGTG ---  
GPx\_Pistil\_4 ACTATACAAG TTCTTG --- --AAATCGAG CAAAGGGG ---  
GPx\_Pistil\_5 AGTGTACAAG TTCTTG --- --AAGGCAAG TAAAGGTG ---  
GPx\_Pistil\_6 ---  
GPx\_Pistil\_7 AGTTTATCAG TTCTTG --- --AAGTCAA TGCTGGAG ---  
GPx\_Pollen\_1 AGTGTACAAG TTCTTG --- --AAGGCAAG TAAAGGTG ---  
GPx\_Pollen\_2 TTTGTATATA CTC --- --AAGTCC ---  
GPx\_Pistil\_8 AATATATAAA TACCTG --- --AAGTCGAG CAAAGGTG ---  
GPx\_Pistil\_9 AATATATAAA TACCTG --- --AAGTCGAG CAAAGGTG ---  
GPx\_Pollen\_3 ---  
GPx\_Pollen\_4 ACTGTACAAG TTCTTG --- --AAGTCGAG CAAAGGTG ---  
GPx\_Pollen\_5 TGTGTACAAG TTCTTG --- --AAGTCCAG TAAAGGTG ---  
GPx\_Pollen\_6 TATCACCTGG TTCTTGCTCA CCAAATGAT TGCATGGAAA AGCCAGTATT  
GPx\_Pistil\_10 AGTGC-CAGG TTCTTGCTGAG CCAAATGAT TGCATGGAAA TGCCAGAATC  
GPx\_Pistil\_11 AATATACAAG TTTCTG --- --AAGTCAAG CAAGGGTA ---  
GPx\_Pollen\_7 ACTGTACAAG TTCTTG --- --AAGTCGAG CAAAGGTG ---  
GPx\_Pollen\_8 CGTCTTCGAG TGGATG --- --AAGAGCGA GCAGCCCC  
Mus\_musculus\_GPx8 TGGGTTTAGA TTTATT --- --GTT ---

951

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 --GAATCTTT GG--GGAG ACATC-----CAGTGG-AAC TTTCGAAAGT  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 --GAATATTT GG--GGATG ATATT-----CAGTGG-AAT TTTGTAAGT  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 --GAATATTT GG--GGATG ATATT-----CAGTGG-AAT TTTGTAAGT  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 --GAATCTTT GG--GGATG ATATC-----CAGTGG-AAC TTTGGCAAAT  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 --GAATCTTT GG--GGATG ATATC-----CAGTGG-AAC TTTGGCAAAT  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 --GAATTTTT GG--TGATG ATATT-----CAGTGG-AAC TTTGTAAGT  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 --GATTACTT GG--AGATA ATATT-----CAGTGG-AAT TTCCGTAAGT  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 --GATTACTT GG--GCATA ATATT-----CAGTGG-AAT TTTGTAAGT  
A.thaliana\_GPx\_chlo --GATTCTTG GG--TGGT TCATT-----AAATGG-AAC TTTGAGAAAT  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 --GAATCTTG GG--AGATG AGATT-----CAATGG-AAC TTTGTAAGT  
A.thaliana\_GPx\_cito --GAATCTTG GG--GCATG ACATT-----CAATGG-AAC TTTGTAAGT  
GPx\_Pistil\_1 --GAATTTTT GG--AGAG AAATT-----CAATGG-AAC TTTGTAAGT  
GPx\_Pistil\_2 --GCTCTTTT GG--AGATA ATATA-----AAATGG-AAC TTTGCAAAAT  
GPx\_Pistil\_3 --GTTTCTTG GG--TGACA GTGTC-----AAATGG-AAC TTCTCGAAAT  
GPx\_Pistil\_4 --GTTTCTTG GG--GGACA GTATT-----AAATGG-AAC TTCTCGAAAT  
GPx\_Pistil\_5 --GTTTCTTG GG--TTCTA GCATC-----AAGTGG-AAC TTCAAAAAT  
GPx\_Pistil\_6 ---  
GPx\_Pistil\_7 --GATTTCTA GG--AGATT TGATT-----AAATGG-AAT TTTGAGAAAT  
GPx\_Pollen\_1 --GTTTCTTG GG--TTCTA GCATC-----AAGTGG-AAC TTCAAAAAT  
GPx\_Pollen\_2 --GATCTTTT AC--CCTTA GCATCTTAA CAGTGAATC GTGGATTGAT  
GPx\_Pistil\_8 --GGATTTTT GG--GGACA GTATT-----AAGTGG-AAC TTCTCGAAGT  
GPx\_Pistil\_9 --GGATTTTT GG--GGACA GTATT-----AAGTGG-AAC TTCTCGAAGT  
GPx\_Pollen\_3 ---  
GPx\_Pollen\_4 --GTTTCTTG GG--TGACA GTGTC-----AAATGG-AAC TTCTCGAAAT  
GPx\_Pollen\_5 --GGATTTTT GG--AGAAG ACATA-----AAGTGGAAAC TTCACTAAGT  
GPx\_Pollen\_6 TCTAATCCTT GA--TCCTT ATACT-----TTGATAAC TTTGTAAGT  
GPx\_Pistil\_10 TCAAAACCTT GA--TCCTT GTACTTCTCA TAA---AGC TTTGTTAGAT  
GPx\_Pistil\_11 --GCTCTTTT GG--AGATA ATATA-----AAATGG-AAC TTTGCAAAAT  
GPx\_Pollen\_7 --GTTTCTTG GG--TGACA GTGTC-----AAATGG-AAC TTCTCGAAGT  
GPx\_Pollen\_8 --GTCTCATG GGCTGAAGA GAGTC-----AAGTGG-AAC TTCCGAAAT  
Mus\_musculus\_GPx8 --GATTTCTT CA--AGAAG GAGCC---A AGGTGG-AAT TTTTGGAAAT

1001

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306  
A.thaliana\_GPx\_chlo  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277  
A.thaliana\_GPx\_cito  
GPx\_Pistil\_1  
GPx\_Pistil\_2  
GPx\_Pistil\_3  
GPx\_Pistil\_4  
GPx\_Pistil\_5  
GPx\_Pistil\_6  
GPx\_Pistil\_7  
GPx\_Pollen\_1  
GPx\_Pollen\_2  
GPx\_Pistil\_8  
GPx\_Pistil\_9  
GPx\_Pollen\_3  
GPx\_Pollen\_4  
GPx\_Pollen\_5  
GPx\_Pollen\_6  
GPx\_Pistil\_10  
GPx\_Pistil\_11  
GPx\_Pollen\_7  
GPx\_Pollen\_8  
Mus\_musculus\_GPx8

1051

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306  
A.thaliana\_GPx\_chlo  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277  
A.thaliana\_GPx\_cito  
GPx\_Pistil\_1  
GPx\_Pistil\_2  
GPx\_Pistil\_3  
GPx\_Pistil\_4  
GPx\_Pistil\_5  
GPx\_Pistil\_6  
GPx\_Pistil\_7  
GPx\_Pollen\_1  
GPx\_Pollen\_2  
GPx\_Pistil\_8  
GPx\_Pollen\_3  
GPx\_Pollen\_4  
GPx\_Pollen\_5  
GPx\_Pollen\_6  
GPx\_Pistil\_10  
GPx\_Pistil\_11  
GPx\_Pollen\_7  
GPx\_Pollen\_8  
Mus\_musculus\_GPx8

1101

S.indicum_GPx8_LOC105157765	---	GAGAT	---	AT	---	---	---	---	---	GAGAAAGCTG	TTGGGACTCT
N.sylvestris_GPx8_LOC104242771	---	GGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	AAAAAAGCTG	CTGGAAATCG
N.tomentosiformis_GPx8_LOC1040	---	GGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	AATAAAGCTG	CTGGAAATTTG
V.vinifera_GPx8X1_LOC100254672	---	ATGAT	---	GT	---	---	---	---	---	AAAGAAGTTG	TTGGAGGTGT
V.vinifera_GPx8X2_LOC100254672	---	ATGAT	---	GT	---	---	---	---	---	AAAGAAGTTG	TTGGAGGTGT
P.euphratica_GPx8_LOC105129046	---	GTGAC	---	AT	---	---	---	---	---	AAAGCAACTG	CTGGAGATCT
S.lycopersicum_GPx8_LOC1012670	---	GGGAC	---	AT	---	---	---	---	---	AAAAAGTCTG	TTGGAAATCG
S.tuberosum_GPx8_LOC102600306	---	GGGAC	---	AT	---	---	---	---	---	AAAAAGTCTG	TTGGAAATCG
A.thaliana_GPx_chlo	---	AAGAC	---	AT	---	---	---	---	---	CCAGAAGTTG	CTTGCCG---
B.rapa_GPx8_LOC103838277	---	ATGAC	---	AT	---	---	---	---	---	CAAGAAGCTT	CTGAAAGCTCT
A.thaliana_GPx_cito	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pistil_1	---	GAGAT	---	GT	---	---	---	---	---	GAGGAAGCTT	TTGGGCTGT
GPx_Pistil_2	---	AGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	AAAGAAGCTG	TTGGAGAAAAG
GPx_Pistil_3	---	AGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	AAAGAAGCTG	CTTGA AAAAGG
GPx_Pistil_4	---	AGGAC	---	AT	---	---	---	---	---	AAAGAAGCTG	CTCGAGAAGG
GPx_Pistil_5	---	GGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	CCAGAAGCTG	TTGGGAGCC
GPx_Pistil_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pistil_7	---	AGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	TCAGAGGCTG	GTTGCAG---
GPx_Pollen_1	TCTCTCAT	---	---	AA	---	---	---	---	---	TACATGTTTG	TTTCTAGTCT
GPx_Pollen_2	---	---	---	TT	---	---	---	---	---	TATCGGTTTG	TAGAGACTAG
GPx_Pistil_8	AGAAGAAACA	GTTTGAT	---	---	---	---	---	---	---	GAAAGGTTG	TGAAAACTC-
GPx_Pistil_9	---	AGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	AAAGAAGCTG	CTGGAAAAGG
GPx_Pollen_3	---	AGGAC	---	AT	---	---	---	---	---	AAAGAAGCTG	CTCGAGAAGG
GPx_Pollen_4	---	AGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	AAAGAAGCTG	CTTGA AAAAGG
GPx_Pollen_5	---	AACAC	---	GT	---	---	---	---	---	GAAGAAGTTG	TTAGGAATTG
GPx_Pollen_6	---	ATGA	---	GT	---	---	---	---	---	AAAA	---
GPx_Pistil_10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pistil_11	---	AGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	AAAGAAGCTG	TTGGAGAAAAG
GPx_Pollen_7	---	AGGAT	---	AT	---	---	---	---	---	AAAGAAGCTG	CTTGA AAAAGG
GPx_Pollen_8	---	---	---	GT	---	---	---	---	---	AGATGGGCTT	---
Mus_musculus_GPx8	---	ATGATTG	GGCAATTAT	TCTTAAAAAG	---	---	---	---	---	AAAGAGGATC	TATGAAACA

1151

S.indicum_GPx8_LOC105157765	--	TGTAACCG	AT	---	GATT	CGAGAAATC	---	---	---	AAT	ACGGT-TTGC
N.sylvestris_GPx8_LOC104242771	--	TGTAGTCG	CC	---	AAGGT	TGAGCTTTC	---	---	---	GAC	GATGTGGATC
N.tomentosiformis_GPx8_LOC1040	--	TGTAGTTG	CC	---	AAGGT	TGAGCTTTC	---	---	---	ACC	GATGTGTATC
V.vinifera_GPx8X1_LOC100254672	--	CTAAATT	CT	---	---	-GAGAAATG	---	---	---	AAG	AGCTTATTAG
V.vinifera_GPx8X2_LOC100254672	--	CTAAATT	CT	---	---	-GAGAAATG	---	---	---	AAG	AGCTTATTAG
P.euphratica_GPx8_LOC105129046	--	CTGATTTC	GC	---	---	-TGGTATAA	---	---	---	AGG	AT---TCAA
S.lycopersicum_GPx8_LOC1012670	--	AGTAGTTG	CC	---	AAGGT	TGAGCCCTC	---	---	---	AA	AAATGTGATC
S.tuberosum_GPx8_LOC102600306	--	AGTAGTTG	CC	---	AAGGT	TGAGCCCTC	---	---	---	AA	AAATGTGATC
A.thaliana_GPx_chlo	--	CTAAAAA	CT	---	---	TT	TGCTCATGAG	TTGAGCATAT	AGAGA	GTGAT	---
B.rapa_GPx8_LOC103838277	---	GACTGAATCA	CC	---	---	---	---	---	---	---	---
A.thaliana_GPx_cito	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pistil_1	---	CTTGAATG	CTATGATATT	AAGGAATCA	---	---	---	---	---	GGG	ACGGTGTGTA
GPx_Pistil_2	---	CTTAAGCA	ATGTAGTGGT	C	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pistil_3	---	CTTGAGAA	TT	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pistil_4	---	CTTAAGCA	TT	---	---	---	---	---	---	AGA	CCCATCTTGT
GPx_Pistil_5	---	TTTG	---	---	---	---	---	---	---	ATG	GACTGATATT
GPx_Pistil_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pistil_7	---	CATAAATT	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pollen_1	---	TGGAGTCC	TT	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pollen_2	---	GTTTTTAATA	C	---	---	---	---	---	---	AGG	GATTTCTAGT
GPx_Pistil_8	---	TGTGTGAC	ATAAATCAAT	AGTGAAACC	---	---	---	---	---	CAA	AGCCCTCTTA
GPx_Pistil_9	---	TGAAGTAA	CGATATGGT	TGTTTGTT	---	---	---	---	---	CTG	AACTTGATTT
GPx_Pollen_3	---	CTTAAGCA	TT	---	---	---	---	---	---	AGA	CCCATCTTGT
GPx_Pollen_4	---	CTTGAGAA	TT	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pollen_5	---	CTTGATTG	TC	---	---	TTAAGAAAC	---	---	---	AA	ATACTATACC
GPx_Pollen_6	---	CCTTGCCCT	CTGTAGAGG	G	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pistil_10	---	CGTCATTG	CC	---	---	TTAGCATCCT	TAAAGTGA	ATCATGAACT	---	---	---
GPx_Pistil_11	---	CTTAAGCA	ATGTAGTGGT	C	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pollen_7	---	CTTGAGAA	TT	---	---	---	---	---	---	---	---
GPx_Pollen_8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Mus_musculus_GPx8	---	CGTGGAG	TCAGGCCAGT	ACAAAG	---	---	---	---	---	GAC	AGAGGTTTTA

1201

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 AGGATGTAA CCTTCGATG -CTCGACTAC TTC-CTCGAT TCCAGTTTTA  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 AATTTTGGAC TTGTTAATG ----- --CTGGCTTA GGAGTTTGT  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 AATTTTGGAC TTGTTAATG TCTGGCTTGG TTTTGTGTA GTAGTTTGT  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 TATCATAGCA GATATCAAG -CT----- ---CCTCATG  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 TATCATAGCA GATATCAAG -CT----- ---CCTCATG  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 GATCACAGAA GAATGGAAG -CAAGAGGAT TCTGGTTGCT GTGCGTATT  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 GATTTCGAAC TTGTTAATG -CTGGCTTGG TTTTATTGTA ---GTTTGT  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 GATTTCGAAC TTGTTAATG -CTGGCTTAG TTTTATTGTA ---GTTTGT  
A.thaliana\_GPx\_chlo GGTAAAGTA ACCGTAATG GTGACATAAA GTTTCCGGTT ATTGTTGTA  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 ----- TCTGT-  
A.thaliana\_GPx\_cito -----  
GPx\_Pistil\_1 AACCGTGGAA CAGCTGATT ----- CTATC  
GPx\_Pistil\_2 -----  
GPx\_Pistil\_3 -----  
GPx\_Pistil\_4 TATGTCTTTC AGTTACTAGT AATAAACATC CCCTAAGCAT TAGAGCCATC  
GPx\_Pistil\_5 TGGTTTGGAA GTTATAAAC -----  
GPx\_Pistil\_6 -----  
GPx\_Pistil\_7 -----  
GPx\_Pollen\_1 ----- GAAATCATT  
GPx\_Pollen\_2 ATATATTTAA ATGGTAAAGG TC -----  
GPx\_Pistil\_8 TAGGAGAAAG AAGTTGATGC AATGGCCCA AAT ---ATTTATT  
GPx\_Pistil\_9 GCTAATAAAC ATCTAATG ----- AGGATTC  
GPx\_Pollen\_3 TATGTCTTTC AGTTACTAGT AATAAACATC CCCTAAGCAT TAGAGCCATC  
GPx\_Pollen\_4 ----- AGAGTCATC  
GPx\_Pollen\_5 CTTTCTGAAA C -----  
GPx\_Pollen\_6 -----  
GPx\_Pistil\_10 GATTGTGGTT TAGCTGAAT -----  
GPx\_Pistil\_11 -----  
GPx\_Pollen\_7 ----- AGAGTCATC  
GPx\_Pollen\_8 -----  
Mus\_musculus\_GPx8 GATTCCAAAA CATAAGGTA AAAAAAGATG TTTAAGGCCA TCTTAATATA

1251

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 TG----- ---TAG TTTCTGGGT CAACTCTGGA -----  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 CC----- ---TTA TTATCATTG GTTATCTGAT AACAGA--AC  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 CC----- ---TTA TTTTCATTG GTGATCTGAT AACAGA--AC  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 TT----- ---TGC TTACCGTGT TGTGTGTGA CCTGAC--CC  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 TT----- ---TGC TTAACCTGTT TGTGTGTGA CCTGAC--CC  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 TT----- ---TAT TAAGACTTGT TAAATATGT TTGACG--AA  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 CCA----- ---TTA TTAATAAAT ACTACATGTT TCTGAA--AC  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 CC----- ---TTA TTAATAAAT CCTACATGTT CCTGAA--AC  
A.thaliana\_GPx\_chlo T----- ---ACC TTCTTACATT CTAAGTTGTA CTAATC--GC  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 ----- ---TGA TAACTGTACT TTGATCTTAA ACTTC-----  
A.thaliana\_GPx\_cito -----  
GPx\_Pistil\_1 CCC----- ---TTT CTCCCATTTG CTTTTCTTTC AAGAAA--TC  
GPx\_Pistil\_2 ----- ---TAG TTCTCTGTT CAGCTACTAA ATAATG---  
GPx\_Pistil\_3 PTA----- ---TTG TGCCTTTCGG TTAATAGTAA TAAAAC--TC  
GPx\_Pistil\_4 TTG----- ---TTA TGTCTTTCAG TTACTAGTAA TAAAAC--TC  
GPx\_Pistil\_5 ----- ---TGA TGACTTTTGT AT-----CC  
GPx\_Pistil\_6 -----  
GPx\_Pistil\_7 -----  
GPx\_Pollen\_1 PTT----- ---CAA ATACTACTCT TTTGC-----  
GPx\_Pollen\_2 ----- ---TGA ATTTCTGGA TTGAAGTGTA AACGGA--CG  
GPx\_Pistil\_8 TCA----- ---TAT TTCATCAATA TGAATCAAAA CGTTCA---  
GPx\_Pistil\_9 TT----- ---GGG AGGTTCTGTT TGAGTATTTA CATATAGTTT  
GPx\_Pollen\_3 TTG----- ---TTA TGTCTTTCAG TTAATAGTAA TAAAAC--TC  
GPx\_Pollen\_4 PTA----- ---TTG TGCCTTTCGG TTAATAGTAA TAAAAC--TC  
GPx\_Pollen\_5 -----  
GPx\_Pollen\_6 ----- ---TCA TTACCCCTAA TGTCTTGAC-----  
GPx\_Pistil\_10 ----- ---TGC TTGCCATTGT CCGATAAAAAG AGAGACTTTC  
GPx\_Pistil\_11 ----- ---TAG TTCTCTGTT CAGCTACTAA ATAATG---  
GPx\_Pollen\_7 PTA----- ---TTG TGCCTTTCGG TTAATAGTAA TAAAAC--TC  
GPx\_Pollen\_8 -----  
Mus\_musculus\_GPx8 CTAATCAGAT GTAATGGCTG TCCCCAAGAT AGAAATGTTA CCTATA--GA

1301

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 ----- --AGTTGTA ATTATATCTA ACTGCTGCTT GTAATATTAT  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 TTGTAT---G TTCTTTTGGG GAAGTTTAA ACTGACTTTT ATTAGTCAA-  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 TTGTAT---G TTCTTTTGGG GAAATTTAA ACCGACTTAT -----  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 TTGGACGAAG TTGAACTTGG ATGATATTAT GTTTAAAGAT GACTCCCTTT  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 TTGGACGAAG TTGAACTTGG ATGATATTAT GTTTAAAGAT GACTCCCTTT  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 TATGACAAGT ATGAGACATA GGTGTGCAA GATCAAGCTG TATACAGTTT  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 TGATATCCAG TTATTTGATA TTAGACAAAT ATTATTATTC TGTCAGTTTG  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 TGATATCCAG TCATTTGATA TTAGACAAAT ATTATTATTC TGTCAGTTTG  
A.thaliana\_GPx\_chlo TTAATAAATTT GCGTATAATG GTAATGTTAT ATACA -----  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 ----- TCATGTAATA AAGCAATCA ATTGCTTTTG GTTTGAATTT  
A.thaliana\_GPx\_cito  
GPx\_Pistil\_1 CCGGATAGA ----- CAGT CTAGATTTAA ATTCCGCACT GGAAAAATTA  
GPx\_Pistil\_2 ----- GTC A TGGTGTATTT GCAAGACTAA ATTGAAC---  
GPx\_Pistil\_3 CTGATGAGGA TTTCTACATC AATAAGTATT ACAATGATCA TGTTTTCCAT  
GPx\_Pistil\_4 CTG-ATGAGG ATGTCAATTA GCAGTATTAT GTTCATGTTT TCTATGTTAA  
GPx\_Pistil\_5 GTAGAACAGG ACCAGCTGTT GATATGATAT GCTTAATGTT TTATATATTA  
GPx\_Pistil\_6  
GPx\_Pistil\_7  
GPx\_Pollen\_1  
GPx\_Pollen\_2 ACGGAGAGAAA ATTTCTTCGC TTAATGACA -----  
GPx\_Pistil\_8 ATATATTATG TGGGTATCAC TTTGAAATCA TTAAGCTCCT  
GPx\_Pistil\_9 GGAATGAAA C CCTTTAAAA GTTCTTCTTG GTGTACCTTT CCGAGAGTTT  
GPx\_Pollen\_3 CTG-ATGAGG ATGTCAATTA GCAGTATTAT GTTCATGTTT TCTATGTTAA  
GPx\_Pollen\_4 CTGATGAGGA TTTCTACATC AATAAGTATT ACAATGATCA TGTTTTCCAT  
GPx\_Pollen\_5  
GPx\_Pollen\_6  
GPx\_Pollen\_7  
GPx\_Pollen\_8  
GPx\_Pistil\_10 TTGAATTAAT ATAAGAGGAA GCCAAGAAA ACAAAAACCT T-----  
GPx\_Pistil\_11 ----- GTC A TGGTGTATTT GCAAGACTAA ATTGAAC---  
GPx\_Pollen\_7 CTGATGAGGA TTTCTACATC AATAAGTATT ACAATGATCA TGTTTTCCAT  
GPx\_Pollen\_8  
Mus\_musculus\_GPx8 GGGAAGAAAAG AGGCTTGGAG GCCAACCCAT GATGAAGTAT --ATTACTTC

1351

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 ----- --T GGAAGAAAAT G-----  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 -----  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 -----  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 GTTT ----- CTCTG GTGTAATCAA A-----  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 GTTT ----- CTCTG GTGTAATCAA A-----  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 GCTTGATATG TTTCTTCCC CAGATTTTGG ATGTTGTAAG T-----  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 TTTTGTTTGA TGAAGAATTA TAAGTTCTTG ATGT-----  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 -----  
A.thaliana\_GPx\_chlo -----  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 GTTATGT-----  
A.thaliana\_GPx\_cito  
GPx\_Pistil\_1 GTTC-----  
GPx\_Pistil\_2  
GPx\_Pistil\_3 CTTA----- T TGTGTTCAA ACTTCGATTC  
GPx\_Pistil\_4 CCGTTCAAAA CTTCCACTCT GTATT-----  
GPx\_Pistil\_5 TGGT-----  
GPx\_Pistil\_6  
GPx\_Pistil\_7  
GPx\_Pollen\_1  
GPx\_Pollen\_2  
GPx\_Pistil\_8 TCAA-----  
GPx\_Pistil\_9  
GPx\_Pollen\_3 GCGTTC-----  
GPx\_Pollen\_4 GTTA----- T TGTGTTCAA ACTTCGATTC  
GPx\_Pollen\_5  
GPx\_Pollen\_6  
GPx\_Pollen\_7  
GPx\_Pollen\_8  
Mus\_musculus\_GPx8 TATTGACCAG AAGGAAAAAT CTAGATGTT CAGTACCAA TACCCCTCAC

1401

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 --TGGTCCAG AACTCATT-- TTC----- --ATGGA C TGGGGACAG  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 --TTCCTACA TCTTATTCTC TCT----- --CTTGAT ATTAACAATC  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 --TTATTAAT CATTATTCTC TCT----- --CTTGAT A-----  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 --TCATCCGT TTTTTTTC CCT----- --TTGGT TTTCTAAGA  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 --TCATCCGT TTTTTTTC CCT----- --TTGGT TTTCTAAGA  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 --TGCTTTGG ATTTGGTT-- ACT----- --CTGAC ATAACAAGAT  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 --TTATTTGT TTCGATTGAA GCT----- --CTCTAT CTATTGAAGG  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 ----- --TTTGT TTTGTTGAAG  
A.thaliana\_GPx\_chlo ----- --TTATAT TCCAAAAAAA  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 ----- --TTGGT TTCATTAAAA  
A.thaliana\_GPx\_cito -----  
GPx\_Pistil\_1 ----- --CTGAC TGGCCAAGAA  
GPx\_Pistil\_2 -----  
GPx\_Pistil\_3 TGTGTTTCT TAAGAGTGT ATCTATGTAA CAGCTTGGGT TTTATAAATG  
GPx\_Pistil\_4 --TTGTTTAA GATTGTTCT TATTAAATAA GAGCTCGAAT ATTGTAACCG  
GPx\_Pistil\_5 ----- --CTTGT ACTGTTGGA  
GPx\_Pistil\_6 -----  
GPx\_Pistil\_7 -----  
GPx\_Pollen\_1 -----  
GPx\_Pollen\_2 ----- --TCAAAAT TTGGGGGAAA  
GPx\_Pistil\_8 ----- --TTAAT TTAAACAATG  
GPx\_Pistil\_9 ----- --CTTGC TTGATTAAGA  
GPx\_Pollen\_3 -----  
GPx\_Pollen\_4 TGTGTTTCT TAGGAGTGT ATCTATGTAA CAGCTTGGGT TTTATAAATG  
GPx\_Pollen\_5 -----  
GPx\_Pollen\_6 ----- --TGTAG TCGTGGACC  
GPx\_Pistil\_10 ----- --TTGAT CGGCGAGAA  
GPx\_Pistil\_11 -----  
GPx\_Pollen\_7 --TGTTCCT TAGGAGTGT ATCTATGTAA CAGCTTGGGT TTTATAAATG  
GPx\_Pollen\_8 -----  
Mus\_musculus\_GPx8 TGTGTTTCAA CTTAAGTTTC TCTAGG---- --ATTAA GTTGTGGAA

1451

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 AA----- --TTTCACTAGT GTTTT----- --  
N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 TC----- --CTGGATAGC CAGGCATTTC AAATTATTGG  
N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 -----  
V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 AA----- CTGAAACAGA ATTAT----- --GTTGATA  
V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 AA----- CTGAAACAGA ATTAT----- --GTTGATA  
P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 AA----- TGTTAATATT TTTAT----- --GTTATGA  
S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 TA----- --GGGTAAG GTCGACGTAT AACTATATT  
S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 AA----- --AAAGTTCTTA  
A.thaliana\_GPx\_chlo AA----- AAAAAAAAAA AAAAAA-----  
B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 T----- CCATAGTAAA ATTTGTTTCA GTTGGTTCT  
A.thaliana\_GPx\_cito -----  
GPx\_Pistil\_1 AG----- CCATTGTAAG TTTGACGAG GAAGATTTTA  
GPx\_Pistil\_2 -----  
GPx\_Pistil\_3 GG----- CAAGGCCACT TGTAACCCA AATATGTACA  
GPx\_Pistil\_4 CT----- -----G GTGTTGATT  
GPx\_Pistil\_5 TG----- TTGACTGGA ATGAGTTTG TTAGTATGT  
GPx\_Pistil\_6 -----  
GPx\_Pistil\_7 -----  
GPx\_Pollen\_1 -----  
GPx\_Pollen\_2 AAAT-----  
GPx\_Pistil\_8 AA----- --AGCAGA CACACAATAA ACATTTGTT  
GPx\_Pistil\_9 TC----- --GG ATTTGTGTAT ACCCTGCATA  
GPx\_Pollen\_3 -----  
GPx\_Pollen\_4 GG----- CAAGGCCACT TGTAACCCA AATATGTACA  
GPx\_Pollen\_5 -----  
GPx\_Pollen\_6 GA-----  
GPx\_Pistil\_10 ATTAAAGAAA TCGAAGAAA ATGAGTGAA TTAAAAATGG GTTAGTCTTA  
GPx\_Pistil\_11 -----  
GPx\_Pollen\_7 GG----- CAAGGCCACT TGTACACCA AATATGTACA  
GPx\_Pollen\_8 -----  
Mus\_musculus\_GPx8 AAGCACAC CACATGGGAC CCGAACACT GTGAGGGTG CATTTTTGGAA



1501

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 ----- -CGAGCACC A----- GTTTTTA--

N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 TCTATCAGTT TTTTGTTCG GTGGCGTCCA CCTGAGAATT GTTTTTA--

N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 -----

V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 CTTATGATCC TGTTCAGTAT TTGGGTTTTG AATGGATTCT CCAACAATCA

V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 CTTATGATCC TGTTCAGTAT TTGGGTTTTG AATGGATTCT CCAACAATCA

P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 GCATTGATGC T-----TAA TTTTTCGTTG GATA-----

S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 TCTTAGA-----

S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 GTTTA-----

A.thaliana\_GPx\_chlo -----

B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 TCT-----

A.thaliana\_GPx\_cito -----

GPx\_Pistil\_1 AGTTTGAGAT TTTGCTTCAA GCTAATATTA AGC-----

GPx\_Pistil\_2 -----

GPx\_Pistil\_3 CCTATGTGTG AAAAAATAGTA GAGTC-----

GPx\_Pistil\_4 TGTTTGGTAG ATTTTGCTAT TAGAGTTG-----

GPx\_Pistil\_5 GATATGAATA TGGTTGATCA T-----

GPx\_Pistil\_6 -----

GPx\_Pistil\_7 -----

GPx\_Pollen\_1 -----

GPx\_Pollen\_2 -----

GPx\_Pistil\_8 ATGAAAAATA AG-----

GPx\_Pistil\_9 -----

GPx\_Pollen\_3 -----

GPx\_Pollen\_4 CCTATGTGTG AAAAAATAGTA TAAAGATCAA TATACGAAAA TCTGCGAATT

GPx\_Pollen\_5 -----

GPx\_Pollen\_6 -----

GPx\_Pistil\_10 CAATTGAATA AGAATGCTTT GGTTGATGG AATTTTGATA-----

GPx\_Pistil\_11 -----

GPx\_Pollen\_7 CCTATGTGTG AAAAAATAGTA TAAAGATCAA TATACGAAAA TCTGCGAATT

GPx\_Pollen\_8 -----

Mus\_musculus\_GPx8 GTAACTAACT CTAGCTGTAA TAAAATATA AATGAATGTT GC-----

1551

S.indicum\_GPx8\_LOC105157765 -----

N.sylvestris\_GPx8\_LOC104242771 -----

N.tomentosiformis\_GPx8\_LOC1040 -----

V.vinifera\_GPx8X1\_LOC100254672 TCTGAACTTG GTCAA-----

V.vinifera\_GPx8X2\_LOC100254672 TCTGAACTTG GTCAA-----

P.euphratica\_GPx8\_LOC105129046 -----

S.lycopersicum\_GPx8\_LOC1012670 -----

S.tuberosum\_GPx8\_LOC102600306 -----

A.thaliana\_GPx\_chlo -----

B.rapa\_GPx8\_LOC103838277 -----

A.thaliana\_GPx\_cito -----

GPx\_Pistil\_1 -----

GPx\_Pistil\_2 -----

GPx\_Pistil\_3 -----

GPx\_Pistil\_4 -----

GPx\_Pistil\_5 -----

GPx\_Pistil\_6 -----

GPx\_Pistil\_7 -----

GPx\_Pollen\_1 -----

GPx\_Pollen\_2 -----

GPx\_Pistil\_8 -----

GPx\_Pistil\_9 -----

GPx\_Pollen\_3 -----

GPx\_Pollen\_4 CACAGAGGTG TAAACCATG TGTAATG

GPx\_Pollen\_5 -----

GPx\_Pollen\_6 -----

GPx\_Pistil\_10 -----

GPx\_Pistil\_11 -----

GPx\_Pollen\_7 CACAGAGGTG TAAACCATG TGTAATG

GPx\_Pollen\_8 -----

Mus\_musculus\_GPx8 -----

## 1.5. Alineamiento de las secuencia nucleotídicas de la GST de polen y pistilo de olivo junto con otras especies.

	1				
GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	-----	-----	-----	-----	-----
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	-----	-----	-----	-----	-----
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----	-----

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	CGGCAAG	CAGCAGAA	CCAGCCG	CAGCCAGG	CAGCAGAA
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	-----	-----	-----	-----	-----
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	-----	-----	-----	-----	-----
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----	-----

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	-----	-----	-----	-----	-----
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	-----	-----	-----	-----	-----
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----	-----

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_6	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	CCGCCCCTG	GGATTCAG	CCCTTTCCTG	CTTCTTCTC	GGCTCTTAA
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	-----	-----	-----	-----	-----
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	-----	-----	-----	-----	-----
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----	-----

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_6	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	TTTCTGCTCA	TTGCTATAAA	TTTCTGCTCA	GGTCTGGG
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	-----	-----	-----	-----
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	-----	-----	-----	-----
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----

GST_Pistil_1					
GST_Pistil_2					
GST_Pistil_3					
GST_Pistil_4					
GST_Pistil_5					
GST_Pistil_6					
GST_Pistil_7					
GST_Pistil_8					
GST_Pistil_9					
GST_Pistil_10					
GST_Pistil_11					
GST_Pistil_12					
GST_Pistil_13					
GST_Pistil_14					
GST_Pistil_15					
GST_Pistil_16					
GST_Pistil_17					
GST_Pistil_18					
GST_Pistil_19					
GST_Pistil_20					
GST_Pistil_21					
GST_Pistil_22					
GST_Pistil_23					
GST_Pollen_1					
GST_Pollen_2					
GST_Pollen_3					
GST_Pollen_4					
GST_Pollen_5					
GST_Pollen_6					
GST_Pollen_7					
GST_Pollen_8					
GST_Pollen_9					
GST_Pollen_10					
GST_Pollen_11					
GST_Pollen_12					
GST_Pollen_13					
GST_Pollen_14					
GST_Pollen_15					
GST_Pollen_16					
GST_Pollen_17					
GST_Pistil_24					
GST_Pistil_25					
GST_Pistil_26					
GST_Pistil_27					
GST_Pistil_28					
GST_Pollen_18					
GST_Pollen_19					
GST_Pistil_29					
GST_Pistil_30					
GST_Pistil_31					
GST_Pistil_32					
GST_Pollen_20					
GST_Pistil_33					
GST_Pistil_34					
GST_Pistil_35					
GST_Pistil_36					
GST_Pistil_37					
GST_Pistil_38					
GST_Pistil_39					
GST_Pollen_21					
GST_Pollen_22					
GST_Pistil_40					
GST_Pistil_41					
GST_Pistil_42					
S.indicum_GST_LOC105171922					
N.sylvestris_GST_LOC104227810					
P.mume_GST_LOC103332585					
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648					
S.tuberosum_GST					
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763					
P.euphratica_GST_LOC105123341					
M.domestica_GST					
M.notabilis_GST					
C.sinensis_GST					
Mus_musculus_GST					

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_6	GGTGGCCAA	CCCGTATG	GAACTT	TATTAACAT	TGCATGGGC
GST_Pistil_7	-----	-----	GGGCGACTTG	AATCCCTGGCA	TTTGTGAC
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	AAGCCCTGCG	CCCGTATG	GGGCGACTTG	GACACACAA	TACATTCG
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	CTGACCTATC	TTAATTCGG
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	-----	-----	CTGATTCG	GTGATTCG	TAATTCGG
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	-----	-----	-----	-----	-----
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----	-----



GST_Pistil_1					
GST_Pistil_2					
GST_Pistil_3					
GST_Pistil_4					
GST_Pistil_5	TCCATGATA	TGGAATCCAT	TCTGGTCC	ATATACCG	GCACTCGAA
GST_Pistil_6	AACAGAG	TCAAGCACAC	GGCTGAAAT	TATATACGCA	ATATGAAAT
GST_Pistil_7					
GST_Pistil_8					
GST_Pistil_9					
GST_Pistil_10					
GST_Pistil_11					
GST_Pistil_12					
GST_Pistil_13					
GST_Pistil_14					
GST_Pistil_15					
GST_Pistil_16					
GST_Pistil_17					
GST_Pistil_18					
GST_Pistil_19					
GST_Pistil_20					
GST_Pistil_21					
GST_Pistil_22					
GST_Pistil_23					
GST_Pollen_1					
GST_Pollen_2					
GST_Pollen_3					
GST_Pollen_4					
GST_Pollen_5	CGCGTAGGG	TACCAGC			
GST_Pollen_6	TCTCACCTAA	CAAAAATCAG	AATCCCTAT	CCATGAAAGAA	AACGATTC
GST_Pollen_7					
GST_Pollen_8					
GST_Pollen_9					
GST_Pollen_10					
GST_Pollen_11					
GST_Pollen_12					
GST_Pollen_13					
GST_Pollen_14					
GST_Pollen_15					
GST_Pollen_16					
GST_Pollen_17					
GST_Pistil_24					
GST_Pistil_25					
GST_Pistil_26					
GST_Pistil_27					
GST_Pistil_28					
GST_Pollen_18					
GST_Pollen_19					AGCAG
GST_Pistil_29					
GST_Pistil_30					
GST_Pistil_31					
GST_Pistil_32					
GST_Pollen_20					
GST_Pistil_33					
GST_Pistil_34					
GST_Pistil_35					
GST_Pistil_36					
GST_Pistil_37					
GST_Pistil_38	GTAGGG	TACCAGC			
GST_Pistil_39					
GST_Pollen_21					
GST_Pollen_22					
GST_Pistil_40					
GST_Pistil_41					
GST_Pistil_42					
S.indicum_GST_LOC105171922					
N.sylvestris_GST_LOC104227810					
P.mume_GST_LOC103332585					
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648					
S.tuberosum_GST	CTCCAAAT	AATCCCAAA	GAATATAT	TAAAAAA	ATATCTAC
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763					
P.euphratica_GST_LOC105123341					
M.domestica_GST					
M.notabilis_GST					
C.sinensis_GST					
Mus_musculus_GST					

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_5	TCTCCCTTATA	CCCTTCATAA	TCTATCTATC	ACTATTCATG	ATCTCTCTGC
GST_Pistil_6	GAAGGABCAC	CTAATGGGAG	GTCTTATCCA	ACRAAGGCAC	AATATCTTAC
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	CTTACCCATA	ATGAAAAAG	AAATATGG	GGTATTAAG	TGCTTCTA
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	ATCTTGAATG	GATGATGAT	TATGGTGG	AGGATATG	ATTCATGATA
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	CTTCAATGATG	ATGGCCATAT	ACTCCATGAT	GGCTCTGATG
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	-----	-----	-----	-----	-----
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CTTCAATATA	TGATGATAG	ACTTTCATCA	ATATCATCCG	TCATGATGGT
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----	-----

GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3				
GST_Pistil_4				
GST_Pistil_5	AGGCTTTCG	GGATATCCCG	CCATNAGCGA	AGTATTGTA
GST_Pistil_6	ACAGTATGAT	TCATATGAGC	AGTCAACAAG	AGCTGGTAT
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8				
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				GG
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18				
GST_Pistil_19				
GST_Pistil_20				
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23			CTCC	ATGATGAGG
GST_Pollen_1				ACATCCGAT
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4		AT	TAATCTCG	CAATATAG
GST_Pollen_5			AAATGATCA	ACTAACCTAC
GST_Pollen_6			GGG	TGATGAAAG
GST_Pollen_7	AGATATGAT	GCATAGCTG	ATATAAATCC	AGTAGGCTTA
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13				CC
GST_Pollen_14				
GST_Pollen_15				G
GST_Pollen_16				GGAAACCA
GST_Pollen_17				
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25				GT
GST_Pistil_26				AGACTTAAAG
GST_Pistil_27	TCGAAACCT	CATGATATA	ATGGTATA	GGATCTAAT
GST_Pistil_28				CATGAACTA
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19	CAAAATCCCG	CATCAATCC	GAAATGORA	TGGATATTC
GST_Pistil_29				TCCGATCAAG
GST_Pistil_30				
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32	TAGGGTCTG	CAATGCTAT	TGCATCCAG	TCCCATTC
GST_Pollen_20				CTCGTTTGG
GST_Pistil_33				
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36				
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				GGCTG
GST_Pistil_39				TGTGAAAG
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922				
N.sylvestris_GST_LOC104227810				
P.mume_GST_LOC103332585			ATATA	TGCTATGGA
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648				GGTCCCTA
S.tuberosum_GST	CAATATCTG	CTCCCTAC	CATCTCTTC	CTATAGCTA
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763				TCTGAAAG
P.euphratica_GST_LOC105123341				ATGCTATC
M.domestica_GST				
M.notabilis_GST				ATG
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST			ATGCTATA	CAAAATGCA
				GAAAGCTTG

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_3	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----	GGG	
GST_Pistil_5	CAGGCGGCTG	TATAGCGGAG	TGADTAGGTC	ATCAGTGTAT	GCTGATAGCG	
GST_Pistil_6	AAGTGGGNGA	AAAAAGGCCG	TGAATATG	ATGCGGAT	-----	
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_8	-----	GGGAA	AAAAAGGAAA	ACTAGCGGGA	ATGGTGGTGA	AGGCTATGG
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_14	-----	-----	GGAAA	ACTAGCGGGA	ATGGTGGTGA	AGGCTATGG
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_16	GGAAAGRAAG	GGGGAAAGCG	TTCATATGTA	CTCCAAAAG	TACCTAACCG	
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_18	-----	G	GATATACCG	TACCCCTGTA	CGGTGTTGA	ATTCGAAAGC
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_21	-----	GGC	TAGACTAAG	ACTAGCGGCG	ATGGTGGTGA	AGGCTATGG
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_23	ATCCAGCGCA	AAACAATGGG	AACTAAATGA	ATCCAGCGCG	ATGGTGGTGA	AGGCTATGG
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_4	AAAAGCCCAATA	ATCGTAAATG	CTCGAAATCG	CTCCAAATGGC	TTCGGTGGAA	
GST_Pollen_5	AAAGGGGGAG	AAAAAGACCG	TATAGTGT	ATCGAGAT	-----	
GST_Pollen_6	GGTAAAGTAG	AGAGTCAAGT	ACTAGCGGCG	ATGGTGGTGA	AGGCTATGG	
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_10	-----	CAA	TATATGGGG	GGGGGTC	TTCGGTGGAA	AGTATGTGA
GST_Pollen_11	-----	G	AAAAAGGCA	TGAAAGCTTA	TTCGGTGGAA	AGTATGTGA
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_13	ATCCCGGTCAC	AAAGTCAATA	AAAGTCAATA	ACAAAACCA	ATTAATCAATA	
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_15	GATCCGTTCC	ATGATCTATC	TATAGATGA	ATAGTGCAT	TTCAAAAG	
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_25	GTATGTTGAR	CTCATGAGG	TTCANAGATG	CTGAAGCTCT	ATTCGATATG	
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_27	ATCAGTAAAG	TATATCTTAC	TATAGGCAATG	TTCAGGCACT	TAAATCAACG	
GST_Pistil_28	-----	G	GAC	-----	-----	
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_19	GTATGTTGAR	CTCATGAGG	TTCANAGATG	CTGAAGCTCT	ATTCGATATG	
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	GAAGAA	TTCAGGCTATG	
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_32	GAATGGTAAAG	CTCTCTGTTG	CTCAATGGTT	GAATGATGCC	TTCGCTGGT	
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_38	ATGGGGGAG	AAAAAGACCG	TAAATGTG	ATCGAGAT	-----	
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----	-----	
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	GGGAC	GAGGCCACAG	TCTACGTTGG	GGGAGCGAT	TTCADAAAC
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	CA	CACACCGTTC	CATAAGAAAA	ACCCACTATA	TTCACAAAAT
P.mume_GST_LOC103332585	AAAAACAAAA	AAAAATGCTA	TTCGAGGAGG	TCCACCAATC	GTGGTGAAT	
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	ACCAATGGG	CACATATAA	CCCAAAACCG	CAATAGGCTC	CTCAGTCCAG	
S.tuberosum_GST	AGTAGGCATA	AAATAAAAA	AAATCCAAAT	ATAATATAT	CGAATCACAA	
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CAAGCTGAT	CAACCTCCG	TCCATAACGA	ACCGTGTGC	CCCAATACCT	
P.euphratica_GST_LOC105123341	AAATATAAAG	CCACCAATAT	TTCAGGCTG	ACCAATCAAT	AGGCTATGAT	
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----	-----	
M.notabilis_GST	ACGAGCCGCG	GAATCAATAT	TCTAGCTCCA	TACCCAAACCG	TTCGCCCCA	
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----	-----	
Mus_musculus_GST	GTATGTTGAR	ATGCTAGGTT	TTCANAGATG	ATCGAGAT	AGTATGTGA	

GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3				
GST_Pistil_4	CCAGCAAN	CCGCCGCG	AGTASGCG	AAA
GST_Pistil_5	TCATGCAGC	ATATCCCCAC	ATCAGGG	C
GST_Pistil_6	CGGCCTCC	CAGCC	TCGCG	CCG
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8	ACCGAATAT	GCTTC	TAGG	GTG
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13	AAATC	GTAGGG	GGG	TAG
GST_Pistil_14	ACCGAATAT	GCTTC	TAGG	GTG
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16	ATCACCTCA	TGGT	TAGG	GTG
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18	GTTCATCT	GCCATGAT	TCGTAGG	AGG
GST_Pistil_19				
GST_Pistil_20	TCATGAGC	CAATGATCA	GAACTAGGA	CAA
GST_Pistil_21	CCCGCAATAT	GCTTC	TAGG	GTG
GST_Pistil_22	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
GST_Pistil_23	ATCACCTCA	TGGT	TAGG	GTG
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4	GTTCATCT	TGGT	TAGG	GTG
GST_Pollen_5	CGGCCTCC	CAGCC	TCGCG	CCG
GST_Pollen_6	CGGCCTCC	CAGCC	TCGCG	CCG
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9	CTATATAT	GATTC		
GST_Pollen_10	ATCATATAT	GATTC		
GST_Pollen_11	GCACCTCCT	TGTA		
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13	CCGAAACAA	CAGCCAAAT	ACAAAT	CCA
GST_Pollen_14	TACATATAT	TATATCAAG	CCGCAATAG	TAG
GST_Pollen_15	GTAAACGG	CAATATATG	CCATAGCA	CAGATC
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17	CGGCCTCC	CAGCC	TCGCG	CCG
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25	GTTCATCT	TGGT	TAGG	GTG
GST_Pistil_26	CCCGCAATAT	GCTTC	TAGG	GTG
GST_Pistil_27	ACCGAATAT	GCTTC	TAGG	GTG
GST_Pistil_28	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19	CGGCCTCC	CAGCC	TCGCG	CCG
GST_Pistil_29				
GST_Pistil_30	GTTCATCT	TGGT	TAGG	GTG
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32	GCATATAT	GATTC		
GST_Pollen_20	CCGAAACAA	CAGCCAAAT	ACAAAT	CCA
GST_Pistil_33	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36	CGGCCTCC	CAGCC	TCGCG	CCG
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38	CGGCCTCC	CAGCC	TCGCG	CCG
GST_Pistil_39	ACCGAATAT	GCTTC	TAGG	GTG
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922	CCAA			
N.sylvestris_GST_LOC104227810	GTTCATCT	TGGT	TAGG	GTG
P.mume_GST_LOC103332585	GCATATAT	GATTC		
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
S.tuberosum_GST	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
P.euphratica_GST_LOC105123341	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
M.domestica_GST	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
M.notabilis_GST	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
C.sinensis_GST	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG
Mus_musculus_GST	TCGAAACTCT	TGGT	TAGG	GTG

GST_Pistil_1					
GST_Pistil_2					
GST_Pistil_3					
GST_Pistil_4					GG
GST_Pistil_5					GGTGGCTTC
GST_Pistil_6					GGTGGCTTC
GST_Pistil_7					GGTGGCTTC
GST_Pistil_8					GGTGGCTTC
GST_Pistil_9					GGTGGCTTC
GST_Pistil_10					GGTGGCTTC
GST_Pistil_11					GGTGGCTTC
GST_Pistil_12					GGTGGCTTC
GST_Pistil_13					GGTGGCTTC
GST_Pistil_14					GGTGGCTTC
GST_Pistil_15					GGTGGCTTC
GST_Pistil_16					GGTGGCTTC
GST_Pistil_17					GGTGGCTTC
GST_Pistil_18					GGTGGCTTC
GST_Pistil_19					GGTGGCTTC
GST_Pistil_20					GGTGGCTTC
GST_Pistil_21					GGTGGCTTC
GST_Pistil_22					GGTGGCTTC
GST_Pistil_23					GGTGGCTTC
GST_Pollen_1					GGTGGCTTC
GST_Pollen_2					GGTGGCTTC
GST_Pollen_3					GGTGGCTTC
GST_Pollen_4					GGTGGCTTC
GST_Pollen_5					GGTGGCTTC
GST_Pollen_6					GGTGGCTTC
GST_Pollen_7					GGTGGCTTC
GST_Pollen_8					GGTGGCTTC
GST_Pollen_9					GGTGGCTTC
GST_Pollen_10					GGTGGCTTC
GST_Pollen_11					GGTGGCTTC
GST_Pollen_12					GGTGGCTTC
GST_Pollen_13					GGTGGCTTC
GST_Pollen_14					GGTGGCTTC
GST_Pollen_15					GGTGGCTTC
GST_Pollen_16					GGTGGCTTC
GST_Pollen_17					GGTGGCTTC
GST_Pistil_24					GGTGGCTTC
GST_Pistil_25					GGTGGCTTC
GST_Pistil_26					GGTGGCTTC
GST_Pistil_27					GGTGGCTTC
GST_Pistil_28					GGTGGCTTC
GST_Pollen_18					GGTGGCTTC
GST_Pollen_19					GGTGGCTTC
GST_Pistil_29					GGTGGCTTC
GST_Pistil_30					GGTGGCTTC
GST_Pistil_31					GGTGGCTTC
GST_Pistil_32					GGTGGCTTC
GST_Pollen_20					GGTGGCTTC
GST_Pistil_33					GGTGGCTTC
GST_Pistil_34					GGTGGCTTC
GST_Pistil_35					GGTGGCTTC
GST_Pistil_36					GGTGGCTTC
GST_Pistil_37					GGTGGCTTC
GST_Pistil_38					GGTGGCTTC
GST_Pistil_39					GGTGGCTTC
GST_Pollen_21					GGTGGCTTC
GST_Pollen_22					GGTGGCTTC
GST_Pistil_40					GGTGGCTTC
GST_Pistil_41					GGTGGCTTC
GST_Pistil_42					GGTGGCTTC
S.indicum_GST_LOC105171922					GGTGGCTTC
N.sylvestris_GST_LOC104227810					GGTGGCTTC
P.mume_GST_LOC103332585					GGTGGCTTC
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648					GGTGGCTTC
S.tuberosum_GST					GGTGGCTTC
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763					GGTGGCTTC
P.euphratica_GST_LOC105123341					GGTGGCTTC
M.domestica_GST					GGTGGCTTC
M.notabilis_GST					GGTGGCTTC
C.sinensis_GST					GGTGGCTTC
Mus_musculus_GST					GGTGGCTTC

GST\_Pistil\_1  
 GST\_Pistil\_2  
 GST\_Pistil\_3  
 GST\_Pistil\_4  
 GST\_Pistil\_5  
 GST\_Pistil\_6  
 GST\_Pistil\_7  
 GST\_Pistil\_8  
 GST\_Pistil\_9  
 GST\_Pistil\_10  
 GST\_Pistil\_11  
 GST\_Pistil\_12  
 GST\_Pistil\_13  
 GST\_Pistil\_14  
 GST\_Pistil\_15  
 GST\_Pistil\_16  
 GST\_Pistil\_17  
 GST\_Pistil\_18  
 GST\_Pistil\_19  
 GST\_Pistil\_20  
 GST\_Pistil\_21  
 GST\_Pistil\_22  
 GST\_Pistil\_23  
 GST\_Pollen\_1  
 GST\_Pollen\_2  
 GST\_Pollen\_3  
 GST\_Pollen\_4  
 GST\_Pollen\_5  
 GST\_Pollen\_6  
 GST\_Pollen\_7  
 GST\_Pollen\_8  
 GST\_Pollen\_9  
 GST\_Pollen\_10  
 GST\_Pollen\_11  
 GST\_Pollen\_12  
 GST\_Pollen\_13  
 GST\_Pollen\_14  
 GST\_Pollen\_15  
 GST\_Pollen\_16  
 GST\_Pollen\_17  
 GST\_Pistil\_24  
 GST\_Pistil\_25  
 GST\_Pistil\_26  
 GST\_Pistil\_27  
 GST\_Pistil\_28  
 GST\_Pollen\_18  
 GST\_Pollen\_19  
 GST\_Pistil\_29  
 GST\_Pistil\_30  
 GST\_Pistil\_31  
 GST\_Pistil\_32  
 GST\_Pollen\_20  
 GST\_Pistil\_33  
 GST\_Pistil\_34  
 GST\_Pistil\_35  
 GST\_Pistil\_36  
 GST\_Pistil\_37  
 GST\_Pistil\_38  
 GST\_Pistil\_39  
 GST\_Pollen\_21  
 GST\_Pollen\_22  
 GST\_Pistil\_40  
 GST\_Pistil\_41  
 GST\_Pistil\_42  
 S.indicum\_GST\_LOC105171922  
 N.sylvestris\_GST\_LOC104227810  
 P.mume\_GST\_LOC103332585  
 F.vesca-vesca\_GST\_LOC101303648  
 S.tuberosum\_GST  
 P.xbretschneideri\_GST\_LOC103936763  
 P.euphratica\_GST\_LOC105123341  
 M.domestica\_GST  
 M.notabilis\_GST  
 C.sinensis\_GST  
 Mus\_musculus\_GST

GST\_Pistil\_1  
 GST\_Pistil\_2  
 GST\_Pistil\_3  
 GST\_Pistil\_4  
 GST\_Pistil\_5  
 GST\_Pistil\_6  
 GST\_Pistil\_7  
 GST\_Pistil\_8  
 GST\_Pistil\_9  
 GST\_Pistil\_10  
 GST\_Pistil\_11  
 GST\_Pistil\_12  
 GST\_Pistil\_13  
 GST\_Pistil\_14  
 GST\_Pistil\_15  
 GST\_Pistil\_16  
 GST\_Pistil\_17  
 GST\_Pistil\_18  
 GST\_Pistil\_19  
 GST\_Pistil\_20  
 GST\_Pistil\_21  
 GST\_Pistil\_22  
 GST\_Pistil\_23  
 GST\_Pollen\_1  
 GST\_Pollen\_2  
 GST\_Pollen\_3  
 GST\_Pollen\_4  
 GST\_Pollen\_5  
 GST\_Pollen\_6  
 GST\_Pollen\_7  
 GST\_Pollen\_8  
 GST\_Pollen\_9  
 GST\_Pollen\_10  
 GST\_Pollen\_11  
 GST\_Pollen\_12  
 GST\_Pollen\_13  
 GST\_Pollen\_14  
 GST\_Pollen\_15  
 GST\_Pollen\_16  
 GST\_Pollen\_17  
 GST\_Pollen\_24  
 GST\_Pistil\_25  
 GST\_Pistil\_26  
 GST\_Pistil\_27  
 GST\_Pistil\_28  
 GST\_Pollen\_18  
 GST\_Pollen\_19  
 GST\_Pistil\_29  
 GST\_Pistil\_30  
 GST\_Pistil\_31  
 GST\_Pistil\_32  
 GST\_Pollen\_20  
 GST\_Pistil\_33  
 GST\_Pistil\_34  
 GST\_Pistil\_35  
 GST\_Pistil\_36  
 GST\_Pistil\_37  
 GST\_Pistil\_38  
 GST\_Pistil\_39  
 GST\_Pollen\_21  
 GST\_Pollen\_22  
 GST\_Pistil\_40  
 GST\_Pistil\_41  
 GST\_Pistil\_42  
 S.indicum\_GST\_LOC105171922  
 N.sylvestris\_GST\_LOC104227810  
 P.mume\_GST\_LOC103332585  
 F.vesca-vesca\_GST\_LOC101303648  
 S.tuberosum\_GST  
 P.xbretschneideri\_GST\_LOC103936763  
 P.euphratica\_GST\_LOC105123341  
 M.domestica\_GST  
 M.notabilis\_GST  
 C.sinensis\_GST  
 Mus\_musculus\_GST



GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3				
GST_Pistil_4	GGATAC		CCAAAG	GGCG
GST_Pistil_5	CATATC		CCAAACT	TCGG
GST_Pistil_6	GGATAC		CCGGG	GAAT
GST_Pistil_7	GGATAC		CCAGAGG	AAAT
GST_Pistil_8	GGATAC		CCGGG	CCG
GST_Pistil_9			CCAG	GGCG
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11	TCCCTC		CCAGGC	CAAC
GST_Pistil_12	GGCTAT		CCAG	GGCG
GST_Pistil_13	CCACTC		CCGAC	GAAT
GST_Pistil_14	GGATAC		CCAG	GGCG
GST_Pistil_15	TTTGGC		CCAAAG	CAAC
GST_Pistil_16	TTTCTC		CCAGG	TTGC
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18	CCATCC			
GST_Pistil_19	AAAAAT		AAAT	AAAT
GST_Pistil_20	TTTATC		CCAGGC	AAAT
GST_Pistil_21	GGATAC		CCAG	CCAG
GST_Pistil_22	CCCTCT		CCAAAC	GAAC
GST_Pistil_23	GGAAAT		CCGGG	CCG
GST_Pollen_1	CCATCC		CCAGG	CCG
GST_Pollen_2	CATATC		CCATCC	GAAC
GST_Pollen_3	GGATAC		CCAGAGG	AAAT
GST_Pollen_4	CCCTCT		CCAAAC	GAAC
GST_Pollen_5	GGATAC		GGGAAAT	AAAT
GST_Pollen_6	GGATAC		CCAG	CCAG
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9	GGATAC		GGAGAAAT	AAAT
GST_Pollen_10	GGATAC		GGAGAAAT	AAAT
GST_Pollen_11	TCCCTC		CCATCC	GAAT
GST_Pollen_12	AAATGA		CCAGAAAT	AAAT
GST_Pollen_13	GAATCC		CCAAACT	CCAT
GST_Pollen_14	GGCTCT		CCGAC	GAAC
GST_Pollen_15	GTATC		CCATCC	CCAT
GST_Pollen_16	AAATGA		CCAGAAAT	AAAT
GST_Pollen_17	GGATCC		CCGGG	AAAT
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25	AGGCTC		GAAGC	AAAT
GST_Pistil_26	AGGCTC		GAAGC	AAAT
GST_Pistil_27	AGGCTC	CCAGGCTAAG	GGCAGGCT	CCAG
GST_Pistil_28	AGGCTC	CCAGGCTAAG	GGCAGGCT	CCAG
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19	AGGCTC		GAAGC	AAAT
GST_Pistil_29	GGATCC		CCAGG	CAAT
GST_Pistil_30	TTTCCCTC		CCAG	AAAT
GST_Pistil_31			CCGGA	CCAT
GST_Pistil_32	GGCTCT		CCAAAC	CCG
GST_Pollen_20	GGATAC		CCAAAC	TCGG
GST_Pistil_33	GGGATC		CCAGG	CCAG
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35	CCATCC		CCAGG	GAAT
GST_Pistil_36	CCCTCT		CCAGG	GAAC
GST_Pistil_37	CCAGAC		CCAGG	CCAT
GST_Pistil_38	GGATAC		GGAGAAAT	AAAT
GST_Pistil_39	CCCTCT		CCGGG	GAAT
GST_Pollen_21	CCGGCT		CCAGG	GGCG
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41	CCCTCT		CCGGG	AAAT
GST_Pistil_42	AGGCTC		CCAGG	GAAC
S.indicum_GST_LOC105171922	TTTCTC		CCATCC	GAAT
N.sylvestris_GST_LOC104227810	CCCTCT		CCGGG	CCG
P.mume_GST_LOC103332585	CCCTCT		CCGGG	CCG
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	CCCTCT		CCGGG	CCG
S.tuberosum_GST	AAAAAA		AAAT	AAAT
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	GGATAC		CCGGG	CCG
P.euphratica_GST_LOC105123341	GGATAC		CCGGG	CCG
M.domestica_GST	GGATAC		CCGGG	CCG
M.notabilis_GST	CCCTCT		CCGGG	CCG
C.sinensis_GST	CCCTCT		CCGGG	CCG
Mus_musculus_GST	GGCTCT		CCAGG	CCG

GST_Pistil_1					
GST_Pistil_2					
GST_Pistil_3					
GST_Pistil_4					
GST_Pistil_5					
GST_Pistil_6					
GST_Pistil_7					
GST_Pistil_8					
GST_Pistil_9					
GST_Pistil_10					
GST_Pistil_11					
GST_Pistil_12					
GST_Pistil_13					
GST_Pistil_14					
GST_Pistil_15					
GST_Pistil_16					
GST_Pistil_17					
GST_Pistil_18					
GST_Pistil_19					
GST_Pistil_20					
GST_Pistil_21					
GST_Pistil_22					
GST_Pistil_23					
GST_Pollen_1					
GST_Pollen_2					
GST_Pollen_3					
GST_Pollen_4					
GST_Pollen_5					
GST_Pollen_6					
GST_Pollen_7					
GST_Pollen_8					
GST_Pollen_9					
GST_Pollen_10					
GST_Pollen_11					
GST_Pollen_12					
GST_Pollen_13					
GST_Pollen_14					
GST_Pollen_15					
GST_Pollen_16					
GST_Pollen_17					
GST_Pistil_24					
GST_Pistil_25					
GST_Pistil_26					
GST_Pistil_27					
GST_Pistil_28					
GST_Pollen_18					
GST_Pollen_19					
GST_Pistil_29					
GST_Pistil_30					
GST_Pistil_31					
GST_Pistil_32					
GST_Pollen_20					
GST_Pistil_33					
GST_Pistil_34					
GST_Pistil_35					
GST_Pistil_36					
GST_Pistil_37					
GST_Pistil_38					
GST_Pistil_39					
GST_Pollen_21					
GST_Pollen_22					
GST_Pistil_40					
GST_Pistil_41					
GST_Pistil_42					
S.indicum_GST_LOC105171922					
N.sylvestris_GST_LOC104227810					
P.mume_GST_LOC103332585	GCCTGCTCA	ATGGCTCTG	AGATGCTG	CATGGCTGC	GTGGCTG
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648					
S.tuberosum_GST	ATGCTG	GTCCAAAGG	ATCCCTG	ATCGCTCA	ATATCTG
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763					
P.euphratica_GST_LOC105123341					
M.domestica_GST					
M.notabilis_GST					
C.sinensis_GST					
Mus_musculus_GST					





GST_Pistil_1	CAATTAAG				
GST_Pistil_2	CTAATAAG				
GST_Pistil_3	CGATAAG				
GST_Pistil_4	AGTTCATG				CAG
GST_Pistil_5	CCGCGCAG				
GST_Pistil_6	TGATCAAG				
GST_Pistil_7	CTAATAAG				
GST_Pistil_8	CCATGACC				
GST_Pistil_9	TTAAGTGA				
GST_Pistil_10	TGATCAAG				
GST_Pistil_11	CTAATAAG				
GST_Pistil_12	TGATCAAG				
GST_Pistil_13	TGATCAAG				
GST_Pistil_14	CTAATAAG				
GST_Pistil_15	TGATCAAG				
GST_Pistil_16	TGATCAAG				
GST_Pistil_17	CAATTAAG				
GST_Pistil_18	CGATTAAG				
GST_Pistil_19	TGATCAAG				
GST_Pistil_20	CTAATAAG				
GST_Pistil_21	CAATTAAG				
GST_Pistil_22	TTAAGTGA	ATACATGAT	GAGGTTGGG	ATTGGGTTCA	ATCCATTCAT
GST_Pistil_23	TTAAGTGA	ATACATGAT	GAGGTTGGG	ATTGGGTTCA	ATCCATTCAT
GST_Pollen_1	TGATCAAG				
GST_Pollen_2	TGATCAAG				
GST_Pollen_3	CCGCGCAG				
GST_Pollen_4	TTAAGTGA	ATACATGAT	GAGGTTGGG	ATTGGGTTCA	ATCCATTCAT
GST_Pollen_5	CAATTAAG				
GST_Pollen_6	CAATTAAG				
GST_Pollen_7					
GST_Pollen_8					
GST_Pollen_9	CAATTAAG				
GST_Pollen_10	GTACCCCT				
GST_Pollen_11	CAATTAAG				
GST_Pollen_12	CTTATGCC				
GST_Pollen_13	TGATCAAG				
GST_Pollen_14	CTTATGCC				
GST_Pollen_15	CAATTAAG				
GST_Pollen_16	CTTATGCC				
GST_Pollen_17	CCGCGCAG				
GST_Pistil_24	CCGCGCAG				
GST_Pistil_25	CTAATAAG				
GST_Pistil_26	CTAATAAG				
GST_Pistil_27	TTAATCCG				
GST_Pistil_28	TTAATCCG				
GST_Pollen_18					
GST_Pistil_29	CAATTAAG				
GST_Pistil_30	TGATCAAG				
GST_Pistil_31	TGATCAAG				
GST_Pistil_32	CAATTAAG				
GST_Pollen_20	CCGCGCAG				
GST_Pistil_33	TGATCAAG				
GST_Pistil_34	TTAATCCG				
GST_Pistil_35	CAATTAAG				
GST_Pistil_36	TGATCAAG				
GST_Pistil_37	TGATCAAG				
GST_Pistil_38	CAATTAAG				
GST_Pistil_39	TGATCAAG				
GST_Pollen_21	CGATTAAG				
GST_Pollen_22	CGATTAAG				
GST_Pistil_40	CCGCGCAG				
GST_Pistil_41	CAATTAAG				
GST_Pistil_42	CCGCGCAG				
S.indicum_GST_LOC105171922	TTAATCCG				
N.sylvestris_GST_LOC104227810	TGATCAAG				
P.mume_GST_LOC103332585	TGATCAAG				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	TGATCAAG				
S.tuberosum_GST	TGATCAAG				
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	TGATCAAG				
P.euphratica_GST_LOC105123341	TGATCAAG				
M.domestica_GST	TGATCAAG				
M.notabilis_GST	TGATCAAG				
C.sinensis_GST	TGATCAAG				
Mus_musculus_GST	CGATTAAG				



GST_Pistil_1	-----	-GGTGGCCAT	GCTAAATTC	GATGCGAAA
GST_Pistil_2	ACCCCTGGGA	AACTCTTTGG	AAGAAAGAGC	CTTAAACCGT
GST_Pistil_3	ACGTTTGGGA	AAGTCAAAGG	AGGAGAAAGG	CAAACTAGAA
GST_Pistil_4	ACGTTTGGG	ACAAAGCCCT	TAGGAAAGGG	GTCAATTAGAT
GST_Pistil_5	ACCTTAGGCA	GGGG	GAAGTCTCTG	AAATGGATGCA
GST_Pistil_6	ACGGTTCCTC	AGCTGATCTT	CAAAAAAGAG	CACCGATCCCA
GST_Pistil_7	CCGTAAGGG	AGGAGCCGG	TATGAAATTC	GATGCGAAA
GST_Pistil_8	AGTGTTCGG	AAGTCAAAGG	AGGAGAAAGG	CAATGTTAGAA
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	TAATTTTA
GST_Pistil_10	AAAGTAAGAG	G	-----	-----
GST_Pistil_11	CCGTAAGGG	-----	AAGTCTCTCT	GATGCGGAACT
GST_Pistil_12	ATCGTTGGGA	-----	AAGTCAAGGG	TCAGCTAGAG
GST_Pistil_13	ACCTTAGGAG	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	ACCTTAGGAG	CCATTCGGNC	TTGTTCTCTG	CATCCAAAGTA
GST_Pistil_15	ATCGTAGGAA	-----	-----	GGGACTTCC
GST_Pistil_16	CCCTTAGGAG	TCATTCCTC	ATGCTCCCA	CTGAAAACT
GST_Pistil_17	CTTGTTCGAA	-----	-----	TAATGCTTAC
GST_Pistil_18	ATCGTAGGAG	-----	ACRGTGATCT	TGCCAAGGTA
GST_Pistil_19	ATCGTAGGAG	TCGCTCTGGT	TTTCTCTCTG	GTGAACTGCTA
GST_Pistil_20	ATCGTAGGAG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
GST_Pistil_21	ATCGTAGGAG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
GST_Pistil_22	ATCGTAGGAG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
GST_Pistil_23	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
GST_Pollen_1	ACAGCTAGG	GGGTCAGGG	AGCGAATTA	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_2	ACAGCTAGG	GGGTCAGGG	AGCGAATTA	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_3	ACAGCTAGG	GGGTCAGGG	AGCGAATTA	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_4	ACAGCTAGG	GGGTCAGGG	AGCGAATTA	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_5	ACAGCTAGG	GGGTCAGGG	AGCGAATTA	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_6	ACAGCTAGG	GGGTCAGGG	AGCGAATTA	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_7	ACAGCTAGG	GGGTCAGGG	AGCGAATTA	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_8	ACAGCTAGG	GGGTCAGGG	AGCGAATTA	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_9	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_10	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_11	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_12	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_13	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_14	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_15	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_16	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_17	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_24	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_25	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_26	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_27	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_28	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_18	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_19	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_29	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_30	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_31	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_32	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_20	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_33	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_34	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_35	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_36	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_37	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_38	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_39	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_21	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pollen_22	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_40	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_41	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
GST_Pistil_42	ATCGTAGGAG	TC	TCGCTCTCTG	TCGCTCTCTG
S.indicum_GST_LOC105171922	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
N.sylvestris_GST_LOC104227810	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
P.mume_GST_LOC103332585	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
S.tuberosum_GST	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
P.euphratica_GST_LOC105123341	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
M.domestica_GST	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
M.notabilis_GST	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
C.sinensis_GST	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC
Mus_musculus_GST	CCGTAAGGG	-----	AGGAGCCCTC	AGCGATTTCTC





GST_Pistil_1	CGATGCTG	GTTGGGATTA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCCAAC
GST_Pistil_2	---	---	---	---	GAAG	CTCAAATC
GST_Pistil_3	---	---	---	---	GAAG	CACCAAA
GST_Pistil_4	---	---	TTAGGG	---	GAAG	GCCAAAC
GST_Pistil_5	---	---	---	---	AAAT	CCCAAGT
GST_Pistil_6	---	---	---	---	GCAAT	CACCTAA
GST_Pistil_7	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
GST_Pistil_8	---	---	---	---	GAAG	CACCAAT
GST_Pistil_9	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_10	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_11	TGATGCTG	TGACAGGCAC	TTGLAGTG	---	AG	CCC GAACCC
GST_Pistil_12	---	---	---	---	GAAG	CACCGAA
GST_Pistil_13	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_14	---	---	---	---	ATA	CTCGAAT
GST_Pistil_15	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_16	ATG	---	---	---	---	---
GST_Pistil_17	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_18	CGTGGTTC	CCAGGCTTA	TTTGGCTTC	ATCGGAGATC	CTCTAAGA	AT
GST_Pistil_19	CTGTTTGGC	GGGGTCAATTA	AAGTATGTA	---	GCTC	CTCAAAT
GST_Pistil_20	GATGGTGGC	AATATCAGCC	AGGTGAAA	---	GAA	CCCCGCCC
GST_Pistil_21	---	---	---	---	GAAG	CACCAAT
GST_Pistil_22	GGTAGCTTAG	TGAAATGCAG	TAGTGGTAG	---	CAAT	TGCGGG
GST_Pistil_23	CGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCCAAC
GST_Pollen_1	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_2	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_3	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_4	GGATGCTTAG	TGAAATGCAG	TAGTGGTAG	---	GCAAT	CACCTAA
GST_Pollen_5	---	---	---	---	CAAT	TGCGGG
GST_Pollen_6	---	---	---	---	GCAAT	CACCAAT
GST_Pollen_7	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
GST_Pollen_8	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_9	TG	---	---	---	GCAAT	CACCAAT
GST_Pollen_10	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_11	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_12	TGATCCATTA	CAAAATCTTA	TGTTGGGG	CCCATA	TTCTGTCAG	CC
GST_Pollen_13	TGCAATTTTA	GAAGGCATTC	TCAATATA	ACTA	GGCCGCAAT	AT
GST_Pollen_14	---	---	---	---	AAAT	GACCAAT
GST_Pollen_15	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
GST_Pollen_16	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_17	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_24	CTATCCATTA	TAGGATTTAA	GTGGGCTAG	---	GCAAT	CACCTAA
GST_Pistil_25	TGATGCTG	AAAC	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_26	TGATGCTG	AAAC	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_27	GGTGGCTAG	TAGGATTTAA	GTGGGCTAG	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_28	GGTGGCTAG	TAGGATTTAA	GTGGGCTAG	---	GAAG	AAC
GST_Pollen_18	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_19	TGATGCTG	AAAC	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_29	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_30	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_31	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_32	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pollen_20	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_33	GAATGGCC	TAGGATTTAA	GTGGGCTAG	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_34	TGATGCTG	AAAC	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_35	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_36	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_37	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_38	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_39	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pollen_21	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pollen_22	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_40	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_41	---	---	---	---	GAAG	AAC
GST_Pistil_42	---	---	---	---	GAAG	AAC
S.indicum_GST_LOC105171922	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
N.sylvestris_GST_LOC104227810	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
P.mume_GST_LOC103332585	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
S.tuberosum_GST	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
P.euphratica_GST_LOC105123341	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
M.domestica_GST	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
M.notabilis_GST	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
C.sinensis_GST	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC
Mus_musculus_GST	TGATGCTG	GTTGGTATA	TTGLAGTG	---	ATA	CCCGAAC

GST_Pistil_1	CTC			CCCCCC	CCGAAATG	
GST_Pistil_2	CATCC			CGTTAGTAT	ACAACTGGT	
GST_Pistil_3	ATVC		AGC	CCCCGTTT	ACACGTTAG	
GST_Pistil_4				CTATACGA	CCAGCCTCG	
GST_Pistil_5	CTTA		ACTCTCT	CAACCTCCCG	GTGAATATG	
GST_Pistil_6	CTTG		CGA	GGGGTCA	GCTCATATA	
GST_Pistil_7	CTTA			CGGCTCA	CCGATATG	
GST_Pistil_8	ATVC		ACC	CCCACTTT	ACAGATTAG	
GST_Pistil_9						
GST_Pistil_10				CCATGGT	CCCCCTGAA	
GST_Pistil_11	CCAAT			GGAACTCC	CCCAGGAA	
GST_Pistil_12	ATVC		GGC	CCCCGTTT	ACGATTTAG	
GST_Pistil_13				CCCTGGT	CCCCTTGA	
GST_Pistil_14				CTACCTTT	CTTGATTAG	
GST_Pistil_15				CTCTTTT	CCCATAAG	
GST_Pistil_16	ATVC		CTCACTT	CACTGCTA	CTCAATGAT	
GST_Pistil_17				CTAAGT	AGTGGCCAG	
GST_Pistil_18	GGCTTCGGC	GTCCCTAAG	ACTCCAG	CCGCAAT	ATCCCTGAT	
GST_Pistil_19		GAG	GTCCAGGAGC	ACTCTTCTA	TCCCTGATC	
GST_Pistil_20	GTATTCCTC	ATCCAGAGC	ATTC	CTGGACA	CCCAAACT	
GST_Pistil_21	ATVC		AGC		CCCCCTTT	ACAGCTTAT
GST_Pistil_22					CTTAGTTT	ACTGATAG
GST_Pistil_23	CTVC			CTCCCC	CCGAAATG	
GST_Pollen_1				CCCTAGG	CTTGTTCTG	
GST_Pollen_2				CCCTAGG	CTTGTTCTG	
GST_Pollen_3	ATVC		CGT	GGGGTCA	GCTAGGATA	
GST_Pollen_4				CTTAGTTT	ACTGATAG	
GST_Pollen_5	CTTA		GGC	CTGGGCA	GCTAGATAG	
GST_Pollen_6	CTVC		AGC	CCCCCTTT	ACAGTTTAG	
GST_Pollen_7	CTVC			CTCGTCC	CCGATATG	
GST_Pollen_8						
GST_Pollen_9	CTTACGC			CTCCGCTCA	CTTACATATG	
GST_Pollen_10				CTCC	ATTAATGAT	
GST_Pollen_11						
GST_Pollen_12	ATCCCTC			CTATCACA	ACCCTGAGC	
GST_Pollen_13	GTCTTCTC			CTCTTCTT	CTCTTAGC	
GST_Pollen_14	GAACTTC			GGAGCTT	CTTGCGAGT	
GST_Pollen_15	GTCCCTTACG	CTCTTGAATG	CTATCCAAATG	CTCAAT	ATCAATGAG	
GST_Pollen_16	CTTCTCT			CTCTGATCC	ATTAATAAA	
GST_Pollen_17	ATVC		CGT	GGGGTCA	GCTAGGATA	
GST_Pistil_24	ATVC			CCCCCTTT	CTAATGAT	
GST_Pistil_25				CTCAACTC	CCAGAAAT	
GST_Pistil_26				CCAAAACTT	ACCTGCTC	
GST_Pistil_27	CTTC			CTCTATCC	CCGAGGATA	
GST_Pistil_28				CTCTATCC	CCGAGGATA	
GST_Pollen_18						
GST_Pollen_19				CTCAACTC	CCAGAAAT	
GST_Pistil_29				GGTGGACA	ATTAAGCTG	
GST_Pistil_30	CTTACGCT			CTCTGCTCA	ATTAAGGAA	
GST_Pistil_31				CTCTGCTCC	CCCAAACT	
GST_Pistil_32	GATCCCTG				CCCCTCAA	
GST_Pollen_20				CTCTTCCA	CCAACTCTG	
GST_Pistil_33				CTCTTCTT	GGAGGGGAA	
GST_Pistil_34	CT			CTCTTCTA	GTGGGCTA	
GST_Pistil_35				CTCAAGCT	CTTGAGAT	
GST_Pistil_36						
GST_Pistil_37	CACTCTCT			CTCCGCTCA	CTTAGATATG	
GST_Pistil_38	CTTA		GGC	CTCCGCTCA	CTTAGATATG	
GST_Pistil_39	ATVC			GGAGCTT	CTTCTCAGA	
GST_Pollen_21						
GST_Pollen_22				CTCTT	AGCCATGAA	
GST_Pistil_40				ATGGATGG	ACCTGCTAT	
GST_Pistil_41				CTGGCCCC	CTTAGATAT	
GST_Pistil_42	CTTA		GT	ATCTAGGGG	CTTGATTTG	
S.indicum_GST_LOC105171922	CTVC			CTCTCTCC	CTCGAAGCT	
N.sylvestris_GST_LOC104227810	CTVC			CTCTCTCC	ATCCGAATTT	
P.mume_GST_LOC103332585	CTVC			CTAAAACTCC	CTCGAATTT	
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	CTVC			CTAAAACTCC	CTCGAATTT	
S.tuberosum_GST	CTTAAA	CTTCTTAACT	CTCTT	CTCCGGTAA	ATTAATATTT	
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CTVC			CTAAAACTCC	CTCGAATTT	
P.euphratica_GST_LOC105123341	CCCC			CTCCATTC	CTCGAATTT	
M.domestica_GST	CTVC			CTAAAACTCC	CTCGAATTT	
M.notabilis_GST	CTTCT			GGGCTCC	CTCGAATTT	
C.sinensis_GST				CTCTGATCC	CTTAGATATG	
Mus_musculus_GST	CTTGCAT	GATCTAGGAA	CTAACT	CTGGAACTCC	CTTAGATATG	

GST\_Pistil\_1  
 GST\_Pistil\_2  
 GST\_Pistil\_3  
 GST\_Pistil\_4  
 GST\_Pistil\_5  
 GST\_Pistil\_6  
 GST\_Pistil\_7  
 GST\_Pistil\_8  
 GST\_Pistil\_9  
 GST\_Pistil\_10  
 GST\_Pistil\_11  
 GST\_Pistil\_12  
 GST\_Pistil\_13  
 GST\_Pistil\_14  
 GST\_Pistil\_15  
 GST\_Pistil\_16  
 GST\_Pistil\_17  
 GST\_Pistil\_18  
 GST\_Pistil\_19  
 GST\_Pistil\_20  
 GST\_Pistil\_21  
 GST\_Pistil\_22  
 GST\_Pistil\_23  
 GST\_Pollen\_1  
 GST\_Pollen\_2  
 GST\_Pollen\_3  
 GST\_Pollen\_4  
 GST\_Pollen\_5  
 GST\_Pollen\_6  
 GST\_Pollen\_7  
 GST\_Pollen\_8  
 GST\_Pollen\_9  
 GST\_Pollen\_10  
 GST\_Pollen\_11  
 GST\_Pollen\_12  
 GST\_Pollen\_13  
 GST\_Pollen\_14  
 GST\_Pollen\_15  
 GST\_Pollen\_16  
 GST\_Pollen\_17  
 GST\_Pistil\_24  
 GST\_Pistil\_25  
 GST\_Pistil\_26  
 GST\_Pistil\_27  
 GST\_Pistil\_28  
 GST\_Pollen\_18  
 GST\_Pollen\_19  
 GST\_Pistil\_29  
 GST\_Pistil\_30  
 GST\_Pistil\_31  
 GST\_Pistil\_32  
 GST\_Pollen\_20  
 GST\_Pistil\_33  
 GST\_Pistil\_34  
 GST\_Pistil\_35  
 GST\_Pistil\_36  
 GST\_Pistil\_37  
 GST\_Pistil\_38  
 GST\_Pistil\_39  
 GST\_Pollen\_21  
 GST\_Pollen\_22  
 GST\_Pistil\_40  
 GST\_Pistil\_41  
 GST\_Pistil\_42  
 S.indicum\_GST\_LOC105171922  
 N.sylvestris\_GST\_LOC104227810  
 P.mume\_GST\_LOC103332585  
 F.vesca-vesca\_GST\_LOC101303648  
 S.tuberosum\_GST  
 P.xbretschneideri\_GST\_LOC103936763  
 P.euphratica\_GST\_LOC105123341  
 M.domestica\_GST  
 M.notabilis\_GST  
 C.sinensis\_GST  
 Mus\_musculus\_GST

GST_Pistil_1	G	GGGC	CC	--	-AAGATATTC	CGTCCTTTC	TCAGTTC
GST_Pistil_2			AC	CG	-ATGGTGTG	CCGCGAAGG	GGCAGGAGC
GST_Pistil_3	A	AAGG	TT		-CCGC	CCA	AGTGGGAAT
GST_Pistil_4			GSTCCAA		-GAGCTTTC	GCCGAGGAT	GAGATCCAG
GST_Pistil_5	TATTAAT	GC	TAGAA	GGC	GAGTCTCCG	AATGGGCA	TGCTATCCG
GST_Pistil_6	A	TCCCT	TA		-TCCACTTC	CGTGGGGCG	CCCCTGAAC
GST_Pistil_7	G	GGGA	CA		-AATAATTC	TCTCCATTC	TAAAGTCTC
GST_Pistil_8	A	ACAG	AT		-TCGCTCCA	AATGGGAAT	CACGCGGAT
GST_Pistil_9							
GST_Pistil_10							
GST_Pistil_11	A	TGGC	TA		-AAGATATTC	TCCAGCTTA	TGGTATTC
GST_Pistil_12	AT	ATAA	TC		-TTAGCTCCA	AATGGGAT	TACAGCAGC
GST_Pistil_13							
GST_Pistil_14							
GST_Pistil_15							
GST_Pistil_16							
GST_Pistil_17							
GST_Pistil_18	C	TACGC	AT		-AAGCGCCCT	TAGAAATTA	GAATCATAA
GST_Pistil_19	CAACAGG	CTC	ATG	TC	-ATGACTTCA	CTTCCATAAC	TAGATCTGC
GST_Pistil_20	G	TCCGC	TT		-CGTATCTTC	GAAAGCCTTC	CTGATCTGGC
GST_Pistil_21	A	AAC	TT		-TCGCTCCA	AATGGGAAT	TACACCGAT
GST_Pistil_22	AT	AAAA	GC		-AGC		
GST_Pistil_23	G	GGGC	CC		-AAGATATTC	CGTCCTTTC	TCAAGTTC
GST_Pollen_1	A	AAGCC	GC		-TACCGGA	GATCTCTTC	CCCATGGC
GST_Pollen_2							
GST_Pollen_3	A	TCCC	TA		-TCCACTTC	CGTGGGGCG	CCCCTGAAC
GST_Pollen_4	AT	AAAA	GC				
GST_Pollen_5	AC	TCTAC	TC		-TGGCCG	CTCTGGGCG	GCCCTGAA
GST_Pollen_6	AT	AAGG	TT		-TCCGCTCCA	AATGGGAAT	TACACCGAT
GST_Pollen_7							
GST_Pollen_8							
GST_Pollen_9	AC	TCTAC	TC		-TGGCCG	CTCTGGGCG	GCCCTGAA
GST_Pollen_10							
GST_Pollen_11							
GST_Pollen_12	TTC	AACAC	TAA		-CTAGATTC	CTATGGRTGG	TCTATGCT
GST_Pollen_13	CCA	CAGCC	TG		-GATGGCCCG	AAGCCCG	
GST_Pollen_14	A	TGGC	TC		-CAGTCTTC	TATCGTTC	TCCCTGAAC
GST_Pollen_15	TC	TGAC	CA		-TGGGGCTTC	TGTCATCA	GAACTAAC
GST_Pollen_16	G	GGGG	CCCA		-TATTCGATCA	CGATCCCTTC	CATCCCAAC
GST_Pollen_17	A	TCCC	TA		-TCCGCTTC	CGTGGGGCG	CCCCTGAAC
GST_Pistil_24							
GST_Pistil_25	G	CCCT	TG		-GRTATATTC	AAGAAAACT	TGGTCTTAC
GST_Pistil_26							
GST_Pistil_27							
GST_Pistil_28							
GST_Pollen_18							
GST_Pollen_19	CC	TGGG	TA		-TATTC	AAGAAAACT	TGGTCTTAC
GST_Pistil_29							
GST_Pistil_30							
GST_Pistil_31							
GST_Pistil_32	AC	TGACT	TC		-AAGTCCGG	AATA	CTACTCA
GST_Pollen_20							
GST_Pistil_33	GA	TAG	TC		-CTAGCTTC	TCCGAGGAT	GAGATCCG
GST_Pistil_34	AT	GG	G	TC	-AAGATATTC	GGGCAATTC	TGACATCC
GST_Pistil_35							
GST_Pistil_36							
GST_Pistil_37							
GST_Pistil_38	AC	TGACT	TC		-AAGTCCGG	AATA	CTACTCA
GST_Pistil_39	AT	TGGG	TC		-TGGCCG	CTCTGGGCG	GCCCTGAA
GST_Pollen_21							
GST_Pollen_22							
GST_Pistil_40	AT	GCCA	GG		-AAGTGGTTC	GAGGAR	GAP
GST_Pistil_41							
GST_Pistil_42							
S.indicum_GST_LOC105171922	G	GGGC	CC		-AATAATTC	CGTCCTTTC	TCAGTTC
N.sylvestris_GST_LOC104227810	G	GGGC	CG		-AATAATTC	CGTCCCTTC	TCTCTTC
P.mume_GST_LOC10332585	G	GGGA	CT		-AAGTATTC	GGTCTTTC	TGACCTTC
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	G	GGGA	CA		-AAGTATTC	GGGCAATTC	TGACATCC
S.tuberosum_GST	TGCAAT	AGAT	TGCA	TT	-ATATATTC	AATCAGATA	GACGTTTTC
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	G	GGGA	CA		-AAGTATTC	GGTCTTTC	TGACCTTC
P.euphratica_GST_LOC105123341	G	GGGT	CA		-AAGTATTC	GGTCTTTC	TGACCTTC
M.domestica_GST	G	GGGA	CA		-AAGTATTC	GGTCTTTC	TGACCTTC
M.notabilis_GST	G	GGGG	CA		-AAGTATTC	GGTCTTTC	TGACCTTC
C.sinensis_GST	G	TGGG	TC	GG	-GATGATTC	TGACAGGAA	GAGTATTC
Mus_musculus_GST	C	GGC	GG	GC	-ATATGGCC	TGGTGAAC	CCCTACCA





GST_Pistil_1	GGGATG				
GST_Pistil_2	GGATG				
GST_Pistil_3	GGATG				
GST_Pistil_4	GGATG				
GST_Pistil_5					
GST_Pistil_6	AAGGATGAG	CCCTTGGG	CCGGGATGA	GGCCCATTG	GGCTGGAA
GST_Pistil_7	GGATG				
GST_Pistil_8	GGATG				
GST_Pistil_9					
GST_Pistil_10					
GST_Pistil_11	AGCTTTG				
GST_Pistil_12	GGATG				
GST_Pistil_13					
GST_Pistil_14					
GST_Pistil_15					
GST_Pistil_16	GGCTT				
GST_Pistil_17					
GST_Pistil_18					
GST_Pistil_19	AAGATTTTC	CACCTTCAAG	CCCTTCC	AGGTC	
GST_Pistil_20					
GST_Pistil_21	GGATG				
GST_Pistil_22	GGATG				
GST_Pistil_23	GGATG				
GST_Pollen_1					
GST_Pollen_2					
GST_Pollen_3	AAGGATGAG	CCCTTGGG	CCGGGATGA	GGCCCATTG	GGCTGGAA
GST_Pollen_4	GGATG				
GST_Pollen_5	AAGGATGAG	CCCTTGGG	CCGGGATGA	GGCCCATTG	GGCTGGAA
GST_Pollen_6	GGATG				
GST_Pollen_7					
GST_Pollen_8	GGATG				
GST_Pollen_9					
GST_Pollen_10					
GST_Pollen_11					
GST_Pollen_12	AAGATTTTC	CACCTTCAAG	CCCTTCC	AGGTC	
GST_Pollen_13					
GST_Pollen_14	GGATG	GG			
GST_Pollen_15					
GST_Pollen_16					
GST_Pollen_17	AAGGATGAG	CCCTTGGG	CCGGGATGA	GGCCCATTG	GGCTGGAA
GST_Pistil_24					
GST_Pistil_25					
GST_Pistil_26					
GST_Pistil_27	AGCTTTT				
GST_Pistil_28	AGCTTTT				
GST_Pollen_18					
GST_Pollen_19					
GST_Pistil_29					
GST_Pistil_30					
GST_Pistil_31					
GST_Pistil_32	GGT				
GST_Pollen_20	GGATG				
GST_Pistil_33					
GST_Pistil_34					
GST_Pistil_35					
GST_Pistil_36					
GST_Pistil_37					
GST_Pistil_38	AAGGATGAG	CCCTTGGG	CCGGGATGA	GGCCCATTG	GGCTGGAA
GST_Pistil_39	GGATG	GG			
GST_Pollen_21					
GST_Pollen_22					
GST_Pistil_40					
GST_Pistil_41					
GST_Pistil_42					
S.indicum_GST_LOC105171922	GGGATG				
N.sylvestris_GST_LOC104227810	GGGATG				
P.mume_GST_LOC103332585	GGGATG				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	GGGATG				
S.tuberosum_GST	ATGGGAGGG	GATGATGCA	CCCTTATAA	ATGGGCGAA	ATGATATAA
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	GGGATG				
P.euphratica_GST_LOC105123341	GGGATG				
M.domestica_GST	GGGATG				
M.notabilis_GST	GGGATG				
C.sinensis_GST	GGGATG				
Mus_musculus_GST					
		AGAGG	AGGTCAGGA	AGCCTCCCAAC	AGGATGGAAG





GST_Pistil_1	GC			ATC	TC	TA	AGCGAAGGGG				
GST_Pistil_2	GC			TGA	GA	CT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_3	GG			AAA	GG	CT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_4	GA			TCA	GG	CT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_5	AA			TAA	AG	CT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_6	C			TCA	GC	TA	TGGAGTAACG				
GST_Pistil_7	GC			TCA	GC	TA	TGGAGTAACG				
GST_Pistil_8	GG			ATA	GG	CT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_9				ACT	AA	GT	GGCGATGGT				
GST_Pistil_10				AC		TA	TGACAAAA				
GST_Pistil_11	T			TAC	TC	TA	TGAAATGGT				
GST_Pistil_12	AG			TGA	GA	CT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_13											
GST_Pistil_14											
GST_Pistil_15						G	GATGATAAG				
GST_Pistil_16				AG	TC	CC	ATTCGATGAGC				
GST_Pistil_17				AA	TA	TC	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_18	A					TC	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_19				ATA	GG	GC	GCCCCAAGCC				
GST_Pistil_20	AA			AG	GG	AG	GGTGAATAT				
GST_Pistil_21	GG			ATA	GG	CT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_22				TAG	GG	GT	GGTGAATAT				
GST_Pistil_23	GC			TTC	TC	TA	AGCGAAGGGG				
GST_Pollen_1							CAATCGGG				
GST_Pollen_2							CAATCGGG				
GST_Pollen_3	C			TGA	GC	GT	GTTCGATGAGC				
GST_Pollen_4				TAG	GG	GT	GGTGAATAT				
GST_Pollen_5	C			TGA	GG	GT	GTTCGATGAGC				
GST_Pollen_6	GG			ATA	GG	CT	GTTCGATGAGC				
GST_Pollen_7				ATA	GG	TA	GGCGAATA				
GST_Pollen_8	G			TAA	GG	CT	GTTCGATGAGC				
GST_Pollen_9				TAA	GG	TA	GGCGAATA				
GST_Pollen_10				TAA	GG	TA	GGCGAATA				
GST_Pollen_11				TAA	GG	TA	GGCGAATA				
GST_Pollen_12				TAA	GG	TA	GGCGAATA				
GST_Pollen_13				TAA	GG	TA	GGCGAATA				
GST_Pollen_14	GG			TAA	GG	TA	GGCGAATA				
GST_Pollen_15				TAA	GG	TA	GGCGAATA				
GST_Pollen_16				TAA	GG	TA	GGCGAATA				
GST_Pollen_17	C			TGA	GC	GT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_24				TGA	GC	GT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_25	GA			TAA	TA	AT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_26							GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_27	AA			TAA	GC	GG	AGGACAGGTA				
GST_Pistil_28	AA			TAA	TCCATGCA	AGGACAGGTA	AGGACAGGTA				
GST_Pollen_18											
GST_Pollen_19	GA			AAA	TC	TC	GCATGATAA				
GST_Pistil_29				AA	AA	TC	ATTCGATGAGC				
GST_Pistil_30				TAG	AG	TC	GCATGATAA				
GST_Pistil_31				TCA	TC	TC	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_32	AG			TCA	GA	CT	TGGAGTAACG				
GST_Pollen_20	GA			TCA	GG	CT	TGGAGTAACG				
GST_Pistil_33							GCCCCAAGCC				
GST_Pistil_34				ACT	TC	TC	GGTGAATAT				
GST_Pistil_35						TA	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_36											
GST_Pistil_37						G	GCAACAGA				
GST_Pistil_38	C			TGA	GC	GT	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_39	GG			TTC	TC	TC	GTTCGATGAGC				
GST_Pollen_21											
GST_Pollen_22				TAC	TC	TC	GTTCGATGAGC				
GST_Pistil_40											
GST_Pistil_41				TCA	CG	CT	TGGAGTAACG				
GST_Pistil_42	T			TCA	CG	CT	TGGAGTAACG				
S.indicum_GST_LOC105171922	GC			TCC	TC	AA	AGCGAAGGGG				
N.sylvestris_GST_LOC104227810	GC			TTC	TC	AA	GGCGAATGGT				
P.mume_GST_LOC103332585	GC			TTC	TC	AA	GGCGAATGGT				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	CC			TTC	TC	AA	GGCGAATGGT				
S.tuberosum_GST	G	GGGA	GGG	G	GGG	T	A	T	TC	GT	GTTCGATGAGC
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	GC			TTC	TC	AA	GGCGAATGGT				
P.euphratica_GST_LOC105123341	GC			TTC	TC	AA	GGCGAATGGT				
M.domestica_GST	GC			TTC	TC	AA	GGCGAATGGT				
M.notabilis_GST	T			TTC	TC	AA	GGCGAATGGT				
C.sinensis_GST				TAG	GG	TA	GGCGAATGGT				
Mus_musculus_GST				TCC	TC	GC	AGCGAAGGGG				

GST_Pistil_1	CCGACG	GGGGG	GAA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_2	AAATAC	AGCGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_3	AAATAC	GGCGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_4	CGATAT	AGCGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_5	ACGATG	GGTGGTG	CGAGT	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_6	AGGATG	GATCGGA	GAATG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_7	CCATAG	GATGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_8	AAATAC	GGCGGGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_9	TATGAGG	TACGAGG	AGAGT	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_10	---	GGTGGT	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_11	CCATAC	GATGGGG	GAATG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_12	ATGATG	GGCGGTG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_13	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_14	---	GGTAAAA	GGTGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_15	GTATGGG	ATGGGGG	GATAT	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_16	AAATAG	CACGGGGA	GAATG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_17	AGGGAT	TCCGAA	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_18	TATCGG	TGTAAGAG	TGGGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_19	AGTGG	TAGGGAA	GAATG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_20	GTGAGG	AGCGGGG	GAATG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_21	AAATAC	GGCGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_22	GCAGAA	GATGGGAA	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_23	CCATAG	TGCGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_1	CAATGAG	TGCGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_2	CAATGAG	TGCGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_3	AGGATG	GATCGGA	GAATG	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_4	GCAGAA	AGTGGGA	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_5	AGGATG	GATCGAA	TGGGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_6	AAATAC	GGCGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_7	ATACG	GTGAA	TGGGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_8	ATGATG	GGCGGGA	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_9	AGGATG	GATCGAA	TGGGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_10	GAATGG	TACGAAAA	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_11	CTGCGG	---	---	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_12	AGGCGA	GATAGAG	TGGGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_13	AAATAG	TACCGGA	TCCAA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_14	CTGGCT	AAATAG	TCCAG	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_15	CCATG	GATCGAA	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_16	AGGCGA	GATAGAG	TGGGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_17	AGGATG	GATCGAA	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_24	GAATCG	GGTGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_25	ATCG	AGCGGGG	GAATG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_26	AAATAC	---	---	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_27	AAATCGG	TGGTGAAG	TGCGGAA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_28	AAATCGG	AGGTGAAG	TGCGGAA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_18	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_19	ATGG	CACGGGG	TGAGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_29	AGGCTGG	AGATAGAA	TGCGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_30	AAATAG	TGGGGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_31	---	AAATAG	CCATG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_32	AAATAT	GGGAGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_20	CGATAT	AGCGGGA	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_33	AAATG	GGGAGG	GGTGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_34	TGATAG	GAATCGG	GGTGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_35	GAAGCG	---	---	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_36	---	GTGGAG	GAATG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_37	---	AGCAAAA	AGTGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_38	AGGATG	GATCGAA	TGGGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_39	CCGCTG	AAATAG	TCCAT	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_21	---	GGCGGGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_22	GCAGAA	GATGGAA	GGTGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_40	GTGCGG	ATAGAAA	GTGGT	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_41	CTCCCGA	ATAGGAC	TGGGG	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_42	AAATG	TGGGAA	GAATA	---	---	---	---	---	---
S.indicum_GST_LOC105171922	CCGATG	GATGGAG	GAATA	---	---	---	---	---	---
N.sylvestris_GST_LOC104227810	CCATAG	GATGGGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
P.mume_GST_LOC10332585	CCATAG	TGCGGGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	CCGATG	TGCGGGA	GAATA	---	---	---	---	---	---
S.tuberosum_GST	TGATCG	GAATG	GAATA	---	---	---	---	---	---
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CCGATG	TGCGGGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
P.euphratica_GST_LOC105123341	CCATAC	TGCGGGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
M.domestica_GST	CCATAC	TGCGGGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
M.notabilis_GST	CCATG	GATGGGA	GAATA	---	---	---	---	---	---
C.sinensis_GST	AAATG	GGGAGG	GAATA	---	---	---	---	---	---
Mus_musculus_GST	AGGCTG	GAAGAAA	GAATA	---	---	---	---	---	---



GST_Pistil_1	---	---	---	GA	GTGGCTCC	AAAGCTTC
GST_Pistil_2	---	---	---	GA	GCCCTTCC	GAATACGA
GST_Pistil_3	---	---	---	TA	GCCACTTCC	ATTTGGTT
GST_Pistil_4	---	---	---	TT	CTCCTTCC	TAATGCTC
GST_Pistil_5	---	---	---	CA	TCCTCATCC	TAATGCTC
GST_Pistil_6	---	---	---	CT	GAAAGGGTCC	GAGGATAC
GST_Pistil_7	---	---	---	GA	GCTTAGCTCC	AAAGCTTC
GST_Pistil_8	---	---	---	TA	GCCCTTCC	ATTTGGTT
GST_Pistil_9	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_10	---	---	---	GG	TAATAATCC	ATTTGGTT
GST_Pistil_11	---	---	---	TA	GGTGGTCC	AAAGCTTC
GST_Pistil_12	---	---	---	TA	GCCCTTCC	ATTTGGTT
GST_Pistil_13	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_14	---	---	---	GA	ACCTGATCC	TCATATTC
GST_Pistil_15	---	---	---	GA	GGTA	---
GST_Pistil_16	---	---	---	CT	TTCTGGTACC	CCAGTTTG
GST_Pistil_17	---	---	---	TA	ATGTA	---
GST_Pistil_18	---	---	---	TT	CTTAGTACC	GAAAGTTC
GST_Pistil_19	---	---	---	TC	GTCGCAATTC	AGAGTGA
GST_Pistil_20	---	---	---	TC	CATACGCTCC	AGTTCCCT
GST_Pistil_21	---	---	---	TA	GCCCTTCC	ATTTGGTT
GST_Pistil_22	---	---	---	GG	CCAGATCC	TAATTTCT
GST_Pistil_23	---	---	---	GA	GTGGTCC	AAAGCTTC
GST_Pollen_1	---	---	---	GA	TTTGGCTGA	CTATGCTT
GST_Pollen_2	---	---	---	GA	TTTGGCTGA	CTATGCTT
GST_Pollen_3	---	---	---	CT	GAAAGGGTCC	GAGGATAC
GST_Pollen_4	---	---	---	GG	CCAGATCC	TAATTTCT
GST_Pollen_5	---	---	---	TA	GAAATGATCC	AAAGCTTC
GST_Pollen_6	---	---	---	TA	GCCCTTCC	ATTTGGTT
GST_Pollen_7	---	---	---	AA	---	---
GST_Pollen_8	---	---	---	GG	ATGACCTTCC	TTACATTC
GST_Pollen_9	---	---	---	TT	GAAATGATCC	GAAAGTTC
GST_Pollen_10	---	---	---	TT	CTGATGCTTC	TAATTTCT
GST_Pollen_11	---	---	---	---	---	---
GST_Pollen_12	---	---	---	GA	GGCTAATTC	TCAGTGA
GST_Pollen_13	---	---	---	GA	TCATGATTC	CAACAAAT
GST_Pollen_14	---	---	---	AG	GCCTCTCCA	ATGACTTC
GST_Pollen_15	---	---	---	GG	GGCTGCTCC	TCGGTCTG
GST_Pollen_16	---	---	---	CT	GGCTAATTC	TCAGTGA
GST_Pollen_17	---	---	---	GA	GAAAGGGTCC	GAGGATAC
GST_Pistil_24	---	---	---	GA	AAGGGTACC	AGAAATTC
GST_Pistil_25	---	---	---	GA	TTCTGGTACC	CCAGTTTG
GST_Pistil_26	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_27	---	---	---	GA	GCCCTTCTT	GAAAGTTC
GST_Pistil_28	---	---	---	GA	GCCCTTCTT	GAAAGTTC
GST_Pollen_18	---	---	---	GA	TTCTGGTACC	CCAGTTTG
GST_Pollen_19	---	---	---	GA	TTCTGGTACC	CCAGTTTG
GST_Pistil_29	---	---	---	GG	ATGCTGGAC	ATTTGGTTG
GST_Pistil_30	---	---	---	---	---	---
GST_Pistil_31	---	---	---	TA	AAATGATTC	TCAGTGA
GST_Pistil_32	---	---	---	GG	ATGCTGGAC	GGTAATGA
GST_Pollen_20	---	---	---	TT	CTCCTTCC	TAATGCTC
GST_Pistil_33	---	---	---	TT	TCCCTGCTTC	TTGGTGA
GST_Pistil_34	---	---	---	AA	ACCCTTATG	GAAATGATTC
GST_Pistil_35	---	---	---	GA	GTAATGCTC	GCTGCTG
GST_Pistil_36	---	---	---	CT	GTCCCTAACC	A
GST_Pistil_37	---	---	---	GA	ACATGATCC	AAATGATTC
GST_Pistil_38	---	---	---	TA	GAAATGATTC	GAAATGATTC
GST_Pistil_39	---	---	---	AG	GTCTCTCCN	ATTTGGTT
GST_Pollen_21	---	---	---	TA	GATCGATTC	---
GST_Pollen_22	---	---	---	GG	ATGCTGGAC	ATTTGGTT
GST_Pistil_40	---	---	---	TA	GCTGGTCC	ATTTGGTT
GST_Pistil_41	---	---	---	TA	GCTGGTCC	ATTTGGTT
GST_Pistil_42	---	---	---	TA	GCTGGTCC	ATTTGGTT
S.indicum_GST_LOC105171922	---	---	---	GA	GTGGTACC	AAAGCTTC
N.sylvestris_GST_LOC104227810	---	---	---	AA	GTGGTCC	AAAACTGT
P.mume_GST_LOC103332585	---	---	---	AA	GTGGTACC	AAAACTGT
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	---	---	---	AA	GTGGTACC	AAAACTGT
S.tuberosum_GST	---	---	---	TT	CTCATTAATTC	AAATTTAAT
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	---	---	---	AA	GTGGTACC	AAAACTGT
P.euphratica_GST_LOC105123341	---	---	---	GA	GCTGGTCC	GAAATGATTC
M.domestica_GST	---	---	---	TA	GCTGGTACC	AAAACTGT
M.notabilis_GST	---	---	---	CT	CTCTGGTACC	CAAGTTTG
C.sinensis_GST	---	---	---	GA	GCTGGTCC	ATTTGGTT
Mus_musculus_GST	ACATGCCCC	GACCAAGGCC	AGCTGCTAAA	ATTTGGTCC	AGAAATGAA	



GST_Pistil_1	GGCTTT	GGCTTA	TTCTAAGGGG	
GST_Pistil_2	GGCTTT	G		
GST_Pistil_3		ATGG	CTGGGAAA	
GST_Pistil_4		ATGGT	GTCGAGAG	
GST_Pistil_5		CTTTGA	ATTTGAAAG	
GST_Pistil_6	CACTTC	TATTTT	GAGGAGCTA	
GST_Pistil_7	ACCTTC	GGCCA	TTCTAGGG	
GST_Pistil_8		ATGG	GCTGGGAA	
GST_Pistil_9		ATCTTC	GTTGGAGAG	
GST_Pistil_10		TTTA	CCCATAAG	
GST_Pistil_11	GGCTTC	GGGCA	TTTATGAAG	
GST_Pistil_12		ATCC	CTTGGAAAG	
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14			TG	
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16	AGTTC	ATTC	GACTGAG	
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18	ATCTTC	ATCCA	TCGAAAT	
GST_Pistil_19	ATCTTC	TGCTC	TTTTTGAAGA	TCAGCTGGAT ACCAGTCAAC
GST_Pistil_20	GGCTTC	GATCA	TAATGCTG	
GST_Pistil_21		ATGG	GTTGGGAA	
GST_Pistil_22	GGCTTC	GATGAC	GCCTCAAG	
GST_Pistil_23	GGCTTC	GGCTCA	TTCTAGGGG	
GST_Pollen_1	AAATTC	ATCTTC	TTTTGAAAG	
GST_Pollen_2	AAATTC	ATCTTC	TTTTGAAAG	
GST_Pollen_3	ATTC	CTCTTC	ATTTTGAAG	
GST_Pollen_4	GGCTTC	GATGAC	GCCTCAAG	
GST_Pollen_5	GAATTC	TATTTT	GACGAGCTG	
GST_Pollen_6		ATGG	GTTGGGAA	
GST_Pollen_7	GGCTTC	AAATTC	GCCTGAGT	
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9	GGCTTC	TATTTT	GACGAGCTG	
GST_Pollen_10		ACAA	ATTTAAGAG	
GST_Pollen_11	TATTT	GGGCT	CTAATGGG	
GST_Pollen_12	GAATTC	TGCTC	TTTTGGAAAGG	TCAGCTGGAT ACCAGTCAAC
GST_Pollen_13	GGCTTC	CTCTTC	GAACTCAATTC	
GST_Pollen_14	GGCTTC	GTACCT	TATTTGAG	
GST_Pollen_15	GGCTTC	TGCTTC	CTTCCAGAG	
GST_Pollen_16	GGCTTC	TGCTTC	TTTTGGAAAGG	TCAGCTGGAT ACCAGTCAAC
GST_Pollen_17	CACTTC	TATTTT	GAGGAGCTA	
GST_Pistil_24	GGATTC	ATTTTA	GCTATATA	
GST_Pistil_25	AGATTC	ATTTTA	GACTTGAAG	AA
GST_Pistil_26	GCCTTC	ATCTTC	ATTTGAAA	
GST_Pistil_27	TCCTTCCTAG	ATACGTAAT	ATTTGAAA	
GST_Pistil_28	TCCTTCCTAG	ATACGTAAT	ATTTGAAA	
GST_Pollen_18	AGATTC	ATTTTA	GACTTGAAG	AA
GST_Pollen_19	AGATTC	ATTTTA	GACTTGAAG	AA
GST_Pistil_29	ATCTTC	GAACCT		
GST_Pistil_30	AAATTC	TCTGCT	ATCTGGAA	
GST_Pistil_31	GCCTTC	ATCTTC	TCATAAAA	
GST_Pistil_32		---G	TCATAAAA	
GST_Pollen_20		ATGCA	GTTGAGAG	
GST_Pistil_33	AAATTC	ATCTTC	GTTGAAAG	
GST_Pistil_34	GAATTC	ATCTTC	ATCTGAGAG	
GST_Pistil_35	GAATTC	ATCTTC	GTTGAGAG	
GST_Pistil_36	GGGCT	ATTTA	GTTGACAG	
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38	GGCTTC	TATTTT	GACGAGCTG	
GST_Pistil_39	GGCTTC	CTACCT	TTTTGGG	
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40	GGCTTC	ATCTTC	TCATACAA	
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922	GGCTTC	GGCCA	TTCTAGAA	
N.sylvestris_GST_LOC104227810	GGCTTC	GGACAC	TTCTAGAG	
P.mume_GST_LOC103332585	GGCTTC	GGCCA	TTCTAGAG	
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	GGCTTC	GGCCA	TTCTAGAG	
S.tuberosum_GST	GGCTTC	GCTTC	GCTTTGAA	
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	GGCTTC	GGCCA	TTCTAGAG	
P.euphratica_GST_LOC105123341	GGCTTC	GGCCA	TTCTAGAG	
M.domestica_GST	GGCTTC	GGCCA	TTCTAGAG	
M.notabilis_GST	GGCTTC	GGGCA	TTTAAAAG	
C.sinensis_GST	AAATTC	ATCTTC	GAGGCTGAG	
Mus_musculus_GST	AGATTC	GTCTTC	ACTTGAAG	CTTACAGG TTTCTAG

GST_Pistil_1	CG	GACG	CCC			
GST_Pistil_2	GA	ACAT	GGT			
GST_Pistil_3	GG	GTAC	GAT			
GST_Pistil_4	GG	GAAC	CTC			
GST_Pistil_5	AG	ATAT	CAATC			
GST_Pistil_6	CA	ATCT	TAA			
GST_Pistil_7	AG	GATG	TCC			
GST_Pistil_8	GG	GATC	GAT			
GST_Pistil_9						
GST_Pistil_10	AA	AGTG	CAA			
GST_Pistil_11	AG	GTAA	TCC			
GST_Pistil_12	GA	GCAT	TGAT			
GST_Pistil_13						
GST_Pistil_14	AG	GAGAA	TCC			
GST_Pistil_15	GA	GATGG	CCAC			
GST_Pistil_16	GA	ATAT	CTATG	CTG		
GST_Pistil_17						
GST_Pistil_18	CG	GGAG	TAA			
GST_Pistil_19	CGG	ATCC	GAAT	TCC		
GST_Pistil_20	AA	GTCC	CAATC			
GST_Pistil_21	GG	GTAC	TGA			
GST_Pistil_22	GA	ATTA	TCC			
GST_Pistil_23	AG	GATG	TCC			
GST_Pollen_1	AA	CATG	TATC			
GST_Pollen_2	AG	CTAC	TCTC			
GST_Pollen_3	GA	GTAA	TCC			
GST_Pollen_4	CA	TCCG	TCC			
GST_Pollen_5	GG	GTAC	TGAT			
GST_Pollen_6	GA	ATC	TCC			
GST_Pollen_7	GA	CCAT	TCC			
GST_Pollen_8	CA	TCCG	TCC			
GST_Pollen_9						
GST_Pollen_10						
GST_Pollen_11						
GST_Pollen_12	AGCAAC	CCA	GGAAAT	AACA		
GST_Pollen_13	AG	CAAT	TCTC			
GST_Pollen_14	GA	ATAC	TATC			
GST_Pollen_15	AG	ATGAG	TCC			
GST_Pollen_16	AGCAAC	CCA	GGAAAT	TCC		
GST_Pollen_17	CA	TCTG	TGAT			
GST_Pistil_24	AA	TCTG	TGAT			
GST_Pistil_25	AA	TCCAT	TCC			
GST_Pistil_26	GG	GTAT	TGAT			
GST_Pistil_27	GT	GTCT	TGAAAC			
GST_Pistil_28	GA	GTCT	TGAAAC			
GST_Pollen_18	AA	TCCAT	TCC			
GST_Pollen_19	AA	TCCAT	TCC			
GST_Pistil_29	AG	ATCT	TGAT			
GST_Pistil_30	GA	GATAT	TGAA			
GST_Pistil_31						
GST_Pistil_32	AA	TGGCT	TCTC			
GST_Pollen_20	GG	GATCT	TCTC			
GST_Pistil_33	GA	GGCT	TGGT			
GST_Pistil_34	AA	ATCC	TGAT			
GST_Pistil_35	AG	GGG	TGAT			
GST_Pistil_36						
GST_Pistil_37	CA	TCAAT	TGAT			
GST_Pistil_38	CA	TCCG	TCC			
GST_Pistil_39	GG	ATAC	TGAT			
GST_Pollen_21	AG	CGAA	TGAT			
GST_Pollen_22						
GST_Pistil_40	CA	GATG	TGAT			
GST_Pistil_41						
GST_Pistil_42						
S.indicum_GST_LOC105171922	AG	GATG	TGAT			
N.sylvestris_GST_LOC104227810	AG	GATG	TGAT			
P.mume_GST_LOC103332585	AG	GATG	TGAT			
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	AG	GATG	TGAT			
S.tuberosum_GST	GA	TGGAG	TCTC	AAGG	TCTC	G
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	AG	GATCG	TCC			
P.euphratica_GST_LOC105123341	AG	GATCG	TCC			
M.domestica_GST	AG	GATCG	TCC			
M.notabilis_GST	AG	GATCG	TCC			
C.sinensis_GST	AG	CCCC	TGAT			
Mus_musculus_GST	GG	GATG	TGAT			

GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3				
GST_Pistil_4				
GST_Pistil_5				
GST_Pistil_6				
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8				
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18				
GST_Pistil_19				
GST_Pistil_20				
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4				
GST_Pollen_5				
GST_Pollen_6				
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13				
GST_Pollen_14				
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17				
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25				
GST_Pistil_26				
GST_Pistil_27				
GST_Pistil_28				
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				
GST_Pistil_29				
GST_Pistil_30				
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32				
GST_Pollen_20				
GST_Pistil_33				
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36				
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				
GST_Pistil_39				
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922				
N.sylvestris_GST_LOC104227810				
P.mume_GST_LOC103332585				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648				
S.tuberosum_GST				
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	GGGCTATG	TGATATTC	TGATCAAT	ATTCGCTG
P.euphratica_GST_LOC105123341				
M.domestica_GST				
M.notabilis_GST				
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST				



GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3				
GST_Pistil_4				
GST_Pistil_5				
GST_Pistil_6				
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8				
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18				
GST_Pistil_19				
GST_Pistil_20				
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4				
GST_Pollen_5				
GST_Pollen_6				
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13				
GST_Pollen_14				
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17				
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25				
GST_Pistil_26				
GST_Pistil_27				
GST_Pistil_28				
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				
GST_Pistil_29				
GST_Pistil_30				
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32				
GST_Pollen_20				
GST_Pistil_33				
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36				
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				
GST_Pistil_39				
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922				
N.sylvestris_GST_LOC104227810				
P.mume_GST_LOC103332585				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648				
S.tuberosum_GST				
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	G	A	A	A
P.euphratica_GST_LOC105123341	G	A	A	A
M.domestica_GST				
M.notabilis_GST				
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST				

GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3				
GST_Pistil_4				
GST_Pistil_5				
GST_Pistil_6				
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8				
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18				
GST_Pistil_19				
GST_Pistil_20				
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4				
GST_Pollen_5				
GST_Pollen_6				
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13				
GST_Pollen_14				
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17				
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25				
GST_Pistil_26				
GST_Pistil_27				
GST_Pistil_28				
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				
GST_Pistil_29				
GST_Pistil_30				
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32				
GST_Pollen_20				
GST_Pistil_33				
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36				
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				
GST_Pistil_39				
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922				
N.sylvestris_GST_LOC104227810				
P.mume_GST_LOC103332585				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648				
S.tuberosum_GST				
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	C	G	A	C
P.euphratica_GST_LOC105123341	C	G	A	C
M.domestica_GST				
M.notabilis_GST				
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST				

GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3				
GST_Pistil_4				
GST_Pistil_5				
GST_Pistil_6				
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8				
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18				
GST_Pistil_19				
GST_Pistil_20				
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4				
GST_Pollen_5				
GST_Pollen_6				
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13				
GST_Pollen_14				
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17				
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25				
GST_Pistil_26				
GST_Pistil_27				
GST_Pistil_28				
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				
GST_Pistil_29				
GST_Pistil_30				
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32				
GST_Pollen_20				
GST_Pistil_33				
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36				
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				
GST_Pistil_39				
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922				
N.sylvestris_GST_LOC104227810				
P.mume_GST_LOC103332585				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648				
S.tuberosum_GST				
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CAGCGG	CACCCTA	TCGCGAC	CTTAGTAA
P.euphratica_GST_LOC105123341				
M.domestica_GST				
M.notabilis_GST				
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST				

GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3				
GST_Pistil_4				
GST_Pistil_5				
GST_Pistil_6				
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8				
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18				
GST_Pistil_19				
GST_Pistil_20				
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4				
GST_Pollen_5				
GST_Pollen_6				
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13				
GST_Pollen_14				
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17				
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25				
GST_Pistil_26				
GST_Pistil_27				
GST_Pistil_28				
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				
GST_Pistil_29				
GST_Pistil_30				
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32				
GST_Pollen_20				
GST_Pistil_33				
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36				
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				
GST_Pistil_39				
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922				
N.sylvestris_GST_LOC104227810				
P.mume_GST_LOC103332585				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648				
S.tuberosum_GST	GGCCGAAA	AAAAGAC	AAATGAAAT	GGCCGAAAG
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	GGCCGAAA	AAAAGAC	AAATGAAAT	GGCCGAAAG
P.euphratica_GST_LOC105123341				
M.domestica_GST				
M.notabilis_GST				
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST				



GST_Pistil_1	G G C T T G C C	A A G G T A T C C C	A A T T G T A T A T	G T T G T G T C T C	T T T C G T T T G C
GST_Pistil_2	T T C T T G G T G G	A C A			G A T A T T T C G A
GST_Pistil_3	T G C A T G G T G G	G A T			G T T A T C A G C A
GST_Pistil_4	G G G T G G T G G G	G A T			G A G G T T C A A
GST_Pistil_5	T G G T A T T G G	A A T			A T G G T C A G C C
GST_Pistil_6	G T C - - C T T G	G C A			A C T A A G G A G G
GST_Pistil_7	A A G T A C T T G	A A G			A T G C T C T T G
GST_Pistil_8	T G C A T G G T G G	G A T			G T T A T C A G C A
GST_Pistil_9					
GST_Pistil_10					
GST_Pistil_11	G T C G T T T T C	A A G			A C A T A T T C G T
GST_Pistil_12	T G C A T G G T G G	G A T			G A T A T C A G C A
GST_Pistil_13					
GST_Pistil_14					
GST_Pistil_15	A A A T T T G C C G	A A G			
GST_Pistil_16					
GST_Pistil_17					
GST_Pistil_18	C C T G T G T C A G	G A T T A T C A T G	G A A T G A T G T G	A A T C G T T G T G	T C T T C T C T T G
GST_Pistil_19	A A A A G C T T G A	A A T		C T C C C A	T G C G C T A A T G
GST_Pistil_20					
GST_Pistil_21	T G C A T G C T G G	G A T		- G C A A T A T A A	A A G C T G T G C
GST_Pistil_22	T T G C T A A A T	A C A			
GST_Pistil_23	T G C T A T G T G	A A G			
GST_Pollen_1	T C T T A A A T	A A G			
GST_Pollen_2					
GST_Pollen_3	G T C C T T G - -				G C A G C T A A G G
GST_Pollen_4	T T G T T A A T	A C A			
GST_Pollen_5	G T C G G G T G G G	G G A			A A A G T C G A G T
GST_Pollen_6	T G C A T G G T G G	G A T			G T T A T C A G C A
GST_Pollen_7	T T A A T T T G G	A A G			
GST_Pollen_8	G G C A T G G T G G	G A G			
GST_Pollen_9	C T C G G G T G G G	G G A			A A A G T C G A G T
GST_Pollen_10	T G T T T C G T C C G	G T G			
GST_Pollen_11					
GST_Pollen_12	T G T C T C T G A A	A A A G C T T G A A	C C T C C C A T C A	A G T A T G T T G	G A A C T T T C T T
GST_Pollen_13	G A A G A A G T T C	A C T			T T T T T G A A
GST_Pollen_14	T T G T T T T G G	A G G	T C A A	T G G G T A C C G G	T T T T G A C T T T G
GST_Pollen_15	A G A A T G T C A G	G A G		G A C C G G C A	G C A G C C T T A A
GST_Pollen_16	A A A A G C T T G A	A C C		T C C C A	T C A G C T A T T G
GST_Pollen_17	G T C C T T G G C A				A C T A A G G A G G
GST_Pistil_24	G T G C T A C T G G	A G T			
GST_Pistil_25	T G C T T T C A T A	G A T			G C T A T C C C A T
GST_Pistil_26	C T G G - -				
GST_Pistil_27	A G T G G A T T A A	G G T			
GST_Pistil_28	A G T G G A T T A A	G G T			
GST_Pollen_18	T G C T T T T C A A	G A T			G C T A T C C C A T
GST_Pollen_19	T G C T T T T C A A	G A T			G C T A T C C C A G
GST_Pistil_29	A A C T T C A A G G	A A G			
GST_Pistil_30	A G C A T G G T T G	C A G			
GST_Pistil_31					
GST_Pistil_32	T G C C T G G T G	G G T			G A T A T C T G G G
GST_Pollen_20					
GST_Pistil_33	C G A A T A A C A	C G A			
GST_Pistil_34	T G C A T T A T G	G C C			
GST_Pistil_35	G T A A T A G T G A	A G A			C
GST_Pistil_36					
GST_Pistil_37	T C A A T C G T A				
GST_Pistil_38	G T C G G G T G G G	G G T			A A A G T C G A G T
GST_Pistil_39	T N T T A G G T G A	G N G		C T T C N T C N G	A A G A T T T G T T
GST_Pollen_21	G G G A T C T T G G	A C A			
GST_Pollen_22					
GST_Pistil_40	T T A A A A A T T T	G A T			
GST_Pistil_41	T T G G - -				
GST_Pistil_42					
S.indicum_GST_LOC105171922	C A P C T A C C T G	A A G			T T G C T T T G G
N.sylvestris_GST_LOC104227810	T A A T T A C T T G	A A G			T T G C C T T C G
P.mume_GST_LOC103332585	T A A G T A C C T G	G A G			C T G C C T T C T
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	T A A G T A C A G	G A G			T T G C T T T C T
S.tuberosum_GST	G A C C T C A A G A	A A A T C G T T T T	T C A A A C T T G T A	T T A T T C A A T	G T A C G A C C T A
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	T A A G T A C C C C	G A G			C T G C C T T T C T
P.euphratica_GST_LOC105123341	C A A C T A C C T T	A A G		T T G A A T G	A C A A G A C C T A
M.domestica_GST	T A A G T A C C C C	G A G			C T G C C T T T C T
M.notabilis_GST	T T G T T T T T G	C A G			A C A T T T T C T
C.sinensis_GST	C T T G A G T G G	G A G			- A C A T T T G C
Mus_musculus_GST	C T A G T G T A G	T A G			A A A T T T G A A A

GST_Pistil_1	CCGATCGTC	AT						CTGTAT
GST_Pistil_2	GTCCGTCGTC	TT						GGATGAAA
GST_Pistil_3	ATGGCCATC	TT						GGATGAAA
GST_Pistil_4	CCCGGATGAC	TT						GGATGAAAG
GST_Pistil_5	AGTGACCTAG	CT						TTAAATAAG
GST_Pistil_6	CTGATACCCA	TG						GGAAACCT
GST_Pistil_7	CTGGGGTGC	TT						TCG-GCBA
GST_Pistil_8	ATAGGCCATC	AT						GGATGAAA
GST_Pistil_9								
GST_Pistil_10								
GST_Pistil_11	CATGGATTC	CT						CGTCAAA
GST_Pistil_12	ATAGGCCATC	TT						GGATGAAAG
GST_Pistil_13								
GST_Pistil_14								
GST_Pistil_15	GGTACATTC	CG						GCATGAAA
GST_Pistil_16								
GST_Pistil_17								
GST_Pistil_18	CATGGGTC	CTCACTTC	GGGTGCGCA	GGATAGGGG	TGGATAT			
GST_Pistil_19	CTGGATCTC	TT						TCCTGGG
GST_Pistil_20								
GST_Pistil_21	CTTCGAT	AT						CTAAGAT
GST_Pistil_22								
GST_Pistil_23								
GST_Pollen_1								
GST_Pollen_2								
GST_Pollen_3	AGGCGATTC	CC						TTGGGAAA
GST_Pollen_4								
GST_Pollen_5	CATATCCAC	GT						GTAAAG
GST_Pollen_6	ATAGGCCATC	TT						GGATGAAA
GST_Pollen_7								
GST_Pollen_8								
GST_Pollen_9	CTGATCCAC	AT						GTAAAG
GST_Pollen_10								
GST_Pollen_11								
GST_Pollen_12	CATGGGTC	AT						CTGTCAA
GST_Pollen_13	CCAAATCTT	CC						CAAGAAA
GST_Pollen_14	TCATGATAAC	CG						GTAAAT
GST_Pollen_15	CTGATGCTC	CT						
GST_Pollen_16	CTGGATCTC	CT						TCCTGGG
GST_Pollen_17	CTGATACCCA	TG						GGAACTT
GST_Pistil_24								
GST_Pistil_25	TAAAGCAGCC	TGATAGGCC	CCAGTGGTA	GAGCCGAGC	ACTATCTG			
GST_Pistil_26								
GST_Pistil_27								
GST_Pistil_28								
GST_Pollen_18	TAAAGTAGCC							TCAAAAAC
GST_Pollen_19	GAAAGCAACC	TG						TCAAAAAC
GST_Pistil_29	AACTAGTC	AT						TCAAAAAC
GST_Pistil_30								
GST_Pistil_31								
GST_Pistil_32	GGCGGCCATC	TT						GGATGAAAG
GST_Pollen_20								
GST_Pistil_33								
GST_Pistil_34								
GST_Pistil_35	CTGGGTGTC	TG						TCATAGAT
GST_Pistil_36								
GST_Pistil_37								
GST_Pistil_38	CTGATCCAC	AT						GTAAAG
GST_Pistil_39	CATGGAGCA	CT						CGTCAAA
GST_Pollen_21								
GST_Pollen_22								
GST_Pistil_40								
GST_Pistil_41								
GST_Pistil_42								
S.indicum_GST_LOC105171922	CTGGGATCT	TT						TCGGAAG
N.sylvestris_GST_LOC104227810	AGCGGATCT	TT						TCGGAAG
P.mume_GST_LOC103332585	CATGGGATTA	TT						TCGGAAG
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	CATGGGATTC	TT						TCGGAAG
S.tuberosum_GST	TTTAGGATTC	AA						TCGGAAG
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CATGGGATTC	TT						TCGGAAG
P.euphratica_GST_LOC105123341	CTTAGGATTC	GG						TCGGAAG
M.domestica_GST	CATGGGATTC	CT						TCGGAAG
M.notabilis_GST	CATGGGATTC	AT						TCGGAAG
C.sinensis_GST	CATGGGATTC	CG						TCGGAAG
Mus_musculus_GST	CATGGGATTC	TG						TCGGAAG

GST_Pistil_1	TTTCTCTTGG	TGGCTAATA	TGGTACCC-	-	-
GST_Pistil_2	GTCAAGGAGC	TCAATTAATA	ATC CAACCG	AAAGATGCGA	TCTGRATTCG
GST_Pistil_3	GTGACCAAC	CTATCCCTTA	TCCATTTTGA	GTTGCTCAA	TAGCTTTTAA
GST_Pistil_4	GTAAATGATG	GGAGAACTG	ACAGCCCGCA	CAGAAAGCTT	GAAATTTGGT
GST_Pistil_5	GTGATTTGATC	GTTACTTTTCG	CGGTGGTGA	AGGCGTGGGA	CACTACTGAA
GST_Pistil_6	GCATAGCAAT	C-----	TCCGACGAAA	AA-	-
GST_Pistil_7	ACGATGATG	CAATGGATA	GGATTTTGA	GGTGGGGC	CCAAAGTTAA
GST_Pistil_8	GTATCCATC	TCTTCCCTTA	TACATCATGA	GTTGCATGCA	TATGGTTTAA
GST_Pistil_9	-	-	-	-	-
GST_Pistil_10	-	-	-	-	-
GST_Pistil_11	ACATGGGCTC	TAACTGAGG	TCTAATTG	-	-
GST_Pistil_12	GTCCCTTC	-	-	-	-
GST_Pistil_13	-	-	-	-	-
GST_Pistil_14	-	-	-	-	-
GST_Pistil_15	TTG-	-	-	-	-
GST_Pistil_16	-	-	-	-	-
GST_Pistil_17	-	-	-	-	-
GST_Pistil_18	GCTGCATGA	GCTATCAGC	TCAATCTGTG	AGCTTTTCA	TCCGATATC
GST_Pistil_19	TTTACCCCTG	CATATCTCAGG	AGATTAATTC	TGTCCTTTGG	CGAGTTGAA
GST_Pistil_20	-	-	-	-	-
GST_Pistil_21	GCTCTGTAA	CAACCTTTA	TGTTAGCTTC	TATGCTCTCA	CC-
GST_Pistil_22	-	-	-	-	-
GST_Pistil_23	-	-	-	-	-
GST_Pollen_1	-	-	-	-	-
GST_Pollen_2	-	-	-	-	-
GST_Pollen_3	CTTGCCTTSG	TATCTCAGC	GAAATA	-	-
GST_Pollen_4	-	-	-	-	-
GST_Pollen_5	GCTGTCAT	C-----	TATGATCTGA	GTA-	-
GST_Pollen_6	GTGATCCAC	TCTTCCCTTA	TCCATTTTGA	GTTGCTCAA	TATGGTTTAA
GST_Pollen_7	-	-	-	-	-
GST_Pollen_8	-	-	-	-	-
GST_Pollen_9	GCTCTGAT	C-----	-	-	-
GST_Pollen_10	-	-	-	-	-
GST_Pollen_11	-	-	-	-	-
GST_Pollen_12	ATCTAGGTC	TCTATGTTGG	CGCTGGTGA	TCTCGATTTT	CACCTCTTCA
GST_Pollen_13	CTCATATTTG	ACAGACTTAA	TGTTGACGGC	AAATTC	-
GST_Pollen_14	CGTGCATA	CACGTCCGC	GGGAAAAGG	GCTCGGTAA	TATGATCTCA
GST_Pollen_15	-	-	-	-	-
GST_Pollen_16	TTTATTTTC	C-----	-	-	-
GST_Pollen_17	GCATGGCA	C-----	TCCGACGAAA	AA-	-
GST_Pistil_24	-	-	-	-	-
GST_Pistil_25	GTCAAGTTC	TAGGRTGGAG	CACATTTTCA	TATAGCTGGC	TATAGTGAAT
GST_Pistil_26	-	-	-	-	-
GST_Pistil_27	TCTGGATTT	TCTGGTCCCT	TCTGAGCAAG	TATATTTGAA	TATAGTCAAA
GST_Pistil_28	TCTGGATTT	TCTGGTCCCT	TCTGAGCAAG	TATATTTGAA	TATAGTCAAA
GST_Pollen_18	-	-	-	-	-
GST_Pollen_19	CC-	-	-	-	-
GST_Pistil_29	ATCTCTCTG	C-----	-	-	-
GST_Pistil_30	-	-	-	-	-
GST_Pistil_31	-	-	-	-	-
GST_Pistil_32	ATCTCTCTG	TCTGAGGCT	TCTGATTAAT	TCTGAAAT	TCTGACTTAA
GST_Pollen_20	-	-	-	-	-
GST_Pistil_33	GCGGTGATA	TCTGTCCTTA	TCTTACCTTC	AA-	-
GST_Pistil_34	-	-	-	-	-
GST_Pistil_35	TATGGCTTC	TATATCTGA	TATGGACGG	TATAGTGA	TATAGCTTAA
GST_Pistil_36	-	-	-	-	-
GST_Pistil_37	-	-	-	-	-
GST_Pistil_38	GCTCTGAT	C-----	TATGATCTGA	GTA-	-
GST_Pistil_39	-	-	-	-	-
GST_Pollen_21	-	-	-	-	-
GST_Pollen_22	-	-	-	-	-
GST_Pistil_40	-	-	-	-	-
GST_Pistil_41	-	-	-	-	-
GST_Pistil_42	-	-	-	-	-
S.indicum_GST_LOC105171922	ACATAGGCTC	CAATGGAACT	CGTCTCGCA	GGTGGGCTC	CCAAAGTTAA
N.sylvestris_GST_LOC104227810	ACCAAGGCTC	CAAAAGAGTT	CTTCAATTTGA	GGTGGGCTC	CCAAAGTTAA
P.mume_GST_LOC103332585	ACCAAA	-	ACTGATGGA	AAATATGTA	TGCCGCTGG
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	ACCAATC	-	CCGAGGCA	AAATATGTA	TCTGGAATGG
S.tuberosum_GST	ATCTATCTT	TCTCTTTGGT	TCTCAAGTTC	TCTGATGAG	TCTAGCTTAA
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	ACCGTCTCTG	C-----	TCTCGA	AAATATGTA	TCTGGAATGG
P.euphratica_GST_LOC105123341	TCTGATGAA	TCTCTAACA	TCTGGTGA	TCTGATGAG	TCTAGCTTAA
M.domestica_GST	ACCGTCTCTG	C-----	TCTCGA	AAATATGTA	TCTGGAATGG
M.notabilis_GST	ACCTCTGCTC	TCTCGAGG	TCTCTTTGG	GGTGGGCTC	CCAAAGTTAA
C.sinensis_GST	AGATATGCT	TCTCTTCT	TCTGGGTA	GG-	-
Mus_musculus_GST	TCTCTCTT	TCTCAATTTAA	CAAAATCAG	TCTCTTCT	TCTGGTAA



GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3	ATGATGATC	AAATAAGGA	ATCGCCATATC	ATCCATAGTCA
GST_Pistil_4	AGGCATGCGA	AGATAGGGG	ATCGATAGG	GGGCGAATCA
GST_Pistil_5	ATGATGATC	AAATAAGGA	ATCGCCATATC	ATCCATAGTCA
GST_Pistil_6	ATGATGATC	AAATAAGGA	ATCGCCATATC	ATCCATAGTCA
GST_Pistil_7	ATGATGATC	AAATAAGGA	ATCGCCATATC	ATCCATAGTCA
GST_Pistil_8	ATGATGATC	AAATAAGGA	ATCGCCATATC	ATCCATAGTCA
GST_Pistil_9	ATGATGATC	AAATAAGGA	ATCGCCATATC	ATCCATAGTCA
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18	AGGACTCTG	TGAGTAAAT	ACAAATGCT	CGTAAATGGG
GST_Pistil_19	CTTAACTTC	TCAAAATCG	TCCCCTAT	GGGAAATCC
GST_Pistil_20				
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4				
GST_Pollen_5				
GST_Pollen_6	AGGCTTCTGA	TAAATAA		CCAGGCA
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12	AAATCAATCC	CAATC		GAGAACTAC
GST_Pollen_13				
GST_Pollen_14	ACCAGGAGG	TCCATCAAC	ACAGGCGG	GGTGA
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17				
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				
GST_Pollen_20				
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pollen_23				
GST_Pollen_24				
GST_Pollen_25				
GST_Pollen_26	GATGATCCAG	A		
GST_Pollen_27				
GST_Pollen_28	ATGATGATC	ATTAATTTG	GAG	
GST_Pollen_29	ATGATGATC	ATTAATTTG	GAG	
GST_Pollen_30				
GST_Pollen_31				
GST_Pollen_32	ATGATGATC	TGATGATC	G	
GST_Pollen_33				
GST_Pollen_34				
GST_Pollen_35	GATG			
GST_Pollen_36				
GST_Pollen_37				
GST_Pollen_38				
GST_Pollen_39				
GST_Pollen_40				
GST_Pollen_41				
GST_Pollen_42				
S.indicum_GST_LOC105171922	TGATGATC	TGATGATC	TGATGATC	AGGCATATC
N.sylvestris_GST_LOC104227810	TCCATGATCC	GATCAAAA	TATGATCCCG	TATGATCCCG
P.mume_GST_LOC103332585	GATGCGAAGG	TGATGATC	AAAATGATG	AGTAAATGAG
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	GATGCGAAGG	TGATGATC	AAAATGATG	AGTAAATGAG
S.tuberosum_GST	GATGCGAAGG	TGATGATC	AAAATGATG	AGTAAATGAG
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	GATGCGAAGG	TGATGATC	AAAATGATG	AGTAAATGAG
P.euphratica_GST_LOC105123341	AGGCATATC	TGATGATC	AAAATGATG	AGTAAATGAG
M.domestica_GST	GATGCGAAGG	TGATGATC	AAAATGATG	AGTAAATGAG
M.notabilis_GST	ATGATGATC	TGATGATC	AAAATGATG	AGTAAATGAG
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST	TGATGATC	TGATGATC	TGATGATC	AGGCATATC

GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3	C G C G G C	A A A C T G A A G	A C G C C C G G	A A A C G A A A G
GST_Pistil_4	C A G C T A G A C	G G G G T T A A A		A G A G A G A G
GST_Pistil_5				
GST_Pistil_6	A A G A G G A A	G A A A A A A A G	A A G A A A G G	
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8				
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18	A			
GST_Pistil_19				
GST_Pistil_20				
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3	A A G A G G A A	G A A A A A A A G	A A G A A A G G	
GST_Pollen_4				
GST_Pollen_5	A G G C A A			
GST_Pollen_6				
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13				
GST_Pollen_14				
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17	A A G A G G A A	G A A A A A A A G	A A G A A A G G	
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25				
GST_Pistil_26				
GST_Pistil_27				
GST_Pistil_28				
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				
GST_Pistil_29				
GST_Pistil_30				
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32				
GST_Pollen_20				
GST_Pistil_33				
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36				
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				
GST_Pistil_39				
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922				
N.sylvestris_GST_LOC104227810	A G A C			
P.mume_GST_LOC103332585				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	A A G A A A G	A A G		
S.tuberosum_GST	A C A A A G G G G	G A A A G G G G A G	G A A G C A A G	A A C C A G C C C
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763				
P.euphratica_GST_LOC105123341				
M.domestica_GST				
M.notabilis_GST				
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST	A C C G A C			

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	GGG GGG G	GGGGG G GC	AGG GAAG	AGSAGSAGS AAAACCCGAGC
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_6	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	CGG	CGG	CGG	CGG
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CGG	CGG	CGG	CGG
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----

GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3	AGCC	CCAC	AGCG	GGCC
GST_Pistil_4	AGCC	CCAC	AGCG	GGCC
GST_Pistil_5				
GST_Pistil_6				
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8				
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18				
GST_Pistil_19				
GST_Pistil_20				
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4				
GST_Pollen_5				
GST_Pollen_6				
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13				
GST_Pollen_14				
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17				
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25				
GST_Pistil_26				
GST_Pistil_27				
GST_Pistil_28				
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				
GST_Pistil_29				
GST_Pistil_30				
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32				
GST_Pollen_20				
GST_Pistil_33				
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36				
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				
GST_Pistil_39				
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922				
N.sylvestris_GST_LOC104227810				
P.mume_GST_LOC103332585				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648				
S.tuberosum_GST				
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763				
P.euphratica_GST_LOC105123341				
M.domestica_GST				
M.notabilis_GST				
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST				

GST_Pistil_1				GGAA TTAGG
GST_Pistil_2				ACCG TCCAT
GST_Pistil_3	TTCAAG TTTT	GTAAAT TTTTG	GTG TSCATG	AG TCACTGGC
GST_Pistil_4				AAAT GTAT
GST_Pistil_5				GCTA GTGG
GST_Pistil_6				ATTA ATAGG
GST_Pistil_7				GAAG GTGC
GST_Pistil_8				ATAA ATCAG
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18				GAAT TTAGG
GST_Pistil_19				ACCT GCAG
GST_Pistil_20				AAC TTAGG
GST_Pistil_21				AGAA GCAT
GST_Pistil_22				AGCT CTGG
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				ATTA ATAGG
GST_Pollen_4				AGCT CTGG
GST_Pollen_5				
GST_Pollen_6				AGAA TTAGG
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				AGAA TTAGG
GST_Pollen_10				TGCT ACCG
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				ATTA GCAG
GST_Pollen_13				AGG TCCAT
GST_Pollen_14				GAAT TTAGG
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				AAAT TTAGG
GST_Pollen_17				ATTA ATAGG
GST_Pistil_24				AGTA TTAGG
GST_Pistil_25				
GST_Pistil_26				
GST_Pistil_27				CGAT TTAGG
GST_Pistil_28				CGAT TTAGG
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				AGGG TTAGG
GST_Pistil_29				AGCT TTAGG
GST_Pistil_30				ATTA TTAGG
GST_Pistil_31				ATTA TTAGG
GST_Pistil_32				CTTA TTAGG
GST_Pollen_20				
GST_Pistil_33				AAAT TTAGG
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				TAGG TTAGG
GST_Pistil_36				ATTA TTAGG
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				
GST_Pistil_39				NNCT TTAGG
GST_Pollen_21				AACT TTAGG
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
<i>S.indicum</i> _GST_LOC105171922				CTCT TTAGG
<i>N.sylvestris</i> _GST_LOC104227810				AGGA TTAGG
<i>P.mume</i> _GST_LOC10332585				AAAT TTAGG
<i>F.vesca-vesca</i> _GST_LOC101303648				ATTA TTAGG
<i>S.tuberosum</i> _GST				GAAT TTAGG
<i>P.xbretschneideri</i> _GST_LOC103936763				CAAG TTAGG
<i>P.euphratica</i> _GST_LOC105123341				CGCT TTAGG
<i>M.domestica</i> _GST				CAAG TTAGG
<i>M.notabilis</i> _GST				AAAT TTAGG
<i>C.sinensis</i> _GST				AAAT TTAGG
<i>Mus_musculus</i> _GST				AAAT TTAGG

GST_Pistil_1	A T A G C T C T C G	T T C A A A T C	G T C C C C G T G T	G A T C A A T A T	A	
GST_Pistil_2	G T G A T G G C A G	G A A G T G A A A C	C T A C T T A A C C	T A G T A A T C C T	C	
GST_Pistil_3	A T T A A A G T T C	T G G C C G T G A	A T C T T A A A A C	T A T A T T G G T	C A C G C T A G	
GST_Pistil_4	C G G T A C T C	G T C A A A C C C	A T C T T T G G A C	C G G T A T G T	A	
GST_Pistil_5	A A A T T A G C G A	T T A T T G A G A C	G A T A T T G A T A	A G T G C C T T	A	
GST_Pistil_6	A T G T A A T A A	T G A A A A G A A	T T T A T T A G T T	T G G C T T G C C	A	
GST_Pistil_7	C T G T A A T A A	G G T G G C T A G	C T T G T G G T	A A G G T G A A	A	
GST_Pistil_8	G T T T C G T G C	G T A A G A A T C G	A C C A G T G A T C	G T G T A T C T	G	
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_18	A G T G A G T T C	G A A A G T G C	T A G T A A G A T	T T G A T G G G	A	
GST_Pistil_19	A G G T A G T A C	T G C A C G A G A A	G G C T G G G C A	G C C G A T C C A C	A	
GST_Pistil_20	A A C A G G G G C	A A G G T T T C	C C T A A G A A G A	G A T C G A T A A T	G	
GST_Pistil_21	C T C A A A A T C	G T A A A C T C C	G T C A A G T C C	T T T G A A T T T T	G	
GST_Pistil_22	A A T A G T A G G	T T G G T T T C	A T T T G G G T T	T T C C C T G T T	G	
GST_Pistil_23	C T G G G C A A G C	A G A A A A T A	T C C A C A A G A	C T T C G T T T T	G	
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_3	A T G A A A T A A	T C A A A A G A A	T T T A A T A G T T	T C G C T T G C C	C	
GST_Pollen_4	A A T A G T A G G	T A G G T T T C T	A T T T G G G T T	C A G G T T G C T	G	
GST_Pollen_5	-----	T A A A G T A	T T C A T A G T	-----	-----	
GST_Pollen_6	A T A A A A C G T A	G T C A G G G T C G	A T T A C T G T T C	G T G C T T G C T	G	
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_9	T A C A A G G G C G	G G A A A T C A T G	G C G A T A A A A	G T A T T T C A T	A	
GST_Pollen_10	C A G G G A A G C G	A A G T G A A G A	T T T A T A A T T	C A G T A G	-----	
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_12	A G T A A T T A C	T C A C G G G A A	G G T G A G T A	T C C G A T G T G	A	
GST_Pollen_13	A C A T A T G G G C	T T G C C A T G C	A C C A A G A G T	T T C A C A C C C T	C	
GST_Pollen_14	C C A A G A G G G	A G G A A G A A C C	T C T T G A G G T	T T G G A G G G C	C	
GST_Pollen_15	C A T T G A T G G T	T T A C G G A T G	T T C G T A T G T	G T C G A A T T G C	C	
GST_Pollen_16	G T C T A T G C C	G G C G C T G G A	G A T G C G A T T	T T C A C C C T T	C	
GST_Pollen_17	A T G A A A T A A	T C A A A A G A A	T T A A A T A G T T	T C G C T T G C C	C	
GST_Pistil_24	T G T G A A A G A	T G C T A A G	-----	-----	-----	
GST_Pistil_25	A A A G A A A T A A	G C T A T A A T A	A T T G T A A T T	A G T A T T C A C	A	
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_27	G C G G C A A G G A	C A N G T G G T C C	G C C A A T A G G A	A A A G A G C T T C	A	
GST_Pistil_28	G C G G C A A G A A	C A A G T G T C T	G C C A A T A G G A	A T A G A G C T T C	A	
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_19	G C C T G A G C A C	T T A G T T G T G T	G	-----	-----	
GST_Pistil_29	T G C T G A C T C A	T T T A G A A G G	G T A T G A G A A	A G T T T T C A C	A	
GST_Pistil_30	A A T C A A A G A A	T G C T G G C C C G	C A C G T G A T A A	G T T G T T G T G	A	
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_32	A T T G T A A T G	T T G A A G A G A	G A A A T G G G A A	C A G T G T G A C	T	
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_33	C T C A G G A G T G	T C T G A A T C G T	G T T G C C T T G T	G T S A A T G T C T	G	
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_35	A G T T T G A G T C	T G A G T T G T G	C T T A C T T A T	C G T G G G T T G	A	
GST_Pistil_36	C T G G A A	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pollen_21	G C A G G G T T T T N	G A C N A A G G T G	A T C N G T G G G T	T N A A A	-----	
GST_Pollen_22	G G G C A A G G G G	T G G C T G G T G G	G A	-----	-----	
GST_Pistil_40	-----	-----	A	G T A A A T G C C T	C A A A G A T T G C	A
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----	-----	
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----	-----	
S.indicum_GST_LOC105171922	G T G C G G T G T	T G C G T G A A A	A T T G T A G T G T	A A T T T T G C C	A	
N.sylvestris_GST_LOC104227810	A T S A T G A A A T	A T C A A T G T A T	C T C G T A A G T T	C T A A A A G T T G	T	
P.mume_GST_LOC103332585	A T G T A A G G G G	T G A G T G G T A A	G C A T G C T C A	T G T G G A T T C	T	
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	G T G T A G T C	T G G G T A G A	G T G C A A A C T	G G G T G G C T A A	A	
S.tuberosum_GST	G A R T C C T G A G	T C A A G G C T A	T T G C A A T A	C A T A G C T C A C	A C T A T C C G	
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	T G T A A T A G	G T T T G A A G A C	A T A T G C A A G T	C A G C T G G G A	A	
P.euphratica_GST_LOC105123341	A C C T A C T A	C T A T T G C C C	A T A C T G G C A T	A T G T A T G G G	G	
M.domestica_GST	T G T A A T A T	G A T T A A A G A C	A T A T C C A A G T	C A T T T G G G A	-----	
M.notabilis_GST	A S T C G A C C C C	A A A A T T C A G	G T S A T G G C T T	T T T C C C T C C C	G	
C.sinensis_GST	A T T G G A G T A G	-----	-----	-----	-----	
Mus_musculus_GST	T G A T G C A A A A	A T A A T G T T T C	C T T A T G G A G A	G T G C C C T T C C	T	

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	CGAGCGAC	GGCCCA	AAGSCAA	CCAGGSC
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_6	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	CCAGGGCA	CCAGGCTA	CCAGGACC	CCAGGAAA
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CCAGGCTA	CCAGGCTA	CCAGGAAA	CCAGGCTA
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	CAAGCAAGGA	CTAAAGCCAC	GGAAAGAGGG	ACTGGTGGCA
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	ACACAGAGGG
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	AAATCA
GST_Pistil_6	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	CTGATGGG	CTGAGTGG	AGCCCAAAA	CTGACCCG
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	-----	-----	-----	CTGGTCAAA
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----G



GST_Pistil_1				A C	AG A T G C C	CTAA A T T G
GST_Pistil_2					AA T T C T T A C	T T G C T T A G A T
GST_Pistil_3	AA C G G G G	C T T T G C	A A G T G G C A C		AA T T C A A C G	T C B A A G A C T
GST_Pistil_4	CCC A C C C C	CC C C G G G G	G C C C C A T A G		A C C G T C C C G	A G A A T T C T A G
GST_Pistil_5					AA T C T T G G C A	A G A T T G A A C
GST_Pistil_6					A C T C T T A C	G A A T T C C A C
GST_Pistil_7					A A C C G T A C	C C A T T A A T A
GST_Pistil_8					A A G T C G T A T	G T G G A T C C
GST_Pistil_9						
GST_Pistil_10						
GST_Pistil_11						
GST_Pistil_12					A C	AG T C C C C C
GST_Pistil_13						CC A A T T C T A
GST_Pistil_14						
GST_Pistil_15						
GST_Pistil_16						
GST_Pistil_17						
GST_Pistil_18						A T G G T G A T
GST_Pistil_19						T C G A T T G C T
GST_Pistil_20					A C	AA T T C G G G
GST_Pistil_21					C A	CC A T T T T C
GST_Pistil_22						CC A T T C T A T
GST_Pistil_23						A A G T C A A T T
GST_Pollen_1						A C C T G G C A T
GST_Pollen_2						AG C T T T C T
GST_Pollen_3						GG G A T C T
GST_Pollen_4						AG T C T C C A C
GST_Pollen_5						G A T C T G G C T
GST_Pollen_6						T T G G T T G A
GST_Pollen_7						A A G A C T T A
GST_Pollen_8						A A G C T T A
GST_Pollen_9						T T G G T T C
GST_Pollen_10						G T G T T C
GST_Pollen_11						A G C T T A G C C
GST_Pollen_12						T C A T T T C
GST_Pollen_13						AA T T C G A G A
GST_Pollen_14						A T T G T A T T
GST_Pollen_15						C T T C G G G A A
GST_Pollen_16						A G G G T C G A T
GST_Pollen_17						G G G A A T G C A
GST_Pistil_24						AA T T C A A T C
GST_Pistil_25						CC A T T T A T C
GST_Pistil_26						A C T C T T A C
GST_Pistil_27						G A A T T C C A C
GST_Pistil_28						A A A T T G A T
GST_Pollen_18						T T G G T T G C
GST_Pollen_19						A A T T C T T T C
GST_Pistil_29						A A T T C T T T C
GST_Pistil_30						G T G G C T T G
GST_Pistil_31						
GST_Pistil_32						
GST_Pollen_20						
GST_Pistil_33						
GST_Pistil_34						
GST_Pistil_35						
GST_Pistil_36						
GST_Pistil_37						
GST_Pistil_38						
GST_Pistil_39						
GST_Pollen_21						
GST_Pollen_22						
GST_Pistil_40						
GST_Pistil_41						
GST_Pistil_42						
S.indicum_GST_LOC105171922	GC A A T G T C G	CCC G A A T T A	T A A A A A C A		T G T T G T G T	A T G A T A G T
N.sylvestris_GST_LOC104227810					T G G A T C T C C	T T G T C T G C
P.mume_GST_LOC103332585					A A G T T G A C T	G G G T T A T T C C
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648						T T A G C
S.tuberosum_GST	A C T A G G T A	G A C A T T C T A	T C A A C C C A A T		G T T G G G A T G	G T G A G T C A T G
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763						A A A C T T G G G T
P.euphratica_GST_LOC105123341						T A A T T C C C G T
M.domestica_GST						G T T T G T G C C T
M.notabilis_GST						G A G G T T A T C
C.sinensis_GST						A A A C T T G A C T
Mus_musculus_GST	ACC A A A T A C T	G A C A G T T C G	T G C T A C T C A		A A C T T T G G G C	T T G G G T T A T T

GST_Pistil_1	CTGTTAATAAT	GTAAATTC	TCCCTTGTG	TTCCTTGG	GTTATGCTG
GST_Pistil_2	GCAGTATAT	TATCG			
GST_Pistil_3	GCAGGGA	AAAGAAAG	TAGCACC	ATTSAAATAT	CCAAAG
GST_Pistil_4	TGCGAATG	AAAGTACTG	AAAGTAAATG	TGAAATTAAG	AAAGGAGTCC
GST_Pistil_5	GCTGAATA	AAACAGTCTG	ACAGCTCTAC	GGTATATCC	
GST_Pistil_6	TGTTAATA	AAATAA-AA	AAAGAAATTA	ATAA	TATGGCTCTG
GST_Pistil_7	TTCCTTCTG	AAAGTCTGA	GAAGATCA	GGAACTTCTG	TATGGCTCTG
GST_Pistil_8	TTCAGGCTT	GGGTAAGCA	TTCAGTCTG	TCAATGCTGA	TTCAGTCTG
GST_Pistil_9					
GST_Pistil_10					
GST_Pistil_11					
GST_Pistil_12	CCAAAGCC	GGATACTTA	CCATG		
GST_Pistil_13					
GST_Pistil_14					
GST_Pistil_15					
GST_Pistil_16					
GST_Pistil_17					
GST_Pistil_18	CGGAAATG	GAACCAAGAA	AGGTTCCTGA	TAAAGTGG	GCCGTTCGAA
GST_Pistil_19	CTCACTTTC	CAACCAATAA	CCAGCTTCTG	GTGCTTCTG	AAAGATTAAG
GST_Pistil_20	CTGAACTGG	CAACCAATAA	CAAGCTTCTG	TGAAGCAATG	TCTGGTCCAT
GST_Pistil_21	TTCAGCTGA	TATCGGATGG	AACTCAATGA	CATAA	
GST_Pistil_22	GTCCGATG				
GST_Pistil_23	TCCAGAAAC	AAAAGGGCA	AAAGGACCG	TGATGCTGG	TATGGTGAAT
GST_Pollen_1					
GST_Pollen_2					
GST_Pollen_3	TGTAATAA	AAATAAGAA	AAAATAATA	ATAATTTG	CTGCTCTG
GST_Pollen_4	TTCAGGCTG	TGTTCTGG	ATGATTAATA	TGGTCTG	AAAGATTAAG
GST_Pollen_5	TGACCTTGG	AGGTCTCTGA	GACGAGCA	ATAAGTA	
GST_Pollen_6	TTCAGTCTG	TTCGG			
GST_Pollen_7	TTCAGAAAT				
GST_Pollen_8	G				
GST_Pollen_9	TGACCTTGG	AGGTCTCTGA	GACGAGCA	ATAAGTCTG	TTCAGTCTG
GST_Pollen_10					
GST_Pollen_11					
GST_Pollen_12	CCCCCTGG	TCTCACAC	GCTGGTGGG	ATCCCTTGG	GCTGATCTA
GST_Pollen_13	TATGGGTTG	TAGGTAGTA	TCTGGCAATG	TATATAATG	CGAGATTTAA
GST_Pollen_14	TTCAGTCTG	GATCTGCTG	AGAGCTTAA	TATG	
GST_Pollen_15	TCTGAATAA	TGGATTAAG	CTTCTCTG	CTG	
GST_Pollen_16	TTCACACAC	CCAAATCAAT	TTCATAGTCTG	ACTCTCA	
GST_Pollen_17	TCTGAATAA	AAATAAGAA	AAAATAATA	ATAATTTG	CTGCTCTG
GST_Pistil_24	TTCAGTCTG	GAT			
GST_Pistil_25	ACTGGATTA	TATATAAGT	TTCAGTCTG	CTTATGCTAA	ATAATTAAGT
GST_Pistil_26					
GST_Pistil_27	TGCAATGAT	GGTGAAGAA	GGATTCGAA	TTCGGATTC	TATGGGGTTC
GST_Pistil_28	TGCCAT				
GST_Pollen_18					
GST_Pollen_19	TTCAGTCTG	TGGCTGCTG	GAAGTCTG	CCGGAAG	
GST_Pistil_29	CTT				
GST_Pistil_30	GGG				
GST_Pistil_31					
GST_Pistil_32	CTTAAATTA	TAGGTCTG	TTCGGATTC	CACAAAAG	
GST_Pollen_20					
GST_Pistil_33	AAATAAGAA	GGGCTAGG	GCTG		
GST_Pistil_34	TTCAGTCTG				
GST_Pistil_35	TCAAAATTA	TTCAGTCTG	TCAAGTCTG	TGGTCTG	TCTGCTG
GST_Pistil_36					
GST_Pistil_37					
GST_Pistil_38					
GST_Pistil_39	TNCCCTTCTG	NGGNNGGGG	NNCCCCNNG	GNCCCNCC	CCGGGGGGG
GST_Pollen_21					
GST_Pollen_22					
GST_Pistil_40					
GST_Pistil_41					
GST_Pistil_42					
S.indicum_GST_LOC105171922	TCTGGGTTG	TTCAGTCTG	TGAGCTCTG	TGGAATTTGG	ATGGAAATTA
N.sylvestris_GST_LOC104227810	CTTATGCTG	AAATAAGAA	GCTCTCTG	AAACCTCTG	TATGCTAAATG
P.mume_GST_LOC103332585	TTCAGTCTG	AAATAAGAA	TTCAGTCTG	ATAATTAAG	TTCAGTCTG
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	TTCAGTCTG	AAATAAGAA	TTCAGTCTG	ATAATTAAG	TTCAGTCTG
S.tuberosum_GST	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG
P.euphratica_GST_LOC105123341	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG
M.domestica_GST	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG
M.notabilis_GST	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG
C.sinensis_GST	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG
Mus_musculus_GST	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG	TTCAGTCTG

GST\_Pistil\_1  
 GST\_Pistil\_2  
 GST\_Pistil\_3  
 GST\_Pistil\_4  
 GST\_Pistil\_5  
 GST\_Pistil\_6  
 GST\_Pistil\_7  
 GST\_Pistil\_8  
 GST\_Pistil\_9  
 GST\_Pistil\_10  
 GST\_Pistil\_11  
 GST\_Pistil\_12  
 GST\_Pistil\_13  
 GST\_Pistil\_14  
 GST\_Pistil\_15  
 GST\_Pistil\_16  
 GST\_Pistil\_17  
 GST\_Pistil\_18  
 GST\_Pistil\_19  
 GST\_Pistil\_20  
 GST\_Pistil\_21  
 GST\_Pistil\_22  
 GST\_Pistil\_23  
 GST\_Pollen\_1  
 GST\_Pollen\_2  
 GST\_Pollen\_3  
 GST\_Pollen\_4  
 GST\_Pollen\_5  
 GST\_Pollen\_6  
 GST\_Pollen\_7  
 GST\_Pollen\_8  
 GST\_Pollen\_9  
 GST\_Pollen\_10  
 GST\_Pollen\_11  
 GST\_Pollen\_12  
 GST\_Pollen\_13  
 GST\_Pollen\_14  
 GST\_Pollen\_15  
 GST\_Pollen\_16  
 GST\_Pollen\_17  
 GST\_Pistil\_24  
 GST\_Pistil\_25  
 GST\_Pistil\_26  
 GST\_Pistil\_27  
 GST\_Pistil\_28  
 GST\_Pollen\_18  
 GST\_Pollen\_19  
 GST\_Pistil\_29  
 GST\_Pistil\_30  
 GST\_Pistil\_31  
 GST\_Pistil\_32  
 GST\_Pollen\_20  
 GST\_Pistil\_33  
 GST\_Pistil\_34  
 GST\_Pistil\_35  
 GST\_Pistil\_36  
 GST\_Pistil\_37  
 GST\_Pistil\_38  
 GST\_Pistil\_39  
 GST\_Pollen\_21  
 GST\_Pollen\_22  
 GST\_Pistil\_40  
 GST\_Pistil\_41  
 GST\_Pistil\_42  
 S.indicum\_GST\_LOC105171922  
 N.sylvestris\_GST\_LOC104227810  
 P.mume\_GST\_LOC103332585  
 F.vesca-vesca\_GST\_LOC101303648  
 S.tuberosum\_GST  
 P.xbretschneideri\_GST\_LOC103936763  
 P.euphratica\_GST\_LOC105123341  
 M.domestica\_GST  
 M.notabilis\_GST  
 C.sinensis\_GST  
 Mus\_musculus\_GST

GST_Pistil_1	CGATTTC	ATCTTGA	GAAATGGAA	AGGTGGCCA	TTTAACT---
GST_Pistil_2					
GST_Pistil_3	AACCCCTG	CCAAACCSG	AAACACCA	CCATCAAG	CAATAGGAC
GST_Pistil_4	AAGGATGCC	ACATGCAT	TAGCCTGAA	TAATAGG	ACCGTGGCC
GST_Pistil_5	CTTTCCTTTC	C---			
GST_Pistil_6					
GST_Pistil_7					
GST_Pistil_8					
GST_Pistil_9					
GST_Pistil_10					
GST_Pistil_11					
GST_Pistil_12					
GST_Pistil_13					
GST_Pistil_14					
GST_Pistil_15					
GST_Pistil_16					
GST_Pistil_17					
GST_Pistil_18					
GST_Pistil_19	TCCCTAA	CAATCTGC	GAAATAAT	CAAGCCGAG	GCATGAAAC
GST_Pistil_20					
GST_Pistil_21					
GST_Pistil_22					
GST_Pistil_23					
GST_Pollen_1					
GST_Pollen_2					
GST_Pollen_3					
GST_Pollen_4					
GST_Pollen_5					
GST_Pollen_6					
GST_Pollen_7					
GST_Pollen_8					
GST_Pollen_9					
GST_Pollen_10					
GST_Pollen_11					
GST_Pollen_12					
GST_Pollen_13					
GST_Pollen_14					
GST_Pollen_15					
GST_Pollen_16					
GST_Pollen_17					
GST_Pistil_24					
GST_Pistil_25					
GST_Pistil_26					
GST_Pistil_27	CGTCTGGTGG	TCCGTGGT			
GST_Pistil_28					
GST_Pollen_18					
GST_Pollen_19					
GST_Pistil_29					
GST_Pistil_30					
GST_Pistil_31					
GST_Pistil_32					
GST_Pollen_20					
GST_Pistil_33					
GST_Pistil_34					
GST_Pistil_35					
GST_Pistil_36					
GST_Pistil_37					
GST_Pistil_38					
GST_Pistil_39					
GST_Pollen_21					
GST_Pollen_22					
GST_Pistil_40					
GST_Pistil_41					
GST_Pistil_42					
S.indicum_GST_LOC105171922					
N.sylvestris_GST_LOC104227810					
P.mume_GST_LOC103332585					
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648					
S.tuberosum_GST					
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	CGTCTGTA	TCCCTCAG	CCCCGGT	GGTCTGTTG	ATTGGGACT
P.euphratica_GST_LOC105123341					
M.domestica_GST					
M.notabilis_GST	CCCCCTGTA	ACCGCCCT	AACTG---		
C.sinensis_GST					
Mus_musculus_GST	AGGAGGGGCT	ATCAATATAC	CCAGCCACAG	AACTCTGAT	TTCGTAAAT

GST_Pistil_1				
GST_Pistil_2				
GST_Pistil_3				
GST_Pistil_4	G G C C C A	G C C C C A C	A A G G C C C A	A G C A G S S C
GST_Pistil_5	A G C A T T G G	G A T T C C		T C S T G C T G C
GST_Pistil_6				
GST_Pistil_7				
GST_Pistil_8				
GST_Pistil_9				
GST_Pistil_10				
GST_Pistil_11				
GST_Pistil_12				
GST_Pistil_13				
GST_Pistil_14				
GST_Pistil_15				
GST_Pistil_16				
GST_Pistil_17				
GST_Pistil_18				
GST_Pistil_19	C T T G T T G T C	A C A A A T T G C G	A G G G T T C T A G	T C G C A A C C A
GST_Pistil_20				A A T G G G A T G G
GST_Pistil_21				
GST_Pistil_22				
GST_Pistil_23				
GST_Pollen_1				
GST_Pollen_2				
GST_Pollen_3				
GST_Pollen_4				
GST_Pollen_5				
GST_Pollen_6				
GST_Pollen_7				
GST_Pollen_8				
GST_Pollen_9				
GST_Pollen_10				
GST_Pollen_11				
GST_Pollen_12				
GST_Pollen_13				
GST_Pollen_14				
GST_Pollen_15				
GST_Pollen_16				
GST_Pollen_17				
GST_Pistil_24				
GST_Pistil_25				
GST_Pistil_26				
GST_Pistil_27				
GST_Pistil_28				
GST_Pollen_18				
GST_Pollen_19				
GST_Pistil_29				
GST_Pistil_30				
GST_Pistil_31				
GST_Pistil_32				
GST_Pollen_20				
GST_Pistil_33				
GST_Pistil_34				
GST_Pistil_35				
GST_Pistil_36				
GST_Pistil_37				
GST_Pistil_38				
GST_Pistil_39				
GST_Pollen_21				
GST_Pollen_22				
GST_Pistil_40				
GST_Pistil_41				
GST_Pistil_42				
S.indicum_GST_LOC105171922				
N.sylvestris_GST_LOC104227810				
P.mume_GST_LOC103332585				
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648				
S.tuberosum_GST				
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	A A T C A A G A G	C T T C T C A A	T C T A G G C C T C	A T C T A G T G C
P.euphratica_GST_LOC105123341				T T G G G T T G C
M.domestica_GST				
M.notabilis_GST				
C.sinensis_GST				
Mus_musculus_GST	A A T G T A T T A T	A T A C T T A G G	A T T C C T A A T A	C T G A A C T G G A

GST_Pistil_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_3	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_4	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_5	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_6	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_23	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_1	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_2	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_3	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_4	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_5	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_6	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_7	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_8	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_9	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_10	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_11	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_12	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_13	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_14	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_15	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_16	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_17	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_24	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_25	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_26	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_27	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_28	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_18	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_19	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_29	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_30	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_31	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_32	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_20	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_33	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_34	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_35	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_36	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_37	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_38	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_39	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_21	-----	-----	-----	-----
GST_Pollen_22	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_40	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_41	-----	-----	-----	-----
GST_Pistil_42	-----	-----	-----	-----
S.indicum_GST_LOC105171922	-----	-----	-----	-----
N.sylvestris_GST_LOC104227810	-----	-----	-----	-----
P.mume_GST_LOC103332585	-----	-----	-----	-----
F.vesca-vesca_GST_LOC101303648	-----	-----	-----	-----
S.tuberosum_GST	-----	-----	-----	-----
P.xbretschneideri_GST_LOC103936763	-----	-----	-----	-----
P.euphratica_GST_LOC105123341	-----	-----	-----	-----
M.domestica_GST	-----	-----	-----	-----
M.notabilis_GST	-----	-----	-----	-----
C.sinensis_GST	-----	-----	-----	-----
Mus_musculus_GST	-----	-----	-----	-----



1. Anexo 1: Alineamientos de secuencias nucleotídicas de los genes de interés.
2. **Anexo 2: Secuencias completas (nucleotídicas y aminoacídicas) de los genes de interés.**
3. Anexo 3: Árbol filogenético de secuencias aminoacídicas de GR.
4. Anexo 4: Análisis LC-MS del contenido en glutatión y análisis ratiométrico de GSH/GSSG durante el desarrollo floral en mutantes *pad2* y *clt*.





**2.1. Secuencia nucleotídica (gris) y aminoacídica (rojo) de la  $\gamma$ -ECS del polen de olivo. En la primera, los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TGA) aparecen en **negrita**.**

**atg**gaattagaattctcgttctgctgtgtacaaaatccacagctcaaaggcccttccttaa  
M E L E F S F C W Y K I H S S K A L P -  
atcctgtgtatgcttgatttctccagctttaagggcatgggtgctgatgtcccaggctggt  
I L C M L D F S Q L - G M V L M S Q A G  
tcatacaatacattcattacaaaataatacagtgcaaagttcgcataataatgtggttcgt  
S S Q Y I H Y K I I Q C K V R Y N V V R  
agcattgccagtaacatggcagaatccaagaagaaggaatTTTTGGTTCAGGTCGATCT  
S I A S N M A E S K K K E F F G S G R S  
tcgtggaattccttgaaggtgattcgaatatgaatttagatgggtgtgttataggaggg  
S W N S L K V I R N M N L D G V V I G G  
agaagaggcaatcaagtaattgtttttgcaagtcctcctacggaagatgccgtcattgct  
R R G N Q V I V F A S P P T E D A V I A  
actgagccattgacgaaagaagatcttgttaggttacctagcgtctggttgcaagcccaag  
T E P L T K E D L V G Y L A S G C K P K  
gaaaaatggagatagggactgaacatgaaaagtttgatttagtttagaacattacga  
E K W R I G T E H E K F G F E F R T L R  
cccatgaagatgaacaaatagctgagcttcttaatggtatctctgagcagatttgattgg  
P M K Y E Q I A E L L N G I S E R F D W  
gataaaataatggaaggtgacaaaattattggactcaaacagggaaagcaaagcatatca  
D K I M E G D K I I G L K Q G K Q S I S  
ctggagcctggtggccagtttgagcttagtggtgcacctcttgaaactttgcatcaaact  
L E P G G Q F E L S G A P L E T L H Q T  
tgtgctgaagtgattcgcacatctttaccaggttaaggctggttcggaggaggttagggatt  
C A E V N S H L Y Q V K A V A E E L G I  
gggttcttgggaattggattccagccaaaatgggctcttaaagatatacctgtgatgcc  
G F L G I G F Q P K W A L K D I P V M P  
aagggaagatacagagattatgagaaattacatgcccagggtgggtctcttggacttgat  
K G R Y E I M R N Y M P K V G S L G L D  
atgatgttccgaacatgcactgttcaggtgaatctggatttcagctctgaagttgatatg  
M M F R T C T V Q V N L D F S S E V D M  
ataaagaagtttcgagctggtcttgccttacagcctgtagccacagcattgtttgtaac  
I K K F R A G L A L Q P V A T A L F A N  
tcgcctttcactgaagggaaaccaaattggttatctcagcatgagaagccaaatttgact  
S P F T E G K P N G Y L S M R S Q I W T  
gatactgataataaccgctctgggatgcttccatttgtttttgatgattcttttgggttt  
D T D N N R S G M L P F V F D D S F G F  
gagcaatatgtagattatgctctcgatgttccaatgtactttgcatatcggaagaaaagn  
E Q Y V D Y A L D V P M Y F A Y R K K X  
tatattgattgtgctggattgtctttccgggattttatggctggtaaacttccgtgtctt  
Y I D C A G L S F R D F M A G K L P C L  
cctggtgaatatccaaacctcaatgattgggaaaatcatctgacaacaatatttccagag  
P G E Y P N L N D W E N H L T T I F P E  
gtcaggccttaaaagatatttggagatgagaggtgctgatggaggaccttggaggaggctt  
V R L K R Y L E M R G A D G G P W R R L  
tgtgcctgctgcatatttgggttaggtctcttgtatgatgaaatctccttgcaaaatgtt  
C A L P A F W V G L L Y D E I S L Q N V  
gtggacatgacagctgattggactcgagaagaagacagatgtaaggaatgcggtacca  
V D M T A D W T R E E R Q M L R N A V P  
aagtatggctgcagactccatttcgagatggcctgctgaagcatgtcgcacaagacgtt  
K Y G L Q T P F R D G L L K H V A Q D V  
gtgaagttggcgaaggatggccttggaaagaagaggctttaaggaacaggatttctaata  
V K L A K D G L E R R G F K E T G F L N  
gaagtcactgaggtggctagaacaggtgtaacatcagccgaaaagctcctcgaattgtac  
E V T E V A R T G V T S A E K L L E L Y  
catgagaagtggggagaatngtggatcctgtttttgaagagctgctttactgaggttgg  
H E K W G R X V D P V F E E L L Y - G W  
tattcactcgatgctccccttcgcatggctgagacatgtcacatggttcactgggactct  
Y S L D A P L R M A E T C H M V H W D S  
cttaactatcaaacttgtctaacgagctgaatag  
L N Y Q T C L T T - -

**2.2. Secuencia nucleotídica (gris) y aminoacídica (rojo) de la GS2 del polen de olivo. En la primera, los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAG) aparecen en negrita.**

ctttgaaaagcagcggagtgaagaa**atg**gagaccataaaagaaattctatgagccttacc  
L K S S G V E E M E T H K R N S M S L I  
tttgatcctcaciaaattgatcaccaattgcttcagaaaatggaatatgatgccttcta  
F D P H K I D H Q L L Q K M E Y D A A L V  
tggagttccctcatggccttcttgggtgggacacgaattcactgagatcaggaagagt  
W S S L H G L L V G D T N S L R S G R V  
cctgggtgtgggcatgatcattgacacattttctttgctacatgcccatttccctgaaagt  
P G V G M I H A P F S L L P M P F P E S  
cactggaacaagcttgccaaatagctcccattttcaatgaaactcgtggatcgcgtgagt  
H W K Q A C Q I A P I F N E L V D R V S  
ttggatggaataatcctacagactcgtatccagaacgaagaaagtggatgcctttact  
L D G K F L Q D S L S R T K K V D A F T  
tccagactcctggaaattccaagatgtagatgccaacaaaatagaggaataatcgt  
S R L L E I H S K M L D A N K I E E I R  
ttaggactacatcgttcagactacatgctggatgaacaaactaaattacttctccaaata  
L G L H R S D Y M L D E Q T K L L L Q I  
gagctcaacacaatttcatcttccatttccaggcgtgagcagcttggtagtgaactcagc  
E L N T I S S S F P G L S S L V S E L H  
aggagcttacttcatcaatataaacaacacactcgcactaaatccagaaaggattccccaa  
R S L L H Q Y K Q H L A L N P E R I P Q  
aacagtctgttactaagtgtgctgaagcattgtctaagcgtggagtgaatataataac  
N S A V T K F A E A L S K A W S E Y N N  
ccaaggcagtagttatggttgggtacaaactgaagaacgaaatatgatgatcaacac  
P R A V V M V V V Q T E E R N M Y D Q H  
tggcttgtacaacggtgaaggaagatatcaagttacaagtattagaagacattggcg  
W L C T T L K E R Y Q V T S I R K T L A  
gaaattgatgccttggggagcttctgcccagatggaacacttgttggatggtgaagca  
E I D A L G E L L P D G T L V V D G E A  
gttgccgctgatatatttagagctgggtatgcaccaagtgattatccttcagaatcagaa  
V A V V Y F R A G Y A P S D Y P S E S E  
tgagagcttaggctactgatggagcagtcacgccaataaagtgccttcaattgcgtac  
W R A R L L M E Q S S A I K C P S I A Y  
catttagctggcaccaagaagattcaacaagaacttgccaaacccaatgtacttgaaga  
H L A G T K K I Q Q E L A K P N V L E R  
tatcttgaacaaagatgatattgtcaaattacgaaaatgctttgctgggttatggagt  
Y L E N K D D I V K L R K C F A G L W S  
ctggagactccaacatcgtaataatgatgctattgagaacactggattatattgtgatgaag  
L E D S N I V N D A I E K P G L Y V M K  
ccccaaagagaaggaggaggggaacaatatctatggtgatgatgtgagagagactcactt  
P Q R E G G G N N I Y G D D V R E T L L  
agaatagaaaaggaaggtcaaacgaaaatgcagcttatattcttatgcagagaattttt  
R I E K E G S N E N A A Y I L M Q R I F  
cctactctttctcctgccatttcaatgcgacaaggcattttctcaaaaagataacgtcata  
P T L S P A I L M R Q G I S Q K D N V I  
tcagaacttggcgtatatgcagcatatttaaggaacaagacaaaagtgataataaatgag  
S E L G V Y A A A Y L R N K T K V I I N E  
gaatctgggtacttgggtgggacgaaggtgtcttccctcaaatgaaggcggagtgttggct  
E S G Y L L R T K V S S S N E G G V V A  
ggcttccggtgttatggatagcatctatttagtataatttacatgattgcattttgcacat  
G F G V M D S I Y L V - F T - L H F A H  
ctctgtgtttctaaaactgtccactagttttgggtggaggcctaaaattcctgcctaggcg  
L C V S K L S T S F G W R P K I P A - A  
acttgggtgtctcccttagagaaagaagtgcggttaaagaatttgattgggtgagaattgta  
T W C L P - R K K C V K E F D W V R I V  
aatttctgcttctatacctcaaggctcgttaacaatgttcagtcgagcacatggttagatt  
N F C F Y T S R L V T M F S R A H G R F  
ttacgaggggttaaaattcgaaatgattattgaattcaaaagtcatgggagtgcaaacagggg  
L R G L K F E M I I E F K V M G V K Q G  
cttagtcttgggattaatttattg**taa**agtttaatttatagctttttgagattcttgaagt  
L S L G I N L L - S - F I V F - D S - S  
ccaaggaatcaatgcactccaccctgttccctacacaaattc  
P R N Q C T P P C S Y T N

**2.3. Secuencia nucleotídica (gris) y aminoacídica (rojo) de la GR1(A) y de la GR2 (B) del polen de olivo. Los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAG) aparecen en negrita.**

**A**

```

cctggtcaactgccaagaacaaaccggctctccctctttctctctcttctacgagactac
L V N C E T R N R L S L F L S L L R D Y
aaccacaactgtacatgagtaacctggtcaactgccaagaacaaaccggctctccctct
N H N C T - V T W S T A K Q E T G S P S
ttctctctcttctacgagactacaaccacaactgtacatgcacaaaagggtgcatcacacc
F S L F Y E T T T T T V H A Q K V H H T
attcagagtgattgatcggtggcaatcttctgcatcaagcactcaaatccaatctagacacc
I Q S I D R G N L L H Q A L K F N L D T
tacacgatcaaatgaaaaagaataaaagggtgctttattcctaatacataatgatt
Y T I K L K K N K - R C F I P N H N S I
atcattatggcaaggaagatgcttattgatgggaagctaggcaatccaatgggagggag
I I M A R K M L I D G K L G N P N G E E
attcactatgactttgatttggttgtgattggagctggcagtggtggagtcctgctcg
I H Y D F D L F V I G A G S G G V R A S
cgattttcagcacagtgatggagctaaagttgggatatgtgagctcccatttctcctata
R F S A Q Y G A K V G I C E L P F H P I
agctctgaagttattggaggatggcggaacgtgtgtaattcgtggttgtgttccaaa
S S E V I G G V G G T C V I R G C V P K
aagattttggtctatggtgcttcttggcctgaactgcaggacgcgaggagttatggg
K I L V Y G A S F G P E L Q D A R S Y G
tggaactgaatgagagaattgatttgcattggaagaacttttgcagaaaaagacagag
W E L N E R I D F D W K K L L Q K K T E
gaaatagtcagattgactggatctataagcgattacttgcgaatgcgggagttaaacta
E I V R L T G I Y K R L L A N A G V K L
tttgaaggagaggggaagatttggctcctaataagttgaagtggtccaattggatggc
F E G E G R V V G P N E V E V V Q L D G
accaagattagctattcagcaaaaaacattctgattgcaacgggaagtagggctcaact
T K I S Y S A K N I L I A T G S R A Q R
gtagctatcccagggcaggaattggctataacatctgatgaggcattgagcttagaagag
V A I P G Q E L A I T S D E A L S L E E
ttacctaagcgagctgttgtatttggggcgggtacattgctgttgatttggcttcaata
L P K R A V V F G A G Y I A V E F A S I
tggcgtgggatgggtgcaacagttgatttattttcagaaaagaaactcccttaagagga
W R G M G A T V D L F F R K E L P L R G
tttgatgatgaaatgcgagcagtggttgcagaatactagaaggcaggggtattaaattg
F D D E M R A V V A R N L E G R G I K L
catcctacaacaacttaactgagctggtgagaacagaaaatggtataaaagttgact
H P T T N L T E L V R T E N G I K V C T
gatcattggtgaagaattgatgctgatggtactccttggctactggttagggcccccaac
D H G E E L M A D V V L F A T G R A P N
acaaaaagattgaatctcgaagctgtaggtggtgagcttgataagattggagctgtaag
T K R L N L E A V G V E L D K I G A V K
gttgatgaatactctcgaacaacctacctaccgtatgggctataggtgatgttacgaac
V D E Y S R T N L P T V W A I G D V T N
cgcatgaaatcttactcctggtttaaaggaaggagctgttttgcaaaaaccggtttt
R M N L T P V A L M E G S C F A K T V F
ggcggagaacctcgaacctgatcactaatgttccctgtgctgtcttctgtatacca
G G E P T K P D H T N V P C A V F C I P
ccattgtctgtagttgggctcagtgagaacaggctatagagcaagcaaatggtgatatt
P L S V V G L S E E Q A I E Q A N G D I
ttggttttcacatcaactgtaataatgcaatgaagaacaccatttctggacggcaagaaaag
L V F T S T F N A M K N T I S G R Q E K
acatttatgaaacttgcgtggatgctgagactgataaagttcttggagcgtccatgtgt
T F M K L V V D A E T D K V L G A S M C
gggccagatgcacctgagatcatgcaggcattgctattgcactcaaatgtggagcaacc
G P D A P E I M Q G I A I A L K C G A T
aaagcacaatttgatagcacgctcgaataacacccttcggctgctgaggagttcgtgaca
K A Q F D S T V G I H P S A A E E F V T
atgctgcttatcacgagacgaatagctgccggtaaaccaaagcaaacctattagacatta
M R S I T R R I A A G K P K T N L - T L
ataggcgatttatggagtattgtttcaagatgtttacagctgcaacagtgaaataacaa
I G D L W S I V S K M F T A A T V K - Q
gttgaaatttagttatgcaatttgggtgtagtggttatttggaaaagaacttgcacct
V E I - F M Q F G C S V V F G K E L A P
tactttgcaatgccttttgggtcacaactattattcatgatgataaaagtagctg
Y F C N A F C V K T I I H D E - K - L

```

B

ggagtactctattggttagaataattcttgtttatTTTTgcagaatgtcaaaatctcttttcat  
S T L L L E - F L F I F A E C Q N L F H  
ttccaagaacgttgTTTTcacaagtcagacttcatttagttacttgggatcttctttt  
F Q E T L F S Q V R L H L V Y L G S S F  
tccttttagatcatttctctgcaccaagagagtttgcgttatttctatTTAatgactcc  
S F - I I S L H Q E S L L L F L F N D S  
gtatttttagtttggatctaatattacttgttcatggattatattatgtgtgtatagc  
V F - F C G S N I T C S W I I L C V Y S  
attgtggccatggcaaggaagatgttgattgatggggagctggaaaagcacagtgaagag  
I V A M A R K M L I D G E L E K H S E E  
gagactcgctatgactttgatttgttggattgggtgctggcagtgccggagttcgtgct  
E T R Y D F D L F V I G A G S G G V R A  
tcacgattttcagcacaatatggagctaaggttgggatatgtgagcttccatttcatcct  
S R F S A Q Y G A K V G I C E L P F H P  
atcagcactgaagtgattggaggagttggcggaacgtgtgtcattcgtggttgttctct  
I S T E V I G G V G G T C V I R G C V P  
aaaaagattttggtctacggtgcaacctttggatctgaattggaggacgcgaggagttac  
K K I L V Y G A T F G S E L E D A R S Y  
ggatgggaattgaatgagaaaattgatttcaattggaagaagcttttccacaaaaagaca  
G W E L N E K I D F N W K K L L H K K T  
gaggaatatgtagttaaacggaatctataaacggttactttcaaagcgggagttaaa  
E E I V R L N G I Y K R L L S N A G V K  
ctatttgaaggagagggaaaagtgttggctcctaataagttgaagtattcaattggat  
L F E G E G K V V G P N E V E V I Q L D  
ggcaccacaaaataagctattcggcaaacacattctgattgcaactggaagtagggctcaa  
G T K I S Y S A K H I L I A T G S R A Q  
cgacctctattcccggacaggaattggctataacatctgatgaggcattgagcttgaa  
R P S I P G Q E L A I T S D E A L S L E  
gagttacttaagcagcggtttacttgggggaggggtacattgctgttgagttgttca  
E L P K R A V I L G G G Y I A V E F A S  
atatggcgtgggatgggtgcaacagtgatttgtgcttcagaaaggagctccctttaaga  
I W R G M G A T V D L C F R K E L P L R  
ggtttttagatgacgaaatgagcagtggttgcagaactcttgaaggcaggggaattact  
G F D D E M R A V V A R T L E G R G I T  
atgctcctgggacaaccttaactgagctagttaaaacagaagatggataaaaagtagc  
M H P G T T L T E L V K T E D G I K V R  
accaacctatggtgaagaattgctggcagatgtggtacttttggcactggtagggcacct  
T N H G E E L L A D V V L F A T G R A P  
aacacaagaggttgaatctggaagctgtaggtgttgaacttgataagactggagctgtg  
N T K R L N L E A V G V E L D K T G A V  
aaggttgacgaataactctgcaccaacttacctagcatatggccattgggtgacgttaca  
K V D E Y S R T N L P S I W A I G D V T  
aaccgaatgaatcttactcctgttgcatatgaaggaacctgttttgctaaaactgtt  
N R M N L T P V A L M E G T C F A K T V  
tttggcgaacaacctcaaaactgattacagccacgttccctgtgctgtgttctgcata  
F G E Q P S K P D Y S H V P C A V F C I  
ccgacctgtctgtagttggtctcagtgaggaaacaggccatagatcaagcaaatggtgat  
P P L S V V G L S E E Q A I D Q A N G D  
gttttagtcttcacatcaacatttaataccaatgaagaacacaatttctggacgtcaagag  
V L V F T S T F N P M K N T I S G R Q E  
aaaacggttatgaagcttgttggatggtgagactgataaagttcctggagcatccatg  
K T V M K L V V D G E T D K V L G A S M  
tgtggccagatgcagctgagatcatacagggcattgctgttgcaactaaatgtggagca  
C G P D A A E I I Q G I A V A L K C G A  
accaggcacaatttgatagcaggttggatatacatccttctgctgcagaagagttcgtg  
T K A Q F D S T V G I H P S A A E E F V  
accatgcgatctgtgagtagcggtatcgcggtggtaaacggaagaccaaccta**tag**gca  
T M R S V S R R I A A G K P K T N L - A  
tgaacgcgaaaacgttcttattatgatcgtgggaaatttagattcactttgagaaag  
- T R K R C T L L - S W E I R F T L R K  
cctattgtagaagacactgattatccttctgggatttagtcataggagacttttctc  
P I V E D T D Y P F W D L V I E R L F L  
cactcagatgttgcctcagcagtaatttcaaacattgcatatcaataatca  
H S D V A S A S A V I S K H C I S N N Q  
ggaacgtgaattgttatgtgcaattggttatctgagtcacgcatattttcaata  
G T - I V M C K L V I - V T H I F N

**2.4. Secuencia nucleotídica (gris) y aminoacídica (rojo) de la GPX8 del polen de olivo. En la primera, los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAG) aparecen en negrita.**

```

caactttccaaaccggctgcttctctctccagaagaagaccgaaatggataagctgtaa
N F P N P A A S L S R R R P E M D K L -
tgacgtgatcccaagaattttgacctattatTTTTTCCCCAAATTGATGTGATTA
- R D P K K F - P Y Y F F P Q I - C D -
gcgaagaatTTTCTCGCGTCTCGTCCGTTTACTTCAATCCAGAAAATTCAGACCTTTAC
A K K F S R V V R L H F N P E N S D L Y
cattttaaataactacaaaatgcctgtattaaaaacctagctctcacaacggataaaa
H F N I Y Y K C L Y - K P S L Y K R I K
ttcaatttggggatTTTgagctgagaagaaatgggggggacgtccatctgtccatcaaaaa
F N L G I L S - E E M G G R P S V H Q K
tcaatccacgatttcaactgtaaggatgctaagggtaaagatgCGGACTTGAGTGATA
S I H D F T V K D A K G K D A D L S V Y
aaagggaaagtctgcttctgctcaatgTTGCTTCCAATGCGGATACACGAATTTGAAC
K G K V L L V V N V A S K C G Y T N L N
tacaccagTTGACAGAactttacagcaagtataaggataatggtttcagagatcttgca
Y T Q L T E L Y S K Y K D N G F E I L A
ttcccttgcaatcaattcttgatcaagaacctgggtcgagtgaggatgcagaacagttt
F P C N Q F L Y Q E P G S S E D A E Q F
ggtgtacaagatttaaggctcaatatcccatctttcaaaaggtaaaagtgaatggtaaa
A C T R F K A Q Y P I F Q K V K V N G K
gatgccgtccagctctacaagttcctcaaggcaagtaaagggtggttttctcggttctagc
D A A P V Y K F L K A S K G G F L G S S
atcaagtggaaacttcacaaagtttctagtcgacaaggatgggtcaagtaattggcgttat
I K W N F T K F L V D K D G Q V I G R Y
ggtacatctaccaccattggcaattgaggcggatattccagaagcgttgggagacggt
G T S T P P L A I E A D I Q K A L G D V
tgagttgactgatatttggTTGGAAGTTATAAACTGATGACTTTTGTATCCGTAGAACAG
- W T D I W F G S Y K L M T F V S V E Q

```

**2.5. Secuencia nucleotídica (gris) y aminoacídica (rojo) de la GSTF12 del polen de olivo. En la primera, los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TGA) aparecen en negrita.**

```

agaaggggggagaaaaatgacgctaaaagtgtatgcagatcggatgtctcaaccttgcgct
R R G R K M T L K V Y A D R M S Q P S R
gcagtaattatcttctgcaaaaataaatgggattgaatttgaagaggtgaaaatcgacatc
A V I I F C K I N G I E F E E V K I D I
tccagacgccagcatagaactcctgaatttgaagaaataaatcccataagaaagttcca
S R R Q H R T P E F E E I N P M K K V P
gcaatagtgtgagggttcaagctTTTTGAGAGTCAATGCAATTATGATCTATCTAGCT
A I V D G R F K L F E S H A I M I Y L A
tatgtatttctggagttgcagatcactgggtatcctgctgacctttccaaaagagcaaaag
Y V F P G V A D H W Y P A D L S K R A K
atccactcagtttagactggcatcactcaaatttacgccacgggtgcagctacatatgtc
I H S V L D W H H S N L R H G A A T Y V
ctcaactctactcttggacctgcacttggcggcctttgaatccaaaagctgcagctgaa
L N S T L G P A L G R P L N P K A A A E
ggtgagaaaaatattatctgagctctcttgcaaaagattgaatctgTTGGCTCAAGGGAAT
G E K I L S E S L A K I E S V W L K G N
ggacgttttctgcttggaaagcttacaaccatccatagcagatcttagtttagtgtgtgaa
G R F L L G S L Q P S I A D L S L V C E
atcatgcagctcgaggttgtgaaatgagaaggatcgtgatcgaatattgggccccacaaa
I M Q L E V V N E K D R D R I L G P H K
aaagtttTGAATGGATCAATGATACGAAGAATGCGACGAGACCTCATTTTGACGAAGTG
K V L K W I N D T K N A T R P H F D E V
cattccgctcttttcaaaagtaaaagagaaaactaaagaggctgcagtcgggagggggcaaaa
H S V L F K V K E K L K R L Q S G G A K
gacgagacacaatccacgttTGAAGTGCTCTGCATTCTAAGATtgagtacaagggggg
D E T Q S T L K S A L H S K M - V Q G G

```

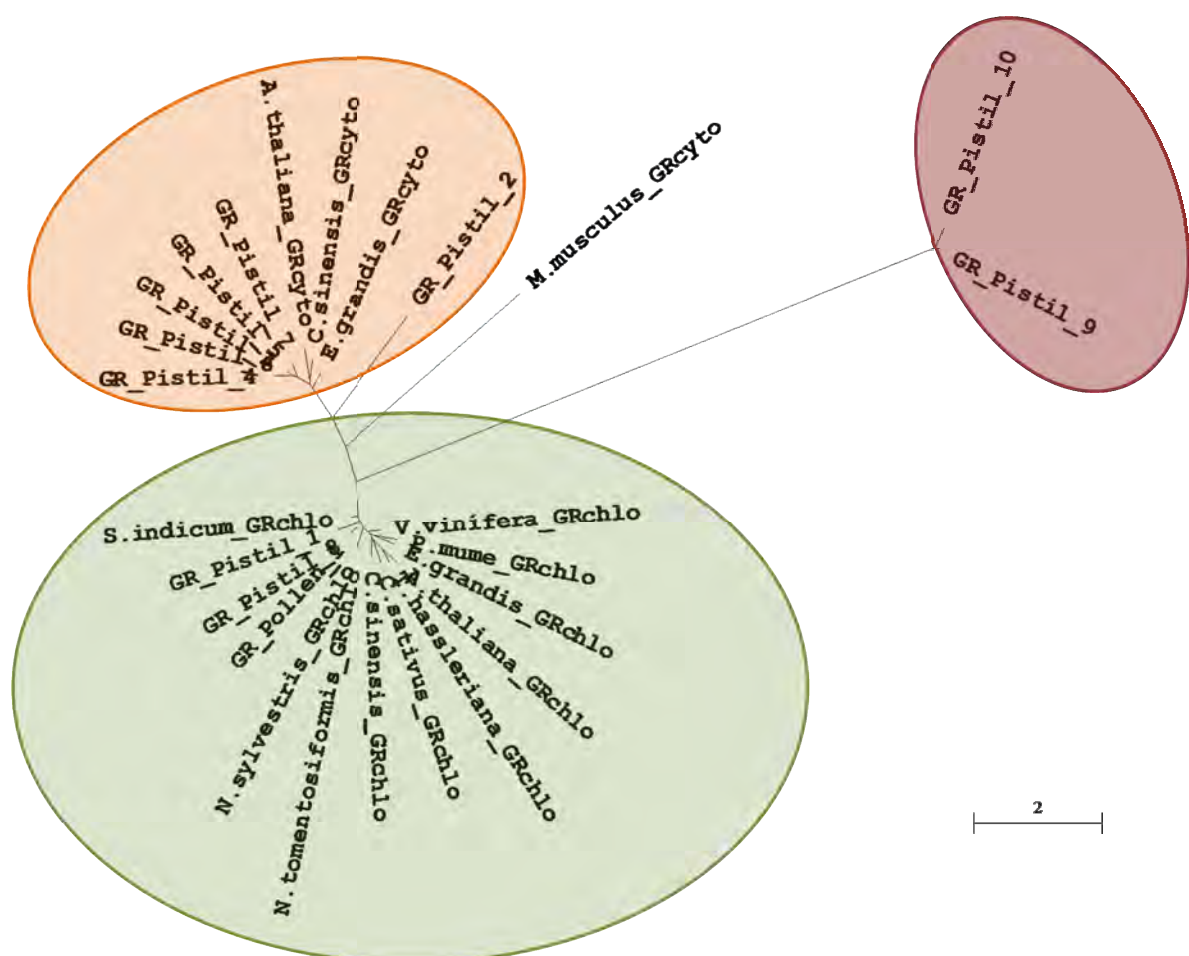


1. Anexo 1: Alineamientos de secuencias nucleotídicas de los genes de interés.
2. Anexo 2: Secuencias completas (nucleotídicas y aminoacídicas) de los genes de interés.
3. **Anexo 3: Árbol filogenético de secuencias aminoacídicas de GR.**
4. Anexo 4: Análisis LC-MS del contenido en glutatión y análisis ratiométrico de GSH/GSSG durante el desarrollo floral en mutantes *pad2* y *clt*.





Tras la traducción de las secuencias nucleotídicas correspondientes a GR de polen y pistilo de olivo, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas, a partir de las cuales se pudo realizar el análisis de la relación filogenética de estas proteínas con las de otras especies homólogas (ExpASY – SIB Bioinformatics Resource Portal, Translate tool). En la figura, en donde se representa el análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas, puede observarse una clara diferenciación entre las isoformas citoplasmática (naranja) y cloroplastidial (verde). Junto con las isoformas citosólicas de otras especies homólogas se aprecia una relación filogenética de las secuencias GR\_pistil\_2, 3, 4, 5, 6 y 7. Por otro lado, en el grupo de las isoformas cloroplastidiales podemos encontrar las secuencias GR\_pistil\_1, 8, 9 y 10; así como la secuencia de polen GR\_pollen\_1. Estos datos sin embargo, contrastan con la identificación inicial de las secuencias mediante BLASTing en cuanto a la isoforma del enzima se refiere.



**Figura.** Relaciones filogenéticas entre las secuencias aminoacídicas de GR de polen y pistilo de olivo con sus homólogos en los tejidos vegetativos y reproductivos de otras plantas. El árbol filogenético fue arraigado con una secuencia aminoacídica también de GR de ratón.



1. Anexo 1: Alineamientos de secuencias nucleotídicas de los genes de interés.
2. Anexo 2: Secuencias completas (nucleotídicas y aminoacídicas) de los genes de interés.
3. Anexo 3: Árbol filogenético de secuencias aminoacídicas de GR.
4. **Anexo 4: Análisis LC-MS del contenido en glutatión y análisis ratiométrico de GSH/GSSG durante el desarrollo floral en mutantes *pad2* y *clt*.**



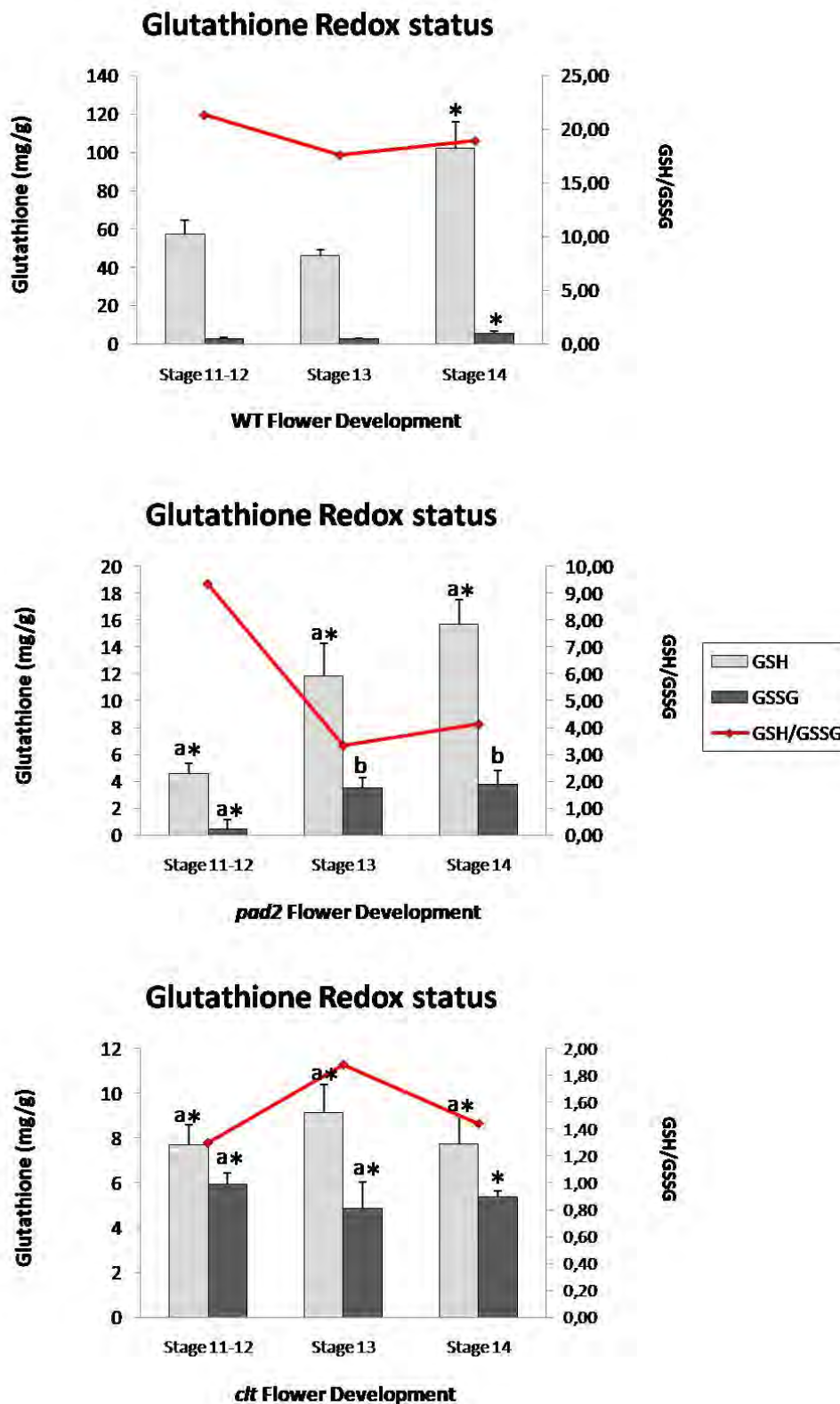


Figura. Contenidos de GSH y GSSG y ratio GSH/GSSG de flores de *A. thaliana* en las diferentes etapas de desarrollo. A) WT, B) *pad2* y C) *ct*. Los asteriscos indican una significación estadística del 95% ( $P \leq 0,05$ ) entre las diferentes etapas de desarrollo. "a y b" representan una significación estadística con un intervalo de confianza de 99% ( $P \leq 0,01$ ) y 95% ( $P \leq 0,05$ ), respectivamente, entre diferentes tipos de plantas.

Los datos del análisis bioquímico realizado por LC-MS revelan diferencias significativas entre las diferentes etapas de desarrollo de floración utilizadas y entre los distintos tipos de flores mutantes. Aquí se presentan los resultados tras el análisis en las líneas *pad2* (B) y *clt* (C) en comparación con el WT.

Los niveles más altos de GSH en *pad2* y WT se determinaron en las flores en la etapa 14, sin embargo en el caso del mutante *clt* se encontraron niveles de GSH más altos en el estadio 13. Se observaron altas relaciones GSH/GSSG mantenidas durante el desarrollo de las flores en las plantas WT (A). En contraste, las flores en las plantas *pad2* y *clt* tenían menos del 50% del GSH presente en las líneas WT en etapas equivalentes del desarrollo de la flor. Sin embargo, los niveles de GSSG en las flores *pad2* y *clt* (B y C) fueron similares o ligeramente superiores a los detectados en WT (A), con excepción del estadio 11-12 de *pad2* en el que la concentración de GSSG fue ligeramente menor al genotipo silvestre.

Después de analizar el estado redox celular en las diferentes muestras, éste fue mucho más reducido (ratio GSH/GSSG mayor) en el genotipo silvestre que en los mutantes deficientes en GSH (Eje secundario). Los genotipos WT y *pad2*, siguen un patrón parecido en la ratio GSH/GSSG, el valor más reducido tiene lugar en el estadio 11-12, disminuye (se oxida) en el estadio 13, para después recuperarse la reducción en el estadio 14. Por el contrario, en el mutante *clt* se produce un patrón diferente, desde el estadio 11-12 la ratio GSH/GSSG va aumentando su valor llegando al máximo en el estadio 13, para después oxidarse de nuevo en el estadio 14.

# **A**BREVIATURAS





ABA, ácido abscísico

ADN, ácido desoxirribonucleico. DNA

APX, ascorbato peroxidasa.

ARN, ácido ribonucleico.

ATP, adenosín trifosfato.

CAT, catalasa.

Cys, cisteína.

DHA, dehidroascorbato.

DHAR, deshidroascorbato reductasa.

EA, ácido etacrínico.

EEZ, Estación Experimental del Zaidín.

EDTA, ácido etilendiaminotetracético.

$\gamma$ -EC,  $\gamma$ -glutamilcisteína.

$\gamma$ -ECS,  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa.

$\gamma$ -GT (GGT),  $\gamma$ -glutamiltranspeptidasa.

FAD, flavín adenín dinucleótido o dinucleótido de flavina y adenina.

G1, primera fase del ciclo celular que consiste en el crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN.

Glu, ácido glutámico.

Gly, glicina.

GPX, glutatión peroxidasa.

GR, glutatión reductasa.

GRX, glutaredoxinas.

GSH, glutatión (y glutatión reducido).

GS, glutatión sintetasa.

GSSG, glutatión oxidado.

GST, glutatión *S*-transferasa.

H<sub>2</sub>O, agua.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno.

hGS, homoglutatiónsintetasa.

His, histidina.

JA, jasmonicacid (ácido jasmónico).

LB, caldo de lisogenia (Lysogeny Broth).

MAPEG, proteínas asociadas a la membrana en el metabolismo eicosanoide y de glutatión.

MDAR, monodehidroascorbato reductasa (MDAR).

Met, metionina.

NAD, nicotinamida adenina dinucleótido.

NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NO, óxido nítrico.

NOX, NADPH oxidasa.

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical superóxido.

O<sub>2</sub>, oxígeno molecular.

OH, hidróxido.

PCD, programmed cell death (muerte celular programada).

PCR, Reacción en cadena de la polimerasa (quantitative polymerase chain reaction).

PDB, Protein Data Base (Base de Datos de Proteínas).

PEB, proteinextraction buffer (tampón de extracción de proteínas).

PER, peroxidasa.

PBS, phosphatebufferedsaline (tampón salino fosfato).

PR, pathogen response (respuesta a patógenos).

PRX, peroxiredoxina.

qRT-PCR, PCR cuantitativa en tiempo real.

RACE, Amplificación de los extremos de cDNA (Rapid amplification of cDNA ends).

RBOH, Respiratoryburst oxidase homologs (homólogo de la oxidasa explosiva respiratoria).

ROH, compuesto orgánico con alcohol.

ROOH, compuesto orgánico con grupo peróxido.

ROS, Reactive oxygen species (especies de oxígeno reactivo).

SA, salicylic acid (ácido salicílico).

SAR, systemic acquired resistance (resistencia sistémica adquirida).

-SH, tiol.

SIDA, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SOD, Superóxido dismutasa.

TAIR, Base de datos de Arabidopsis (The Arabidopsis Information Resource).

TCA, ácido tricloroacético.

TCHQD, Tetraclorohidroquinona deshidrogenasa.

TAE, Tris-acetate-EDTA.

Tris-base, tris(hidroximetil)aminometano.

Trp, triptófano.

TRX, Tiorredoxina.

Tyr, tirosina.

WT, genotipo silvestre (Wild type).



**PUBLICACIONES**



# Identification and *in silico* Analysis of Glutathione Reductase Transcripts Expressed in Olive (*Olea europaea* L.) Pollen and Pistil

Estefanía García-Quirós<sup>1</sup>, Rosario Carmona<sup>1,2</sup>, Adoración Zafra<sup>1</sup>, M. Gonzalo Claros<sup>2</sup>, and Juan de Dios Alché<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain  
{estefania.garcia, dori.zafra, juandedios.alche}@eez.csic.es

<sup>2</sup> Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga, Málaga, Spain  
{rosariocarmona, claros}@uma.es

**Abstract.** Glutathione (GSH) protects proteins against oxidation of their thiol-containing groups, by alternatively becoming the subject of oxidation, forming glutathione disulfide (GSSG). Appropriate GSH:GSSG levels are maintained by glutathione reductase (GR), a homodimeric flavoprotein which uses NADPH to reduce one GSSG molecule to two of GSH. This enzyme has been characterized in several species, and described as highly conserved, with two isoforms only. Heterogeneity and distinctiveness of plant reproductive tissues led us to investigate the presence of GR sequences. A *de novo* assembled and annotated olive reproductive transcriptome was subjected to screening, which allowed us to identify at least 11 GR homologues (1 pollen-specific and 10 from pistils). Primers were designed, and full-length sequences were obtained through PCR. *In silico* analysis, including phylogeny, 3-D modeling of N-terminus, and prediction of cellular localization and post-translational modifications was carried out to shed light into the involvement of olive pollen-intrinsic GR in reproductive development.

**Keywords:** Glutathione reductase · Pollen · Pistil · ROS · Glutathione

## 1 Introduction

Olive tree is one of the most important crops in the Mediterranean area, representing one 95% of globally cultivated olive trees, and the source of olive oil, accounting the sixth most abundant vegetable oil produced worldwide. It exhibits a high tolerance towards salinity and drought as compared to other salinity susceptible fruit trees as recently reviewed [1]. Resistance to different abiotic stresses is modulated by reactive oxygen species (ROS) metabolism in numerous plant species. Concomitantly, other metabolically related chemicals like total glutathione, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) contents, GSH/GSSG ratio and glutathione reductase



(GR; EC 1.6.4.2) activity have been described as key actors in the response to salt-stress in plants [2]. Compounds with high ability to oxidize GSH include ROS such as superoxide or hydroxyl radicals. Glutathione reductase (GR) is a flavoprotein enzyme that functions as dimeric disulfide oxidoreductase and utilizes an FAD prosthetic group and NADPH to reduce one molar equivalent of GSSG to two molar equivalents of GSH [3, 4]. Classical fractionation studies described higher GR activities in chloroplasts [5] but it has also been detected in mitochondria, cytosol and peroxisomes [4, 6–9]. Of the four enzymes of glutathione metabolism, GR is by far the best genetically characterized. GR is conserved between all kingdoms. In plant genomes, two GR genes are encoded. Of the two genes encoding GR in *Arabidopsis*, the second, GR2 (At3g54660), encodes a GR homologous to the GR pea protein with dual localization in plastids and mitochondria [10]. Such dual localization was also demonstrated in *Arabidopsis* [11]. GR cytosolic activity is encoded by GR 1 (At3g24170), but proteomic analysis also suggested that this gene encoded GR peroxisomal activity [12]. From the results obtained in peas it appears that the peroxisomal enzyme represents a relatively low part of the gene product GR1 [9], responsible for 30 to 60% of total enzyme activity in leaves of *Arabidopsis* [13]. Available information suggests that GR1 is therefore primarily addressed to the cytosol, although an intriguing question is the physiological significance of its location in peroxisomes, which can be important sources of ROS and related signals [14–17]. Glutathione reductase is a homodimer consisting of 52Kd monomers, each containing 3 domains. GR exhibits single sheet, double layered topology where an anti-parallel beta-sheet is largely exposed to the solvent on one face while being covered by random coils on the other face [18]. This includes a NADPH-binding Domain, FAD-binding domain(s) and a dimerization domain. Each monomer contains 478 residues and one FAD molecule. As mentioned, two GRs are encoded in *Arabidopsis thaliana* [19], both with a isoform in pollen and pistil nonspecific. GR activity is essential for proper pollen development and pollen tube growth, leading to fertilization [20]. Although it is expected that the pollen GR is mainly of type I, and therefore located in the cytosol, a chloroplastidial localization has also been described.

Recently a complete transcriptome of reproductive tissues olive (pollen, pistil and seed) was generated from cDNA using a/Roche 454 Titanium + platform [21]. We have riddled such transcriptome to identify the presence of GR transcripts in the olive reproductive tissues, using the retrieved sequences for further sequence confirmation and bioinformatics analysis.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Screening and Identification of GR Transcripts in the Olive Reproductive Transcriptome

Different strategies for selecting these transcripts were defined. The searches were conducted by definition using GO, EC, KEGG and InterPro terms and codes, orthologues and gene names in the annotated transcriptome. BLAST searches were carried on using heterologous sequences available in public databases and library resources

well established as TAIR, GenBank and the recent Plant DNA C-values Database and Olive genome and annotation files [22, 23].

## 2.2 Olive Pollen GR Cloning and Sequencing

Olive pollen transcriptome retrieved sequences corresponding to GR-homologues (partial and complete sequences) were used to design primers in order to amplify the known sequence from pollen cDNA. Plant material was obtained according to [24]. Total RNA from mature pollen was extracted using the RNeasy Plant Total RNA kit (Quiagen, U.S.A.) and first-strand cDNA was synthesized with oligo(dT)19 primer and M-MLV reverse transcriptase (Fermentas). Standard PCR was carried out using Taq polymerase (Promega) and Pfu (Promega) to obtain or confirm nucleotide sequences. Full sequences were obtained by means of both 3'- and 5'-RACE (smarter RACE, Clontech), following manufacturer's specifications. pGEMT-easy (Promega) was used for cloning purposes. Sanger sequencing was achieved in the facilities of the EEZ-CSIC institute in Granada.

## 2.3 *In silico* Analysis of the Sequences

Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL OMEGA multiple alignment tool with default parameters [25]. Phylogenetic trees were constructed with the aid of the software Seaview [26] using the maximum likelihood (PhyML) method and implementing the most probable nucleotide substitution model (GTR) previously calculated by JmodelTest2 [27]. The branch support was estimated by bootstrap resampling with 100 replications.

For the prediction of protein cell localization, the software Plant-mPloc [28] was used. PhosPhAt [29] and PlantPhos [30] were used to predict serine, threonine and tyrosine phosphorylation. GPS-SNO 1.0 was used for prediction of S-nitrosylation sites [31]. TerminiNator was used to predict N-terminal methionine excision, acetylation, myristoylation or palmitoylation [32].

Structure prediction of GR2 N-terminal region was modeled by using the fold recognition-based Phyre2 server [33], with c4dnaA as the template and a 100% confidence. 3D modeling was carried out by PyMol (<https://www.pymol.org/>).

# 3 Results

## 3.1 Recovery, Cloning and Phylogenetic Analysis of GR Sequences from the Olive Reproductive Transcriptome

Eleven entries were identified within the raw data transcriptome, either as partial sequences or as complete sequences corresponding to GR (Table 1) by BLASTing each individual sequence against the GenBank database. On the other hand, these eleven previously selected inputs were individually confronted by BLASTing against the genomic *Olea europaea* assembly and annotation database. Table 1 shows the results

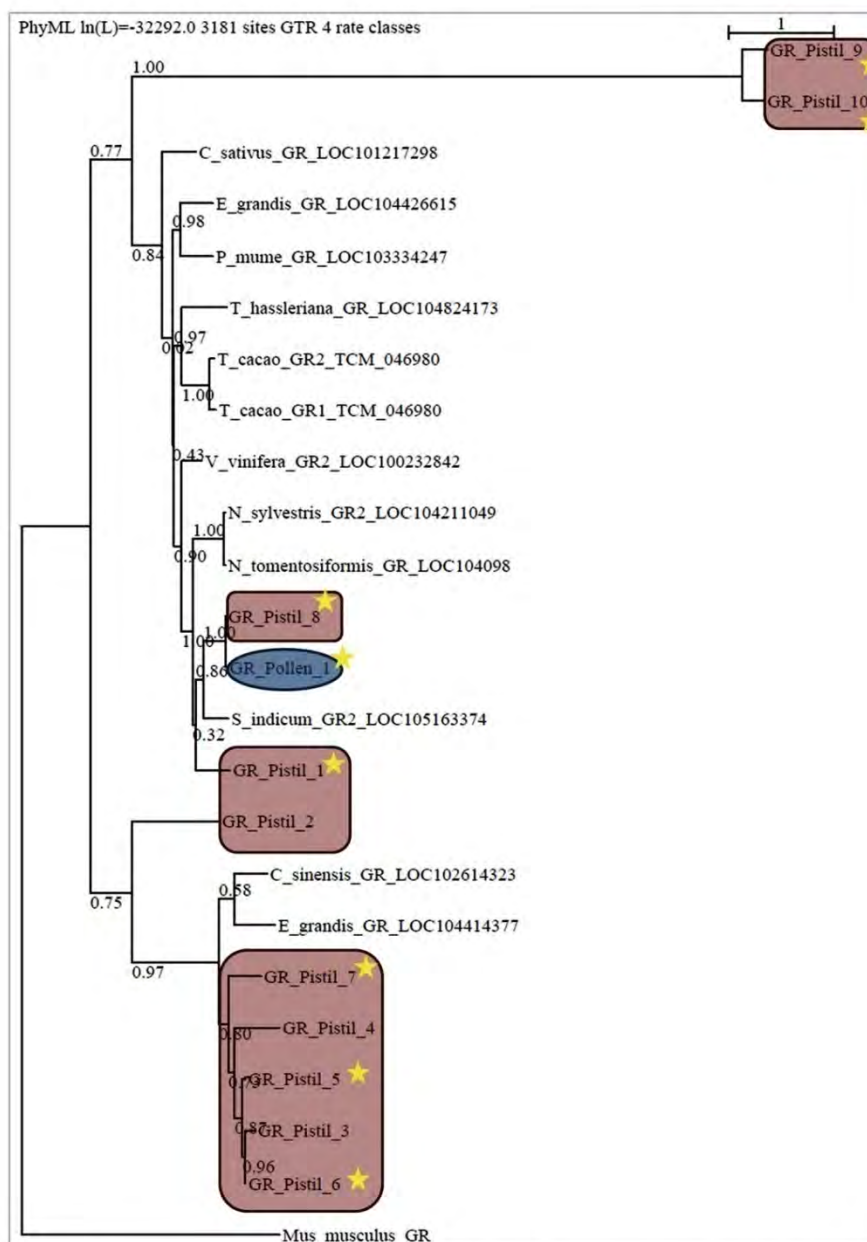
obtained in this second BLASTing. Most query sequences have high homology (more than 94%) with the input OE6A000198T2 from genomic *Olea europaea* assembly and annotation database. Noteworthy, GR\_Pollen\_1 (the only pollen specific sequence obtained from the reproductive transcriptome), and GR\_Pistil\_8 have full identity with OE6A112067T2, whereas GR\_Pistil\_1 has also full identity with Oe\_s02429. All these olive genome sequences were identified as chloroplastidial GRs (GR2) by blasting [23].

**Table 1. Upper panel.** Output sequences identified as GR after screening. The lengths of the assembled sequences are indicated. **Lower panel.** Blasting with genome from olive.

Sequence	Sequence Name	Length (pb)
GR_Pistil_1	st11_olive_039691	687
GR_Pistil_2	st11_olive_007100	193
GR_Pistil_3	st11_olive_003323	128
GR_Pistil_4	st11_olive_051636	513
GR_Pistil_5	st11_olive_003115	2020
GR_Pistil_6	st11_olive_003323	1974
GR_Pistil_7	st11_olive_004231	1838
GR_Pistil_8	st11_olive_018143	1049
GR_Pistil_9	st11_olive_004231	1838
GR_Pistil_10	st11_olive_003323	1979
GR_Pollen_1	po11_olive_018706	435

Sequence	Genomic homologous	Homology	Identity
GR_Pistil_1	Oe6_s02429	100%	Glutathione reductase
GR_Pistil_2	Oe6_s07823	95,53%	Uncharacterized
GR_Pistil_3	OE6A000198T2	100%	Glutathione reductase
GR_Pistil_4	OE6A000198T2	94,64%	Glutathione reductase
GR_Pistil_5	OE6A091299T1	98,24%	Glutathione reductase
GR_Pistil_6	OE6A000198T2	94,88%	Glutathione reductase
GR_Pistil_7	OE6A117561T3	99,67%	Glutathione reductase
GR_Pistil_8	OE6A112067T2	99,43%	Glutathione reductase
GR_Pistil_9	OE6A117561T3	99,67%	Glutathione reductase
GR_Pistil_10	OE6A000198T2	94,83%	Glutathione reductase
GR_Pollen_1	OE6A112067T2	100%	Glutathione reductase

Figure 1 shows a phylogenetic analysis including the 11 outputs identified in the annotated transcriptome together with a representation of GRs identified in different taxonomical groups. No clear differentiation between GR1 and GR2 was observed, and the high similarity between both isoforms was particularly evident in one of the homologous species used for phylogenetic study (*T. cacao*). Most (8 of 11) of the rescued GR sequences from the olive reproductive transcriptome were identified as chloroplastidial isoforms of the enzyme, and two of these forms (GR\_pistil\_9 and 10) clustered together, slightly apart from the remaining sequences. This discovery corroborates the data obtained from recent studies showing that in fact the isoform involved in pollen development is GR2 [13].



**Fig. 1.** Phylogenetic relationships between olive pollen GRs and their homologues in vegetative and reproductive tissues. The phylogenetic tree was rooted with a sequence of mouse GR. Yellow stars indicate sequences corresponding to the GR2 (chloroplastial isoform).

### 3.2 *In silico* Prediction of Cellular Localization and Post-translational Modifications

PCR amplification of cDNA enabled us to obtain the whole sequence of the coding region of GR1 (1978 bp) and a large proportion of the coding region of GR2 (1839 bp). The nucleotide sequences of both genes were subjected to the present analysis. After using software Plant-mPloc we were able to predict the cellular localization of GR1 in the cytoplasm and the plasma membrane, and the localization of GR2 in chloroplasts and the nucleus, as it occurs with AtGR1 and AtGR2 from *Arabidopsis thaliana* and GRs from other species.

PhosPhAt and PlantPhos allowed us to predict 10 putative post-translational modification sites (Table 2). In 5 sequences rescued from the olive reproductive transcriptome, potential S-nitrosylation sites were identified in up to 10 Cys-containing peptides by using the software GPS-SNO, as described in Table 3. Moreover, the N-terminus methionine of the mature protein was predicted to be acetylated with a 97% probability for GR2 and a 78% probability for GR1 by using the prediction tools cited in Materials and methods. On the contrary, the presence of myristoylation or palmitoylation sites was not predicted.

**Table 2.** Amino acids prone to phosphorylation within the GR sequence as predicted by PhosPhAt/PlantPhos.

	Locations (aa)	Modification	Substrate side
1	5	Phosphoserine(CK1)	EDNHSTVED
2	182	Phosphothreonine(CK2)	ELAITSDEA
3	188	Phosphoserine(CK1)	DEALSLEEF
4	203	Phosphotyrosine(INSR)	LGGGYISVE
5	203	Phosphotyrosine(Jak)	LGGGYISVE
6	256	Phosphothreonine(PKC)	HPRTTLEL
7	315	Phosphotyrosine(Jak)	KVDEYSRTS
8	316	Phosphoserine(CK1)	VDEYSRTSV
9	334	N-linked Asparagine	TNRMNLTVP
10	360	Phosphotyrosine(INSR)	SKPDYSNIA

**Table 3.** Cys-containing peptides prone to S-nitrosylation within the GR\_Pistil\_5, GR\_Pistil\_6, GR\_Pistil\_7, GR\_Pistil\_9 and GR\_Pistil\_10 sequences as predicted by GPS-SNO.

Sequence	Position	Peptide	Sequence	Position	Peptide
GR_Pistil_5	51	YGAKVGICELPFHPI	GR_Pistil_6	51	YGAKVGICELPFHPI
	70	IGGVGGTCVIRGCVP		70	IGGVGGTCVIRGCVP
	75	GTCVIRGCVPKKILV		75	GTCVIRGCVPKKILV
	229	MGASVDLCFRKELPL		229	MGATVDLCFRKELPL
	352	VALMEGTCPAKTVFG		352	VALMEGTCPAKTVFG
	372	PDYSHVPCAVFCIPP		372	PDYSHVPCAVFCIPP
	376	HVPCAVFCIPPLSVV		376	HVPCAVFCIPPLSVV
	438	KVLGASMCGPDAAEI		438	KVLGASMCGPDAAEI
455	GIAVALKCGATKAQF	455	GIAVALKCGATKAQF		

(continued)

**Table 3.** (continued)

Sequence	Position	Peptide	Sequence	Position	Peptide
GR_Pistil_7	51	YGAKVGICELPFHPI	GR_Pistil_9	51	YGAKVGICELPFHPI
	70	IGGVGGTCVIRGCV		70	IGGVGGTCVIRGCV
	75	GTCVIRGCVPKKILV		75	GTCVIRGCVPKKILV
	277	TENGIKVCIDHGEEL		267	TENGIKVCIDHGEEL
	352	VALMEGSCFAKTVFG		342	VALMEGSCFAKTVFG
	372	PDHTNVPCAVFCIPP		362	PDHTNVPCAVFCIPP
	376	NVPCAVFCIPPLSVV		266	NVPCAVFCIPPLSVV
	438	KVLGASMCQDAPEI		428	KVLGASMCQDAPEI
	455	GIAIALKCGATKAQF		445	GIAIALKCGATKAQF
GR_Pistil_10	18	RLAMTLICLLIGAS			
	44	YGAKVGICELPFHPI			
	63	IGGVGGTCVIRGCV			
	68	GTCVIRGCVPKKILV			
	222	MGATVDLCFRKELPL			
	345	VALMEGTCFAKTVFG			
	365	PDYSHVPCAVFCIPP			

### 3.3 2D Structure Prediction and 3D Modeling of the Structure and *in Silico* Analysis of the Function

After several tests, it was elucidated that both GR1 and GR2 isoforms share the same predicted secondary structure, as expected. The GR\_Pistil\_10 sequence corresponding to a GR of the chloroplastial type was chosen to predict the secondary structure (Fig. 2) and 3D modeling shown in Fig. 3. The predicted structure confirmed that the corresponding translated amino acid sequences of GR\_Pistil\_10 were consistent with available 3D models developed by using folding-recognition software.

## 4 Discussion

Reproductive tissue transcriptomes differ from their somatic counterpart due to the large number of specific transcripts that are produced during the physiological event that involves reproduction in plants [34]. This can be explained by the requirement of signaling that must take place during pollen tube germination, pollen-pistil interaction... etc., which triggers an increase in transcription during these processes. Thereby, the use of transcriptomes can be an useful way to elucidate enzymatic or signaling networks involved in the development of the micro- and macrosporocytes in Angiosperms, pollen tube germination and pollen-pistil interactions at the time of fertilization [35]. This paper has conducted a bioinformatic screening of exome sequences of olive tree mature pollen and pistil. It has been able to detect the existence of at least two GR genes homologous to other GR genes described above in plant species such as *A. thaliana* or *T. cacao*. The use of PCR and RACE experiments has confirmed the expression of these genes in olive

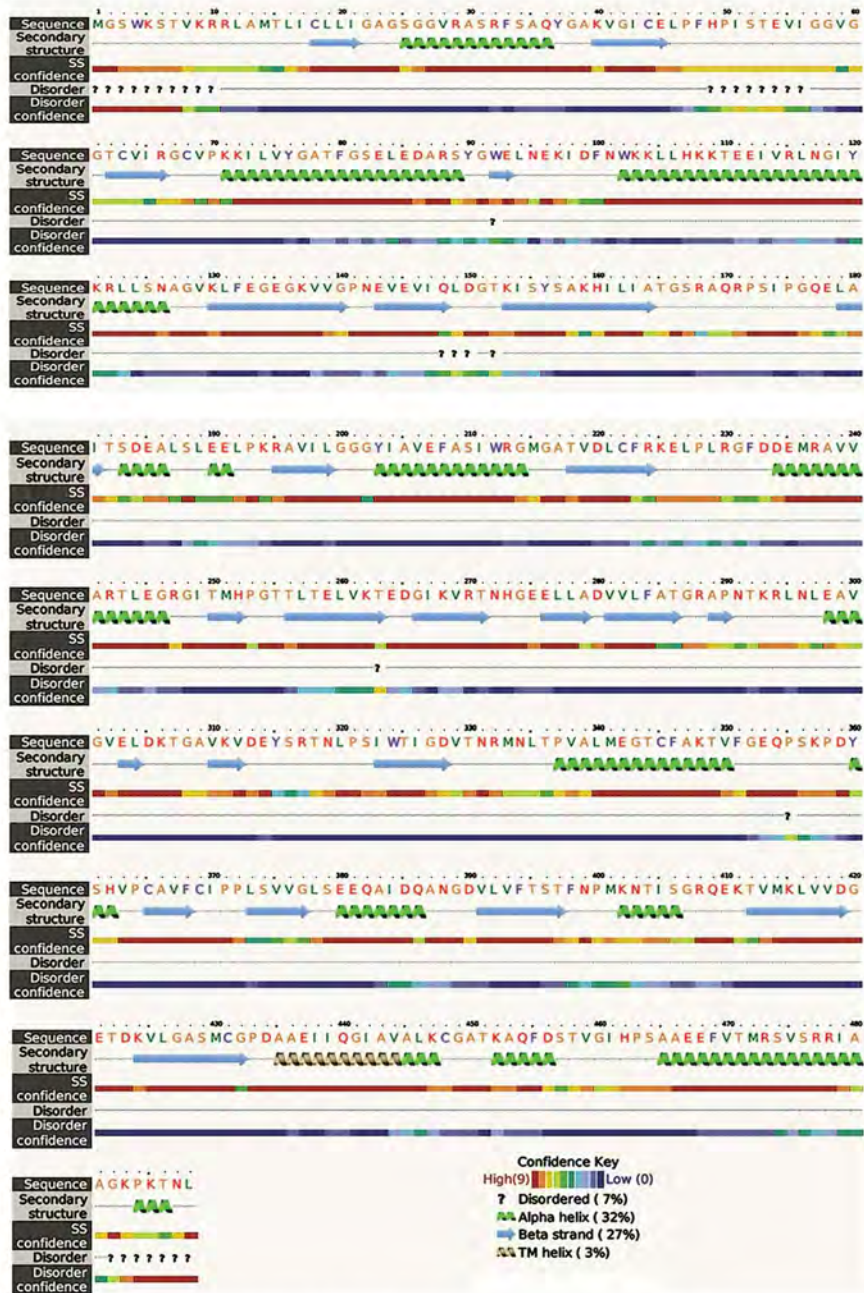
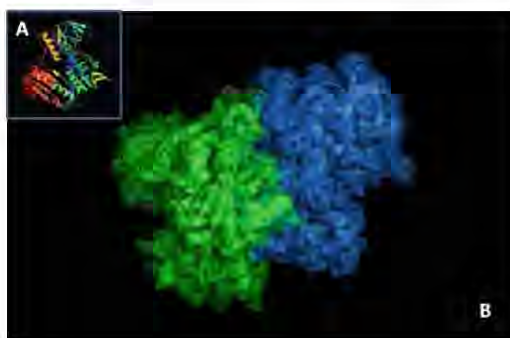


Fig. 2. Prediction of secondary structure in olive pollen GR2.



**Fig. 3.** (A) Prediction of 3D structure in olive pollen GR2 (by Phyre2). (B) 3D modeling by PyMol of olive pollen GR2.

tree pollen, and led to obtain the complete or a majority of the sequence of GR1 and GR2 genes. Cleaning and filtering of all outputs of the transcriptome to identify those eleven GR sequences obtained proved highly complicated due to the high homology between these two genes. The phylogenetic analysis carried out did not cluster GR1 and GR2 within specific group, thus we cannot suggest distinctive features for these GR homologous in the reproductive tissues. However, by predicting the cellular location of these genes we identified that most of the GR2s are expressed in the chloroplast, thus confirming previous studies which suggested that this is the isoform really involved in adequate pollen development [13].

GSH production by GR is essential for proper pollen tube tip growth [13, 36, 37] controlling both the speed and orientation during pollen tube elongation. Due to the high metabolism rate in olive pollen, grand quantities of ROS are generated and this can be detected by using confocal microscopy [38]. Still many aspects have to be elucidated, such as the importance of GSH in pollen-stigma signaling, and the action of this and GR activity during pollen hydration among others.

**Conflict of Interest.** The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

**Acknowledgments.** This work was supported by ERDF-cofunded projects BFU2016-77243-P, P2011-CVI7487, 201540E065, RTC-2015-4181-2 and RTC2016-4824-2. EGQ thanks the MINECO for FPI grant funding.

## References

1. Shah, Z.H., Hamooh, B.T., Daur, I., Ha Rehman, H.M., Alghabari, F.: Transcriptomics and biochemical profiling: current dynamics in elucidating the potential attributes of olive. *Curr. Issues Mol. Biol.* **21**, 73–98 (2017)
2. Kaur, H., Bhatla, S.C.: Melatonin and nitric oxide modulate glutathione content and glutathione reductase activity in sunflower seedling cotyledons accompanying salt stress. *Nitric Oxide* **59**, 42–53 (2016)



3. Halliwell, B., Foyer, C.H.: Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* **139**(1), 9–17 (1978)
4. Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M.: Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**, 278–284 (1990)
5. Foyer, C.H., Halliwell, B.: The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**(1), 21–25 (1976)
6. Rasmusson, A.G., Møller, I.M.: NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant Physiol.* **94**, 1012–1018 (1990)
7. Jiménez, A., Hernández, J.A., del Río, L.A., Sevilla, F.: Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* **114**, 175–284 (1997)
8. Stevens, R.G., Creissen, G.P., Mullineaux, P.M.: Characterization of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta* **211**, 537–545 (2000)
9. Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., del Río, L.A., Palma, J.M.: Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytol.* **170**, 43–52 (2006)
10. Creissen, G., Edwards, E.A., Enard, C., Wellburn, A., Mullineaux, P.: Molecular characterization of glutathione reductase cDNAs from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant J.* **2**(1), 129–131 (1992)
11. Chew, O., Whelan, J., Miller, A.H.: Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defences in plants. *J. Biol. Chem.* **278**(47), 46869–46877 (2003)
12. Kaur, N., Reumann, S., Hu, J.: Peroxisome biogenesis and function. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD (2009). doi:10.1199/tab.0123
13. Marty, L., Siala, W., Schwarzländer, M., Fricker, M.D., Wirtz, M., Sweetlove, L.J., Meyer, Y., Meyer, A.J., Reichheld, J.P., Hell, R.: The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 9109–9114 (2009)
14. Foyer, C.H., Noctor, G.: Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* **119**, 355–364 (2003)
15. del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B.: Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes Production scavenging and role in cell signaling. *Plant Physiol.* **141**, 330–335 (2006)
16. Nyathi, Y., Baker, A.: Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1478–1495 (2006)
17. Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G.: Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* **61**, 4197–4220 (2010)
18. Garrett, R.H., Grisham, C.M.: *Biochemistry*, 3rd edn. Thomson Brooks/Cole, Belmont (2005). ISBN 0534490336
19. Anjum, N.A., Umar, S., Chan, M.T. (eds.): *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Springer, Netherlands (2010). ISBN 978-90-481-9404-9
20. Cejudo, F.J., Meyer, A.J., Reichheld, J.P., Rouhier, N., Traverso, J.A.: *Thiol-Based Redox Homeostasis and Signalling*. Frontiers Media SA, Lausanne (2014). ISBN 978-2-88919-284-7
21. Carmona, R., Zafra, A., Seoane, P., Castro, A.J., Guerrero-Fernández, D., Castillo-Castillo, T., Medina-García, A., Cánovas, F.M., Aldana-Montes, J.F., Navas-Delgado, I., Alché, J.D., Claros, M.G.: ReprOlive: a database with linked data for the olive tree (*Olea europaea* L.) reproductive transcriptome. *Frontiers Plant Sci.* **6**, 625 (2015)

22. Cruz, F., Julca, I., Gómez-Garrido, J., Loska, D., Marcet-Houben, M., Cano, E., Galán, B., Frias, L., Ribeca, P., Derdak, S., Gut, M., Sánchez-Fernández, M., García, J.L., Gut, I.G., Vargas, P., Alioto, T.S., Gabaldón, T.: Genome sequence of the olive tree, *Olea europaea*. *GigaScience* **5**, 29 (2016)
23. Olive genome and annotation files. <http://denovo.cnag.cat/genomes/olive/>
24. de Dios Alché, J., Mrani-Alaoui, M., Castro, A.J., Rodríguez-García, M.I.: Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during *in vitro* germination. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1149–1157 (2004)
25. McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., Lopez, R.: Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **41**, W597–W600 (2013)
26. Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O.: SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 221–224 (2010)
27. Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.: jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Meth.* **9**, 772 (2012)
28. Chou, K.C., Shen, H.B.: Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS ONE* **5**, e11335 (2010)
29. Heazlewood, J.L., Durek, P., Hummel, J., Selbig, J., Weckwerth, W., Walther, D., Schulze, W.X.: PhosPhAt: a database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucleic Acids Res.* **36**, D1015–D1021 (2008)
30. Lee, T.-Y., Bretana, N., Lu, C.-T.: PlantPhos: using maximal dependence decomposition to identify plant phosphorylation sites with substrate site specificity. *BMC Bioinf.* **12**, 261 (2011)
31. Xue, Y., Liu, Z., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X., Ren, J.: GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PLoS ONE* **5**, e11290 (2010)
32. Martinez, A., Traverso, J.A., Valot, B., Ferro, M., Espagne, C., Ephritikhine, G., Zivy, M., Giglione, C., Meinnel, T.: Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes. *Proteomics* **8**, 2809–2831 (2008)
33. Kelley, L.A., Sternberg, M.J.: Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363–371 (2009)
34. Rutley, N., Twell, D.: A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reprod.* **28**, 73–89 (2015)
35. Dukowic-Schulze, S., Chen, C.: The meiotic transcriptome architecture of plants. *Frontiers Plant Sci.* **5**, 220 (2014)
36. Zechmann, B., Mauch, F., Sticher, L., Müller, M.: Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *J. Exp. Bot.* **59**, 4017–4027 (2008)
37. Zechmann, B., Koffler, B.E., Russell, S.D.: Glutathione synthesis is essential for pollen germination *in vitro*. *BMC Plant Biol.* **11**, 54 (2011)
38. Zafra, A., Rodríguez-García, M.I., Alché, JdD: Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biol.* **10**, 36 (2010)





RESEARCH PAPER

## Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour

Estefanía García-Quirós<sup>1,2</sup>, Juan de Dios Alché<sup>1</sup>, Barbara Karpinska<sup>3</sup>, and Christine H. Foyer<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Plant Reproductive Biology and Advanced Microscopy Laboratory, Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, Spain

<sup>2</sup> Centre for Plant Sciences, School of Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK

<sup>3</sup> School of Biosciences, College of Life and Environmental Sciences, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK

\* Correspondence: c.h.foyer@bham.ac.uk

Received 2 May 2019; Editorial decision 6 August 2019; Accepted 10 August 2019

Editor: Zoe Wilson, University of Nottingham, UK

### Abstract

The importance of the glutathione pool in the development of reproductive tissues and in pollen tube growth was investigated in wild-type (WT) *Arabidopsis thaliana*, a reporter line expressing redox-sensitive green fluorescent protein (roGFP2), and a glutathione-deficient *cad2-1* mutant (*cad2-1/roGFP2*). The *cad2-1/roGFP2* flowers had significantly less reduced glutathione (GSH) and more glutathione disulfide (GSSG) than WT or roGFP2 flowers. The stigma, style, anther, germinated pollen grains, and pollen tubes of roGFP2 flowers had a low degree of oxidation. However, these tissues were more oxidized in *cad2-1/roGFP2* flowers than the roGFP2 controls. The ungerminated pollen grains were significantly more oxidized than the germinated pollen grains, indicating that the pollen cells become reduced upon the transition from the quiescent to the metabolically active state during germination. The germination percentage was lower in *cad2-1/roGFP2* pollen and pollen tube growth arrested earlier than in roGFP2 pollen, demonstrating that increased cellular reduction is essential for pollen tube growth. These findings establish that ungerminated pollen grains exist in a relatively oxidized state compared with germinating pollen grains. Moreover, failure to accumulate glutathione and maintain a high GSH/GSSG ratio has a strong negative effect on pollen germination.

**Keywords:** Flower development, glutathione, oxidative stress, pollen germination, redox regulation, redox-sensitive green fluorescent protein (roGFP).

### Introduction

The tripeptide thiol  $\gamma$ -glutamylcysteine glycine (glutathione, GSH) is the most abundant low-molecular-weight thiol in plants and animals (Noctor *et al.*, 2011). GSH synthesis in the cytosol and plastids of plant cells (Wächter *et al.*, 2005; Galant *et al.*, 2011) occurs via the sequential action of two ATP-dependent enzymes,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS), also called  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase, and glutathione synthase (GS) (Cairns *et al.*, 2006; Pasternak *et al.*, 2008; Galant *et al.*, 2011; Noctor *et al.*, 2011). In the first step,  $\gamma$ -glutamylcysteine

( $\gamma$ -EC) is produced from cysteine and glutamate by the action of  $\gamma$ -ECS. In the second step, glycine is added to  $\gamma$ -EC to form GSH by the action of GS (Noctor *et al.*, 2002; Sugiyama *et al.*, 2004; Wächter *et al.*, 2005; Galant *et al.*, 2011). GSH synthesis is regulated by the availability of cysteine or glycine and by the post-translational redox activation of  $\gamma$ -ECS via the formation of an intramolecular disulfide bond (Cys186-Cys406 in *Arabidopsis*) (Noctor, *et al.*, 2002; Gromes, *et al.*, 2008). In this way GSH synthesis is regulated by the redox

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

environment of the chloroplast, allowing rapid responses to biotic and abiotic stresses.

Knockout  $\gamma$ -ECS mutants are lethal (Cairns et al., 2006). However, there are a number of *Arabidopsis* mutants with defects in  $\gamma$ -ECS that allow a lower level of GSH synthesis (Cobbett et al., 1998; Ball et al., 2004). These mutants have significantly lower levels of GSH accumulation than the wild type (WT), and have no marked shoot phenotypes but variable effects on root system development and architecture (Schnaubelt et al., 2013). For example, very low levels of GSH are present in the *nud1* mutant, leading to arrest of the root apical meristem (Vernoux et al., 2000; Schnaubelt et al., 2013). In contrast, the *cad2-1* mutant contains ~30% of WT GSH levels and shows some effects on lateral root production (Schnaubelt et al., 2013).

GSH and  $\gamma$ -EC are exported from the chloroplasts to the cytosol by CLT transporters, but the mechanisms of import of GSH into mitochondria and other cellular compartments are largely unknown (Gigolashvili and Kopriya, 2014; Zechmann, 2014). GSH accumulates at high concentrations (5–10 mM) in plant cells and is directly involved in the maintenance of intracellular redox homeostasis, acting as a redox buffer (Meister et al., 1983; Schafer et al., 2001; López-Mirabal et al., 2008; Noctor et al., 2011, 2016). Like ascorbate, GSH serves to limit the accumulation of reactive oxygen species (ROS) within plant cells (Mittler et al., 2004; Foyer and Noctor, 2005, 2009, 2011; Noctor et al., 2012; Mittler, 2017). As a result of interactions with ROS, GSH is oxidized to glutathione disulfide (GSSG). GSSG is reduced back to GSH by the action of glutathione reductase (Schwarzländer et al., 2008; Marty et al., 2009; García-Quiros et al., 2017). GSH and GSSG are key players in cellular redox regulation, governing the redox potential and ensuring a stable redox environment within the cell. GSH and GSSG are also involved in the control of gene expression (Foyer et al., 2001; Maughan and Foyer, 2006). However, *in vivo* measurements of the glutathione pool have revealed that the cytosol, nuclei, and mitochondria contain very little GSSG, and that oxidative challenges are rapidly counterbalanced by the network of other antioxidants (Queval et al., 2009; Noctor et al., 2011, 2016; de Simone et al., 2017). Moreover, GSSG can be rapidly sequestered in the vacuole (Noctor et al., 2013).

Together with nitric oxide (Araiki et al., 2011), ROS and GSH are key regulators of plant development (Considine and Foyer, 2014). These redox molecules are particularly important in the development of flowers and in pollen germination (Zechmann and Müller, 2010; Zechmann et al., 2011a, b; Traverso et al., 2013; Schippers et al., 2016). GSH functions together with NADPH-thioredoxin (TRX)-reductase NTR/TRX pathways to regulate auxin signalling during and after pollen germination (Zechmann et al., 2011a, b; Traverso et al., 2013). GSH depletion triggers alterations in auxin metabolism that lead to the inhibition of pollen germination. This observation is likely to be linked to changes in ROS accumulation that occur in the reproductive tissues during pollen and pistil development, pollen tube germination, and pollen–pistil interactions (Zafra et al., 2010). However, the relevance of glutathione-dependent pathways remains poorly understood, and too little is known about the compartment-specific changes in redox processes that occur during flower and pollen development.

A combination of different techniques has been used to investigate the role of glutathione in fertilization and the germination of the pollen tube. Specific antibodies were used to characterize the abundance of GSH in flowers during development. In addition, the effects of low GSH in the cytosol and nuclei of *Arabidopsis thaliana* reproductive tissues were determined using *in vivo* redox-sensitive green fluorescent protein (roGFP) reporter lines (Meyer et al., 2007). roGFP-expressing WT (roGFP2) and *cad2-1* mutant (*cad2-1*/roGFP2) reporter lines were used in the present study to estimate the redox state of the nuclei and cytosol of flower and pollen cells to provide some of the missing pieces of information required to decipher the role of glutathione in these key processes.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

Seeds of WT *Arabidopsis thaliana* accession Columbia-0 (Col-0), *Ubi-1* expressing roGFP2 (de Simone et al., 2017), and *cad2-1* mutants expressing roGFP2 (*cad2-1*/roGFP2) were surface sterilized and washed twice with sterile water. After stratification for 2 days in the dark at 4 °C, seeds were sown on soil and grown in controlled environment chambers under 120–150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance with an 8 h/16 h day/night period, 22 °C/18 °C day/night temperatures, and a relative humidity of 60%. Samples were collected from 6-week-old plants bearing flowers at different stages (Alvarez-Buylla et al., 2010). Samples were collected from younger flower buds at flowering stage 6–7, with sepals that still enclose buds and anthers (at meiosis) and tetrads. Flowers were also collected from later stages of flowering, particularly flowering stage 11–12 (when petals, stamens and pollen at the bicellular–tricellular transition are present), flowering stage 13 (when stamens overtop the gynoecium and anthers dehisce), and flowering stage 14 (when dehiscent anthers extend above the stigma). Each experiment was repeated three times and results are the average of three independent experiments.

### Pollen germination

A total of 25–30 freshly opened flowers (at stage 14) of *Arabidopsis* were collected and allowed to dry at room temperature for 30 min in a 1.5 ml tube with the lid opened. A 1 ml volume of germination medium (Fan et al., 2001) was added and the pollen was concentrated according to Li (2011). The pollen grains were germinated at 28 °C and in the dark for 1, 2, and 3 h. Images of germinated pollen grains were taken in a Leica DM6000B or a Nikon Eclipse TE2000-U inverted epifluorescence microscope. The germination of the pollen was assessed by counting the germinated grains (those in which the pollen tube length was greater than the pollen diameter) at the different germination times, and expressing the number of germinated grains as a percentage of the total number of pollen grains. The length of the pollen tubes was calculated using the Straight tool of ImageJ software. Data presented are the means and SD of a minimum of nine different samples of each one of three experimental replicates.

### Sample preparation for immunohistochemistry

Samples were collected at the different developmental stages identified in the figure legends and immersed in a fixative solution (4% paraformaldehyde and 0.25% glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2). Further dehydration in an ethanol series and embedding in (Uicryl) resin followed by polymerization using UV light at –20 °C were performed. Thin sections (1  $\mu\text{m}$ ) were attached to 3-triethoxysilylpropylamine-treated slides.

### Immunolabeling of glutathione

Thin sections were incubated in phosphate-buffered saline (pH 7.2) containing 2.5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) for 1 h at room

temperature and then treated with primary anti-GSH antibody (Agrisera prod. No. AS09 594) followed by secondary antibody (anti-rabbit IgG Alexa549-labelled secondary antibody Molecular Probes). Negative controls were prepared by omitting the primary antibody. After washing three times, samples were mounted with citifluor (Ted Pella). Fluorescence microscopy observations were performed using a Nikon Eclipse TE2000-U inverted microscope fitted with a ProgRes MF Cool CCD microscope camera (Jenoptik). Fluorescence intensity was quantified using ImageJ software. Data presented are the average of a minimum of nine images obtained in three independent experiments.

#### Liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry

Tissue glutathione contents were determined by liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry (LC-ES/MS). Samples of open flowers and floral buds (green and white) of WT, roGFP2, and *cad2-1/roGFP2* plants were frozen in liquid nitrogen, ground, and immediately homogenized in 1 ml 0.1 M HCl. After centrifugation, supernatants were extracted again. The supernatants were pooled and filtered through 0.45 µm polyvinylidene fluoride filters and analysed by LC-ES/MS on a Triple quadrupole mass spectrometer (Quattro micro) coupled to a liquid chromatograph (Waters Alliance 2695) with dual wavelength detection.

#### Confocal laser scanning microscopy and image analysis

Freshly opened flowers (day 0 according to Bouzidi *et al.*, 2007) were incubated in 1 ml of germination medium (Fai *et al.*, 2001) at 28 °C for 1 h in darkness. After the incubation, selected flowers were assembled on evaporated slides, containing a few drops of the germination medium. They were immediately observed with a C-1 confocal microscope (Nikon) fitted on a Nikon Eclipse TE2000-U inverted microscope, using an image capture schedule equivalent to that described by de Siqueira *et al.* (2017). Briefly, the image of reduced roGFP (green) was calculated by subtracting the image after excitation with 405 nm from the image obtained after excitation with 488 nm, by using ImageJ software. The final reduced roGFP/oxidized roGFP ratios were also determined with ImageJ, by using a threshold of 10. Finally, to better illustrate the redox potential differences in the images evaluated, the grayscale was converted in a false-color scale image using the ImageJ “Fire” query table. All measurements were taken with identical adjustments to be able to compare them in absolute terms (Meyer *et al.*, 2007). The intensity per area was measured in each image by using ImageJ software, and these data were used to determine the degree of oxidation and the redox potential in each tissue examined according to the Nernst equation (de Siqueira *et al.*, 2017). A minimum of 10 samples per treatment were analysed.

#### Statistical analysis

IBM SPSS Statistics software (version 21.0.0.0) was used to analyse the statistical significance of the results. The Shapiro–Wilk test combined with the Kolmogorov–Smirnov test was used to evaluate the normality of the data. A one-way ANOVA was performed in combination with a Tukey’s multiple range test and *post hoc* Bonferroni procedure to verify the statistical significance of the data.

## Results

### Immunolocalization of GSH during flower development

GSH was detected in the microsporocytes, tetrads, pollen grains, and anther tissues (including the tapetum) of the WT, roGFP2, and *cad2-1/roGFP2* plants using anti-GSH antibody (Figs 1–3). GSH was also present in the gynoecium (including stigma), the embryo sacs, and other tissues of the ovary (Figs 4–6) of the WT and roGFP2 plants.

GSH was present in the nuclei, cytosol, apoplast/cell wall compartment, tapetum, and embryo sacs of these lines. GSH and GSSG are transported throughout the plant, and both metabolites are readily taken up by the plasma membrane. Low levels of GSH and GSSG have been detected in the apoplastic fluid of leaf cells (Vanacker *et al.*, 1998), consistent with our findings. The antibody-linked fluorescence was much less intense in all the flower tissues of the *cad2-1/roGFP2* plants than either the WT or roGFP2 plants. This observation reflects the lower levels of GSH present in the *cad2-1/roGFP2* plants than the other lines, which had similar levels of GSH during all developmental stages, especially at the end of anther development (Fig. 7).

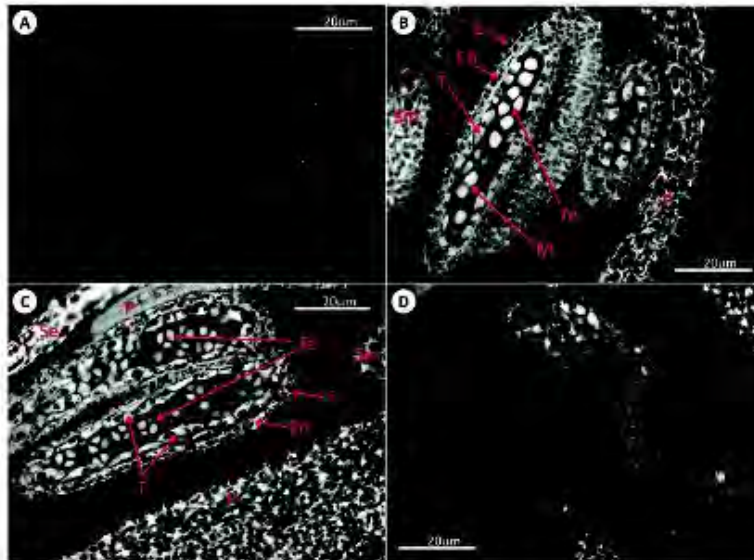
### LC-ES/MS determination of GSH and GSSG levels

The levels of GSH and GSSG were similar in WT (Fig. 8A) and roGFP2 (Fig. 8B) flowers at all stages of development. The highest levels of GSH were determined in flowers at stage 14, with high GSH/GSSG ratios maintained throughout flower development in the WT (Fig. 8A) and roGFP2 (Fig. 8B) plants. In contrast, the flowers of *cad2-1/roGFP2* plants had less than 50% of the GSH present in WT or roGFP2 lines at equivalent stages of flower development. Moreover, the levels of GSSG in *cad2-1/roGFP2* flowers (Fig. 8C) were similar to or slightly higher than those detected in WT (Fig. 8A) and roGFP2 (Fig. 8B) flowers, resulting in lower GSH/GSSG ratios.

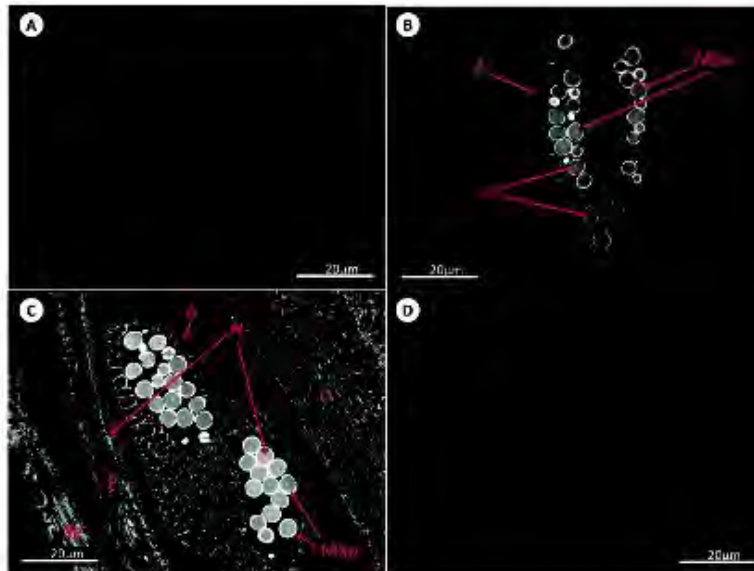
### Redox state of the glutathione pool in vivo

roGFP fluorescence was readily detected in the anthers, pistils, and germinated pollen grains of roGFP2 and *cad2-1/roGFP2* plants (Figs 9–11). The degree of oxidation was low in the stigma, style, anther, germinated pollen grains, and pollen tubes of roGFP2 flowers (Fig. 12), suggesting that the glutathione pool is highly reduced in these tissues. This finding is in agreement with the data obtained by biochemical analysis of the tissues described above. In contrast, the ungerminated pollen grains were significantly more oxidized than the germinated pollen grains (Fig. 12). The degree of oxidation was also higher in the ungerminated pollen grains of *cad2-1/roGFP2* flowers compared with germinated pollen grains and other tissues (Fig. 12). All tissues (stigma, style, anther, mature and germinated pollen grains, and pollen tubes) of the *cad2-1/roGFP2* flowers tended to be more oxidized than the respective tissues of roGFP2 flowers (Fig. 12). However, these differences were statistically significant only for stigma, anther, and mature pollen.

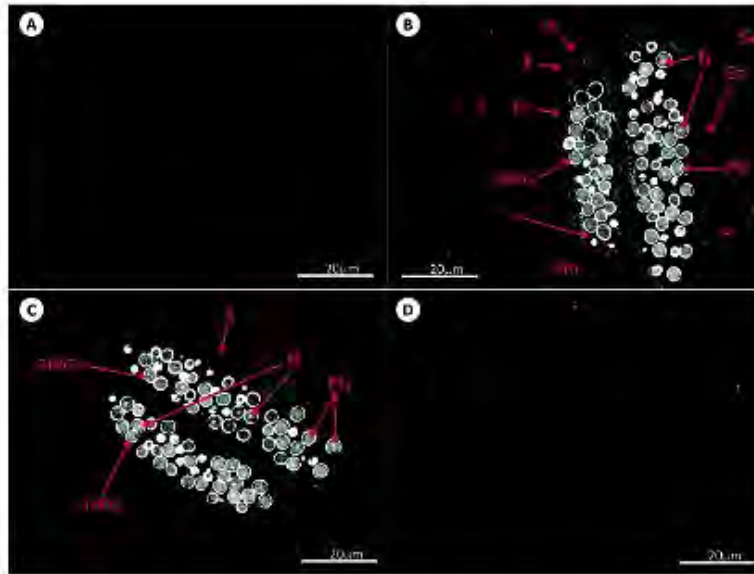
The glutathione redox potentials were similar in the stigma, style, anther, germinated pollen grains, and pollen tubes of the roGFP2 flowers (Fig. 13). However, the glutathione redox potential of the ungerminated pollen grains was significantly lower than that of the germinated pollen grains of roGFP2 (Fig. 13). The degree of oxidation was lower in the stigma, style, anther, germinated pollen grains, and pollen tubes of *cad2-1/roGFP2* flowers than in roGFP2 plants (Fig. 13). The most positive glutathione redox potentials were determined in the ungerminated pollen grains. These values were significantly more positive than those calculated for the roGFP2 plants (Fig. 13).



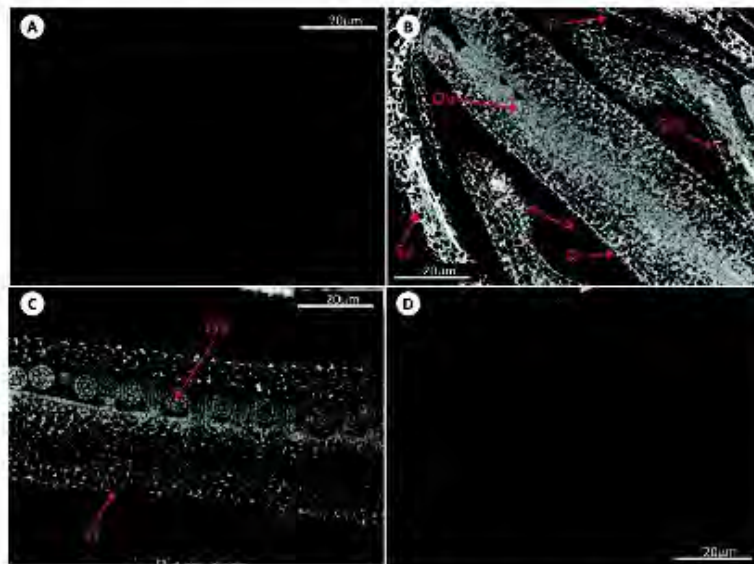
**Fig. 1.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in *Arabidopsis* anthers at stages 6–7 of development. (A) Negative control (microcytes); (B) WT (microcytes); (C) roGFP2 (tetrads); (D) *cad2-1/roGFP2* (microcytes). E, epidermis; En, endothecium; M, meiosis; P, petal; Se, sepal; Sm, stamen; T, tapetal layer; Te, tetrad.



**Fig. 2.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in *Arabidopsis* anthers at stage 13. (A) Negative control; (B) WT; (C) roGFP2; (D) *cad2-1/roGFP2*. A, anther; MSp, microspores; N, nucleus; O, ovary; P, petal; Se, sepal.

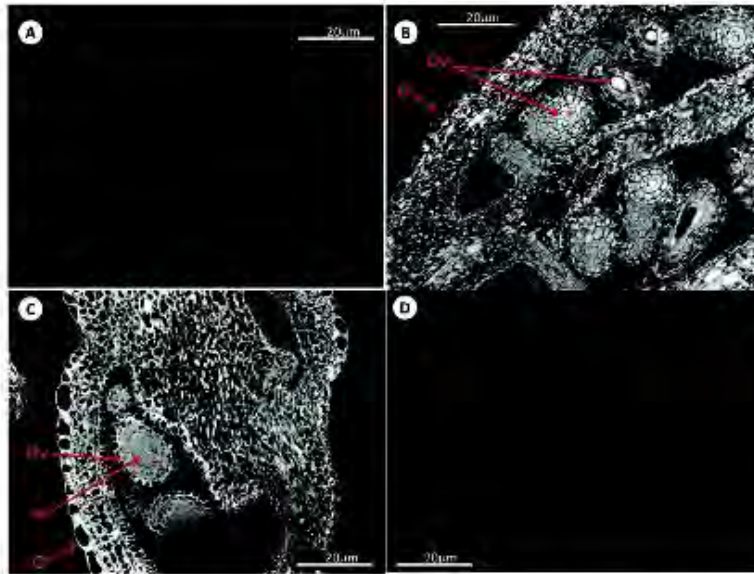


**Fig. 3.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in *Arabidopsis* anthers at stage 14. (A) Negative control; (B) WT; (C) roGFP2; (D) *cad2-1/roGFP2*. A, anther; BPG, bicellular pollen grain; E, epidermis; En, endothecium; N, nucleus; P, petal; PG, pollen grain; Se, sepal; Sm, stamen; T, tapetal layer; TRG, trilete pollen grain.

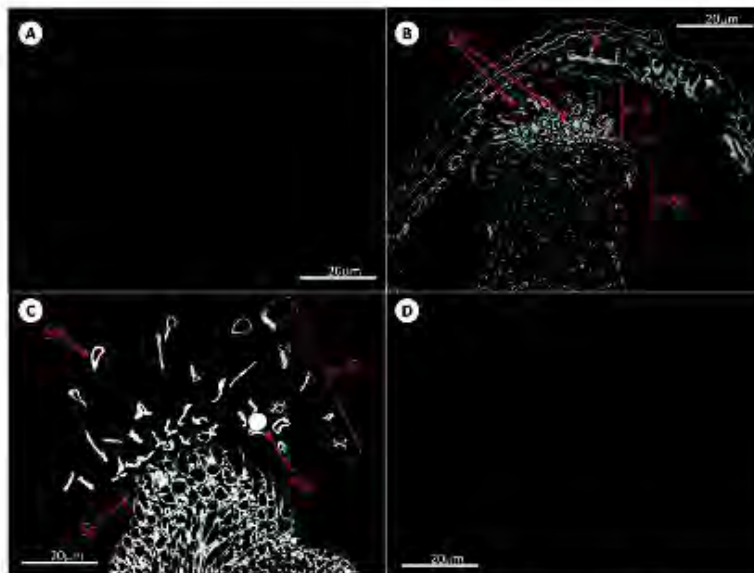


**Fig. 4.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in *Arabidopsis* flowers (pistil) at stage 11-12. (A) Negative control; (B) WT; (C) roGFP2; (D) *cad2-1/roGFP2*. A, anther; O, ovary; Ov, ovum; P, petal; Se, sepal; Sm, stamen.

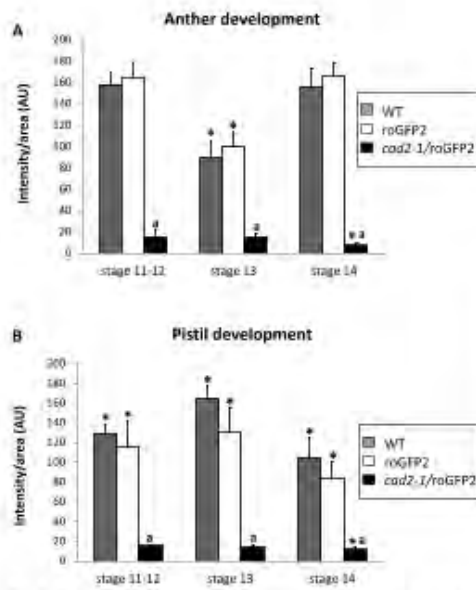




**Fig. 5.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in *Arabidopsis* pistils at stage 13. (A) Negative control; (B) WT; (C) *rad2-1/rad2-1::GFP2*; (D) *rad2-1/rad2-1::GFP2*. N, nucleus; O, ovary; Ov, ovum.



**Fig. 6.** Immunolocalization of GSH by antibody-associated fluorescence microscopy in *Arabidopsis* petals at stage 14. (A) Negative control; (B) WT; (C) *rad2-1/rad2-1::GFP2*; (D) *rad2-1/rad2-1::GFP2*. P, petal; PG, pollen grain; S, stigma; SP, stigmatic papillae; St, style.

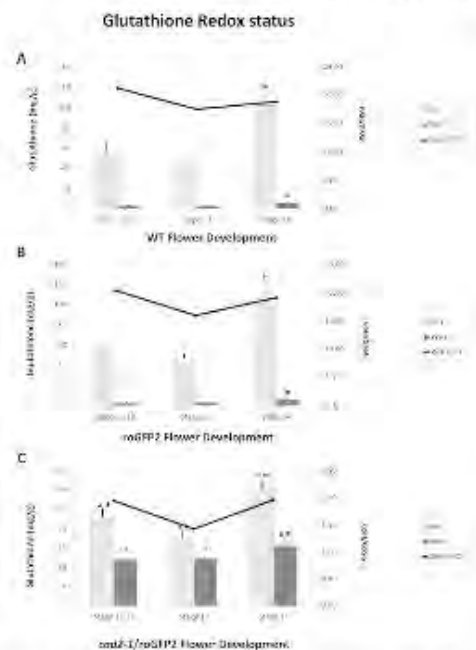


**Fig. 7.** Relative antibody-associated fluorescence in different organs at different stages of flower development (11–12, 13, and 14) in WT, roGFP2, and *cad2-1/roGFP2* plants. (A) Development of anthers. (B) Development of pistils. Asterisks indicate statistical significance ( $P < 0.05$ ) among the different developmental stages within the same line (roGFP2 or *cad2-1*). a indicates statistical significance ( $P < 0.05$ ) between different lines.

Germination was significantly slower in *cad2-1/roGFP2* pollen than in roGFP2 pollen (Fig. 14). The germination percentage was also lower in the *cad2-1/roGFP2* pollen. Pollen tube growth arrested earlier in *cad2-1/roGFP2* pollen compared with roGFP2 pollen (Fig. 14). Viability experiments demonstrated that the non-germinated pollen grains were alive (data not shown).

## Discussion

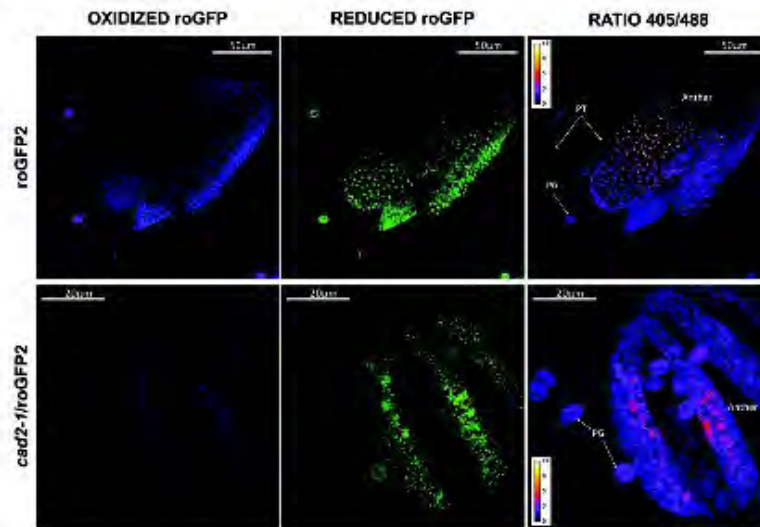
The redox state of cells is a crucial regulator of metabolism, signalling, and function. While very few tools are available to measure the redox state of living cells, the roGFP probes have proved to be reliable and widely applicable (Meyer *et al.*, 2007; Schwarzländer *et al.*, 2008, 2009; Allen *et al.*, 2013), especially when they incorporate a glutaredoxin (Fernandes *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2007; Gutscher *et al.*, 2008). The data obtained from roGFP probes therefore provides reliable information concerning the abundance and oxidation state of the glutathione pool *in situ* and *in vivo*. Moreover, roGFP probes have been expressed in a wide variety of cells and organisms, where they can be targeted to specific organelles (Hanson *et al.*, 2004; Birk *et al.*, 2013). The effectiveness of the roGFP2 probes in measuring the redox status of the glutathione pool has previously been demonstrated in studies on other species, such as *Drosophila* (Liu *et al.*, 2012; Allen *et al.*, 2013). The data presented



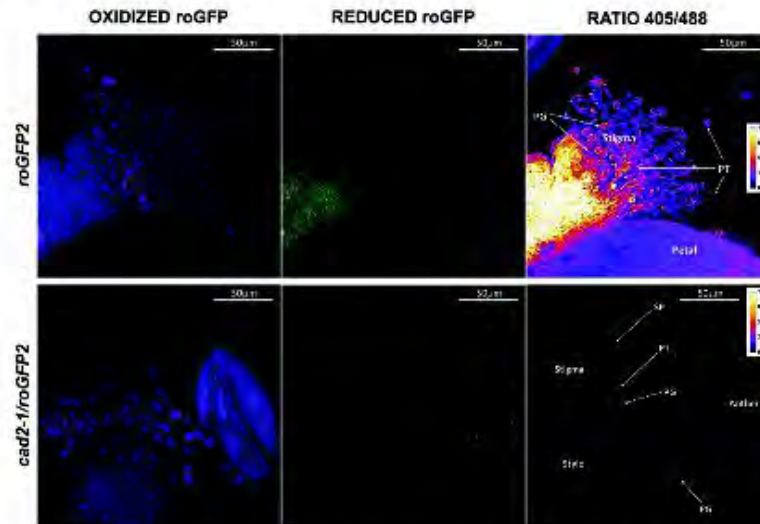
**Fig. 8.** GSH and GSSG contents and GSH/GSSG ratios of flowers at different stages of development. (A) WT; (B) roGFP2; (C) *cad2-1/roGFP2*. Asterisks indicate statistical significance ( $P < 0.05$ ) between different developmental stages. a and b indicate statistical significance at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively, between different lines.

here show that all the tissues of the *cad2-1/roGFP2* flowers had a lower GSH/GSSG ratio (Fig. 8) and a higher degree of oxidation than the roGFP2 flowers (i.e. in the WT background; Figs 12 and 13). These findings contrast with data from leaves: the level of total glutathione was decreased in the leaves of *cad2-1* mutants but the GSH/GSSG ratios were similar to the WT (Schmaubek *et al.*, 2015). Taken together, these findings suggest that the flowers of *cad2-1* mutants have a lower capacity to keep the cellular glutathione pool reduced and maintain high GSH/GSSG ratios than the leaves.

A strong association between the extent of glutathione accumulation and flowering time has been demonstrated (Ogawa *et al.*, 2001; Yanagida *et al.*, 2004). Flowering was accelerated in the *cad2-1/roGFP2* mutants compared to the WT (Kocsy *et al.*, 2013). Moreover, glutathione is required for the initiation of the floral meristem (Bashandy *et al.*, 2010; Kocsy *et al.*, 2013) and also pollen tube germination (Zechmann *et al.*, 2011b). The data presented here builds on this firm foundation and reveals the presence of a low degree of oxidation in all the flower parts (stigma, style, anther, germinated pollen grains and pollen tubes) except the ungerminated pollen. Ungerminated pollen exists in a highly oxidized state that is similar to that found in other quiescent cells (Schippers *et al.*, 2016). In contrast to



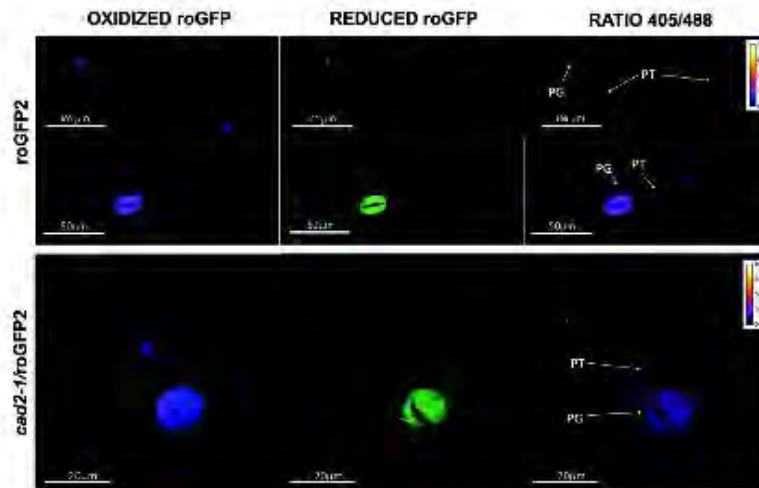
**Fig. 9.** roGFP fluorescence in anthers with pollen grains at dehiscence (stage 14). The first column shows fluorescence resulting from excitation at 405 nm, the second shows fluorescence resulting from excitation at 488 nm, and the last column shows the ratio of fluorescence at 405/488 nm. PG, pollen grain; PT, pollen tube.



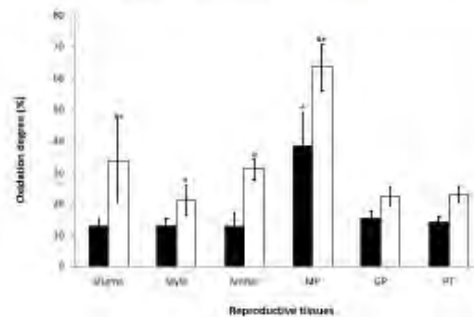
**Fig. 10.** roGFP fluorescence in flowers (pistil, anther, and germinated pollen) (stage 14) on germination medium. The first column shows fluorescence resulting from excitation at 405 nm, the second shows fluorescence resulting from excitation at 488 nm, and the last column shows the ratio of fluorescence at 405/488 nm. PG, pollen grain; PT, pollen tube; SP, stigmatic papillae.

ungerminated pollen, germinated pollen grains and pollen tubes have a similar degree of oxidation to the other flower parts. These findings suggest that the glutathione pool in pollen

is either increased or becomes more reduced (or both) once metabolism is triggered by germination. This process appears to be essential for germination and pollen tube growth because



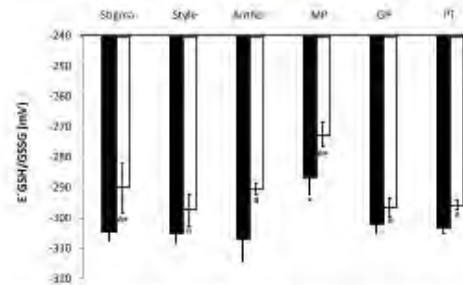
**Fig. 11.** GFP fluorescence in germinated pollen (stage 14). The first column shows fluorescence resulting from excitation at 405nm, the second shows fluorescence resulting from excitation at 488 nm, and the last column shows the ratio of fluorescence at 405/488 nm. PG, pollen grain; PT, pollen tube.



**Fig. 12.** Degree of oxidation in the stigma, style, anther, ungerminated pollen grains (MP), germinated pollen grains (GP), and pollen tube (PT) in roGFP2 (black bars) and *cad2-1/roGFP2* (white bars). Asterisks indicate statistical significance ( $P < 0.05$ ) among the different tissues within the same line. \* indicates statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the two lines.

these processes are significantly impaired in the *cad2-1/roGFP2* pollen, which maintained a high degree of oxidation compared with the roGFP2 controls.

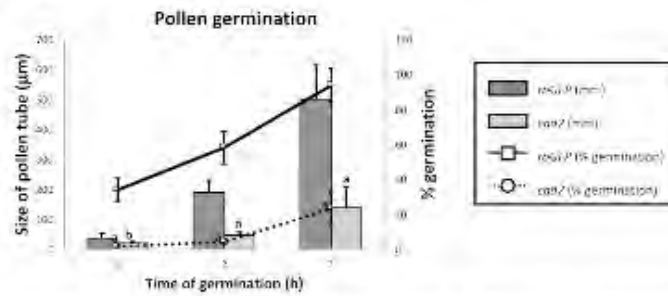
The pollen germination rates measured in the WT in the present study were comparable to values in the literature (~71%; Boavida *et al.*, 2007). Germination rates were decreased to ~5–20% in the pollen grains of the *cad2-1/roGFP2* mutants, which have a restricted capacity for glutathione synthesis (Cobbett *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2007; Maughan *et al.*, 2010; Zechmann *et al.*, 2011a, b; Aller *et al.*, 2013). In addition, the growth rates were much lower in the pollen grains of the mutants. Calculations of glutathione redox potentials based on the roGFP2 measurements confirmed that all the flower parts



**Fig. 13.** Redox potential in the stigma, style, anther, ungerminated pollen grains (MP), germinated pollen grains (GP), and pollen tube (PT) in roGFP2 (black bars) and *cad2-1/roGFP2* (white bars). Asterisks indicate statistical significance ( $P < 0.05$ ) among the different tissues within the same line. \* indicates statistical significance ( $P < 0.05$ ) between the two lines.

apart from ungerminated pollen are maintained in a highly reduced state, as is the case for the germinated pollen and pollen tubes. The highly reduced states measured in the germinated pollen show that the endogenous antioxidant systems have sufficient capacity to deal with the large amounts of ROS and reactive nitrogen species produced by the mitochondria (Traverso *et al.*, 2013; Jiménez-Quesada *et al.*, 2016, 2017; Zafra *et al.*, 2018). Interestingly, the mitochondria in leaf cells were found to have the highest concentrations of glutathione of any of the intracellular compartments, even more than the chloroplasts (Zechmann *et al.*, 2008). A roGFP probe targeted specifically to the mitochondria may be useful in future studies of the role of the glutathione pool in pollen tube mitochondria (Rosenwasser *et al.*, 2010).

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article-abstract/doi/10.1093/jxb/erz355/5574032 by guest on 09 October 2019



**Fig. 14.** Differences in *in vitro* pollen germination between freshly opened flowers of roGFP2 and *cat2-1/roGFP2*. The primary axis (on the left and with bars) shows the elongation of the pollen tube during *in vitro* pollen germination. The secondary axis (on the right and with lines) corresponds to the percentage pollen germination measured at the different lines of germination. a and b indicate statistical significance at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively.

The finding that the glutathione levels were highest in mature flowers, with a gradual increase in glutathione accumulation during flower development, is interesting. Increasing accumulation ROS during flower development may lead to the oxidative activation of  $\gamma$ -ECS in the plastids, resulting in increased glutathione synthesis and accumulation (Gomes *et al.*, 2008). ROS accumulate during leaf senescence and during the orchestration of programmed cell death because of alterations in the expression of enzymes involved in the antioxidant system and changes in mitochondrial metabolism (Mari *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2012). However, the concept that ROS are pro-life signals generated by aerobic metabolism is widely accepted (Foyer *et al.*, 2018). Open flowers contain mature pollen, which will have already interacted with the pistil to trigger the signalling cascade that results in the germination of the pollen tube. A flow cytometry approach to determine the viability of mature tomato and *Arabidopsis* pollen related to ROS accumulation revealed that two types of pollen populations could be identified, namely 'low-ROS' and 'high-ROS' populations, representing low or high metabolic activity, respectively (Luria *et al.*, 2019). The high-ROS pollen germinated with a much higher frequency than the low-ROS pollen (Luria *et al.*, 2019). The metabolically active high-ROS pollen would require high levels of antioxidant activity, particularly high activities of enzymes such as glutathione reductase in order to maintain high GSH/GSSG ratios. Exposure to high temperatures resulted in an increase in the pollen ROS levels and a decrease in germination (Luria *et al.*, 2019). Such stress-induced increases in ROS signals can modify metabolism and cell signalling, particularly if there is no compensating increase in antioxidant capacity. The accumulation of GSSG that was observed in the *cat2-1/roGFP2* flowers (Figs 8, 12, 13) suggests that the pollen cells were in an oxidized state, which would have a negative impact on pollen-pistil metabolism and pollen tube germination in the mature flowers. Cellular GSSG levels are usually kept at very low levels because this metabolite is not compatible with metabolism. In mutants such as the catalase-deficient *cat2*, where GSSG accumulates, the metabolite is sequestered in the vacuoles (Queval *et al.*, 2011; Noctor *et al.*, 2013). It is therefore likely that much of the GSSG accumulated in the *cat2-1/roGFP2* flowers is localized in the vacuole and not the

cytoplasm. Mature flowers begin to degenerate, undergoing programmed cell death processes, which involve high ROS concentrations (Mari *et al.*, 2009; Ayer *et al.*, 2010). The restriction of glutathione accumulation in the *cat2-1/roGFP2* flowers and the lower GSH/GSSG ratios may therefore result in faster flower senescence.

Taken together, the data presented here confirm that maintenance of a highly reduced glutathione pool is essential for pollen germination and tube growth (Zechmann *et al.*, 2008). The transition from the oxidized quiescent state to the metabolically active germinated state that facilitates pollen growth therefore requires a large change in cellular redox homeostasis that involves both increased glutathione accumulation and extensive reduction of the glutathione pool. The data presented here show that the capacity to regenerate GSH from GSSG is restricted in *cat2-1/roGFP2* flowers, as is the ability to synthesize glutathione. These findings demonstrate the importance of cellular redox control in pollen germination and tube growth. Further work is required to demonstrate the nature of the mechanisms involved.

Future studies using combinations of techniques such as roGFP2, fluorochromatic methods (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970), and propidium iodide staining (Jimenez-Quesada *et al.*, 2017) are required to investigate the mechanisms involved in oxidation-induced losses of viability and function. However, current methods that are able to determine the viability of individual pollen grains are difficult to use simultaneously with roGFP2 analysis of redox properties. For example, fluorochromatic detection interferes with the roGFP2 signal because both methods use similar excitation and emission wavelengths.

Pollen grains require a robust antioxidant system to germinate and penetrate through the stigma (Creissen *et al.*, 1999; Zechmann, 2008); further studies are required to determine how much of this defence is constitutive and how much is induced upon alleviation of the quiescent state. The data presented here demonstrate that glutathione is an essential component of this antioxidant defence and perhaps also pollen-stigma signalling through thiol-disulfide exchange mechanisms, protein glutathionylation, and *S*-nitrosoglutathione-mediated processes (Corpas *et al.*, 2013; Zahra *et al.*, 2016). Future work using a range of other mutants and oxidative stress markers is required

- Marty L, Siala W, Schwarzländer M, Fricker MD, Wirtz M, Sweetlove LJ, Meyer Y, Meyer AJ, Reichheld JP, Hell R. 2009. The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **106**, 9109–9114.
- Maughan S, Foyer CH. 2006. Engineering and genetic approaches to modulating the glutathione network in plants. *Physiologia Plantarum* **126**, 382–397.
- Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, et al. 2010. Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter, *PCRT*, are required for glutathione homeostasis and stress responses. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **107**, 2331–2336.
- Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* **52**, 711–760.
- Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R. 2007. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *The Plant Journal* **52**, 973–986.
- Mittler R. 2017. ROS are good. *Trends in Plant Science* **22**, 11–19.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490–498.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1283–1304.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH. 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* **35**, 454–484.
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH. 2016. Oxidative stress and antioxidant systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, Cell & Environment* **39**, 1140–1160.
- Noctor G, Mhamdi A, Queval G, Foyer CH. 2013. Regulating the redox gatekeeper: vacuolar sequestration puts glutathione disulfide in its place. *Plant Physiology* **163**, 665–671.
- Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH. 2011. Glutathione. *The Arabidopsis Book* **9**, e0142.
- Ogawa K, Tasaka Y, Mino M, Tanaka Y, Iwabuchi M. 2001. Association of glutathione with flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* **42**, 524–530.
- Pasternak M, Lim B, Wirtz M, Hell R, Cobbett CS, Meyer AJ. 2008. Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *The Plant Journal* **53**, 999–1012.
- Queval G, Jaillard D, Zechmann B, Noctor G. 2011. Increased intracellular  $H_2O_2$  availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant, Cell & Environment* **34**, 21–32.
- Queval G, Thominet D, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Gakière B, Noctor G. 2009.  $H_2O_2$ -activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Molecular Plant* **2**, 344–356.
- Rosenwasser S, Rot I, Meyer AJ, Feldman L, Jiang K, Friedman H. 2010. A fluorometer-based method for monitoring oxidation of redox-sensitive GFP (roGFP) during development and extended dark stress. *Physiologia Plantarum* **138**, 493–502.
- Schafer FQ, Buettner GR. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine* **30**, 1191–1212.
- Schippers JH, Foyer CH, van Dongen JT. 2016. Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Current Opinion in Plant Biology* **29**, 121–126.
- Schnaubelt D, Queval G, Dong Y, Diaz-Vivancos P, Makgopa ME, Howell G, De Simone A, Bai J, Hannah MA, Foyer CH. 2015. Low glutathione regulates gene expression and the redox potentials of the nucleus and cytosol in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **38**, 266–279.
- Schnaubelt D, Schulz P, Hannah MA, Yocco RE, Foyer CH. 2013. A phenomics approach to the analysis of the influence of glutathione on leaf area and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **4**, 416.
- Schwarzländer M, Fricker MD, Müller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove LJ, Hell R, Meyer AJ. 2008. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *Journal of Microscopy* **231**, 299–316.
- Schwarzländer M, Fricker MD, Sweetlove LJ. 2009. Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. *Biochimica et Biophysica Acta* **1787**, 468–475.
- Sugiyama A, Nishimura J, Mochizuki Y, Inagaki K, Sekiya J. 2004. Homoglutathione synthesis in transgenic tobacco plants expressing soybean homoglutathione synthetase. *Plant Biotechnology* **21**, 79–83.
- Traverso JA, Pulido A, Rodriguez-Garcia MI, Alché JD. 2013. Thiol-based redox regulation in sexual plant reproduction: new insights and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, 465.
- Vanacker H, Harbinson J, Ruisch J, Carver TLW, Foyer CH. 1998. Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma* **205**, 129–140.
- Vernoux T, Wilson RC, Seelley KA, et al. 2000. The *ACOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell* **12**, 97–110.
- Wachter A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T. 2005. Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *The Plant Journal* **41**, 15–30.
- Yanagida M, Mino M, Iwabuchi M, Ogawa K. 2004. Reduced glutathione is a novel regulator of vernalization-induced bolting in the rosette plant *Eustoma grandiflorum*. *Plant & Cell Physiology* **45**, 129–137.
- Zafra A, Castro AJ, Alché JD. 2018. Identification of novel superoxide dismutase isoenzymes in the olive (*Olea europaea* L.) pollen. *BMC Plant Biology* **18**, 114.
- Zafra A, Rejón JD, Hiscock SJ, Alché Jde D. 2016. Patterns of ROS accumulation in the stigmas of angiosperms and visions into their multifunctionality in plant reproduction. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1112.
- Zafra A, Rodríguez-García MI, Alché Jde D. 2010. Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biology* **10**, 36.
- Zechmann B. 2014. Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science* **5**, 566.
- Zechmann B, Koffler BE, Russell SD. 2011b. Glutathione synthesis is essential for pollen germination in vitro. *BMC Plant Biology* **11**, 54.
- Zechmann B, Liou LC, Koffler BE, Horvat L, Tomašić A, Fulgosi H, Zhang Z. 2011a. Subcellular distribution of glutathione and its dynamic changes under oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **11**, 631–642.
- Zechmann B, Mauch F, Sticher L, Müller M. 2008. Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *Journal of Experimental Botany* **59**, 4017–4027.
- Zechmann B, Müller M. 2010. Subcellular compartmentation of glutathione in dicotyledonous plants. *Protoplasma* **246**, 15–24.







