

76



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“CARACTERIZACION GENETICA Y MOLECULAR DE LA POBLACION 011613-x de *Nicotiana glauca* (SOLANACEAE)”

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
GABRIELA GARCIA RAMOS



MEXICO, D. F.

Director de Tesis:
DR. FELIPE CRUZ GARCIA



2002

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ANEXO al Decreto No. 11
 17 DE ABRIL DE 1960

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización genética y molecular de la población O11613-X
 de Nicotiana glauca (Solanaceae)

realizado por Gabriela García Ramos

con número de cuenta 9408385-9, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

Dr. Felipe Cruz García

Propietario

Dra. G. Judith Márquez Guzmán

Propietario

Dra. Sonia Vázquez Santana

Suplente

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente

M. en C. Eduardo Cuevas García *E. Eduardo Cuevas G.*

FACULTAD DE CIENCIAS
 U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Patricia Ramos Morales
 Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGIA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García y con apoyo de los proyectos:

- **CONACYT J31752-N**
- **DGAPA IN-202799**

Además , durante el desarrollo de esta tesis se recibió la beca del proyecto DGAPA

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a **Dios** por haberme ayudado a seguir luchando en esta vida con todo y todo.

A mis **padres** por haberme dado la vida pero sobre todo por haber puesto tanto empeño y amor en mí para poder realizar este sueño una realidad aun a pesar de todos los dolores de cabeza que pasamos juntos, este trabajo es suyo **Manta** y **Caquito**, gracias por tanto **AMOR** y tanto **APOYO**, los **AMO**.

A mis **hermanos**, **Ely** a ti por ser más que una hermana una amiga, gracias por tus consejos pero sobre todo por tu apoyo en **TODO** y por aguantarme tanto; a ti mi **Chavito** por hacerme reír y llorar en los momentos en que más necesitaba de ti, los **ADORO**.

A ti **amor mio**, por haberme aguantado y comprendido durante todo momento, por estar siempre a mi lado cada vez que más te he necesitado demostrándome tu **AMOR** y **CONFIANZA**, pero sobre todo por no rendirte y brincar las barreras que se atravesaron, **TE AMO**.

A mis **padrinos**, por ser más que tíos y padrinos, unos segundos padres. Gracias por su apoyo y sus consejos pero más que nada por ese gran **AMOR** que siempre me han demostrado. Esto también va para ti **Micky**.

A mis **compadres**, a ti **Norma** por ser una hermana más para mí y por estar a mi lado siempre. A ti compadre **Marco** por apoyarme desde el momento en que nos conocimos, pero a los dos gracias por darme unas niñas tan preciosas que me han llenado plenamente y me hacen fijarme más metas, las amo chiquitas (**Saraj** y **Aixa**).

A mis abuelitos, **Meche**, **Chucho** y **Ana**, por sus sabios consejos y que aunque ya no están físicamente siempre estarán en mi corazón, este trabajo también es para ustedes. A mi abuelito **Amado**, por estar conmigo compartiendo estos momentos de felicidad pero sobre todo por quererme tanto y dejarme ser su gordita.

A mis primos **Germán** y **Feliciano**, por apoyarme en las buenas y en las malas, gracias por su **AMOR Chesman** y **Flaquito**.

A mis asesores **Felipe**, por despertar en mí la ilusión de ser algo más en esta vida, por apoyarme moralmente y ayudarme a fijarme metas insospechables. Gracias por ser más que un asesor un gran **AMIGO**, confidente y compañero de laboratorio.

A la familia **Hernández Rosales**, por ese cariño y su entusiasmo que siempre me han transmitido así como a las muchachas, **Arge**, **Idania** y **Gris**.

A mis compañeros de laboratorio, **Grethel**, por ayudarme cuando más lo he necesitado como amiga y compañera de trabajo; **Javiercito** por ese entusiasmo de hacer las cosas y tu buen humor; **Yuridia** por encontrar en ti una gran amiga; **Gaby A.** y **Adriana** por demostrarme su confianza y apoyo; a **Luis** por ser una personita en quien me pude apoyar.

A **Sony**, por ayudarme durante todo el transcurso de la elaboración de este trabajo, así como por el gran apoyo en la enseñanza de la técnica de microscopía de epifluorescencia, gracias.

A mis amigos de la **Lic.**, **Yaz**, **Tanicus**, **Jaime**, **Karlita**, **Violet**, **Margarita F.**, **Fernando**, **Christian**, **Laurita** por estar a mi lado durante la carrera apoyándome y echándome porras.

A todos los integrantes del **Laboratorio 104**, en donde he ido creciendo como persona y académicamente, a la **Dra. Irma** por apoyarme cada vez que lo he necesitado brindándome su apoyo y confianza; a **Vane** y **Adriana** por ser unas muy buenas compañeras de trabajo; a **Carmen Parra**, por ser no sólo una maestra sino una personita en quien confiar y pedir un consejo cuando se necesita, al **Sr. Enrique** por ayudarme a tener todo el material que necesito a tiempo.

A mis amigos muy íntimos, **Lalo** y **Gaby G.** a quienes con su estímulo de amistad me han hecho llegar hasta donde estoy, así como a todos mis **compañeros** de los demás laboratorios: **101**, **102**, **103**, **105** por brindarme su apoyo y disponibilidad para enseñarme la mecánica de los equipos.

A **Gaby Bruciaga**, que gracias a ella nunca nos falta nada en el laboratorio y me saca siempre de apuros, pero más que eso, ha sido una gran amiga a la que quiero mucho

Y gracias a todos aquellos que me faltaron por mencionar pero que siempre han estado conmigo.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	I
INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE TABLAS	IV
Resumen	V
1.0. ANTECEDENTES	1
1.1. Estructura de la flor	1
1.2. Polinización	3
1.2.1. Papel del estigma y ovario durante la polinización	4
2.0. Autoincompatibilidad heteromórfica	4
2.1. Morfología trístilica	5
3.0. Autoincompatibilidad homomórfica	7
3.1.1. Sistema de AI esporofítico en <i>Brassica</i>	10
3.1.2. Sistema de AI gametofítico en solanáceas	12
3.1.3. Sistema de AI gametofítica en <i>Papaver</i>	15
4.0. Genes modificadores	16
4.1. Genes modificadores en <i>Brassica</i> y el sistema de AI	17
4.2. Genes modificadores en Solanaceae	17
5.0. Antecedentes inmediatos	19
5.1. Pedigrí de la población 011613-X	19
6.0. OBJETIVO GENERAL	22
6.1. Objetivos particulares	22
7.0. MATERIALES Y METODOS	23
7.1. Determinación del fenotipo de polinización de la población 011613-X de <i>N. alata</i> por medio de polinizaciones manuales	23
7.2. Genotipificación de la población 011613-X	23
7.2.1. Purificación de DNA total	23
7.2.2. Amplificación por PCR de fragmentos de DNA codificante para las S-RNasas 24	24
7.3. Análisis electroforético de proteínas estilares para determinar si las S-RNasas se expresan normalmente en plantas AC y AI	27
7.4. Análisis del crecimiento de tubos polínicos en estilos de plantas AC y AI de la población 011613-X	27
8.0. RESULTADOS	29
8.1. Análisis genético de la población 011613-X por medio de polinizaciones manuales	29
8.2. Las plantas de la población 011613-X portan los genes de la S _{C10} ⁻ , S _{A2} ⁻ ó S ₁₀₅ ⁻ RNasas	31
8.3. Las plantas de la población 011613-X expresan niveles normales de S-RNasas	34
8.4. Evaluación del crecimiento de tubos polínicos en estilos de plantas AC y AI de la población segregante 011613-X de <i>N. alata</i>	36
9.0. DISCUSION	41
10.0. CONCLUSIONES	46
11.0. LITERATURA CONSULTADA	47
A P E N D I C E I	54
A P E N D I C E II	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una flor típica mostrando los cuatro verticilos florales: cáliz, corola, androceo y gineceo.

Figura 2. Esquema de antera y óvulo típicos.

Figura 3. Morfología de las plantas distílicas en el sistema de AI heteromórfica.

Figura 4. Morfología de flores de tipo tristilica.

Figura 5. Funcionamiento del sistema de AI.

Figura 6. Mecanismo de activación de la respuesta de AI en *Brassica*.

Figura 7. Representación esquemática de la estructura primaria de las S-RNasas.

Figura 8. Dos modelos de la activación alelo específico de la respuesta de AI en Solanaceae.

Figura 9. Pedigrí de la población recombinante 011613-X.

Figura 10. Fenotipo de polinización de la población recombinante 011613-X.

Figura 11. Amplificación por PCR de los segmentos de DNA de la S_{C10} y S_{A2} -RNasa de las plantas AI de la población recombinante 011613-X.

Figura 12. Fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 2% de los segmentos de DNA de plantas AC de la población 011613-X.

Figura 12. Amplificación por PCR del DNA de la S_{105} -RNasa de plantas AC y AI de *N. alata*.

Figura 13. Análisis electroforético por PAGE-SDS de las S-RNAs que segregan en la población 011613-X.

Figura 15. Localización de la inhibición de los tubos polínicos por medio de la técnica de microscopía de epifluorescencia en plantas AC y AI de la población 011613-X (*N. alata*) después de 72 h de haber sido polinizadas.

Figura 16. Inhibición del crecimiento de los tubos polínicos en plantas AC y AI ($S_{C10}S_{C10}$) de la población segregante 011613-X.

Figura 17. Inhibición de tubos polínicos en plantas AI cuando son polinizadas con el polen donador de la planta homociga $S_{C10}S_{C10}$.

Figura 18. Crecimiento normal de tubos polínicos en plantas AC y AI de la población 011613-X de *N. alata*.

Figura 19. Hipótesis de dos locus que controlan la AI en plantas AI de la población 011613-X.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de los sistemas de AI homomórfica: gametofítico y esporofítico (Sims, 1993).

Tabla 2. Características de los sistemas de AI para los cuales los datos moleculares están disponibles (Kao y McCubbin, 1996; Schopfer *et al.*, 1999; Shiba *et al.*, 2001).

Tabla 3. Comportamiento fenotípico de las plantas AC de la población 011613-X de *N. alata*, por medio de polinizaciones manuales.

Tabla 4. Comportamiento fenotípico de la población segregante 011613-X de *N. alata*.

Resumen

El reconocimiento del polen por el pistilo involucra una serie de interacciones entre el grano de polen y el pistilo de la planta receptora. Uno de los eventos tempranos de esta interacción es la capacidad que tiene la planta receptora a nivel del pistilo, para discriminar su propio polen de aquel de plantas genéticamente relacionadas y no relacionadas. Este fenómeno es conocido como autoincompatibilidad. En muchos casos la incompatibilidad está controlada por un solo locus multialélico, conocido como el locus S, el cual determina la especificidad de la reacción tanto en el grano de polen como en el pistilo.

En las solanáceas los productos génicos del locus S en el pistilo son S-RNasas. Aunque se sabe que las S-RNasas son las determinantes genéticas que controlan el rechazo del polen alelo S específico, existen evidencias de que otros factores genéticos (genes modificadores) no codificados en el locus S son requeridos para el rechazo del polen propio. A la fecha solo un gen modificador ha sido identificado y clonado. Este gen es conocido como HT. Sin embargo, la vía genética del rechazo del polen debe ser más compleja y por tanto, se cree que deben participar varios genes.

Para abordar estos estudios es necesario contar con poblaciones que segregan en plantas autocompatibles (AC) y autoincompatibles (AI), las cuales deben ser además plantas genéticamente homogéneas y las diferencias genéticas entre plantas AC y AI, sólo deben radicar en los genes involucrados en el rechazo del polen.

Este trabajo tuvo como objetivo principal la caracterización genética y molecular de la población recombinante 011613-X de *Nicotiana glauca*, para conocer el comportamiento genotípico y fenotípico de esta población, así como para evaluar la funcionalidad *in vivo* de las S-RNasas que se encuentran segregando en la población.

Para conocer cuántos son los genes modificadores asociados a la respuesta de autoincompatibilidad en las plantas AI, cada individuo de la población fue polinizado manualmente con su propio polen y aquel de las plantas homocígas $S_{A_2}S_{A_2}$, $S_{C_{10}}S_{C_{10}}$ y

S₁₀₅S₁₀₅. Asimismo, por ensayos de PCR y SDS-PAGE se evaluó la presencia de las S-RNasas tanto a nivel de DNA como de proteína.

El análisis genético en plantas AC y AI permitió concluir que la mutación en las plantas AC de *N. alata* es recesiva y que el fenotipo de AI en la población 011613-X está controlado por dos genes con funciones redundantes, ya que la población 011613-X segrega en una proporción fenotípica de 3:1, es decir, 3 plantas AI por una AC ($\chi^2 = 0.015$, $\alpha = 0.90$). Además se comprobó que tanto las plantas AC como las AI expresan niveles normales de S-RNasas en el estilo. No obstante, éstas no son funcionales en los estilos de las plantas AC, ya que no son capaces de inhibir el crecimiento de tubos polínicos de polen incompatible.

1.0. ANTECEDENTES

Dentro de las angiospermas es común que algunas plantas produzcan flores hermafroditas, es decir, están presentes tanto los órganos reproductores masculinos (estambres) como los femeninos (pistilos) dentro de la misma flor, lo cual en muchas ocasiones, promueve la autofecundación y la endogamia, eventos asociados con la disminución de la variabilidad genética y por tanto son considerados deletéreos para la evolución de las angiospermas en algunos casos (Mauseth, 1998).

1.1. Estructura de la flor

Por lo general en las plantas con flores existen cuatro tipos de verticilos florales: cáliz, corola, androceo y gineceo, cada uno formado por un conjunto de sépalos, pétalos, estambres y carpelos, respectivamente. Cuando una flor presenta todos estos tipos de apéndices se le conoce como flor completa y perfecta. En el caso de que uno de los verticilos florales esté ausente, se dice que las flores son incompletas y si uno de esos verticilos faltantes son el androceo o el gineceo se llama imperfecta. La posición de cada uno de estos verticilos florales puede apreciarse en la figura 1. El cáliz es el verticilo más externo de los cuatro verticilos que conforman la flor y está formado por los sépalos, que son hojas modificadas y su función principal es proteger el botón floral durante su desarrollo, así como mantener la humedad dentro de éste; también se les atribuye una función protectora contra las bacterias y esporas de hongos. Los pétalos en conjunto forman lo que se conoce como la corola y son internos al cáliz en la mayoría de las angiospermas. Los pétalos generalmente funcionan como atrayentes de polinizadores específicos. Los sépalos y pétalos forman el perianto y cuando no existe distinción entre uno y otro verticilo floral a cada unidad se le llama tépalo.

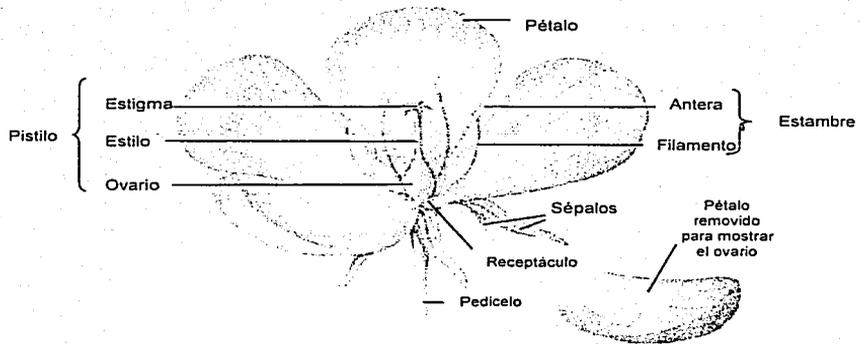


Figura 1. Esquema de una flor típica mostrando los cuatro verticilos florales: cáliz, corola, androceo y gineceo. Los pétalos funcionan como atrayentes de polinizadores. Los estambres producen el polen. El pistilo, es el que contiene el ovario y a su vez los óvulos, lugar donde se lleva a cabo la fecundación (Tomado y modificado de Mauseth, 1998).

El tercer verticilo de afuera hacia adentro es el androceo, cuyos estambres son referidos como los órganos masculinos de la flor, ya que éstos producen el polen (gametofito masculino). En la figura 2 se muestra como los estambres se componen por dos partes, el filamento y la antera, generalmente integrada por dos lóbulos y cuatro esporangios, donde se lleva a cabo la microesporogénesis y microgametogénesis para originar el polen haploide. El polen se encuentra formado por una compleja pared celular que consiste de una capa interna llamada intina, compuesta principalmente de celulosa y una más externa llamada exina formada principalmente de esporopolenina (Mauseth, 1998).

El pistilo es la parte que constituye el gineceo y salvo una excepción en las flores hermafroditas, está localizado en el centro de la flor, sobre el receptáculo. Está compuesto de tres partes (figura 1):

- 1) Estigma. Es el sitio del pistilo donde el polen es depositado por diversos vectores (por viento, animales, agua, etc).
- 2) Estilo. Estructura por la cual se conecta el estigma al ovario y a través del cual crecen los tubos polínicos.

- 3) Ovario. Lugar donde se localizan los óvulos y dentro de los cuales se encuentra al saco embrionario que contiene al gameto femenino u ovocélula (figura 2).

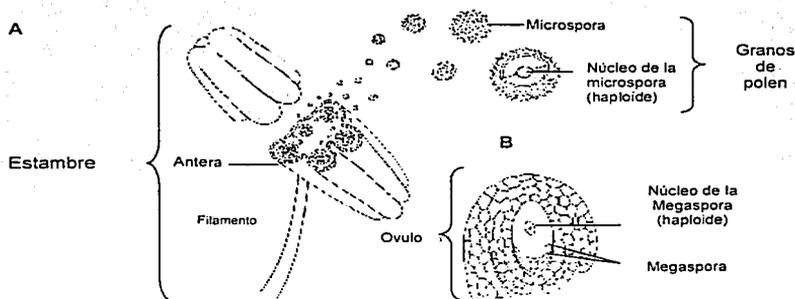


Figura 2. Esquema de antera y óvulo típicos. A, en la antera, las células madres de la microsporas por medio de meiosis generan cuatro células llamadas microsporas o granos de polen. B, en el pistilo se encuentra el óvulo, el cual genera cuatro células haploides por medio de meiosis, de éstas sólo una será la megaspora funcional que formará al saco embrionario (Tomado y modificado de Mauseth, 1998).

En la reproducción sexual de las angiospermas se presenta una alternancia de generaciones: la fase esporofítica o esporofito, en donde las células resultantes serán siempre diploides y la fase gametofítica, en la cual existe la parte masculina o microgametofito (grano de polen) y la femenina o megagametofito (saco embrionario).

1.2. Polinización

En botánica este término se utiliza para describir los eventos durante la reproducción sexual de las angiospermas que ocurren desde el momento en que el grano de polen es liberado de la antera y transportado al estigma, para algunos botánicos la polinización incluye también el evento hasta que el tubo polínico descarga las células espermáticas dentro del saco embrionario (Lord, 2000). Aunque a la etapa después de la germinación del polen hasta los eventos previos a la fecundación, también se le conoce como fase progámica (Franklin-Tong, 1999).

El proceso de polinización es el único evento en las plantas que involucra la interacción célula a célula entre los tejidos femeninos (estigma, estilo y ovario) y el gametofito masculino a través del tubo polínico, el cual contiene las células espermáticas.

1.2.1. Papel del estigma y ovario durante la polinización

El estigma y el estilo tienen diversos papeles importantes en el proceso de polinización. Primero, el estigma actúa como una superficie receptiva para atrapar los granos de polen, y en algunas especies forma una barrera inicial contra el polen indeseado (Knox *et al.*, 1976; Clarke *et al.*, 1979). Segundo, aunque no hay evidencia directa de que el estigma suministre un soporte nutricional para el grano de polen, el estilo parece proveer un recurso de nutrición para la elongación del tubo polínico. El tercer papel del tejido de transmisión del estilo parece ser la guía del tubo polínico hacia el ovario. Sanders y Lord (1989) sugieren un cuarto papel para el estilo el cual participa activamente facilitando la extensión del tubo polínico por medio de un sistema de reconocimiento- adhesión bioquímico. La cuarta función del pistilo (estigma, estilo y ovario) es que actúa como una barrera para la autopolinización, evitando de esta manera la endogamia en cruces intraespecíficas y la formación de híbridos fútiles en cruces interespecíficas.

Las barreras que evitan la autopolinización fueron descritas desde Darwin cuando él observó que algunas especies vegetales eran completamente estériles con su propio polen pero no con el polen de otra planta. Con la observación de Darwin, a este tipo de plantas se les ha podido clasificar en plantas con autoincompatibilidad (AI) heteromórfica ó AI homomórfica (Raghavan, 1997).

2.0. Autoincompatibilidad heteromórfica

El análisis morfológico del sistema heteromórfico se ha enfocado con mayor atención sobre la diferencia en longitud de los estambres y los estilos en flores de la misma especie. Dependiendo de la arquitectura floral, la AI heteromórfica se puede distinguir en dos tipos de morfos florales en las especies distílicas o en tres morfos florales en el caso de las especies trístílicas (Raghavan, 1997).

En las típicas especies distílicas, un morfo presenta el estilo más largo que los estambres, y es conocido como *pin*, mientras que el otro morfo es conocido como *thrum*, el cual se

distingue porque el estilo es más corto que los estambres (figura 3). El éxito de la polinización de estas especies depende principalmente de la polinización cruzada recíproca entre estos dos morfos, ya que los estigmas sólo aceptaran el polen proveniente de anteras que estén a su mismo nivel.

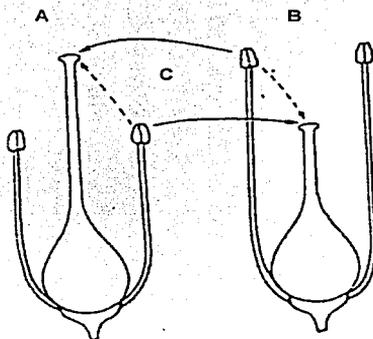


Figura 3. Morfología de las plantas distílicas en el sistema de AI heteromórfica. A, flores tipo *pin* donde el estilo es más largo que los estambres. B, morfo *thrum*, los estambres son más largos que el estilo. C, conducta de polinización entre flores distílicas (Tomado de Raghavan, 1997).

2.1. Morfología trístilica

El análisis de la morfología trístilica como un mecanismo de reproducción ha sido estudiada en pocos miembros de las familias Oxalidaceae, Pontederiaceae y Lythraceae, ya que el porcentaje de plantas que lo representan es poco. Las características distintivas de la morfología trístilica es la presencia de tres formas florales: estilo largo, estilo medio y estilo corto. La unión de estambres de dos longitudes diferentes en cada morfo, corresponde a las longitudes de los estilos en los otros dos morfos. Esto es, que aquellos morfos que poseen estilo largo tienen estambres de longitud media y corta, los que tienen estilo medio tienen estambres largos y cortos, y los de estilo corto tienen estambres de larga y mediana longitud, como se puede ver en la figura 4.

En términos de relaciones de compatibilidad, el principio general es que, para que las polinizaciones sean exitosas, la polinización debe darse entre las plantas que poseen las anteras y los estilos al mismo nivel. Por ejemplo, en una flor con estambres cortos se cruzará con una planta con estilo corto y una flor de estambres de longitud media con el estilo de un morfo de estilo medio (Devi, 1964; Ornduff, 1964; Dulberger, 1970; Barrett, 1977; Price and Barrett, 1982; Glover y Barrett, 1983; Richards y Barrett, 1987; Scribailo y Barrett, 1991).

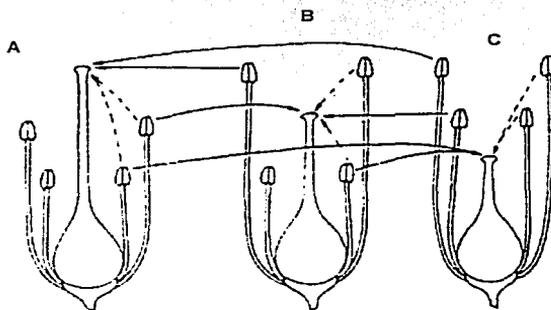


Figura 4. Morfología de flores de tipo tristilica. A, la flor muestra un morfo donde el estigma es largo pero con estambres de corta y mediana longitud. B, la forma de la flor que aquí se puede observar es con estigma medio pero los estambres que posee son largos y cortos, y C, este morfo presenta un estigma corto y los estambres de mediana y larga longitud (Tomado de Raghavan, 1997).

Los caracteres heteromórficos de estambres y estigmas están involucrados en el síndrome de incompatibilidad, la heterostilia es claramente un fenómeno controlado esporofíticamente. Comparado con el sistema homomórfico, el mecanismo del rechazo del polen a nivel genético en un sistema heteromórfico se acopla a diferencias en la morfología floral para promover la polinización cruzada. De Nettancourt (1977) y Lewis y Jones (1992) describieron con detalle la genética y herencia de la AI en los sistemas heteromórficos. Las bases genéticas de la morfología distilica están gobernadas por el complejo del gen *S* con dos alelos, *S* y *s*. El alelo dominante es encontrado en las plantas de estilo corto (morfo *thrum*) en un estado heterocigoto (*Ss*), mientras que, el alelo *s* se presenta en un estado homocigoto (*ss*) en plantas con estilo largo (morfo *pin*). Sin

embargo, muy poco es lo que se sabe acerca de las vías genéticas y bioquímicas donde actúan los productos de estos genes.

3.0. Autoincompatibilidad homomórfica

La distribución de la autoincompatibilidad homomórfica es relativamente más extensa que la del tipo heteromórfico ya que se han podido describir estos sistemas de AI en 91 de las aproximadamente 271 familias de angiospermas que existen (Dickinson *et al.*, 1992). Mientras que los sistemas heteromórficos poseen mecanismos morfológicos en la flor para impedir la autopolinización, los sistemas homomórficos presentan un sistema genético complejo que ayuda al rechazo del polen propio y de aquel de otras especies.

El rechazo del polen de otras especies es conocido como rechazo interespecífico y el rechazo del polen que proviene del mismo individuo se conoce como rechazo intraespecífico. Son muchas las especies que tienen control sobre el tipo de polen que llega a su estigma y son capaces de excluir el polen no deseado, mediante un sistema genético de reconocimiento específico del polen. En especies homomórficas la autoincompatibilidad (AI) se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir semillas después de su autopolinización (De Nettancourt, 1977), este sistema es capaz de promover la polinización cruzada así como la variabilidad genética entre las angiospermas.

El control genético de la AI homomórfica está dada por un locus multialélico conocido como locus S (De Nettancourt, 1977), el cual contiene al menos el alelo S del polen y el alelo S del estilo (Revisado en Cruz-García y McClure, 2001). Este locus es el que determina la especificidad de la reacción tanto en el grano de polen como en el pistilo. El número de alelos S presentes en una población puede variar de especie a especie, ya que por ejemplo, en algunas especies de *Brassica* se han encontrado más de 60 alelos, en *Papaver* van de 60 a 80 alelos y en *Trifolium* de 150 a 250 (Dickinson *et al.*, 1992; McClure *et al.*, 2000).

3.1. Sistemas de AI esporofítica y gametofítica

Los sistemas de AI homomórfica se han dividido en dos tipos: gametofítico y esporofítico (Raghavan, 1997; De Nettancourt, 1977), los cuales se diferencian por el sitio de

expresión del alelo S, ya que éste puede ser en el tejido diploide materno ($2n$) de la antera (AI esporofítica) o en el genoma haploide del grano de polen (AI gametofítica).

En la AI gametofítica, el genotipo haploide del grano de polen expresa sólo el alelo S que heredó, el cual es la determinante genética que va a definir el fenotipo para la incompatibilidad, y la fecundación va a ser impedida si el alelo S del polen es igual a uno de los alelos S presentes en pistilo de la planta receptora. En contraste, en la AI esporofítica, la determinante genética del polen es expresada en las células tapetales de la antera (tejido materno $2n$) secretada y depositada en la cubierta del polen, por lo que los productos de los alelos que presenta el polen en su superficie serán el resultado de la expresión de la planta madre (esporofito), es decir, el grano de polen portará en su cubierta los productos de los dos alelos que porta la planta madre. El rechazo del polen se presenta cuando hay coincidencia entre al menos uno de los alelos del estigma y el grano de polen (figura 5). Algunas otras diferencias entre los sistemas de AI gametofítica y esporofítica se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación de los sistemas de AI homomórfica: gametofítico y esporofítico (Sims, 1993).

Sistema de AI gametofítico	Sistema de AI esporofítico
El fenotipo de reconocimiento está determinado por el genotipo haploide del polen.	El fenotipo de reconocimiento está determinado por el genotipo diploide de la planta madre.
Existencia de codominancia de la actividad del alelo S en el estilo y el polen.	Codominancia de los alelos S en el estigma con codominancia, dominancia o con debilidad mutua en el polen.
El sitio donde se lleva a cabo la respuesta de AI es el tejido de transmisión del estilo.	La reacción de AI se desarrolla en la superficie del estigma.
La respuesta de AI se manifiesta con la inhibición del crecimiento del tubo polínico.	La respuesta de AI se lleva a cabo por la inhibición de la germinación del grano de polen o si éste germina, no hay penetración en la cutícula del estigma.
Característico de especies con polen bicelular y estigmas húmedos.	Característico de especies con polen tricelular y estigmas secos.

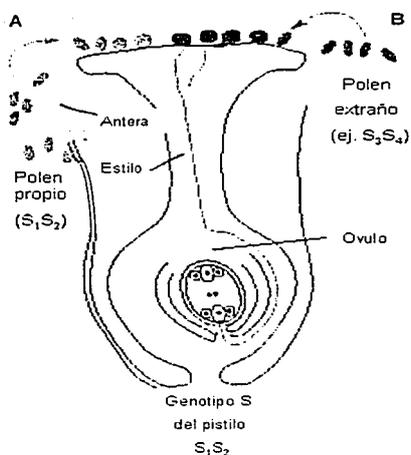


Figura 5. Funcionamiento del sistema de AI. En este ejemplo la planta tiene un genotipo S_1S_2 , por lo que su polen portará los alelos S_1 y S_2 . Si la AI es determinada esporofíticamente (como sucede en *Brassica*), el polen de esta planta podría tener los fenotipos S_1S_2 . Pero en cambio, si la AI es gametofítica (tal es el caso de *Papaver* y *Nicotiana*) el polen podría tener el fenotipo S_1 ó S_2 . A, en un escenario incompatible, el polen de una planta S_1S_2 , llegará al estigma de la misma planta o de otra con los mismos alelos S (es decir, S_1S_2), y por lo tanto el polen será incompatible y la germinación y el crecimiento de los tubos polínicos será inhibida, según sea el caso. En *Brassica* y *Papaver* la inhibición es muy rápida ya que ocurre en la superficie del estigma. Mientras que, en *Nicotiana* es un poco más tardío el efecto de inhibición se lleva a cabo en la parte estilar de la planta y como consecuencia de esto no hay formación de semillas. B, en el caso de que los alelos del polen sean diferentes a los alelos del pistilo, la hidratación, germinación y crecimiento de los tubos polínicos será de manera normal, por lo que la fecundación de los óvulos permitirá formación de semillas (Adaptado de Franklin-Tong, 2002).

En general, la AI esporofítica ha sido estudiada en tres familias esencialmente: Brassicaceae, Asteraceae y Convolvulaceae, siendo más extensivos los estudios en *Brassica*. En tanto, la AI gametofítica se ha descrito en más de 60 familias de plantas con flores (Kao y McCubbin, 1996), pero ha sido estudiada con mayor detalle a nivel molecular en *Papaveraceae* y en miembros de la familia *Solanaceae* incluyendo a *Nicotiana*,

Petunia, *Solanum* y *Lycopersicon*, mientras que, la AI esporofítica ha sido estudiada extensivamente en Brassicaceae (*Brassica*).

La existencia de los sistemas de autoincompatibilidad como estrategias para promover la variabilidad genética han sido documentadas desde los estudios genéticos clásicos de Darwin que datan desde finales del siglo XVIII. Pero es dentro de las dos últimas décadas donde los científicos han sido capaces de complementar los estudios genéticos con análisis bioquímicos y moleculares contribuyendo así a elucidar las complejas series de interacciones que ocurren en la interfase polen-pistilo.

3.1.1. Sistema de AI esporofítico en *Brassica*

En el caso de la AI esporofítica en *Brassica* se han identificado dos proteínas que segregan con el fenotipo de AI. Una de ellas es la proteína SLG, que es una proteína de secreción y la otra es la SRK, una proteína cinasa con propiedades de receptor que posee dominios extracelulares con alta homología a SLG, una región transmembranal y un dominio de cinasa intracelular (Takasaki *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 2001). Ambas proteínas son expresadas en las células papilares del estigma (Nasrallah y Nasrallah, 1993; Nasrallah, 1997). Aunque se sabe que las dos proteínas son codificadas por el locus S, evidencias recientes sugieren que la SRK es la que determina la especificidad de la respuesta en las células papilares del estigma (Goring y Rothstein, 1992; Goring *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1996; Kusaba y Nishio, 1999). En lo que respecta a la determinante masculina, recientemente fue clonado el gen que codifica para ésta (Nasrallah, 1999). Este gen fue denominado SCR/SP11 y codifica para una proteína rica en cisteína de bajo peso molecular con ocho residuos de cisteína que forma cuatro puentes disulfuro (Schopfer *et al.*, 1999; Shiba *et al.*, 2001). El gen SCR/SP11 se expresa en las células tapetales de la antera y es secretado a la exina. Un modelo de rechazo del polen alelo S específico en *Brassica* fue propuesto por Franklin-Tong (2000). En este modelo (figura 6) se propone que cuando se presenta la reacción de AI la proteína SCR/SP11 interactúa primero con la proteína SLG que se encuentra en la matriz extracelular de las células papilares del estigma y que posteriormente el complejo SLG-SCR/SP11 interactuará con el dominio extracelular de SRK, activando su dominio intracelular de cinasa y por tanto, su autofosforilación (Goring, 1993). La forma fosforilada de SRK interactuará con la proteína ARC presente en la papila estigmática, la cual contacta a un intermediario desconocido, quedando de esta manera instalada la respuesta de AI, que culminará con

la inhibición de la germinación del grano de polen (Franklin-Tong, 2002). Los detalles de la cascada de señalización intracelular dentro de la célula papilar aún se desconoce. Sin embargo, las evidencias sugieren que ésto podría regular la actividad de las acuaporinas, las cuales podrían estar limitando la salida de agua de las células papilares para la hidratación del polen, evitando su germinación.

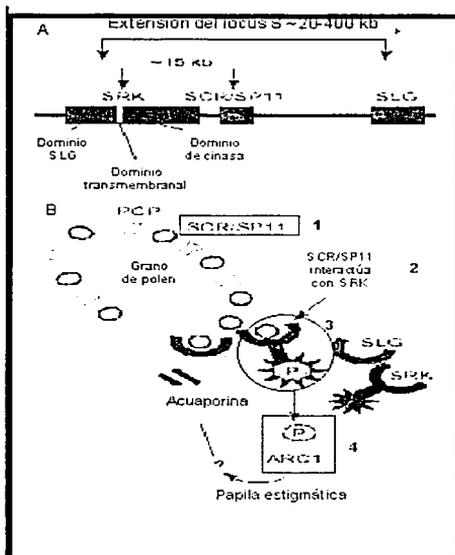


Figura 6. Mecanismo de activación de la respuesta de AI en *Brassica*. A, el tamaño del locus S es estimado entre 20 y 400 kb. Las determinantes femeninas son SLG y SRK. SRK posee un dominio de cinasa. SLG y SRK definen la extensión del locus S. El determinante masculino es SCR/SP11 y se localiza entre SLG y SRK. La distancia entre SRK y SCR/SP11 es de aproximadamente 15 kb. B, cuando el grano de polen llega a la superficie estigmática, SCR/SP11 que fue localizado en la cubierta del grano de polen (1), y cuando éste interactúa con SRK (2). Esta interacción estimula la fosforilación del dominio de cinasa de SRK del grano de polen(3). Seguido de ésto, SRK fosforila a ARC1 presente en la papila estigmática (4) y algunos estudios sugieren que ésto es lo que regula la limitación de entrada de agua necesaria en el grano de polen para su hidratación y germinación (Franklin-Tong, 2002).

3.1.2. Sistema de AI gametofítico en solanáceas

En la familia Solanaceae, específicamente en *Nicotiana*, los estudios que se han realizado sobre la biología de la polinización han permitido identificar algunos factores genéticos y bioquímicos que controlan la polinización. Asimismo, estos estudios han demostrado que la AI es controlada genéticamente por un locus polimórfico llamado locus S (De Nettancourt, 1977). El producto del locus S en el pistilo es una ribonucleasa (McClure *et al.*, 1989). Estas proteínas son conocidas como S-RNasas, las cuales son glicoproteínas básicas de alrededor de 30 kDa que se secretan hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, por donde se dirige el tubo polínico al ovario (Anderson *et al.*, 1986; Cornish *et al.*, 1987; Broothaerts *et al.*, 1995; McClure *et al.*, 1993; Sassa *et al.*, 1996; Xue *et al.*, 1996).

Estas glicoproteínas son exclusiva y abundantemente expresadas en el pistilo y se localizan en el tejido de transmisión del estilo, donde se lleva a cabo el rechazo del tubo polínico en *Nicotiana* (Cornish, 1987; Anderson *et al.*, 1989; Jahnen, 1989). En la figura 7 se muestran los dominios por los que están conformadas las S-RNasas. Estas enzimas poseen cinco regiones altamente conservadas (C1-C5). Tres de estas regiones C1, C4 y C5, contienen aminoácidos hidrofóbicos implicados en la formación de la estructura núcleo de las S-RNasas (Kao, 1996; Ioerger 1991). Las otras dos regiones conservadas, C2 y C3, presentan una notable similitud de secuencia con el sitio activo de las ribonucleasas de hongos: la RNasa T2 y la RNasa Th y en particular, existen dos residuos de histidina que son requeridos para la actividad de RNasa (Kawata, 1988; McClure *et al.*, 1989; Kawata *et al.*, 1990; Green, 1994; Royo *et al.*, 1994; Ishimizu, 1995; Parry *et al.*, 1997).

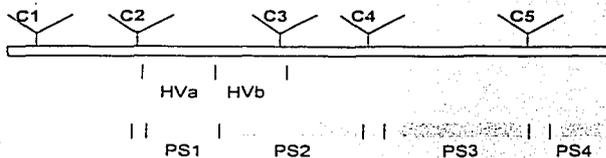


Figura 7. Representación esquemática de la estructura primaria de las S-RNasas. Las 5 regiones conservadas se denotan por C1-C5. Se muestran las 2 regiones identificadas como regiones hipervariables (HVa y HVb) loerger *et al.* (1991), así como los dominios de selección positiva (PS1-PS4) por Ishimizu *et al.* (1998).

Las diferentes formas alélicas de la S-RNasa también comparten de siete a diez residuos de cisteínas conservadas, las cuales están involucradas en la formación de 4 enlaces disulfuro y en la estabilización de la estructura terciaria de la proteína (Tsai *et al.*, 1992; Oxley y Bacic, 1996; Ishimizu *et al.*, 1996; Parry *et al.*, 1998). Las regiones conservadas de las S-RNasas están separadas por regiones que muestran distintos grados de variabilidad entre los alelos de la S-RNasa. Hay dos regiones hipervariables, HVa y HVb, las cuales exhiben un alto grado de diversidad en secuencia (loerger *et al.*, 1991; Silva y Goring, 2001). Estas dos regiones hipervariables son muy hidrofílicas por naturaleza, por lo que se sugiere que estas regiones son las responsables de la interacción con los productos del alelo S del polen. Además se ha sugerido que otras regiones largas dentro de la estructura de la S-RNasa, PS1-PS4 podrían estar involucradas en la determinación de la especificidad alélica de la autoincompatibilidad (Ishimizu *et al.*, 1998).

La actividad de ribonucleasa es esencial para el rechazo del polen (reacción de autoincompatibilidad), sugiriendo que las S-RNasas actúan como agentes citotóxicos alelo S-específicos, responsables de la degradación del RNA ribosomal (RNAr) del tubo polínico (Gray *et al.*, 1991; McClure *et al.*, 1990). En este modelo, las S-RNasas pueden jugar dos papeles: uno de reconocimiento y otro catalítico. Esto puede ser comprobado con el hecho de que cuando las S-RNasas pierden su actividad, las plantas no llegan a presentar el fenotipo que las caracteriza por rechazar el polen y por tanto, no se observa la degradación del RNAr (Huang *et al.*, 1994). En tanto, el componente del polen en la AI

aún se desconoce; únicamente lo que se conoce es como un factor susceptible a ciertas condiciones de citotoxicidad específica de la S-RNasa.

A pesar de conocer que las proteínas S son requeridas para la respuesta de AI, aún no se sabe con certeza cuál es el mecanismo por el cual las S-RNasas inhiben el crecimiento de los tubos polínicos autoincompatibles. Por ello se han propuesto dos modelos para tratar de explicar las bases moleculares del rechazo del polen (Thompson y Kirch, 1992; Matton *et al*, 1994; Kao y McCubbin, 1996). El primer modelo es el del inhibidor (figura 8A), y en él se propone que el producto S del polen funciona como un inhibidor general de la S-RNasa localizado en el citosol del tubo polínico, interfiriendo con la actividad de RNasa de todas las S-RNasas excepto de la S-RNasa alelo específico (Thompson y Kirch, 1992; Matton *et al.*, 1994; Kao y McCubbin, 1996). Como se ilustra en la figura 8A, el transporte de las S-RNasas no es alelo S específico; por lo tanto, ambas S-RNasas (S₁ y S₂-RNasas) podrían entrar en los tubos polínicos S₁ y S₃. No obstante, dentro del tubo polínico S₁, únicamente la S₁-RNasa podría activarse e inhibir el crecimiento del tubo polínico S₁ (marcado con una X en la figura 8A). En el ejemplo del tubo polínico S₃, su crecimiento podría continuar ya que el inhibidor S₃ del polen estaría inhibiendo tanto a la S₁ y la S₂-RNasas.

El segundo modelo se llama modelo del receptor (figura 8B). Este modelo dice que el producto S del polen es un receptor de superficie localizado en la pared celular o membrana plasmática del tubo polínico, éste es capaz de reconocer y translocar específicamente a las S-RNasas estilares dentro del tubo polínico (figura 8B). Por ejemplo, si un pistilo lleva los alelos S₁ y S₂, podría sintetizar y secretar a la S₁- y S₂-RNasas estilares dentro del tejido de transmisión del pistilo donde los tubos polínicos S₁ y S₃ están creciendo. La proteína S₁ del polen podría reconocer a la S₁-RNasa y permitir la entrada de ésta al tubo polínico S₁ donde se llevará a cabo la degradación de su RNA y detener así el crecimiento de este tubo polínico (denotado por una X en la figura 8B). En cambio, la proteína S₃ del polen no es reconocida por las S₁- y S₂-RNasas por lo que se impide la entrada de aquellas S-RNasas dentro del tubo de polen S₃ y permite el crecimiento normal del tubo polínico.

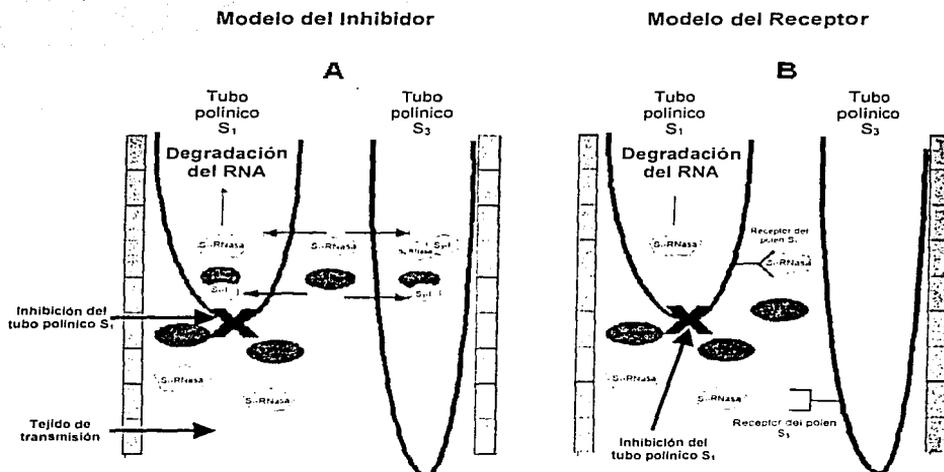


Figura 8. Dos modelos de la activación alelo específico de la respuesta de AI en Solanaceae. A, modelo del inhibidor y B, modelo del receptor de la S-RNasa, ambos regulan el rechazo del polen. Cada modelo exhibe el crecimiento del tubo polínico S₁ en el espacio extracelular del tejido de transmisión del estilo que produce y secreta las proteínas S₁- y S₂-RNasas. En A, ambas proteínas (S₁ y S₂-RNasa) son capaces de entrar al tubo polínico S₁, pero únicamente la proteína S₁ es capaz de funcionar como RNasa e inhibir el crecimiento del tubo (X); en cambio en B, únicamente la proteína S₁ es capaz de entrar al tubo polínico S₁ y detener su crecimiento (X). En ambos modelos, la actividad de RNasa de la proteína S₁ es responsable de la inhibición del crecimiento del tubo polínico S₁, en tanto, el crecimiento del tubo polínico S₃ continúa normalmente ya que en ninguno de los dos modelos es reconocido e inhibido.

3.1.3. Sistema de AI gametofítica en *Papaver*

Papaver rhoeas es la especie más estudiada de este género, al igual que en las solanáceas, el control genético es gametofítico. El sistema de AI en *P. rhoeas* es controlado genéticamente por medio de un locus S multialélico. El producto estilar de este locus S en esta especie es una proteína que se secreta hacia la superficie del estigma y tienen una masa molecular de alrededor de 15 kDa. Esta proteína se ha determinado como proteína S y muestra una estructura compacta con 6 hojas β y 2 α hélices cerca del C-terminal. Estas proteínas no presentan ningún tipo de homología con las S-RNasas y se

ha reportado que bajo condiciones *in vitro* las proteínas S son suficientes para causar el rechazo del polen alelo S específico (Foote *et al.*, 1994; Franklin *et al.*, 1995). Al igual que en *Nicotiana* la determinante masculina no se ha identificado aún. Sin embargo, a diferencia de la actividad en *Nicotiana* y otras solanáceas, la respuesta de AI se manifiesta con la inhibición del crecimiento del tubo polínico inmediatamente después de la germinación del polen sobre la superficie del estigma y no en el estilo como se ha observado en las solanáceas (Revisado en Cruz-García y McClure, 2001). El sistema de AI en *P. rhoeas* es totalmente distinto del sistema *Solanaceae* (tabla 2). Los datos que se han obtenido de los estudios realizados en *P. rhoeas* sugieren que el mecanismo de AI gametofítica que presenta involucra una cascada compleja, incluyendo cambios en los niveles de las concentraciones de Ca^{2+} , la fosforilación de las proteínas específicas y la transcripción de los genes específicos dentro de los tubos polínicos. Un resumen sobre el tipo de control genético y los productos del locus S en la actualidad se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Características de los sistemas de AI para los cuales los datos moleculares están disponibles (Kao y McCubbin, 1996; Schopfer *et al.*, 1999; Shiba *et al.*, 2001)

Familia	Control Genético	Sitio de inhibición del polen	Componente del locus S clonado	Actividad catalítica implicada
Brassicaceae	Solo un locus esporofítico	Superficie del estigma	Femenino Masculino	Cinasa
Solanaceae	Solo un locus gametofítico	Estilo	Femenino	RNasa
Papaveraceae	Solo un locus gametofítico	Superficie estigmática	Femenino	Cinasa
Rosaceae	Solo un locus gametofítico	Estilo	Femenino	RNasa
Scropulariaceae	Solo un locus gametofítico	Estilo	Femenino	RNasa

4.0. Genes modificadores

Por definición los productos del locus S determinan la especificidad de la respuesta de AI. Sin embargo, sólo en el caso de *Papaver* la especificidad del pistilo es suficiente para iniciar la respuesta de AI (Foote *et al.*, 1994; Franklin-Tong *et al.*, 1995; Franklin-Tong *et al.*, 1997). No obstante, se ha visto que no solo las S-RNasas son las que están

involucradas en el rechazo del polen (inhibición del tubo polínico) sino que existen otros factores genéticos que regulan dicha actividad. En el sistema de AI en *Brassica* y en aquellos que son dependientes de las S-RNasas se han reportado que existen otros genes o factores diferentes a las determinantes genéticas de la AI, los cuales son requeridos para que se desencadene el rechazo del polen alelo S específico y por tanto, module la respuesta de AI además de los genes S del pistilo y del polen. A estos factores se les ha denominado genes modificadores y pueden ser clasificados en 3 grupos: Grupo 1, son aquellos factores genéticos que afectan directamente la expresión de los genes que determinan la especificidad. Grupo 2, son los que interactúan estrechamente alelo-S-específico (genética o bioquímicamente) con los determinantes específicos y son requeridos para el rechazo del polen. Grupo 3, incluye los genes que funcionan en el rechazo del polen y en otras interacciones polen-pistilo (McClure *et al.*, 2000).

4.1. Genes modificadores en *Brassica* y el sistema de AI

En *Brassica*, la respuesta de AI no sólo se lleva a cabo con las proteínas SRK, SLG y SCR/SP11 sino que existen otros genes involucrados dentro de esta respuesta de especificidad. El gen SCF es un ejemplo de gen modificador del grupo 1, que afecta la expresión de los genes relacionados a los SGL, aunque se desconoce su mecanismo de acción (Nasrallah *et al.*, 1992; Gaude *et al.*, 1995; Kusaba y Nishio, 1999). El gen MOD es un ejemplo del grupo 2. Este gen codifica para una acuaporina, la cual puede estar involucrada en la regulación de liberación de agua desde las células papilares del estigma para hidratar al polen en cruza compatibles (Ikeda *et al.*, 1997).

4.2. Genes modificadores en Solanaceae

Existen evidencias genéticas señalan que factores independientes al locus S son requeridos en la respuesta de AI dependiente de las S-RNasas (Anderson y De Winton, 1931; Mather, 1943; Martin, 1968). Recientemente, Tsukamoto *et al.*, (1999) estudiaron poblaciones silvestres de *Petunia axilaris* con plantas AI y autocompatibles (AC). Ellos encontraron que la autocompatibilidad (AC) fue originada por un efecto alelo S específico sobre la expresión de la S-RNasa, colocando al factor afectado en el grupo 1 de los genes modificadores. Asimismo, Ai *et al.* (1991) trabajando con plantas AC del cultivar Strawberry Daddy, encontraron que cuando estas plantas fueron cruzadas con aquellas AI de *Petunia hybrida*, todas las plantas en la generación F1 fueron AI. Por lo tanto, se puede

decir que el cultivar Strawberry Daddy tiene una mutación recesiva que cae en el grupo 2 de los genes modificadores, el cual no se requiere para la expresión de la S-RNasa, pero es necesario para la respuesta de AI.

En el caso de *Nicotiana* también se requieren genes modificadores del grupo 2. Por ejemplo, en *Nicotiana plumbaginifolia* que es una especie AC que no expresa S-RNasas y por lo tanto siguiendo el modelo de que las S-RNasas son las únicas que determinan el rechazo del polen alelo S específico, es de esperarse que si se clonara y expresara alguna S-RNasa en *N. plumbaginifolia*, esta especie podría desarrollar la respuesta de AI.

Sin embargo, cuando se generaron plantas transgénicas de *N. plumbaginifolia* que expresan niveles normales de la S_{A2} -RNasa o de la S_{C10} -RNasa, las plantas transgénicas resultantes fueron incapaces de rechazar el polen con el alelo S_{A2} o S_{C10} . No obstante, cuando éstas fueron cruzadas con aquellas plantas AC de *N. alata* cultivar BT, plantas que normalmente no expresan ninguna S-RNasa, pero que contienen factores diferentes a las S-RNasas importantes para el rechazo del polen, los híbridos producto de esta cruce adquirieron la capacidad de rechazar el polen S_{A2} o S_{C10} (Murfett *et al.*, 1996), indicando que la respuesta de AI que desarrollaron los híbridos fue dependiente de factores diferentes de S-RNasas heredados por *N. alata* BT.

Para identificar los supuestos genes modificadores del grupo 2 en *Nicotiana*, McClure *et al.* (1999), realizaron la búsqueda de genes que se expresan diferencialmente entre *N. alata* BT y *N. plumbaginifolia*. Durante la búsqueda se identificó un cDNA, el cual fue designado como HT, éste codifica para una proteína de 101 aminoácidos con una región en el extremo carboxilo rica en residuos de asparagina y aspartato. El transcrito de HT se expresa fuertemente en estilos de plantas AI de *N. alata*, pero no se detecta en estilos de *N. plumbaginifolia*.

Para evaluar la participación de la proteína HT en la respuesta de AI alelo S-específico, se prepararon plantas transgénicas que expresaron en antisentido el cDNA HT. La construcción en la cual se clonó en antisentido el cDNA HT fue utilizada para transformar plantas de *N. plumbaginifolia*, las cuales se cruzaron con plantas AI de *N. alata* S_{C10} S_{C10} . La progenie híbrida de 5 plantas independientes no mostraron niveles detectables de la proteína HT y aceptaron el polen con el alelo S_{C10} . De esta manera, estos resultados

implican a la proteína HT como un factor del grupo 2, por su especificidad de acción en la respuesta de AI (McClure *et al.*, 1999).

5.0. Antecedentes inmediatos

En la familia Solanaceae el alelo S en el estilo codifica para una proteína de alrededor de 30 kDa con actividad de RNasa, la cual es conocida como S-RNasa. Aunque se sabe que la S-RNasa es la determinante genética en el estilo de la AI en esta familia, existen evidencias genéticas que señalan que otros factores genéticos diferentes a éstas son necesarios para el rechazo del polen alelo S específico. Estos factores son conocidos como genes modificadores (McClure, 2000). Para identificar y clonar molecularmente genes modificadores se generó una población recombinante de *N. alata* (población 011613-X, datos no publicados) que segrega en plantas autocompatibles (AC) y autoincompatibles (AI), donde se presume, se encuentran expresando estos genes en plantas AI y que están ausentes o no expresados en plantas AC.

5.1. Pedigrí de la población 011613-X

La población 011613-X se originó a partir de la cruce entre una planta mutante natural de *N. alata* ($S_{A_2}S_{C_{10}}$), que acepta su propio polen y que sintetiza niveles normales de la S_{A_2} - y la $S_{C_{10}}$ -RNasa. Esta mutante fue cruzada recíprocamente con una planta AI de *N. alata* $S_{105}S_{105}$ y su fenotipo de polinización fue evaluado en la generación F1, encontrándose que todas las plantas fueron capaces de rechazar su propio polen, por lo que el defecto en la mutante fue declarado como recesivo (figura 9A). El hecho de que todas las plantas en la F1 fueron AI demuestra fehacientemente que las S-RNasas en la mutante no presentan alguna mutación puntual que afecte directamente su actividad o el dominio de reconocimiento del producto del polen S, lo que provocaría que acepte su propio polen. De no ser así, se habría obtenido alguna subpoblación con plantas parcialmente AI, ya que algunas plantas en la progenie F1 heredaría la S-RNasa defectuosa.

Para generar una población que segregara con plantas AC y AI, una planta heteróciga de la generación F1 (5279-1, $S_{A_2}S_{105}$) fue retrocruzada con la mutante original y la población obtenida fue designada 04936 (Figura 9A).

El fenotipo de polinización en la población 04936 se evaluó probando su capacidad para producir semillas después de ser autopolinizadas y con polen de los homócigos $S_{A_2}S_{A_2}$, $S_{105}S_{105}$ y $S_{C_{10}}S_{C_{10}}$, lo que permitió ubicar el defecto en la parte estilar. De las plantas evaluadas se identificaron aquellas que fueron capaces de formar frutos y se designaron como AC y aquellas que no formaron como AI.

Para ratificar y fijar el defecto recesivo en las plantas AC, se eligieron las plantas autocompatibles 04936-177 ($S_{A_2}S_{C_{10}}$) y 04936-224 ($S_{A_2}S_{105}$). Estas plantas expresan niveles normales de la S_{A_2} , S_{105} y la $S_{C_{10}}$ -RNasa. Estos individuos fueron cruzados recíprocamente y la progenie analizada en su capacidad de aceptar o rechazar polen con los alelos S_{A_2} , S_{105} ó $S_{C_{10}}$. Los resultados de esta cruce mostraron que toda la progenie fue AC (Figura 9B), lo cual indica que la mutación en las plantas defectuosas además de ser recesiva fue heredada de manera estable, por lo que la planta 04936-177 fue seleccionada como defectuosa en su parte estilar y funcionó como uno de los padres para producir una nueva población recombinante genéticamente más homogénea (011613-X, figura 9C).

La planta 04936-177 se cruzó con la planta AI de *N. alata* ($S_{105}S_{105}$, donadora de polen), que se postula como un homócigo capaz de restaurar el defecto observado en la mutante de esta especie. La progenie heterociga resultante (11611) recuperó la capacidad de rechazar el polen con los alelos $S_{C_{10}}$, S_{A_2} y S_{105} . Ratificando que la mutación de la planta defectuosa (102-118) es recesiva (Figura 9C).

Para investigar cuantos factores son los defectuosos en las plantas AC, una planta AI (11611-23, $S_{A_2}S_{105}$) de la población heterociga 11611, fue retrocruzada con la planta defectuosa 04936-177 ($S_{A_2}S_{C_{10}}$) quien actuó como donadora de polen. La población resultante fue designada como 011613-X (Figura 9C).

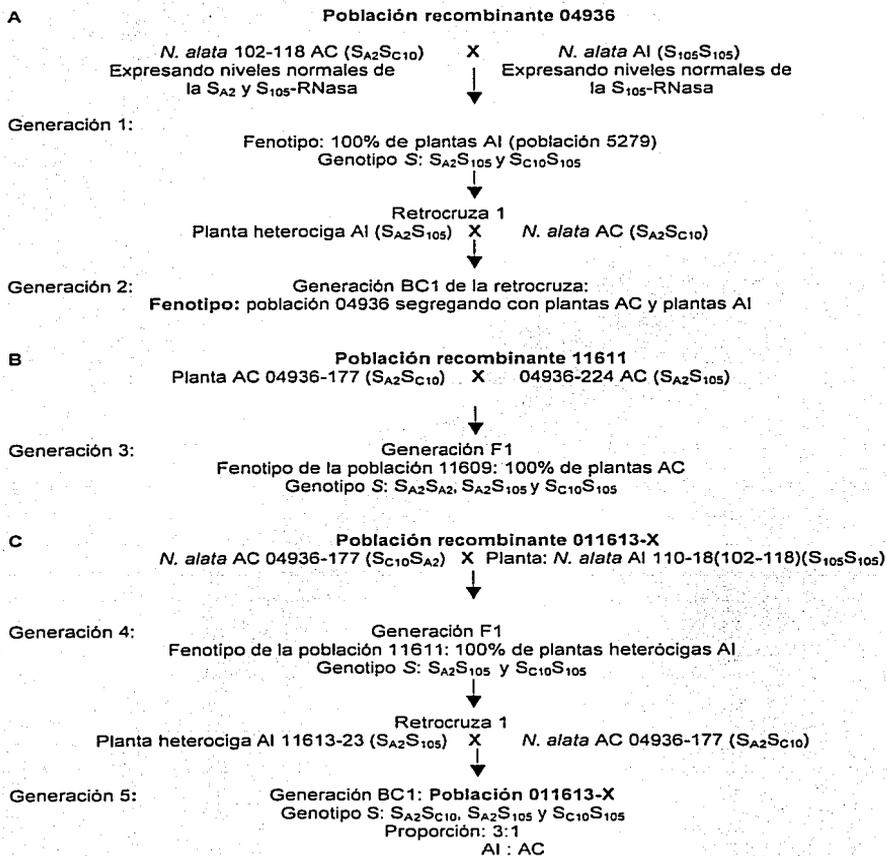


Figura 9. Pedigrí de la población recombinante 011613-X. En este diagrama se muestran 5 generaciones donde se indican las cruza genéticas que originaron la población 011613-X.

6.0. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar genética y molecularmente la población 011613-X de *Nicotiana alata*.

6.1 Objetivos particulares:

- a. Analizar el comportamiento genético de la población segregante 011613-X de *N. alata* en cuanto a la capacidad de aceptar o rechazar su propio polen.
- b. Determinar si las plantas AC de la población segregante 011613-X de *N. alata*, portan el gen de las S-RNAsas y si éste es expresado.
- c. Evaluar si las S-RNAsas que segregan en la población 011613-X de *N. alata* son funcionales *in vivo* mediante técnicas de microscopía de fluorescencia.

7.0. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Determinación del fenotipo de polinización de la población 011613-X de *N. alata* por medio de polinizaciones manuales.

Semillas producto de la cruce entre la planta AI (11611-23, $S_{C10}S_{105}$) con la planta defectuosa 4936-177 ($S_{A2}S_{C10}$) fueron germinadas y las plántulas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero con 16 h luz /8 h oscuridad y una temperatura de entre 25 y 30°C. La población analizada consistió de 100 individuos. Una vez que las plantas alcanzaron la floración (~2 meses después de la siembra), se emascularon 7 flores de cada individuo 48 h antes a la antesis, para evitar contaminación con el polen propio. Las polinizaciones se llevaron a cabo tres días después de la emasculación. Los estigmas fueron polinizados con polen proveniente de la misma planta (autopolinización) y con aquel proveniente de las plantas homocigas $S_{A2}S_{A2}$, $S_{105}S_{105}$ y $S_{C10}S_{C10}$, debido a que en la población 011613-X segregan las S_{A2}^- , S_{105}^- y S_{C10}^- RNasa. El fenotipo de polinización se evaluó como la capacidad de formación de frutos después de los 10 días después de la polinización. Las plantas fueron declaradas completamente autocompatibles (AC) cuando el 90% de las flores polinizadas con el polen propio y con aquel proveniente de las plantas homocigas, formaron frutos.

7.2. Genotipificación de la población 011613-X

7.2.1. Purificación de DNA total

La genotipificación de la población 011613-X se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El DNA que se usó como molde para realizar la PCR fue purificado de hojas jóvenes de cada individuo de la población, ya que este tipo de tejido contiene pocos polisacáridos y compuestos polifenólicos. La extracción del DNA total se realizó mediante el protocolo de aislamiento de DNA para tejido en plantas (QIAGEN) como se indica abajo.

1. Se pulverizaron 100 mg del tejido de hoja en nitrógeno líquido y el polvo fue transferido a un tubo Eppendorf donde se le adicionaron inmediatamente 400 μ l del buffer AP1 y 4 μ l de la solución de RNasa A (100 mg/ml). La mezcla fue agitada en un vórtex.
2. La mezcla se incubó por 10 minutos a 65°C, mezclando de 2-3 veces por inversión del tubo.

3. Se adicionaron 130 μ l del buffer de lisis AP2. Las muestras se mezclaron e incubaron por 5 min en hielo.
4. El lisado fue aplicado a una columna (*QIAshredder*) situándola en un tubo de colección de 2 ml y centrifugando por 2 min a 13,000 rpm.
5. El eluato fue recuperado y transferido a un nuevo tubo, al cual se le adicionaron 0.5 del volumen del buffer AP3 y 1 volumen de etanol (96-100%) y se mezcló pipeteando.
6. De la mezcla anterior, 650 μ l fueron transferidos a otra columna de intercambio iónico (*DNeasy*), la cual se colocó en un tubo de colección de 2 ml, éste se centrifugó por un minuto a 8000 rpm y se descartó el eluato.
7. La columna *DNeasy* fue colocada en un nuevo tubo de colección para adicionar 500 μ l del buffer AW. La mezcla se centrifugó por un minuto a 8000 rpm. Se eliminó el eluato. Este paso fue repetido 2 veces.
8. La columna *DNeasy* se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml y se adicionaron 100 μ l de H₂O destilada en el centro de la membrana de la columna. La membrana húmeda se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y después se centrifugó por un minuto a 8000 rpm.

7.2.2. Amplificación por PCR de fragmentos de DNA codificante para las S-RNasas

Los fragmentos de DNA codificante para la S_{A2}-, S₁₀₅- y S_{C10}-RNasas fueron amplificados por PCR, utilizando como templado DNA total de cada individuo de la población 011613-X.

Las secuencias de los oligonucleótidos que fueron utilizadas para flanquear los segmentos de DNA genómico de las plantas de esta población fueron las siguientes:

a) Amplificación del DNA para la S₁₀₅-RNasa.

Oligo: S₁₀₅-250S

5'- TGA CCT CCA CCG AAG AGG ATT GTA AAG-3' T_m= 61.5°C %GC= 48.1

Oligo: S₁₀₅-250A

5'- GCT GTG TAG GTT TTC CCA ATG CCA GG-3' T_m= 64.2°C %GC= 53.8

b) Amplificación del DNA para la S_{A2}-RNasa.

Oligo: S_{A2}-P1

5'- AAA GTA CCA TCG CGA CTT CG-3' T_m= 52.0°C %GC= 50.0

Oligo: S_{A2}-P2

5'- TGT GAA GTT ATT CAT CGT CGG-3' T_m= 50.2°C %GC= 42.9

c) Amplificación del DNA para la S_{C10} -RNasa.

Oligo: S_{C10} -P1

5'- GAC CTA ACC ACC GCA GAA AC-3'

$T_m = 51.2^\circ\text{C}$ %GC= 55.0

Oligo: S_{C10} -P2

5'- CAT CGA GTC GAA ACA TAT GCC-3'

$T_m = 52.2^\circ\text{C}$ %GC= 47.6

d) Amplificación del DNA para la Rubisco (utilizado como control positivo de amplificación).

Oligo: Rub-P1

5'- AGG CCT GGA TCC GTA TTA TTG-3'

$T_m = 52.2^\circ\text{C}$ %GC= 47.6

Oligo: Rub-P2

5'- GGT CTC ATA ACT TGG TAG GAA TGC-3'

$T_m = 52.9^\circ\text{C}$ %GC= 45.8

Las reacciones de PCR se realizaron por separado para la amplificación de la S_{105} -RNasa, utilizando los oligos S_{105} -250S y S_{105} -250A a una concentración final de 13 pM. En el caso de la amplificación de la S_{C10} - y S_{A2} -RNasa, la reacción de PCR se realizó utilizando una mezcla de 6 oligos (S_{A2} -P1, S_{A2} -P2, S_{C10} -P1, S_{C10} -P2, Rub-P1 y Rub-P2) de la siguiente manera:

Los oligos utilizados estuvieron a una concentración final de 13 pM. Es importante mencionar que en la mezcla de los 6 oligos se incluyeron aquellos que amplifican un fragmento de DNA que codifica para la subunidad pequeña de la Rubisco. Lo anterior se realizó para tener un control positivo de amplificación del PCR, ya que se sabe que este gen está presente en todas las plantas verdes.

La mezcla de reactivos que se usaron para las reacciones de PCR fue como sigue, donde solo varían los primers para cada reacción:

16.15 μl de H_2O
 0.75 μl MgCl_2 (50 mM)
 2.5 μl Buffer PCR (10X), 15.6 unidades
 0.3 μl dNTP's (20 mM)
 2.0 μl mezcla de 6 oligos (13 pM)
 0.3 μl Taq polimerasa recombinante (5 unidades/ μl ; GIBCO)
3.0 μl de DNA templado
 25.0 μl total

Las longitudes de los productos de PCR esperados son los siguientes:

- S_{A2} - ~400 pb.
- S_{C10} - ~300 pb
- S_{105} - ~200 pb
- Rubisco- ~200 pb

Las condiciones de PCR a las que fueron sometidas las muestras correspondientes a la amplificación de los productos de la S_{A2} y S_{C10} -RNasa fueron las siguientes:

94°C- 1 minuto		un ciclo
94°C- 45 segundos	}	40 ciclos
63°C- 1 minuto		
72°C- 2 minutos		
72°C- 2 minutos		un ciclo

Las condiciones de amplificación para la S_{105} -RNasa fueron:

94°C-1 minuto		un ciclo
94°C- 5 segundos	}	40 ciclos
72°C- 1 minuto		
72°C- 5 minutos		un ciclo

Una vez concluidas las reacciones de PCR los productos se fraccionaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) para determinar que genes de las S-RNasas se encuentran segregando en las plantas de la población 011613-X.

7.3. Análisis electroforético de proteínas estilares para determinar si las S-RNasas se expresan normalmente en plantas AC y AI.

Para este análisis se seleccionaron 3 plantas AC (38, 60 y 65) y 3 AI (15, 120 y 134), a las cuales se les extrajeron proteínas totales de estilos. Brevemente, se maceraron 20 estilos con aproximadamente 500 μ l de amortiguador de extracción de proteínas (50 mM NaCl; 50 mM AcNa pH 5.0 y 1% β -Mercaptoetanol) en un mortero preenfriado. El homogenado fue recuperado y clarificado por centrifugación a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue trasladado a un tubo limpio y mantenido en hielo o guardado a -80°C hasta su uso. La concentración de proteína fue cuantificada por el método de Bradford, el cual consiste en utilizar diluciones de albúmina de suero de bovino (BSA, GIBCO BRL) a partir de 0.1 mg/ml 1 mg/ml (a intervalos de 0.1 mg) y se disolvieron en el reactivo de Bradford en una proporción de 1:100, ésto con el fin de obtener la curva patrón de absorbencia / concentración. De la misma manera y en la misma proporción se aplicaron las muestras a analizar. Las lecturas de absorbencia se realizaron a temperatura ambiente y a una longitud de onda de 595 nm.

10 μ g de proteína total fueron aplicados a un gel desnaturalizante con SDS de poliacrilamida al 10% y fueron fraccionadas electroforéticamente. Esta electroforesis se llevó a cabo en dos fases: a) una en el gel concentrador, el cual contiene una concentración de 4% de acrilamida y pH 6.8 y b) un gel separador 10% con pH 8.8. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie. La identificación de las S-RNasas se realizó por su abundancia, ya que se sabe que del 15-30% de las proteínas totales en el estilo son S-RNasas y debido a que la S_{A2} y S₁₀₅-RNasas tienen una masa molecular de 32 KDa, mientras que la S_{C10}-RNasa de 34 KDa (Murfett *et al.*, 1996).

7.4. Análisis del crecimiento de tubos polínicos en estilos de plantas AC y AI de la población O11613-X.

Con el fin de comprobar que las S-RNasas son funcionales *in planta* se realizaron observaciones del crecimiento de los tubos polínicos por medio de aplastados de estilos en plantas AC y AI. Se seleccionaron 3 plantas AC (38, 60 y 65) y 3 AI (15, 120 y 134) con el mismo genotipo (S_{C10}S₁₀₅).

Las flores (3 de cada planta) fueron emasculadas 48 h antes de la antesis de la flor. Pasados 3 días, éstas fueron polinizadas manualmente con el polen proveniente de las tres plantas homocigas ($S_{A2}S_{A2}$, $S_{C10}S_{C10}$ y $S_{105}S_{105}$) así como con su propio polen (autopolinizaciones).

Después de 72 h, tiempo suficiente para que los tubos polínicos hayan alcanzado el ovario, los estilos fueron colectados y fijados en etanol/ ácido acético (3:1). Después de haber permanecido por lo menos un día en la solución fijadora, los estilos fueron transferidos a una solución de sulfito de sodio al 10%, con el fin de reblandecerlos, adicionando un tratamiento de 5 minutos en autoclave en la misma solución, para un mayor reblandecimiento del tejido. Transcurrido el tiempo en esta solución, los estilos se transfirieron a una solución de azul de anilina al 0.1%. La incubación en azul de anilina es de por lo menos 12 hrs. Después de este tratamiento los estilos polinizados fueron colocados en portaobjetos de vidrio adicionando azul de anilina y cubriendo con cubreobjetos y posteriormente ser aplastados. Las preparaciones se sellaron con barniz para uñas transparente y fueron observados por microscopía de epifluorescencia a una longitud de onda 360 nm.

Las observaciones se realizaron a nivel del estigma, la parte media y base del estilo, tanto en las plantas AC como en las AI y se tomaron fotomicrografías.

8.0. RESULTADOS

8.1. Análisis genético de la población 011613-X por medio de polinizaciones manuales.

Para determinar la proporción fenotípica de plantas AC y AI en la población recombinante 011613-X, se realizaron polinizaciones manuales en 100 individuos, evaluando la capacidad de cada una de las plantas para producir semillas después de la autopolinización y de la polinización cruzada con polen proveniente de los homocigos $S_{A_2^-}$, S_{105^-} y $S_{C_{10}}$, debido a que en la población 011613-X segregan las $S_{A_2^-}$, S_{105^-} y $S_{C_{10}}$ RNAsas. Cabe señalar que la polinización con el polen proveniente de las plantas homocigas, permitió descartar aquellas plantas que fueron declaradas como AI por su incapacidad de formar frutos, lo cual en algunos casos fue impreciso, ya que se detectó que algunas plantas producen poco polen viable. La proporción fenotípica de plantas que rechazaron o aceptaron el polen propio y de aquel proveniente de los homocigos $S_{A_2^-}$, S_{105^-} y $S_{C_{10}}$ se puede observar en la figura 10.

En esta figura se muestra únicamente el comportamiento fenotípico de 90 plantas, ya que de las 100 plantas analizadas en este sentido, 10 presentaron un fenotipo de polinización confuso, por lo que se decidió no tomarlas en cuenta para el análisis estadístico. De las 90 plantas analizadas se encontró que el 75.6% representa a las 68 plantas AI, es decir, son plantas que rechazan su propio polen así como aquel con los alelos $S_{A_2^-}$, S_{105^-} y $S_{C_{10}}$, mientras que, el 24.4% es el porcentaje que representa a las 22 plantas restantes, las cuales aceptan todo tipo de polen, por lo que fueron declaradas AC (figura 10). El comportamiento detallado de las plantas AC y AI se puede observar con mejor detalle en las tablas 3 y 4 del apéndice II.

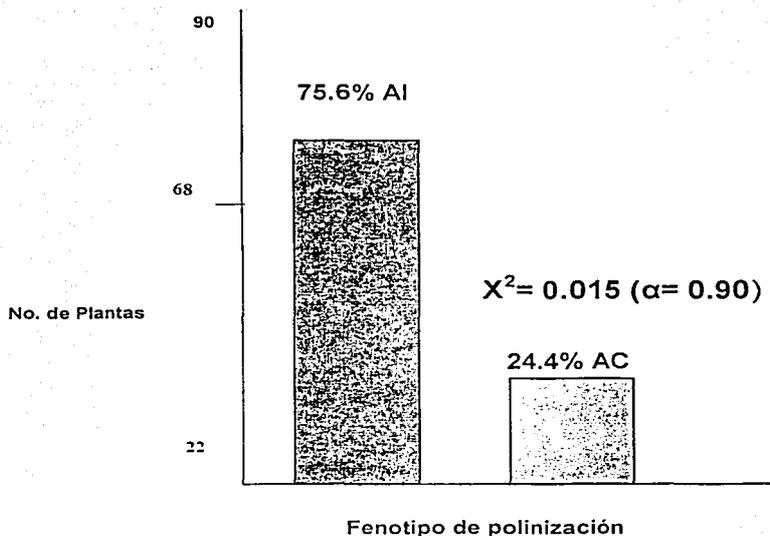


Figura 10. Fenotipo de polinización de la población recombinante 011613-X. 90 plantas de esta población fueron analizadas, de las cuales el 75% corresponde a plantas AI y el 24.9% a plantas AC ($X^2 = 0.015$, $\alpha = 0.90$). AC= Autocompatibles, AI= Autoincompatibles.

Al observar la distribución fenotípica de los porcentajes de las plantas AI y AC en la población 011613-X, se planteó la hipótesis de que la segregación era 3:1 (AI:AC). Para probar esta hipótesis se calculó el estadístico de X^2 , el cual tuvo un valor de 0.015 a un nivel de probabilidad de 0.90. Este valor permite decir con un 90 % de confianza que la población 011613-X segrega de manera Mendeliana con una proporción fenotípica 3:1, es decir por cada 3 plantas AI, hay una AC.

8.2. Las plantas de la población 011613-X portan los genes de la $S_{C_{10}}$, S_{A_2} ó S_{105} -RNAsas

Uno de los aspectos importantes a conocer en los individuos que conforman la población recombinante, fue si portaban y expresaban los genes para las S-RNAsas que segregan en esta población, ya que como se mencionó antes, esta población es el producto de la cruce entre las plantas heterocigas 4936-177 (AC , $S_{A_2}S_{C_{10}}$) y la planta 11611-23 (AI , $S_{A_2}S_{105}$). Tomando en cuenta la cruce donde la planta AI es la madre, los individuos en la población deberán portar en su estado diploide las siguientes combinaciones de S-RNAsas: $S_{C_{10}}S_{105}$, $S_{C_{10}}S_{A_2}$ ó $S_{A_2}S_{105}$ pero nunca homocigos para la S_{A_2} -RNasa, debido a que la planta 11611-23 ($S_{A_2}S_{105}$) que fungió como madre es AI y rechaza el polen S_{A_2} .

La predicción de los genotipos anteriores fue evaluada por PCR, utilizando iniciadores específicos para la S_{A_2} , la S_{105} y la $S_{C_{10}}$ -RNasa. La PCR se realizó utilizando DNA total de cada una de las plantas que conforman esta población, el cual fue utilizado como templado en las reacciones de amplificación.

Un ejemplo de los resultados obtenidos después de fraccionar los productos de PCR en geles de agarosa al 2% se muestran en la figura 11, donde se pueden observar los genes de plantas AI y AC . En los carriles 2 y 3 se presentan bandas prominentes de 400 y 300 pb que corresponden a la amplificación de los segmentos de DNA de los genes de la S_{A_2} y la $S_{C_{10}}$ -RNasa, respectivamente, ya que fue utilizado el DNA de las plantas homocigas $S_{A_2}S_{A_2}$ y la $S_{C_{10}}S_{C_{10}}$ como controles positivos para este ensayo. Además, en la figura 11 se puede ver en los carriles 4, 5, 8, 9, 12 y 13 productos de PCR de 400 pb correspondientes a los segmentos de DNA de la S_{A_2} -RNasa de las plantas AI (156, 157, 72, 59, 151 y 32) y en los carriles 6, 7, 10 y 11 productos de PCR de 300 pb, los cuales corresponden a la amplificación de segmentos de DNA de la $S_{C_{10}}$ -RNasa también de plantas AI (77, 66, 7 y 56). Estos resultados indican que estas plantas portan los alelos que codifican para la $S_{C_{10}}$ -RNasa y la S_{A_2} -RNasa.

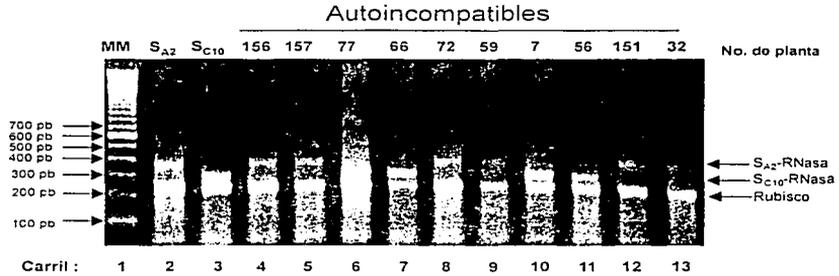


Figura 11. Amplificación por PCR de los segmentos de DNA de la S_{C10} y S_{A2}-RNasa de las plantas AI de la población recombinante 011513-X. Los productos de PCR fueron fraccionados electrofóticamente en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2 y 3: productos de PCR amplificados a partir de plantas homocigas S_{A2}S_{A2} y S_{C10}S_{C10} utilizados como controles; carriles 4-13: productos de PCR de los DNAs de las plantas AI (156, 157, 77, 66, 72, 59, 7, 56, 151 y 32).

Asimismo, en la figura 12 en los carriles 2 y 3, también se pueden observar como controles, productos de PCR de 400 y 300 pb respectivamente, que de igual manera corresponden a los segmentos de DNA de las plantas homocigas S_{A2}S_{A2} y S_{C10}S_{C10}, y a partir del carril 4 podemos observar el producto de PCR del DNA de la planta 38 que corresponde al segmento de DNA de la S_{C10}-RNasa, mientras que, en los carriles 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 19 y 20 se pueden observar productos de PCR del DNA de plantas las 12, 26, 27, 34, 37, 48, 57, 62, 69, 74, 76, 143 y 145 respectivamente, que corresponden al segmento de DNA de la S_{A2}-RNasa. En lo que respecta a los carriles 10, 14 y 18 que corresponden a las plantas 46, 63 y 132 no se llevó a cabo la amplificación adecuadamente por lo que no se puede observar ningún producto de PCR. Todas ellas son plantas AC pertenecientes a esta población segregante y lo anterior permite decir que estas plantas AC portan los alelos que codifican para la S_{C10}-RNasa y la S_{A2}-RNasa.

Autocompatibles

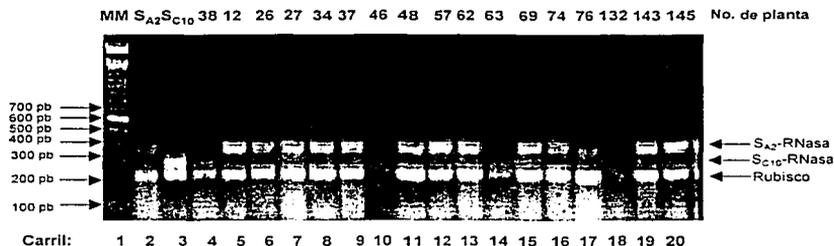


Figura 12. Fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 2% de los segmentos de DNA de plantas AC de la población 011613-X. Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2 y 3: productos de PCR de las plantas homocigotas S_{A2}S_{A2} y S_{C10}S_{C10} (controles); carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 19 y 20: DNA amplificado de las plantas AC (12, 26, 27, 34, 37, 48, 57, 62, 69, 74, 76, 143 y 145). Demostrando de esta manera que todas estas plantas se encuentran segregando con el gen de las S-RNasas. En el caso de los carriles 10, 14 y 18 corresponden a las plantas 46, 63 y 132 no hubo una buena amplificación por lo que no aparece ningún producto de PCR.

En el caso de los productos de PCR correspondientes a la amplificación de los segmentos de DNA del gen S₁₀₅-RNasa, también fueron fraccionados en geles de agarosa al 2% y pueden observarse en la figura 13. En donde, el DNA que se utilizó como templado provino de plantas AC y AI, así como de la planta homocigota S₁₀₅S₁₀₅, que fungió como control. En esta figura se pueden observar en los carriles 2-4 y 7-9 los productos de PCR de las plantas AC y AI (38, 60, 65, 15, 120 y 134) respectivamente, permitiendo de esta manera confirmar que efectivamente todas presentan el gen de la S₁₀₅-RNasa, ya que las bandas prominentes que se observan se encuentran a la altura de las 200 pb. Este resultado ya se esperaba debido a que todas las plantas de esta población portan el alelo S₁₀₅. Como un control adicional se colocó una muestra con agua destilada (carril 6), que indica que no hay amplificaciones inespecíficas.

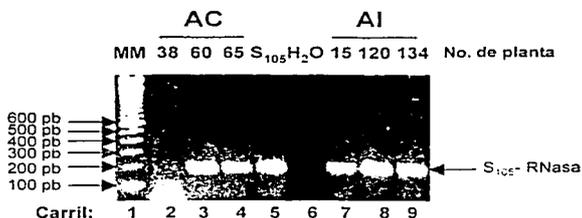


Figura 13. Amplificación por PCR del DNA de la S₁₀₅-RNasa de plantas AC y AI de *N. alata*. MM: marcador de peso molecular (100 pb); 38, 60 y 65: segmentos amplificados de DNA de plantas AC; S₁₀₅S₁₀₅: producto de PCR de la planta homocigota S_{C10}S₁₀₅; H₂O: agua destilada como control de amplificación; 15, 120 y 134: Segmentos amplificados de DNA de plantas AI. Todas las plantas de la población 011613-X portan el gen de la S₁₀₅-RNasa

8.3. Las plantas de la población 011613-X expresan niveles normales de S-RNasas

Una vez confirmado que tanto los individuos AC como AI de la población 011613-X portan los genes de las S-RNasas, existía la posibilidad de que las plantas AC rechazaran su propio polen porque los genes de las S-RNasas no se estuvieran expresando correctamente, por lo que fue importante conocer si los estilos de estas plantas expresaban niveles normales y suficientes de S-RNasas para rechazar el polen propio y aquel con el alelo-S idéntico a alguno de los portados por la planta receptora. Para resolver esto, se eligieron 3 plantas AC (38, 60 y 65, genotipo: S_{C10}S₁₀₅) y 3 plantas AI (15, 120 y 134, genotipo: S_{C10}S₁₀₅), a las cuales se les extrajo proteína total de los estilos. Las proteínas fueron fraccionadas electroforéticamente a través de PAGE-SDS al 10%. Es importante mencionar que todas las plantas que fueron elegidas para este ensayo poseen el mismo genotipo S para facilitar la interpretación de los resultados. El análisis electroforético es suficiente dado que las S-RNasas son glucoproteínas de alrededor de 30 kDa que se expresan en cantidades que van de 1 a 10 µg por estilo en *N. alata*, lo cual representa del 15-30% de la proteína total (Jahnen *et al.*, 1989). En la figura 14 se observa que las plantas homocigotas S_{C10}S_{C10}, tienen una proteína prominente que bandea alrededor de 34 kDa (carril 3) mientras que los homocigotas S_{A2}S_{A2} y S₁₀₅S₁₀₅ de alrededor de 32 kDa (carriles 2 y 4), como ha sido reportado por Murfett *et al.* (1996). Las S-RNasas

de estos homócigos fueron utilizadas como referencia de cantidad y masa molecular para las S-RNasas correspondientes. En ese sentido se puede observar que tanto las plantas AC como las AI expresan cantidades similares a los homócigos de la S_{105} y la S_{C10} -RNasa (carriles 5-10), las cuales bandean a 32 y 34 kDa, respectivamente. Estos resultados permiten concluir que tanto las plantas AC como AI expresan niveles normales de S-RNasa; sin embargo, ésto no significa que sean funcionales en los estilos de las plantas AC.

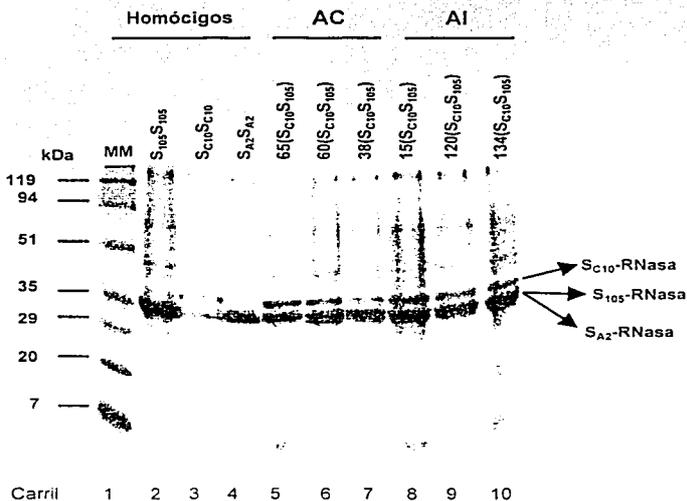


Figura 14. Análisis electroforético por PAGE-SDS de las S-RNasas que segregan en la población 011613-X. Extractos de proteína total de estilos de plantas AC y AI fueron fraccionados electroforéticamente en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10%, y teñido con azul brillante de Coomassie. La S_{105} -RNasa, S_{C10} -RNasa y S_{A2} -RNasa de las plantas homócigos fueron tomadas como controles para referencia de cantidad y masa molecular. AC= Plantas autocompatibles; AI= Plantas autoincompatibles.

8.4. Evaluación del crecimiento de tubos polínicos en estilos de plantas AC y AI de la población segregante 011613-X de *N. alata*

Tanto las plantas AC como las AI portan y expresan los genes de las S-RNasas. Sin embargo, parece que a pesar de expresar niveles normales en el estilo, éstas parecen no ser funcionales *in planta*. Para probar esta hipótesis se realizaron polinizaciones manuales en las plantas 38, 60, 65 (AC) y las plantas 15, 120 y 134 (AI), las cuales tienen un genotipo $S_{C10}S_{105}$. Estas plantas fueron las mismas que se utilizaron en el análisis electroforético de proteínas de estilo.

Las plantas fueron emasculadas 72 h antes de la polinización con su propio polen y con aquel proveniente de los donadores homocigotos $S_{C10}S_{C105}$, $S_{A2}S_{A2}$ o $S_{105}S_{105}$. Transcurridas 72 h, los estilos fueron colectados, fijados y sumergidos en una solución de azul de anilina para observar los tubos polínicos, ya que este colorante al estar en presencia de la luz ultravioleta hace que florezca la callosa de éstos y determinar el sitio en el estilo donde se inhibe el crecimiento de los tubos polínicos.

En las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestran los resultados observados en las plantas AC y la respuesta de las plantas AI. Las observaciones bajo el microscopio se realizaron a tres niveles en el pistilo: en el estigma, en la parte media del estilo y en la base de éste. En lo que respecta a las plantas AC, se puede observar en la figura 15A, que una gran cantidad de tubos polínicos alcanzan la base del estilo cuando estas son autopolinizadas. El mismo crecimiento hasta la base de estilo se observó cuando las plantas fueron polinizadas con polen S_{C10} , S_{A2} o S_{105} (figuras 16A, 17A y 18A). Sin embargo, en el caso de la planta AI los tubos polínicos nunca alcanzan la base del estilo cuando las plantas son polinizadas con su propio polen (figura 15B) ni con el polen S_{C10} o S_{105} (figuras 16B y 17B), lo cual se debe a que el genotipo de los estilos es $S_{C10}S_{105}$. No obstante, estas plantas fueron capaces de aceptar el polen con el alelo S_{A2} , como lo indica la presencia de un gran número de tubos polínicos en la base del estilo (figura 18B). Cabe resaltar que la inhibición se presenta como a las $\frac{3}{4}$ partes de estilo únicamente en las plantas AI, ya que al igual que en las plantas AC, se observa una gran cantidad de granos de polen germinando y creciendo hasta la parte media de estilo, pero a las $\frac{3}{4}$ partes ya se observa una inhibición (figuras 15B, 16B, 17B).

Estos resultados permiten concluir que aunque las plantas AC expresen niveles normales de S-RNasa en sus estilos, éstas no funcionan en el rechazo del alelo S específico del polen en el entorno genético de estas plantas.

Autopolinización

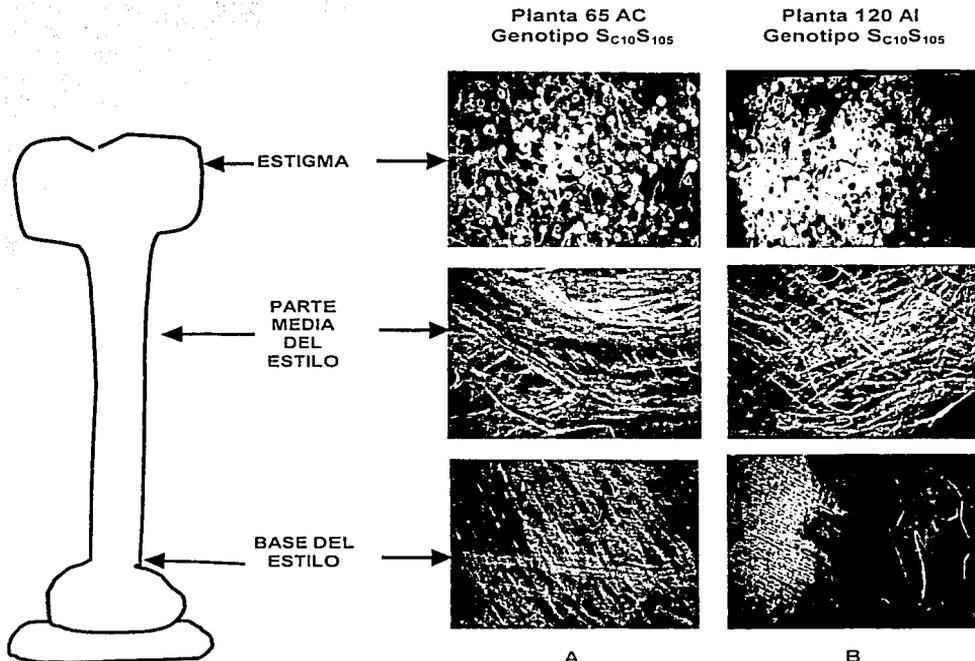


Figura 15. Localización de la inhibición de los tubos polínicos por medio de la técnica de microscopía de epifluorescencia en plantas AC y AI de la población 011613-X (*N. alata*) después de 72 h de haber sido polinizadas. A y B, pistilos de *N. alata*. Cuando la planta AC (A) es autopolinizada se observa desde la parte del estigma hasta la base del estilo un crecimiento normal de tubos polínicos, en tanto, cuando la planta AI es autopolinizada, se presenta una germinación y crecimiento normal hasta antes de las $\frac{3}{4}$ partes del estilo, y a partir de este límite se observa la inhibición total de los tubos, específicamente en la base del estilo.

Donador S_{105}

Planta 65 AC
Genotipo $S_{C_{10}}S_{105}$



ESTIGMA

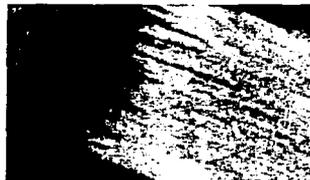


PARTE
MEDIA
DEL
ESTILO



A

Planta 120 AI
Genotipo $S_{C_{10}}S_{105}$



B

Figura 16. Inhibición del crecimiento de los tubos polínicos en plantas AC y AI ($S_{C_{10}}S_{C_{10}}$) de la población segregante 011613-X. A y B, pistilos de *N. alata*. La planta AC es polinizada con el polen donador de la planta homociga $S_{105}S_{105}$ y se observa un crecimiento normal desde el estigma hasta la base del estilo, mientras que, en las plantas AI polinizadas con este mismo polen, a $\frac{3}{4}$ partes se observa una inhibición absoluta del crecimiento de tubos polínicos. Esto es debido a que este polen lleva un alelo que coincide con uno de los alelos de la planta receptora.

Donador $S_{C_{10}}$

Planta 65 AC
 Genotipo $S_{C_{10}}S_{105}$



ESTIGMA


 PARTE
 MEDIA
 DEL
 ESTILO


A

Planta 120 AI
 Genotipo $S_{C_{10}}S_{105}$



B

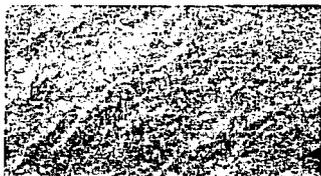
Figura 17. Inhibición de tubos polínicos en plantas AI cuando son polinizadas con el polen donador de la planta homóciga $S_{C_{10}}S_{C_{10}}$. A, se observa el pistilo de plantas AC, donde el crecimiento de tubos polínicos es normal y muy abundante, en tanto, en las plantas AI (B) se observa un crecimiento normal hasta antes de las $\frac{3}{4}$ partes, ya que a partir de este límite se presenta una inhibición total de tubos polínicos.

Donador S_{A2}

Planta 65 AC
Genotipo $S_{C10}S_{105}$



ESTIGMA



PARTE
MEDIA
DEL
ESTILO



A

Planta 120 AI
Genotipo $S_{C10}S_{105}$



B

Figura 18. Crecimiento normal de tubos polínicos en plantas AC y AI de la población 011613-X de *N. alata*. En A y B se observa un crecimiento normal de tubos polínicos ya que, al no coincidir el alelo del polen con los de la planta receptora se presentan los tubos polínicos normalmente incluso en la base del estilo, lugar donde se lleva a cabo la inhibición en plantas AI, hay una abundancia de éstos en ambos casos.

9.0. DISCUSIÓN

Es claro que los productos del locus *S* determinan la especificidad de la respuesta de AI. Sin embargo, sólo en el caso de *Papaver* la especificidad del pistilo es suficiente para iniciar esta respuesta (Foote *et al.*, 1994; Franklin-Tong *et al.*, 1995; Franklin-Tong *et al.*, 1997). En el sistema de AI en *Brassica* y en aquellos dependientes de las S-RNasas se ha reportado que otros genes o factores no ligados al locus *S*, son requeridos para que se desencadene el rechazo del polen alelo *S*-específico (Anderson y De Winton, 1931; Mather, 1943; Martin, 1968). Estos factores genéticos son conocidos como genes modificadores (McClure *et al.*, 1999).

Recientemente, Tsukamoto *et al.* (1999) estudiaron poblaciones silvestres de *Petunia axilaris* que segregan con plantas AC y AI. Estos investigadores reportaron que la AI es responsabilidad de un factor alelo *S*-específico que regula la expresión de la S-RNasa. Asimismo, Ai *et al.* (1991) trabajando con plantas AC del cultivar Strawberry Daddy, encontraron que cuando estas plantas fueron cruzadas con aquellas AI de *Petunia hybrida*, todas las plantas en la generación F1 fueron AI. Por lo tanto, se puede decir que el cultivar Strawberry Daddy tiene una mutación recesiva que no afecta la expresión de la S-RNasa, pero que es necesario para la respuesta de AI.

Tomando en cuenta las evidencias genéticas de la importancia de los genes modificadores en la repuesta de AI, se puede decir que para que los productos del locus *S* sean funcionales en el estilo requieren de un entorno genético adecuado. Un ejemplo de lo anterior es el caso de *Nicotiana plumbaginifolia* que es una especie AC que no expresa S-RNasas y por lo tanto siguiendo el modelo de que las S-RNasas son las únicas que determinaran el rechazo del polen alelo *S*-específico, es de esperarse que si se clonara y expresara alguna S-RNasa en *N. plumbaginifolia*, esta especie podría desarrollar la respuesta de AI. Sin embargo, cuando se generaron plantas transgénicas de *N. plumbaginifolia* que expresan niveles normales de la S_{A_2} -RNasa o de la $S_{C_{10}}$ -RNasa, las plantas transgénicas resultantes fueron incapaces de rechazar el polen con el alelo S_{A_2} o $S_{C_{10}}$. No obstante, cuando éstas fueron cruzadas con aquellas plantas AC de *N. alata* cultivar BT, plantas que normalmente no expresan ninguna S-RNasa, pero que contienen factores diferentes a las S-RNasas importantes para el rechazo del polen, los híbridos producto de esta cruce adquirieron la capacidad de rechazar el polen S_{A_2} o $S_{C_{10}}$ (Murfett *et*

al., 1996), indicando que la respuesta de AI que desarrollaron los híbridos fue dependiente de factores diferentes de S-RNasas heredados por *N. alata* BT.

A la fecha solo un gen modificador ha sido clonado en *N. alata*, el cual fue designado HT. Este gen codifica para una proteína de 101 amino ácidos con una región en el extremo carboxilo rica en residuos de asparagina y aspartato. El transcrito de HT se expresa fuertemente en estilos de plantas AI de *N. alata*, pero no se detecta en estilos de *N. plumbaginifolia* (McClure *et al.*, 1999). Estudios recientes realizados por Kondo *et al.* (2002) en *Lycopersicon esculentum*, demuestra que ésta es una especie AC en la que no se ha detectado ninguna actividad estilar de S-RNasa. En experimentos anteriores estos mismos autores clonaron el transgen de la S6-RNasa en plantas de *L. esculentum*. Las plantas obtenidas expresan niveles normales de la S₆-RNasa. Sin embargo, fueron incapaces de rechazar su propio polen y aquel de *L. peruvianum*, una especie AI. Lo anterior indica que el defecto en S-RNasa no es el único responsable de la AC. Estos autores se enfocaron entonces a analizar otros factores estilares que pudieran estar afectados en *L. esculentum*, para lo cual analizaron al gen HT, ya que se sabe que éste es un gen modificador involucrado en la respuesta de AI (McClure *et al.*, 1999). En *L. esculentum* existen copias del gen HT denominadas LeHT-A y LeHT-B, las cuales presentan mutaciones puntuales. Una mutación en la región codificante del gen Le HT-A provoca un corrimiento del marco de lectura, mientras que en el gen Le HT-B la mutación genera un codón de término prematuro. Estos hallazgos llevan a la conclusión de que la pérdida de la AI en *L. esculentum* se asocia con las mutaciones tanto en el gen de la S-RNasa como en los genes de HT.

De acuerdo con las evidencias descritas antes, se postula que la vía bioquímica involucra a más de un gen modificador, por lo que en un intento por identificar y clonar otros genes modificadores involucrados en el sistema de AI gametofítico de *N. alata* este estudio tuvo como objetivo generar una población segregante con plantas AC y AI con genotipos muy similares donde las diferencias genéticas solo radiquen en aquellos genes relacionados con la AI. Esta población se originó a partir de la cruce de una planta mutante natural de *N. alata* defectuosa en la parte estilar que consiste en su incapacidad de rechazar su propio polen, con una planta AI de *N. alata* (figura 9). La planta mutante expresa niveles similares de S-RNasa que la silvestre, indicando que otros genes diferentes a las S-RNasas modulan su función en el rechazo del polen alelo S específico.

La generación F1 producto de la cruce anterior fue 100% AI, lo que demuestra que el defecto en la mutante es recesivo. Además, este resultado demostró que el defecto en la mutante no radica en una mutación que afecte directamente a las S-RNasas (S_{C10} ó S_{A2}), ya que de ser así la generación final segregaría con plantas que tuvieran una AI parcial, debido a que algunas plantas heredarían la(s) S-RNasa(s) mutada(s).

Para generar la población recombinante de *N. alata* que permitiera mezclar los genomas de la planta mutante con la silvestre y obtener una descendencia genéticamente homogénea con plantas AC y AI, una planta heteróciga AI de la F1 fue retrocruzada con la mutante original, obteniéndose la población 04936 (figura 9B). Dicha población segrega con plantas AC y AI. La población 04936 ya pudo haber sido analizada genéticamente; sin embargo, se quería estar seguro de que la mutación en las plantas AC era estable, por lo que se realizaron cruces recíprocas entre dos plantas AC de esta población (Figura 9B). La progenie (F1) de esta cruce fue 100% AC, lo cual permitió concluir que la mutación es heredada de manera estable y a la población se le dio el nombre de 11609 (figura 9B).

Habiendo asegurado lo anterior se procedió a generar otra población recombinante más homogénea a partir de la cruce de *N. alata* AI planta 110-18 (102-118) ($S_{105}S_{105}$) con *N. alata* AC 04936-177 ($S_{A2}S_{C10}$) (figura 9C). La generación F1 fue 100% AI y heteróciga como se esperaba, por lo que una planta de esta población (11611) fue retrocruzada con la planta defectuosa (AC) 04936-177 ($S_{A2}S_{C10}$), generándose una población segregante (011613-X). Esta población fue analizada genéticamente por medio de polinizaciones manuales, encontrándose que ésta segrega con una proporción fenotípica de 3:1, es decir 3 plantas AI por cada una AC (Figura 10).

En la población 011613-X tanto las plantas AC como las AI expresan niveles normales de las S-RNasas que segregan en la población (figura 14). Sin embargo, parecía que estas enzimas no eran funcionales en los estilos de las plantas AC, ya que éstas no inhiben el crecimiento de los tubos polínicos producto de su propio polen. Lo anterior quedó confirmado cuando se realizaron observaciones directas de tubos polínicos creciendo en estilos de plantas AC y AI ($S_{C10}S_{105}$), ya que cuando las plantas AC fueron polinizadas con su propio polen y con aquel con los alelos S_{A2} , S_{105} o S_{C10} , los tubos polínicos alcanzaron la base del estilo, pero no así en las plantas AI donde solo alcanzaron la base del estilo cuando fueron polinizadas con el polen S_{A2} , un alelo que no se encuentra en el pistilo de

la planta receptora (Figura 18B). La inhibición del crecimiento de los tubos polínicos en los estilos de las AI se presentó después de la parte media del estilo como ha sido reportado para esta especie (de Nettancourt, 1979). El hecho de que las S-RNAs no estén provocando la respuesta de AI, aún sabiendo que son funcionales en un entorno genético adecuado, permite plantear tres hipótesis: 1) las S-RNAs no están siendo secretadas correctamente a la matriz extracelular estilar en las plantas AC y 2) si las S-RNAs son secretadas correctamente a la matriz extracelular del tejido de transmisión, entonces el defecto pudiera estar en su incapacidad de transportarse al citoplasma del tubo polínico, siempre y cuando el transporte fuera promovido por factores estilares ausentes en el estilo de las plantas AC y 3) que las S-RNAs si se transporten al citoplasma de los tubos polínicos pero que no actúen en la degradación del RNAr, lo que implicaría que la S-RNasa se estaría transportando con factores estilares que inhibieran su actividad.

Finalmente los resultados del análisis genético permiten proponer que en las plantas AC de la población recombinante 011613-X, dos genes en locus diferentes con funciones redundantes pueden ser defectuosos, los cuales son los que propician el entorno genético adecuado para las S-RNAs en las plantas AI, para el rechazo del polen alelo S específico. Una figura que ilustra esta hipótesis se muestra en el figura 19. En esta figura se postula que la planta defectuosa (AC) de *N. alata* tiene dos genes recesivos que le provocan la AC, pero que al ser cruzada con una planta silvestre de *N. alata*, la generación F1 heteróciga restaura al 100% la AI (figura 19A). Sin embargo, cuando una planta heteróciga de la F1 se retrocruza con la mutante original (AC) se genera una población con individuos AI heterócigos con genotipos que heredan al menos uno de los dos factores, los cuales al tener funciones redundantes ocasionan que las plantas rechacen su propio polen, lo que no sucede cuando se generan homócigos recesivos (19B).

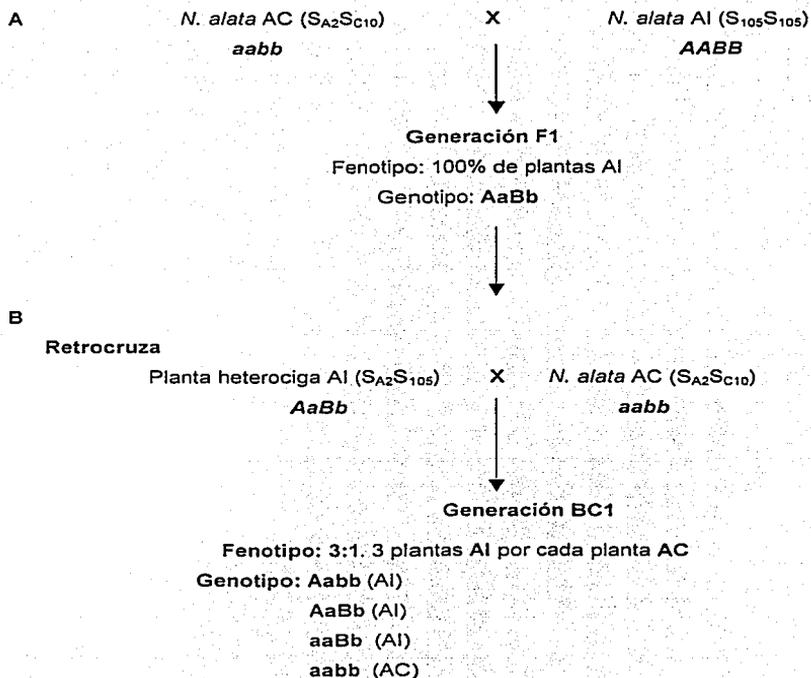


Figura 19. Hipótesis de dos locus que controlan la AI en plantas AI de la población 011613-X.

10.0. CONCLUSIONES

- El defecto observado en la planta mutante AC de *N. alata* es recesivo y en genes modificadores.
- Las plantas AC de la población recombinante 011613-X de *N. alata* expresan niveles similares de S-RNasa a las plantas AI.
- Las S-RNasas en las plantas AC no llevan a cabo su función biológica en los estilos.
- La población 011613-X de *N. alata* segrega en una proporción fenotípica 3:1 (3 plantas AI por 1 AC). Lo cual sugiere que dos genes diferentes con funciones redundantes y ubicados en locus distintos, son los defectuosos en las plantas AC.

11.0. LITERATURA CONSULTADA

1. Ai Y., A. Singh, C.E. Coleman, T. R. Joerger, A. Kheyr-Pour and T.-H. Kao. 1990. Self-incompatibility in *Petunia inflata*: isolation and characterization of cDNAs encoding three S-allele-associated proteins. *Sex. Plant Reprod.* 3: 130-138.
2. Ai Y., E. Kron and T. H. Kao. 1991. S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.* 230: 353-358.
3. Ai Y., D.-S. Tsai and T.-H. Kao. 1992. Cloning and sequencing of cDNAs encoding two S-proteins of a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* 3: 130-138.
4. Anderson E. and D. De Winton. 1931. The genetic analysis of an unusual relationship between self-sterility and self-fertile in *Nicotiana*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 18: 97-116.
5. Anderson, M. A., E.C. Cornish, S-L. Mau, E.G. Williams, R. Hoggar, A. Atkinson, I. Boning, B. Grego, R. Simson, P.J. Roche, J.D. Haley, J.D. Penschow, H.D. Nial, G.W. Tregear, J. P. Coghlan, R.J. Crawford and A..E. Clarke. 1986. *Nature* 321: 38-44.
6. Anderson, M.A., G.I. McFadden, R. Bernatzky, A. Atkinson, T. Orpin, H. Dedman. 1989. Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* 1: 483-491.
7. Barrett S. C. H. (1977). The breeding system of *Pontederia rotundifolia* L., a tristylous species. *New Phytol.* 78: 209-220.
8. Bredemeijer G. M. M. and J. Blaas. 1981. S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theor. Appl. Genet.* 59: 185-190.
9. Broothaerts W., G.Janssens, P. Proost and W. Broekaert. 1995. *Plant Mol. Biol.* 27: 449-511.
10. Clark K.R., J. J. Okuley, P.D. Collins and T. L. Sims. 1990. Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-incompatible and pseudo-self-compatible *Petunia*. *Plant Cell* 2: 815-826.
11. Clarke A. E., P. Gleeson, S. Harrison and R. B. Knox. 1979. Pollen-stigma interactions: identification and characterization of surface components with recognition potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 3358.
12. Cornish E.C., J. M. Pettitt, I. Boning and A. E. Clarke. 1987. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 326:99.
13. Cruz-García F. and B. A. McClure. 2001. Sexual Incompatibility. In: Current opinion in embryology of angiosperms. S.S. Bhojwani (ed). *Kluwer Academic Publishers. The Netherlands* 167-196

14. De Nettancourt D. 1977. Incompatibility in angiosperms. In: Monographs on Theoretical and Applied Genetics, No. 3, pp. 1-96, Frankel R., Gall G.A. E. and Linskens H.F. (eds), Springer, Berlin.
15. Devi P.M. 1964. Heterostyly in *Biophytum sensitivum* DC. *J. Genet.* 59: 41-48.
16. Dickinson H.G. 1999. No stigma attached to male rejection. *Science* 286: 1690-1691.
17. Dickinson H. G., M. J. C. Crabbé and T. Gaude. 1992. Sporophytic self-incompatibility systems : S-gene product. *Int. Rev. Cytol.* 140: 525-561.
18. Dulberger R. 1970. Tristyly in *Lythrum junceum*. *New Phytol.* 69: 751-759.
19. Foote H. G., V.E. Franklin-Tong, E. A. Walker, M. J. Lawrence and F. C. H. Franklin. 1994. Cloning and expression of a novel self-incompatibility (S-) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2265-2269.
20. Franklin-Tong V.E. 1999. Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell* 11: 727-738.
21. Franklin-Tong V.E. 2002. Receptor-ligand interaction demonstrated in *Brassica* self-incompatibility. *Trends in Genet.* 18: 113-115.
22. Franklin-Tong V.E. and C. H. Franklin. 2000. Self-incompatibility in *Brassica*: the elusive pollen S gene is identified. *Plant Cell* 12: 305-308.
23. Franklin-Tong V.E., G. Hacket and P.K. Hepler. 1997. Ratio-imaging of Ca²⁺ in the self-incompatibility response in pollen tubes of *Papaver rhoeas*. *Plant J.* 12: 1375-1386.
24. Franklin F.C.H., M.J. Lawrence and V.E. Franklin-Tong. 1995. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int. Rev. Cytol* 158:1-64.
25. Franklin-Tong V.E., E. Ruuth, P. Marmey, M.J. Lawrence and F.C. Franklin. 1989. Characterization of a stigmatic component from *Papaver rhoeas* L. which exhibits the specific activity of a self-incompatibility (S-) gene product. *New Phytol.* 112: 307-315.
26. Golz J. F., V. Su, A. E. Clarke and E. Newbigin. 1999. A molecular description of mutations affecting the pollen component of the *Nicotiana glauca* S locus. *Genetics* 152: 123-1135.
27. Gaude T., M. Rougier, P. Heizmann, D. J. Ockendon and C. Dumas 1995. Expression of the SLG gene is not correlated with the self-incompatibility phenotype in the class II S haplotypes of *Brassica oleraceae*. *Plant Mol. Biol.* 27: 1003-1014.
28. Glover D. E. and S. C. H. Barrett. 1983. Trimorphic incompatibility in Mexican populations of *Pontederia sagittata* (Pontederiaceae). *New Phytol.* 95: 439-455.

29. Goring D. R., T. L. Gavin, U. Schafer and S. J. Rothstein. 1993. An S-receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1 bp deletion. *Plant Cell* 5: 531-539.
30. Goring D. R. and S. J. Rothstein. 1992. The S-locus receptor kinase gene is a self-incompatible *Brassica napus* line encode a functional serine threonine kinase. *Plant Cell* 4: 1273-1281.
31. Gray J. E., B. A. McClure, I. Bonig, M. A. Anderson and A. E. Clarke. 1991. Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata* (S-RNase) in *in vitro*-grow pollen tubes. *Plant Cell* 3: 271.
32. Green P.J. 1994. The ribonucleases of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 421-445.
33. Huang S., H.-S. Lee, B. Karunanandaa and T.-H. Kao. 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* 6: 1021-1028.
34. Ikeda S., J. B. Nasrallah, R. Dixit, S. Preiss and M. E. Nasrallah. 1997. An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science* 276: 1564-1566.
35. Ioerger T.R., J. R. Gohlke, B. Xu and T.-H. Kao. 1991. Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* 4: 81-87.
36. Ishimizu T.I., M. Miyagi, S. Norioka, Y.-H. Liu, A. E. Clarke and F. Sakiyama. 1995. Identification of histidine 31 and cysteine 95 in the active site of self-incompatibility associated S₆-RNase in *Nicotiana alata*. *J. Biochem.* 118: 1007-1013.
37. Ishimizu T., S. Norioka, M. Kanai, A. E. Clarke and F. Sakiyama. 1996. Location of cysteine and cysteine residues in S-ribonuclease associated with gametophytic self-incompatibility. *Eur. J. Biochem.* 242: 627-635.
38. Ishimizu T., T. Endo, Y. Yamaguchi-Kabata, K.T. Nakamura, F. Sakiyama and S. Norioka 1998. Identification of regions in which positive selection may operate in S-RNase of Rosaceae: implication for S-allele-specific recognition sites in S-RNase. *FEBS Lett.* 440: 337-342.
39. Jahnen W., M.P. Batterham, A. E. Clarke, R. L. Moritz and R. J. Simpson. 1989. Identification, isolation, and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Plant Cell* 1: 493-499.
40. Kao T-H and A.G. McCubbin. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:12059-12065.
41. Kaufmann H., F. Salamini and R. D. Thompson. 1991. Sequence variability and gene structure at the self-incompatibility locus of *Solanum tuberosum*. *Mol. Gen. Genet.* 226: 457-466.

42. Kawata Y., F. Sakiyama and H. Tamaoki. 1988. Amino acid sequence of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **176**: 683-697.
43. Kawata Y., F. Sakiyama, F. Hayashi and Y. Kyogoku. 1990. Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **187**: 255-262.
44. Knox R. B., A. Clarke, S. Harrison, P. Smith and J. J. Marchalonis. 1976. Cell recognition in plants: determinants of the stigma surface and their pollen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**: 2788.
45. Kondo K., M. Yamamoto, D. P. Matón, T. Sato, M. Hira, S. Norioka, T. Hattori and Y. Kowiyama. 2002. Cultivated tomato has defects in both S-Rnases and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant J.* **29**: 627-636.
46. Kusaba M. and Nishio, T. 1999. Comparative analysis of S haplotypes with very similar SLG alleles. *Plant. J.* **17**:83-91.
47. Lee H.S., S. Huang and T.H. Kao. 1994. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature.* **367**:560-563.
48. Lewis D. and D. A. Jones. 1992. The genetics of heterostyly. In *Evolution and Function of Heterostyly*, ed. S. C. H. Barrett, pp. 129-150. Berlin. Springer-Verlag.
49. Lord E. 2000. Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends in Plant Science.* **5** (9): 368-373.
50. Luu D. T., X. Qin, D. Morse and M. Cappadocia. 2000. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* **407**: 649-651.
51. Martin F. W. 1968. The system of self-incompatibility in *Ipomea*. *Genetics* **45**: 215-235.
52. Mather K. 1943. Specific differences in *Petunia l.* *J. Genet.* **45**: 215-235.
53. McClure B. A., F. Cruz-García, B. Beecher and W. Sulaman. 2000. Factors affecting inter-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Annals of Botany* **85** (supplement A): 113-123.
54. McClure B.A., H. Du, Y.H. Lui and A.E. Clarke. 1993. S- locus products in *Nicotiana glauca* pistils are subject to organ-specific post-translational processing but not post-translational process. *Plant Mol. Biol.* **22**: 177-187.
55. McClure B.A., J. E. Gray, M. A. Anderson and A. E. Clarke. 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature.* **347**: 757-760.
56. McClure B.A., V. Haring, P. R. Ebert, M.A. Anderson, R.J. Simpson and E.C. Cornish. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature.* **342**: 955-957.

57. McClure B.A., B. Mou, S. Canevascini and R. Bernatzky. 1999. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:13548-13553.
58. Matton D. P., N. Nass, A. E. Clarke and E. Newbigin. 1994. Self-incompatibility: how plants avoid illegitimate offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1992-1997.
59. Mauseth J. D. 1998. *Botany: An introduction to Plant Biology, 2/e*. Massachusetts. Jones and Bartlett Publishers, Inc. pp. 232-254
60. Murfett J., T.L. Atherton, B. Mou, B. Beecher and B.A. McClure. 1996. RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: Multiple pollen rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatibility and self-compatible species. *Plant Cell* 8:943-958.
61. Nasrallah J.B. 1997. Signal perception and response in the interactions of self-incompatibility in *Brassica*. *Essays in Biochem.* 32: 143-160.
62. Nasrallah J.B. and M. E. Nasrallah. 1993. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 5: 1325-1335.
63. Nasrallah M. E., M.K. Kandasamy and J.B. Nasrallah. 1992. A genetically defined trans-acting locus regulates S-locus function in *Brassica*. *Plant J.* 2:497-506.
64. Ornduff R. 1964. The breeding system of *Oxalis suksdorfii*. *Am. J. Bot.* 51: 307-314.
65. Oxley D. and A. Bacic. 1996. Disulphide bonding in a stylar self-incompatibility ribonuclease of *Nicotiana glauca*. *Eur. J. Biochem.* 242: 75-80.
66. Parry S., E. Newbigin, D. Craik, K.T. Nakamura, A. Bacic and D. Oxley. 1998. Structural analysis and molecular model of a self-incompatibility RNase from wild tomato. *Plant Physiol.* 116: 463-469.
67. Parry S., E. Newbigin, G. Currie, A. Bacic and D. Oxley. 1997. Identification of active-site histidine residues of a self-incompatibility ribonuclease from a wild tomato. *Plant Physiol.* 115: 1421-1429.
68. Price S. D. and S. C. H. Barrett. 1982. Tristyly in *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *Can. J. Bot.* 60: 897-905.
69. Raghavan V. 1997. *Molecular Embryology of Flowering Plants*. Cambridge, Cambridge University Press.
70. Richards J. H. and S. C. H. Barrett. 1987. Development of tristyly in *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). I. Mature floral structure and patterns of relative growth of reproductive organs. *Am. J. Bot.* 74: 1831-1841.
71. Royo J., C. Kunz, Y. Koyama, M. Anderson, A. E. Clarke and E. Newbigin. 1994. Loss of histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated

- with self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 6511-6514.
72. Sanders L. C. and E. M. Lord. 1989. Directed movement of latex particles in the gynoecea of three species of flowering plants. *Science* 243: 1606.
73. Sassa H., T. Nishio, Y. Kowyama, H. Hirano, T. Koba and H. Ikehashi. 1993. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 250: 547-557.
74. Sassa H., T. Nishio, Y. Kowyama, H. Hirano, T. Koba and H. Ikehashi. 1996. Self-incompatibility (S) alleles on the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S-ribonucleases superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 250: 547-557.
75. Schopfer C. R., M.E. Nasrallah and J. B. Nasrallah. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286: 1697-1700.
76. Scribailo R. W. and S. C. H. Barrett. 1991. Pollen-pistil interactions in tristylous *Pontederia sagittata* (Pontederiaceae). I. Floral heteromorphism and structural features of the pollen tube pathway *Am. J. Bot.* 78: 1643-1661.
77. Shiba H., S. Takayama, M. Iwano, H. Shimosato, M. Funato, T. Nakagawa, F.-S. Che, G. Suzuki, M. Watanabe and A. Isogai. 2001. A pollen coat protein, *SP11/SCR*, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica species*. *Plant Physiol.* 125: 2095-2103.
78. Silva N. F. and D. R. Goring. 2001. Review: Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1988-2007.
79. Silva N. F., S.L. Stone, L. N. Christine, W. Sulaman, K. A. P. Nazarian, L.A. Burnett et al. 2001. Expression of the S receptor kinase in self-compatible *Brassica napus* cv. Westar leads to the allele-specific rejection of self-incompatible *Brassica napus* pollen. *Mol. Genet. Genom.* 265: 552-559.
80. Sims, T.L. (1993). Genetic regulation of self-incompatibility. *Cr. Rev. Pl. Sci.* 12: 129-167.
81. Stein J. C., T. Dixit, M. E. Nasrallah and J. B. Nasrallah. 1996. *SRK*, the stigma-specific S locus receptor kinase of *Brassica*, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco. *Plant Cell* 8: 429-445.
82. Tao R., H. Yamane, H. Sassa, H. Mori, T. M. Gradziel and A. M. Dandekar. 1997. Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol.* 38: 304-311.
83. Thompson R. D. and H.H. Kirch. 1992. The S locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends Genet.* 8: 381-387.
84. Takasaki T., K. Hatakeyama, G. Suzuki, M. Watanabe, A. Isogai and K. Hinata. 1999. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigmas. *Nature* 403: 913-916.

85. Tsai D.-S., H.-S. Lee, L.C. Post, K.M. Kreiling and T.-H. Kao. 1992. Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other Solanaceae S-proteins. *Sex. Plant Reprod.* 5: 256-263.
86. Tsukamoto T., T. Ando, H. Kokubun, H. Watanabe, M. Masada and X. Zhu. 1999. Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-compatible and self-incompatible plants. *Sex. Plant Reprod.* 12: 6-13.
87. Wheeler M. J. et al. 2001. The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytol.* 151: 565-584.
88. Xu B., J. Mu, D. L. Nevins, P. Grun and T.-H. Kao. 1990. Cloning and sequencing of cDNAs encoding two self-incompatibility associated proteins in *Solanum chacoense* *Mol. Gen. Genet.* 224: 341-346.
89. Xue Y., R. Carpenter, H.G. Dickinson and E.S. Coen. 1996. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus RNases. *Plant Cell* 8:805-814.

APENDICE I

Acrilamida al 4% (gel concentrador)

- Acrilamida: 5.85 g
- Bis-acrilamida: 0.15 g
- EDTA 0.5 M: 600 μ l
- Tris-Cl 0.5 M pH 6.8: 37.8 ml
- Aforar a 150 ml
- Guardar a 4°C

Acrilamida 10% (fase separadora)

- Acrilamida 30% / Bis-acrilamida 0.8%: 5 ml
- 4X Tris-Cl/SDS pH 8.8 : 3.75 ml
- H₂O desionizada: 5 ml

Amortiguador del ánodo 5X (para SDS-PAGE)

- Tris-Cl pH 8.9: 1 M

Amortiguador del cátodo 5X (para SDS-PAGE)

- Tris: 0.5 M
- Tricina: 0.5 M
- Disolver con H₂O desionizada
- Ajustar a pH 8.25
- Agregar SDS a una concentración final de 0.5%

Amortiguador de extracción de proteínas

- NaCl: 50 mM
- Acetato de sodio pH 5.0: 50 mM
- β -Mercaptoetanol: 1%
- Por cada 10 ml de solución, agregar una tableta (0.05 g) de un coctel de inhibidores de proteasas (Roche).

Amortiguador de PCR (10X)

- 500 mM KCl
- 100 mM Tris-Cl, pH 8.8
- 30 mM DTT
- 1 mg/ml BSA

Bromuro de etidio (10 mg/ml)

- Disolver 0.2 g de bromuro de etidio en 20 ml de H₂O
- Mezclar bien y mantener a 4°C.

Geles de agarosa 2% (para una cámara de electroforesis con capacidad de 60 ml)

- Agarosa al 2%
- TAE (1X) (400 mM Acetato-Tris y 10 mM EDTA).
- 2 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml)

Preparación de los oligonucleótidos

Los oligos que fueron utilizados deben estar a una concentración final de 13 pM y se deseaba preparar 300 µl de cada uno, originalmente se encontraban a distintas concentraciones por lo que fueron preparados de la siguiente manera:

- S_{C10} P1 (99.2 pM), se tomaron 35.6 µl y se adicionaron 264.4 µl de agua
- S_{C10} P2 (109.6 pM), se tomaron 39.3 µl y se adicionó 260.7 µl de agua.
- Rub P1 (104 pM), se tomaron 37.5 µl y se le adicionó 262.5 µl de agua.
- Rub P2 (113.8 pM), se tomaron 34.3 µl y se adicionó 265.7 µl de agua.
- S_{A2} P1 (96.2 pM), se tomaron 40.5 µl y se adicionó 259.5 µl de agua.
- S_{A2} P1 (96.0 pM), se tomaron 40.6 µl y se adicionó 259.4 µl de agua.
-

Solución para desteñir

- Metanol: 50%
- Ácido acético: 10%

Solución de tinción

- Para preparar la solución de tinción, sólo se agregó azul brillante de Coomassie G-250 a una concentración de 0.5% (w/v) a la solución para desteñir .

Tinción de proteína con azul brillante de Coomassie

- Al finalizar la electroforesis, el gel se incubó con la solución para desteñir durante toda la noche.
- Retirar la solución de tinción (se puede reutilizar nuevamente) y agregar solución para desteñir hasta que el fondo del gel esté lo suficientemente claro para que las bandas de las proteínas se distinguen fácilmente.

A P E N D I C E II

Tabla 3. Comportamiento fenotípico de las plantas AC de la población 011613-X de *N. alata*, por medio de polinizaciones manuales.

No. de Planta	Autopolinización (Ac/Polinizadas)	Pol. 1 - 2 (Ac/No. Pol.)	Pol. 3 - 20 (Ac/No. Pol.)	Pol. 110 - 18 (Ac/No. Pol.)	Genotipo PCR
2	0/7	7/7	7/7	7/7	SA2S105
3	7/7	7/7	7/7	7/7	SA2S105
12	0/7	7/7	7/7	5/7	SA2S105
26	0/7	7/7	5/7	6/7	SA2S105
27	4/7	7/7	6/7	4/7	SA2S105
29	0/7	6/7	6/7	3/7-7/7	SA2S105
34	0/7	3/7-6/7	7/7	3/7-5/7	SA2S105
37	0/7	4/7	7/7	5/7	SA2S105
38	0/7	7/7	7/7	0/7-4/7	SC10S105
46	2/7	7/7	4/7	5/7	SC10S105
48	0/7	5/7	7/7	0/7-4/7	SA2S105
57	0/7	5/7	4/7	0/7-6/7	SA2S105
60	2/7	6/7	4/7-5/7	4/7-5/7	SC10S105
62	1/7	7/7	7/7	6/7	SA2S105
63	0/7	4/7	7/7	1/7-5/7	SA2S105
65	7/7	7/7	7/7	4/7	SC10S105
69	6/7	6/7	7/7	3/7-3/5	SA2S105
74	0/7	6/7	6/7	3/7-6/7	SA2S105
76	7/7	5/7	6/7	4/7-7/7	SA2SC10
143	0/7	3/7-4/7	7/7	4/7	SA2S105
145	0/7	5/7	6/7	0/7-6/7	SA2S105
132	0/7	5/7	7/7	2/7-4/7	SA2S105

NOTA: En este tipo de polinizaciones se esperaba que todas las plantas de esta subpoblación formaran frutos, sin embargo, como se observa en estos resultados, en estas plantas se asume que existen problemas con la viabilidad del polen por lo que las autopolinizaciones no se llevan a cabo adecuadamente, sin embargo al polinizarlas con el polen donador de las plantas homocigas los resultados son más claros.

Tabla 4. Comportamiento fenotípico de la población segregante 011613-X de *N. alata*.

No. de Planta	Autopolinización (Ac/Polinizadas)	Pol. 1 - 2 (Ac/No. Pol.)	Pol. 3 - 20 (Ac/No. Pol.)	Pol. 110 - 18 (Ac/No. Pol.)	Genotipo por polinización	Genotipo PCR
4	0/7	3/7	5/7	0/7	SA2S105	SA2S105
7	3/7	7/7	2/7	0/7	SC10S105	SC10S105
8	1/7	0/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105
9	0/7	2/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105
10	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
11	6/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
13	1/7	6/7	0/7	3/7-0/7	SC10S105	SC10S105
15	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
16	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
18	2/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
20	0/7	0/7	5/7	0/7	SA2S105	SA2S105
21	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
23	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
24	7/7	7/7	1/7	1/7-2/7	SC10S105	SC10S105
30	0/7	0/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105
31	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
32	0/7	1/7	6/7	0/7	SA2S105	SA2S105
35	0/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
36	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
41	0/7	3/7-3/7	7/7	1/7	SA2S105	SA2S105
43	0/7	7/7	0/7	4/7-0/7	SC10S105	SC10S105
44	1/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
45	3/7	3/7	4/7-7/7	1/7	SA2S105	SA2S105
47	0/7	4/7-2/7	6/7	0/7-0/7	SA2S105	SA2S105
51	6/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
52	0/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
54	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
55	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
56	3/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
59	0/7	0/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105
61	0/7	4/7	7/7	3/7-1/7	SA2S105	SA2S105
66	0/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
68	5/7	1/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105

70	0/7	0/7	6/7	0/7	SA2S105	SA2S105
72	0/7	0/7	6/7	0/7	SA2S105	SA2S105
73	6/7	6/7	1/7-0/7	1/7-1/7	SC10S105	SC10S105
77	0/7	6/7	1/7	0/7	SC10S105	SC10S105
79	1/7	7/7	2/7	0/7	SC10S105	SC10S105
84	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
88	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
90	0/7	0/7	6/7	0/7	SA2S105	SA2S105
91	0/7	0/7	6/7	0/7	SA2S105	SA2S105
92	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
97	0/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
118	0/7	6/7	1/7-4/7-0/7	2/7	SC10S105	SC10S105
119	0/7	0/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105
120	0/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
125	0/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
127	0/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
129	0/7	0/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105
130	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
131	0/7	3/7-4/7-2/7	7/7	0/7-2/7-0/7	SA2S105	SA2S105
133	5/7	6/7	1/7	1/7-1/7-2/7	SC10S105	SC10S105
134	0/7	6/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
135	1/7	2/7	0/7	7/7	SA2S105	SA2S105
136	0/7	3/7-1/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105
137	2/7	7/7	3/7-0/7	1/7-1/7	SC10S105	SC10S105
138	0/7	2/7-6/7	1/7-0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
139	0/7	0/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105
141	6/7	5/7	3/7	2/7-2/7	SC10S105	SC10S105
144	0/7	0/7	5/7	0/7	SA2S105	SA2S105
150	1/7	7/7	3/7-3/7	1/7-3/7-2/7	SC10S105	SC10S105
151	0/7	0/7	6/7	0/7	SA2S105	SA2S105
152	0/7	7/7	0/7	0/7	SC10S105	SC10S105
153	0/7	0/7	7/7	0/7	SA2S105	SA2S105
155	0/7	3/7-3/7	7/7	0/7-0/7	SA2S105	SA2S105
156	0/7	1/7	3/7-5/7	0/7	SA2S105	SA2S105
157	0/7	5/7	1/7	0/7	SC10S105	SC10S105

NOTA: En este caso no se esperaba que en las autopolinizaciones hubiera formación de frutos, sin embargo, algunas presentan este comportamiento debido a que el estilo quizá tiene problemas de reconocimiento con su propio polen.