



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO  
Ciencias Bioquímicas

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Purificación y caracterización  
de una metaloproteína exclusiva del  
pistilo de *Nicotiana alata***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

Biól. YURIDIA CRUZ GONZALEZ ZAMORA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FELIPE CRUZ GARCÍA



MÉXICO D.F.

ABRIL, 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Esta tesis fue desarrollada en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica ubicado en el Conjunto "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y con el financiamiento de los siguientes proyectos:

CONACYT: 40614-Q

DGAPA: IN211702

PAIP: 629015

El comité tutorial asignado para la asesoría de la presente tesis estuvo conformado por:

Dra. Marina Gavilanes Ruiz          Facultad de Química

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin    Facultad de Ciencias

Dr. Felipe Cruz García                Facultad de Química

El análisis de la tesis fue realizado por el siguiente jurado:

PRESIDENTE          Dr. Diego González Halphen

VOCAL                 Dra. Marina Gavilanes Ruiz

SECRETARIO         Dra. Alejandra Covarrubias Robles

SUPLENTE            Dr. Eleazar Martínez Barajas

SUPLENTE            Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Agradezco el apoyo técnico brindado por la Q. Laurel Elide Fabila Ibarra y a todos mis compañeros del laboratorio 104.

## Indice

<i>Indice de figuras</i>	5
<i>Abreviaturas</i>	6
<i>Resumen</i>	7
<i>Introducción</i>	9
<b>1.0 Estructura floral</b>	9
<b>2.0 Polinización</b>	10
2.1 Interacciones polen-pistilo	11
2.2 Hidratación del grano de polen	11
2.3 Germinación del tubo polínico	13
2.4 Interacciones del tubo polínico con el estilo	13
2.5 Destino final del tubo polínico: el saco embrionario	15
<b>3.0 Sistema de incompatibilidad</b>	15
3.1 Genes modificadores	18
<i>Antecedentes inmediatos</i>	20
<i>Hipótesis</i>	22
<i>Objetivo general</i>	22
<i>Objetivos particulares</i>	22
<i>Materiales y métodos</i>	23
Material vegetal	23
Purificación de la proteína Nap11 a partir de estilos maduros	23
Purificación de Nap11 a partir de estilos en etapa I de desarrollo.	24
Identificación de proteínas que copurifican con Nap11	24
Extracción secuencial de proteínas de ME de estilos	25
Cuantificación de proteína total	25
Electroforesis desnaturizante en geles discontinuos de poliacrilamida	25
Tinción con Azul Brillante de Coomassie Coloidal	26
Tinción con nitrato de plata	26
Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	26
Producción de anticuerpos policlonales anti Nap11 en conejo	27
Inmunodetección por actividad de peroxidasa de rábano	27
Inmunodetección por actividad de fosfatasa alcalina	27
Purificación de la S-RNasa	28
Preparación de la columna de Affigel	29
Ensayo de interacción proteína-proteína	29
Análisis filogenético	30

<i>Resultados</i>	31
Purificación de Nap11 a partir de estilos maduros de <i>N. alata</i>	31
Validación de los anticuerpos anti Nap11	32
Microsecuenciación por MALDI MS/MS de fragmentos de la proteína Nap11	36
El cDNA de Nap11 codifica una proteína parecida a la quimocianina de <i>L. longiflorum</i>	38
Patrón de expresión de Nap11 en plantas de <i>N. alata</i> .	40
Nap11 es una proteína de matriz extracelular del tejido de transmisión	42
Nap11 se expresa en plantas AI y AC	43
Purificación de Nap11 utilizando estilos jóvenes de <i>N. alata</i>	44
<i>Discusión</i>	46
Nap11 es una fitocianina	47
Posible papel de Nap11 en las interacciones polen-pistilo	49
<i>Conclusiones</i>	51
<i>Perspectivas</i>	52
<i>Apéndice A</i>	53
<i>Referencias</i>	54

## Índice de figuras

Figura 1. Purificación parcial de la proteína Nap11 a partir de estilos maduros de <i>N. alata</i> BT.	32
Figura 2. Nap11 copurifica con fracciones de alto peso molecular.	33
Figura 3. El suero anti Nap11 reconoce específicamente a la proteína de 11 kDa del EC que se une a la S <sub>C10</sub> -RNasa.	33
Figura 4. Inmunodetección de Nap11 en las fracciones semipurificadas por cromatografía de intercambio iónico.	34
Figura 5. Inmunodetección de Nap11 en fracciones obtenidas por filtración molecular.	34
Figura 6. Nap11 es inmunodetectada en fracciones de alto peso molecular junto con las glicoproteínas S <sub>105</sub> -RNasa, NaTTS y 120K.	36
Figura 7. Nap11 es inmunodetectada en fracciones exclusivas de proteínas de alto peso molecular junto con NaTTS, la S <sub>105</sub> -RNasa y 120K.	37
Figura 8. Los péptidos coinciden con los deducidos del cDNA de Nap11.	39
Figura 9. Arbol filogenético de la familia de las fitocianinas.	40
Figura 10. Nap11 es una proteína exclusiva del pistilo y se expresa en forma de gradiente.	41
Figura 11. Nap11 se expresa desde etapas tempranas del desarrollo en estilos de <i>N. alata</i> .	41
Figura 12. Expresión de Nap11 durante la polinización de <i>N. alata</i> .	42
Figura 13. Nap11 se inmunodetecta en la fracción soluble de la MEC de estilos de <i>N. alata</i> .	43
Figura 14. Nap11 se expresa en especies AC y AI de Nicotiana.	44
Figura 15. Purificación de Nap11 a partir de estilos en etapa I de desarrollo de <i>N. alata</i> BT.	45

## Abreviaturas

3'RACE	Amplificación rápida de los extremos 3' de DNA complementario
AC	Autocompatible
ACC	Ácido 1-amino-ciclopropano-1 carboxílico
ACS	Ácido 1-amino-ciclopropano-1 sintasa
AGP	Arabinogalactoproteína
AI	Autoincompatibilidad
BLAST	Herramienta para la búsqueda de alineamiento básico local
BP	Proteína de adhesión
BSA	Albúmina sérica bovina
C1-C5	Regiones conservadas de las S-RNasas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUC	Dominio de unión a cobre
EC	Extracto crudo
EM	Espectrometría de masas
ERO	Especie reactiva de oxígeno
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
GABA	Ácido $\gamma$ -amino butírico
GM	Genes modificadores
GRP	Proteína rica en glicina
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
Hv	Región hipervariable
IE	Incompatibilidad interespecífica
MEC	Matriz extracelular
NaTTS	TTS de <i>Nicotiana glauca</i>
NOX	NADPH oxidasa
Pb	Pares de bases
PCP	Proteína de la cubierta del polen
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizado con dodecil sulfato de sodio
SI	Sistema de incompatibilidad
SLF	Proteína con caja F codificada en el locus S
SLG	Glicoproteína codificada en el locus S
SLR	Receptor relacionado al locus S
TP	Tubo polínico
TTS	Proteína específica del tejido de transmisión

## Resumen

*Nicotiana glauca* tiene un sistema de incompatibilidad (SI) gametofítico que le permite discriminar a su propio polen de aquel proveniente de plantas genéticamente diferentes. Este mecanismo de reconocimiento del polen está controlado 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. El rechazo del polen se presenta cuando el alelo *S* que porta el polen es igual a uno de los dos alelos *S* presentes en el pistilo diploide de la planta receptora, provocando que el crecimiento del TP se inhiba generalmente a nivel del estilo. En esta especie como en otros miembros de la familia Solanaceae, el producto del locus *S* en el pistilo es una glicoproteína citotóxica denominada S-RNasa, la cual se secreta hacia el espacio extracelular del tejido de transmisión desde el estigma hasta el ovario. Su acción citotóxica la ejerce ingresando al citoplasma del tubo polínico y si el polen lleva el mismo haplotipo del pistilo, su RNA se degrada ocasionando su muerte. Sin embargo, aunque se sabe que las S-RNasas son las determinantes femeninas de la AI, hay evidencia genética de que genes modificadores estilares no ligados al locus *S* son importantes en la vía bioquímica del rechazo del polen *S*-específica.

Mediante técnicas bioquímicas de interacción proteína-proteína *in vitro*, se identificaron 4 proteínas que pudieran estar codificadas por genes modificadores. Tres de ellas son glicoproteínas de alto peso molecular, inmunoidentificadas como NaTTS, 120K y PELP III, y la cuarta una proteína no descrita denominada Nap11. Las cuatro proteínas son retenidas en una columna de afinidad donde el ligando fue la S-RNasa.

Una de estas proteínas es Nap11, la cual fue parcialmente purificada por cromatografía de afinidad, secuenciada en su extremo amino-terminal y mediante técnicas basadas en PCR se clonó un cDNA que codifica los primeros 18 aminoácidos del extremo amino de la proteína madura de Nap11. Para profundizar en el conocimiento de Nap11 esta investigación tuvo como objetivos: a) purificar a mayor resolución a Nap11, b) caracterizar sus patrones de expresión en plantas de *N. glauca* y c) evaluar sus relaciones de homología con las fitocianinas.

La purificación se llevó a cabo esencialmente por cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular a partir de extractos crudos de estilos de *N. glauca*. La evaluación de los patrones de expresión se realizó por inmunoanálisis mediante ensayos tipo Western. Los resultados de esta investigación indican lo siguiente: 1) Nap11 es una proteína que se encuentra asociada *in vivo* a glicoproteínas de mayor peso molecular como 120K y NaTTS, 2) Nap11 es una proteína de secreción específica del pistilo y cuya expresión es constante desde etapas muy tempranas de su desarrollo, 3)

Nap11 no es una proteína exclusiva de especies incompatibles de *Nicotiana*, 4) su expresión no se afecta por la polinización y 5) Nap11 es una fitocianina que presenta 70% de similitud con una proteína que es quimiotáctica para tubos polínicos en crecimiento *in vitro* de *Lilium longiflorum*, llamada quimocianina.

## Introducción

### 1.0 Estructura floral

Durante la reproducción sexual, los gametos masculinos contenidos en el tubo polínico (TP) son descargados al saco embrionario en el óvulo, para que uno de ellos se fusione con la ovocélula y así generar un nuevo individuo diploide con nuevas combinaciones alélicas. El grupo de las angiospermas o plantas con flor es el más exitoso en cuanto a diversidad genética se refiere, ya que cuenta con más de 250,000 especies. La reproducción sexual involucra una sola estructura, la flor, la cual produce los órganos y células necesarias para llevar a cabo dicho proceso. En general, la función de la flor es atraer a los polinizadores, resguardar los gametos masculinos y femeninos, así como proveer a la planta un lugar seguro para que se lleve a cabo la reproducción sexual.

Las flores se pueden clasificar en dos tipos, las imperfectas y las perfectas. Las flores perfectas son aquellas que poseen los cuatro verticilos florales (sépalos, pétalos, anteras y gineceo) en una sola flor; en cambio, en las imperfectas puede faltar uno o más de los verticilos (Mauseth, 2003).

El primer verticilo está conformado por los sépalos, los cuales son hojas modificadas que rodean y protegen las otras partes florales conforme la flor madura. Su función es proteger al botón floral en desarrollo de las esporas bacterianas y hongos, permitiendo al mismo tiempo que exista al interior una alta humedad. Al conjunto de sépalos se les denomina cáliz.

El siguiente verticilo lo forman los pétalos que se localizan en el receptáculo formando la corola. Los pétalos junto con los sépalos forman el perianto. Esta estructura es importante para atraer a los polinizadores. Cada especie posee flores de diferente tamaño, forma, color y disposición de los pétalos, lo que permite a los polinizadores hacer reconocimientos especie-específicos (Graham, 2002).

En el tercer verticilo se incluyen los estambres, quienes en conjunto forman el androceo. Cada estambre posee dos partes bien definidas: el filamento y la antera. En esta última estructura se producen y son liberados los granos de polen. Los granos de polen al momento de salir de la antera pueden contener dos o tres células (célula vegetativa y una o dos células espermáticas). La pared interna del polen está compuesta por una capa denominada intina (formada principalmente por celulosa) y por una externa llamada exina, que es una estructura ornamentada compuesta por esporopolenina (Stanley, 1974).

En el último verticilo, localizado al centro del receptáculo se encuentran los carpelos que constituyen al gineceo. El gineceo comprende tres partes principales: estigma, estilo y ovario. El estigma es la superficie receptiva a la cual se adhieren los granos de polen; además media la migración del TP hacia el estilo. Los estigmas se pueden dividir en dos tipos: secos y húmedos. Los secos como el de

*Arabidopsis thaliana* tienen una superficie intacta de células que emergen como papilas cubiertas por una pared celular primaria, una cutícula serosa y una película rica en proteínas. La adhesión de los granos de polen a estos estigmas debe ser específica, siendo así el primer sitio de reconocimiento polen-pistilo (Mauseth, 2003).

Los estigmas húmedos, representados en *Nicotiana* y *Lilium*, están cubiertos por células superficiales que a menudo se rompen para secretar un líquido viscoso rico en proteínas, lípidos, polisacáridos y pigmentos (Edlund *et al.*, 2004). En estos estigmas, casi cualquier grano de polen puede germinar en su superficie, a diferencia de lo que ocurre en estigmas secos, donde se ha visto que la unión entre el grano de polen y el estigma está mediada por interacciones específicas (Edlund *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2004).

Los estilos se pueden clasificar como abiertos, cerrados o semisólidos basándose en características morfológicas. En los estilos abiertos, característicos de muchas monocotiledóneas como *Lilium longiflorum*, los TPs crecen en el canal lleno de mucílago, a lo largo de la epidermis.

En los estilos cerrados, presentes en la mayoría de las dicotiledóneas, como las Solanáceas, los TP crecen a través del tejido de transmisión, que es un continuo con la zona secretora del estigma. Las células del tejido de transmisión se encuentran conectadas por plasmodesmos en las paredes transversales, mientras que las paredes longitudinales están separadas por la matriz intercelular que secretan (Edlund *et al.*, 2004).

El estilo eleva al estigma a una posición adecuada para que pueda captar los granos de polen. Los estilos pueden ser de diferentes longitudes, muy cortos como los de la familia Brassicaceae (Swanson *et al.*, 2004), o muy largos como en *Nicotiana* y *Lilium* (Lord, 2000). El crecimiento del TP hacia el ovario se desarrolla a través de este tejido compuesto por una matriz extracelular (MEC) rica en proteínas y lípidos capaces de mantener el crecimiento rápido.

## 2.0 Polinización

Para que se lleve a cabo la reproducción sexual es necesario que se desarrollen una serie de eventos que en conjunto se denominan polinización, la cual inicia con la liberación del grano de polen de la antera, su transporte hacia el estigma, su hidratación y germinación, el crecimiento del tubo polínico por el estilo y culmina con la descarga de las células espermáticas al saco embrionario del óvulo (Franklin-Tong, 1995). La polinización puede suscitarse entre individuos de la misma especie, denominada polinización cruzada o incluso en un solo individuo, cuando un pistilo es polinizado por polen de la misma flor o de una flor diferente de la misma planta; a este tipo de polinización se le llama autopolinización.

Los granos de polen recién liberados de las anteras son transportados por medio de diferentes vectores, ya sea bióticos como los insectos, o abióticos como el viento o el agua, hacia una superficie estigmática.

### 2.1 Interacciones polen-pistilo

La primera interacción que tiene el grano de polen con el estigma es independiente de cualquier lípido o proteína que se encuentren en la cubierta del polen (Zinkl *et al.*, 1999) y únicamente es mediada por la pared de la exina a través de moléculas lipofílicas (Lord, 2000). En estigmas secos como el de *Arabidopsis*, cuando el grano de polen es capturado, la cubierta del polen se moviliza hacia el punto de contacto con el estigma y se forma una estructura denominada “pie” en donde se mezclan proteínas, carbohidratos y lípidos, tanto del grano de polen como del estigma para mantener fuertemente unidos ambas estructuras. En el estigma de *Brassica* se identificó un par de proteínas (SLR1 y SLG) involucradas en la adhesión del grano de polen. La proteína SLR1 se une a proteínas de la cubierta del polen de la clase A (PCP-A. Pollen Coat Protein), específicamente a proteínas de adhesión, como BP1 y BP2. Experimentos con plantas transgénicas evidenciaron que cuando se suprime a SLR1-BP se debilita la adhesión del polen (Luu *et al.*, 1997, 1999).

La proteína SLG también es un miembro de la familia multigénica de las proteínas relacionadas con el locus *S*. Se expresa en las células papilares del estigma y se acumula en la pared celular. Se ha reportado que SLG interacciona con las proteínas PCP-A1 *in vitro*, lo que sugiere un mecanismo de adhesión paralelo (Hiscock *et al.*, 1995; Doughty *et al.*, 1993). A diferencia de SLR1, SLG también se une al menos a otras 10 proteínas parecidas a las PCPs, lo que indicaría funciones múltiples y/o que su papel en la adhesión sería indirecto (Swanson *et al.*, 2004).

### 2.2 Hidratación del grano de polen

Después que el grano de polen se adhirió al estigma, comienza la hidratación y elongación del TP. El fenómeno de hidratación puede ocurrir rápidamente o tardarse hasta una hora, dependiendo del grado de desecación del polen cuando fue liberado de la antera (pueden tener de un 15% a un 35% de contenido en agua) (Sánchez *et al.*, 2004). Los primeros nutrientes y líquidos requeridos por el grano de polen para reactivar su metabolismo los adquiere del estigma por medio de canales de agua presentes en la membrana plasmática de las células papilares del estigma (Lord, 2001).

En flores con estigmas húmedos, los granos de polen capturados por el estigma son rápidamente

rodeados por los exudados estigmáticos estableciendo contacto directo con el estigma o con otros granos de polen (Sánchez *et al.*, 2004). La secreción de lípidos del estigma es necesaria para la polinización. Esto fue comprobado en plantas transgénicas de *N. tabacum* que expresan el gen citotóxico *barnasa* en su estigma, lo cual provoca que no se desarrollen células papilares y, por lo tanto, tampoco haya secreción de los exudados ricos en triacilgliceroles, lo que a su vez provoca esterilidad masculina. La fertilidad de estas plantas puede ser reestablecida por la adición de triacilgliceroles no saturados (Goldman *et al.*, 1994).

La hidratación del polen es temporal y espacialmente regulada. En estigmas secos, esta regulación representa una barrera muy efectiva en la discriminación del polen no deseado, ya que al mismo tiempo, en la misma papila estigmática, un grano de polen compatible puede ser hidratado y otro grano incompatible no. En este tipo de estigmas, la cubierta del polen forma un canal hidráulico compuesto por lípidos entre el grano de polen y la superficie estigmática (Swanson *et al.*, 2004). Cuando se altera la síntesis de lípidos, en especial los de cadena larga, el grano de polen no puede ser hidratado, lo que conlleva a esterilidad masculina. Experimentos *in vitro* en *A. thaliana*, demostraron que para reestablecer la fertilidad del grano de polen solamente se tienen que adicionar triacilgliceroles puros o aumentar la humedad de la superficie (Lord, 2001).

En el proceso de hidratación también intervienen las oleosinas, proteínas ricas en glicina (GRPs) que poseen un dominio de unión a lípidos. A diferencia de los lípidos presentes en la cubierta del polen, la secuencia de estas proteínas presenta una gran diversidad originada quizá por una rápida evolución gracias a un alto número de inserciones/deleciones. Esta diversidad puede estar contribuyendo al reconocimiento especie-específica del polen, ya que algunas oleosinas se localizan en la cubierta del polen (Mayfield *et al.*, 2001).

Las oleosinas previenen la agregación de lípidos, regulan el tamaño de los cuerpos lipídicos y se localizan rodeando las gotas de aceite en semillas, anteras y, como ya se mencionó, en la cubierta del polen. La oleosina más abundante en el polen es la GRP7, la que al ser silenciada, provoca un retraso en la hidratación del grano de polen (Mayfield y Preuss 2000). A diferencia de lo que ocurre con los lípidos, en este caso no se pierde la capacidad de hidratación lo cual indica que la participación de las proteínas en este proceso no es esencial.

En *N. tabacum* no se han encontrado ninguna proteína ortóloga a las oleosinas presentes en la cubierta del polen de *A. thaliana*, lo que sugiere que, en estigmas húmedos, la hidratación es facilitada por otros factores (Sánchez *et al.*, 2004).

### 2.3 Germinación del tubo polínico

La hidratación transforma al grano de polen en una célula altamente polarizada, lista para germinar. Las interacciones célula-célula del estigma con el polen favorecen su germinación, la cual comienza con la secreción de enzimas digestivas del propio TP (Sánchez *et al.*, 2004). Modelos *in vitro* muestran que el TP puede detectar el establecimiento de gradientes de agua a través de una matriz de lípidos y regular la velocidad de hidratación para orientar su crecimiento. En *N. tabacum* y en otras especies de la familia Solanaceae, el exudado lipídico es producido por las células de la zona secretora del estigma y secretado en la madurez del pistilo. Por debajo del exudado se encuentra una delgada capa de agua rodeando las células de la zona secretora (Sánchez *et al.*, 2004).

En estigmas secos, el crecimiento ocurre a través de la pared celular de las papilas y la penetración del TP es acompañada por la expansión de la pared celular en el estigma o en algunos casos su desintegración. Al parecer, el crecimiento del TP es facilitado por enzimas producidas por el polen o por el estigma que degradan la pared (Edlund *et al.*, 2004).

En *N. tabacum*, en donde el estigma es húmedo y el estilo cerrado, el TP crece a través de los espacios intercelulares entre las células de la zona secretora, dentro del exudado producido por éstas (Sánchez *et al.*, 2004). De diferente manera, en *L. longiflorum*, los estilos son abiertos y están formados por una epidermis secretora por la cual los TP viajan hacia el ovario, evitando cualquier penetración de tejidos (Lord, 2003).

Tanto en estilos cerrados como en abiertos, para que el TP continúe con su crecimiento polarizado hacia el ovario, tiene que ser guiado por señales químicas y/o por interacciones físicas emitidas por el esporofito femenino. Hasta la fecha, se han identificado sólo dos proteínas con características quimiotácticas, TTS de *N. tabacum* (Wu *et al.*, 2000) y una fitocianina denominada quimocianina de *L. longiflorum* (Kim *et al.*, 2003). Ambas proteínas fueron descubiertas en la MEC del pistilo y se encuentran en gradiente a lo largo del estilo, siendo el ovario el lugar de mayor expresión. La quimocianina, en condiciones *in vitro*, es capaz de atraer los TP de *L. longiflorum*; sin embargo, esta atracción no es ejercida únicamente por la quimocianina, sino también por una adhesina estilar (Kim *et al.*, 2003). Además, se sabe que la sobreexpresión de una fitocianina de *A. thaliana* (At2g02850), la cual presenta un 51.9% de identidad con la proteína de *L. longiflorum*, causa alteraciones en el crecimiento del tubo polínico (Dong *et al.*, 2005).

### 2.4 Interacciones del tubo polínico con el estilo

La mayoría de las proteínas que interaccionan con el TP son glicoproteínas ricas en Hyp/Pro, Ala, Thr

y Ser (HRGP), a las cuales se les unen arabinosa y galactanos como carbohidratos sustituyentes (Nothnagel, 1997). Éstas a su vez se pueden dividir en tres grupos: arabinogalactanos (AGPs), extensinas y lectinas (Showalter y Varner, 1989; Schultz *et al.*, 1997).

Las AGPs presentan sitios de glicosilación con características estructurales y bioquímicas únicas; no tienen una secuencia consenso para la hidroxilación y glicosilación de los residuos de prolina (Cheung, 1999); sin embargo, el contenido de carbohidratos oscila entre el 90 y 98% de su masa, y se encuentran generalmente unidos a la cadena polipeptídica por residuos de hidroxiprolina. Las AGPs mejor caracterizadas son las glicoproteínas TTS (por Transmitting Tissue-Specific), descubiertas por el grupo de Cheung (1999). Las TTS son un grupo de isoformas de diferente masa molecular, originada por los distintos grados de glicosilación. Con respecto a su función, Wu y colaboradores (2000) observaron que TTS promueve el crecimiento del TP *in vivo* e *in vitro* ya que puede funcionar como atrayente. La proteína TTS se adhiere a la superficie de la punta del TP con una localización final en la pared celular del TP. Se sabe que los sitios de glicosilación son hidrolizados por enzimas del TP y que sus azúcares podrían estar funcionando como sustrato para la síntesis de la pared celular de la punta del tubo polínico. Se ha reportado que estos grupos de azúcares se requieren para la estimulación del crecimiento del tubo polínico y como quimioatrayentes (Swanson *et al.*, 2004).

El grado de glicosilación de la proteína TTS se encuentra en forma de gradiente a lo largo del pistilo, siendo el ovario el órgano en donde hay un mayor grado. Este patrón de expresión puede involucrar a las proteínas TTS en la guía del tubo polínico hacia el ovario (Wu *et al.*, 1995).

La proteína TTS se encuentra conservada en *N. alata*. Wu y colaboradores (2000) purificaron y caracterizaron esta proteína denominándola NaTTS (por *N. alata* TTS) NaTTS tiene un 98% de identidad con TTS de tabaco y presenta isoformas que van desde los 30-110 kDa, originadas por los diferentes grados de glicosilación (Wu *et al.*, 2000). Además, es muy abundante y su localización es casi exclusiva del tejido de transmisión estilar en la matriz intercelular. Al igual que las TTS de tabaco, NaTTS puede estimular el crecimiento de TP y puede funcionar como atrayente del mismo (Wu *et al.*, 2000).

Cuando el TP sale de la pared celular del estigma, entra al tejido de transmisión el cual conecta al estigma, estilo y ovario. Los TP crecen mucho más rápido y mejor cuando están inmersos en la MEC que en condiciones *in vitro* lo que indica que los TP responden a factores provenientes del gametofito femenino (Johnson y Preuss, 2002).

A medida que el TP crece a través del tejido de transmisión del estilo, se mantiene una constante comunicación entre el TP y las células del estilo, logrando establecer un estricto control en la admisión de los TPs.

### **2.5 Destino final del tubo polínico: el saco embrionario**

Los TPs que logran pasar los puntos de control del megagametofito, llegan al ovario en donde enfrentan su último obstáculo: percibir las señales correctas que los guíen hacia el óvulo, pasando por el septo, a través del funículo y al micrópilo. Hasta la fecha, no se ha descrito una molécula que pueda estar funcionando como guía para que los TP lleguen al septo; sin embargo, el análisis de mutantes del gen *POP2* de *Arabidopsis*, el cual codifica una transaminasa de ácido g-amino butírico (GABA), indica que es necesario el establecimiento de un gradiente de GABA a lo largo del camino de los TP, siendo mayor en las células del tegumento interno que rodean al micrópilo para que los TP lleguen a los óvulos (Sawnsen *et al.*, 2004).

Cuando el TP sale del tejido de transmisión, el microambiente cambia drásticamente de un tejido conectivo rico en nutrientes a una cámara llena de aire. Esta transición se caracteriza por la reducción en el espacio donde crece el TP. La competencia entre los TP se ve aumentada durante esta etapa y solamente los más aptos serán capaces de llegar al óvulo.

En la placenta, los TPs se adhieren fuertemente a la superficie celular del septo, después se adhieren también al funículo y cuando se dirigen hacia el óvulo, este patrón de adhesión se rompe, ya que no hay más contacto con la superficie. Entonces, los TP se extienden hacia los espacios abiertos, en búsqueda del micrópilo (Swanson *et al.*, 2004). Higashiyama y colaboradores (2001) a través de la eliminación celular de cada una de las células que componen al saco embrionario, demostraron que los TPs son guiados únicamente por las células sinérgidas y que de hecho, sólo se requiere de una de ellas para su guía, la otra célula potencia la acción de la otra.

Muchas de las moléculas del pistilo involucradas en la guía y nutrición del TP son redundantes y están presentes en el pistilo antes de la polinización, lo que implica que el pistilo ya está predeterminado para mantener y dirigir el crecimiento del TP. Hasta ahora, se han identificado muy pocos genes cuya expresión es inducida exclusivamente por la polinización; en orquídeas, se han identificado tres genes que codifican para las sintasas 1-aminociclopropano-1-carboxylato (Phal-ACS1, Phal-ACS2 y Phal-ACS3), las cuales son detectadas después de varias horas de polinización y están relacionadas con la regulación de la biosíntesis del etileno, que coordina varias respuestas desarrolladas después de la polinización (Bui, A.Q. y O'Neill S.D., 1998).

### **3.0 Sistema de incompatibilidad**

Si un grano de polen germina sobre el estigma y el TP alcanza el ovario de una especie diferente, se podría generar una progenie híbrida con baja adecuación, poniendo en riesgo la identidad de la especie. Sin embargo, para evitar que exista flujo genético entre especies y favorecer la diversidad

genética dentro de una especie, las angiospermas han desarrollado barreras inter e intraespecíficas (Kao y McCubbin, 1996).

Una de las barreras para evitar la autopolinización en flores perfectas es la asincronía en maduración de los estilos y anteras. En muchas especies, las anteras liberan el polen cuando el estigma todavía está en etapa inmadura y no es receptivo; la inmadurez del estilo sitúa al estigma cerca de la base de la flor, mientras que las anteras, ya maduras, se encuentran elevadas por filamentos largos, donde difícilmente pueden polinizar los estigmas aún inmaduros. Cuando maduran el estilo y el estigma, ya no hay polen disponible en las anteras, por lo tanto, la polinización de estos pistilos se lleva a cabo por flores jóvenes que recientemente abrieron sus anteras. No obstante, esta no es una vía muy efectiva para asegurar la polinización cruzada. En plantas con muchas flores que no florecen simultáneamente, las flores más viejas pueden ser polinizadas por flores recién abiertas de la misma planta (Mauseth, 2003).

Las plantas han desarrollado otros mecanismos genéticos para favorecer la polinización cruzada: los sistemas de incompatibilidad (SI). Estos sistemas permiten discriminar y rechazar el polen de la misma planta y, al mismo tiempo, fomentan la polinización cruzada. Este fenómeno fue descrito por Charles Darwin en un libro publicado hace más de 100 años (1876). Observó que en muchas especies de vegetales parecían estériles cuando la polinización se lleva a cabo empleando su propio polen. Sin embargo, cuando provenía de cualquier otra planta de la misma especie, resultaba fértil (citado en Kao y McCubbin, 1996). En 1977, de Nettancourt propuso una definición precisa de Autoincompatibilidad (AI): “incapacidad de una planta hermafrodita fértil de producir cigotos después de la autopolinización”.

En las solanáceas, la AI es gametofítica y 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. El rechazo del polen se presenta cuando el alelo *S* que porta el polen es igual a uno de los dos alelos *S* presentes en el pistilo diploide de la planta receptora, provocando que el crecimiento del TP se inhiba generalmente a nivel del estilo (Revisado en Cruz-García y McClure, 2001).

Los sistemas de AI se encuentran ampliamente distribuidos en las angiospermas y se han descrito en 91 de 271 familias. El número de alelos *S* presentes en una población puede ser muy grande y variar de especie a especie. Por ejemplo, se conoce que en algunas especies de *Brassica* existen más de 60 alelos, en *Papaver* de 60 a 80 y en *Trifolium* de 150 a 250 (Dickinson, 1992). En el locus *S*, se encuentran codificadas la determinante masculina la cual se expresa en el polen y tubo polínico y la femenina, expresada en el pistilo (McClure *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1994; Murffet *et al.*, 1994; Broothaerts *et al.*, 1995; Sassa *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 2002; Entani *et al.*, 2003).

En los miembros de la familia solanácea estudiados al momento, los sistemas de AI están basados en la acción citotóxica de la glicoproteína denominada S-RNasa. Estas proteínas son el producto del alelo S del pistilo y se secretan hacia el espacio extracelular del tejido de transmisión del estilo. Las secuencias aminoacídicas de estas glicoproteínas son muy variables, poseen entre un 38% y 98% de similitud. Las S-RNasas comparten dos regiones hipervariables llamadas HVa y HVb; estos dominios son los que presentan el mayor grado de diversidad en las S-RNasas (Ioerger *et al.*, 1991), además de ser las más hidrofílicas de la proteína, por lo que se encuentran expuestas al solvente en la superficie de la proteína. Se ha propuesto que HVa y HVb podrían ser las responsables de la interacción con el producto del alelo S del polen, determinando así la especificidad alélica (Anderson *et al.*, 1986; Cornish *et al.*, 1987; McClure *et al.*, 1993; Xue *et al.*, 1996; Matton *et al.*, 1997).

Las regiones conservadas de las S-RNasas son cinco y se han designado C1-C5 (Ioerger *et al.*, 1991). Las regiones C1, C4 y C5 contienen la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos lo que indica que están involucradas en la estructura principal de las S-RNasas. Las regiones conservadas C2 y C3 comparten un alto grado de similitud de secuencias con las correspondientes regiones de la RNasa T2 y de la RNasa de *Rhizophus* (McClure *et al.*, 1989; Green, 1994). Entre los aminoácidos conservados de las S-RNasas y otras RNasas se encuentran dos histidinas, una en la región C3 y otra en la región C2. Se ha demostrado que tanto en la RNasa T2 (Woodward *et al.*, 1989) y las S<sub>3</sub>-RNasas de *Petunia* (Huang *et al.*, 1994), estas dos histidinas son requeridas para la actividad de ribonucleasa.

La determinante masculina fue identificada a través del análisis genómico de la región del locus S en *Petunia inflata* y fue nombrado SLF (S-locus F-box protein). SLF contiene un motivo llamado caja F hacia la región NH<sub>2</sub>-terminal, el cual se propone podría funcionar como mediador en las interacciones con otras proteínas, las cuales conforman un complejo enzimático nombrado ubiquitina ligasa E3. Estas enzimas actúan conjuntamente con las enzimas E2 para ubiquitinar proteínas blanco, quienes en la mayoría de los casos son degradadas por el proteosoma 26S (Gagne *et al.*, 2002).

El mecanismo completo de la respuesta de AI es aún desconocido. Sin embargo, a través de experimentos de interacción proteína-proteína se demostró que SLF puede interactuar en condiciones *in vitro* con las S-RNasas, ASK y proteínas similares a culina. Por lo tanto, posiblemente *in vivo*, se forme un complejo SCIA<sup>hSFL-S2</sup> que degrade a las S-RNasas de diferente haplotipo (Quiao *et al.*, 2004).

Todas las S-RNasas, estudiadas a la fecha, son glicoproteínas con N- glicanos asociados. El número de sitios potenciales de N-glicosilación varían de uno a cinco, con la secuencia consenso N-X-T/S; siendo X cualquier aminoácido excepto prolina (Kao y McCubin, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que los glicanos unidos a la S-RNasa no son requeridos para su función en el rechazo del polen, por lo que la información de la especificidad está en la secuencia aminoacídica (revisado en Takayama e Isogai,

2005).

Las S-RNAsas son transportadas desde la MEC del tejido de transmisión del estilo hasta el citoplasma del TP a través de un mecanismo aún desconocido, sin importar el genotipo de la planta receptora (Wu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006). En el interior del TP si la cruza es incompatible, la S-RNasa debe interactuar con SLF para desencadenar, por un mecanismo todavía no descubierto, el rechazo del polen S-específico.

### 3.1 Genes modificadores

Aunque las S-RNAsas son las determinantes femeninas de la incompatibilidad, hay evidencia genética que indica que los productos de genes modificadores no ligados al locus *S* (Genes modificadores) son importantes en la vía bioquímica del rechazo del polen *S*-específica (Anderson and de Winton, 1931; Mather, 1943; Martin, 1968; Ai *et al.*, 1991; Murfett *et al.*, 1996; Tsukamoto *et al.*, 1999).

Los genes modificadores (GM) se han clasificado en tres grupos (McClure *et al.*, 2000). El grupo I incluye genes cuyos productos regulan la expresión de las determinantes de la especificidad (*SLF* y *S-RNasa*) en la respuesta de incompatibilidad. Un ejemplo de este grupo de genes se describió por Tsukamoto *et al.* (1999; 2003) en una población silvestre de *Petunia axillaries*, con plantas autocompatibles (AC) y autoincompatibles. Estos autores encontraron que la expresión de *S<sub>13</sub>-RNasa* se encontraba suprimida en las plantas AC por un locus llamado *MDF*.

El grupo II comprende GM que regulan la actividad biológica de las determinantes de especificidad, por lo tanto su función se restringe a la respuesta de incompatibilidad. En este grupo sólo se han identificado dos GM y, de los cuales se ha confirmado su papel directo en la respuesta de rechazo del polen (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005). Estos GM codifican para las proteínas HT-B y 120K. HT-B es una proteína de 8.2 kD rica en asparagina, mientras que 120k es una glicoproteína de 120 kDa que ingresa al tubo polínico en *N. alata* (revisado en Goldraij *et al.*, 2006). El papel de estos GM en la AI fue confirmado al silenciarlos por técnicas de RNA antisentido y RNAi, en plantas transgénicas de *Nicotiana*. Cuando HT-B o 120K fueron silenciados de manera independientemente, se observó que las plantas transgénicas pasaron de ser AI a AC. Además, se observó que el crecimiento de los tubos polínicos en los estilos de estas plantas no se afectó, lo que confirma claramente que HT-B y 120K participan exclusivamente en la autoincompatibilidad sin afectar otros eventos de la polinización. Otros grupos de investigación han confirmado el papel de HT-B como un GM en *Lycopersicon* y *Solanum* (O'Brien *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2002a; 2002b). Sin embargo, su función bioquímica exacta se desconoce.

La proteína 120k es una arabinogalactoproteína (AGP) específica de estilos de *N. alata* y que forma complejos *in vitro* con las S-RNasas (Cruz-García *et al.*, 2005). La proteína 120K ingresa a los TPs sin importar si son compatibles o incompatibles (Hancock *et al.*, 2005).

El tercer grupo de GM incluye genes que funcionan en el rechazo del polen y en otros procesos de la interacción polen-pistilo. Algunos candidatos potenciales incluyen proteínas tales como una proteína específica del tejido de transmisión (TT) del estilo de *N. alata* (NaTTS), una proteína similar a extensina (PELP III) y un proteína similar a una quimiocianina (Nap11), las cuales interactúan físicamente con las S-RNasas (McClure *et al.*, 2000; Cruz-García *et al.*, 2003, 2005). Otro gen que es un buen candidato a GM en esta clase es *NaTrxh*, un gen que se expresa preferencialmente en especies AC de *Nicotiana*. *NaTrxh* y que codifica una tiorredoxina h que se secreta a la matriz extracelular de TT de estilo de *N. alata* y que reduce específicamente a la S-RNasas *in vitro* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

### Antecedentes inmediatos

Los sistemas genéticos del reconocimiento del polen alelo *S*-específico en Solanáceas requieren de la interacción física entre el producto del alelo *S* masculino (*SLF*) y el femenino (*S-RNasa*). Sin embargo, para que ésto suceda se requiere la participación de los productos de los GM, de los cuales no se tiene mucha información. Una hipótesis, en el caso del sistema de AI gametofítico de *N. alata* es que éstos formen complejos moleculares en el estilo con las *S-RNasas* que participen en el reconocimiento y/o en el transporte de éstas al citoplasma del TP (McClure *et al.*, 2000, Cruz-García *et al.*, 2005).

Esta hipótesis se evaluó en *N. alata* mediante técnicas bioquímicas de interacción proteína-proteína. En columnas de afinidad, donde el ligando fue la *S*<sub>C10</sub>-RNasa, se identificaron tres especies principales de proteínas que fueron retenidas en la columna, a partir de extractos crudos de *N. alata* *S*<sub>C10</sub>*S*<sub>C10</sub>: 1) glicoproteínas de alto peso molecular, identificadas por inmunodetección como NaTTS, 120K y el homólogo de PELPIII, NaMG15; 2) una proteína de aproximadamente 34 kDa, inmunoidentificada como la propia *S*<sub>C10</sub>-RNasa, y 3) una proteína pequeña nombrada Nap11, por su masa molecular aparente de 11 kDa (Cruz-García *et al.*, 2005). La proteína Nap11 fue purificada a partir de extractos crudos de estilos de *N. alata* por medio de cromatografía de intercambio catiónico y la técnica de FPLC. Se obtuvieron fracciones parcialmente puras de la proteína Nap11 con contaminación de proteínas de alto peso molecular (Cruz-García, comunicación personal).

Estas fracciones fueron separadas electroforéticamente por SDS PAGE y la banda correspondiente a la proteína Nap11 fue escindida del gel de y secuenciada en su extremo amino terminal. La secuencia obtenida fue la siguiente: AIYNVGDNGWTFGVSN. Con esta secuencia se diseñaron oligonucleótidos (cebadores) degenerados específicos de esta región para amplificar por la técnica 3'RACE el cDNA de Nap11 a partir de RNAm de estilos de *N. alata*. De esta forma, fue posible clonar un cDNA que codifica una proteína que contiene los primeros 18 aminoácidos del extremo amino Terminal de la proteína madura Nap11.

Al analizar la secuencia del cDNA, se encontró un marco de lectura abierto para una proteína de 10.4 kDa que incluye una señal de secreción en su extremo amino, la cual es aparentemente procesada para originar una proteína madura de 9.6 kDa. Al comparar esta secuencia con la de otras proteínas en la base de datos (BLAST), se encontró similitud con proteínas que unen cobre llamadas cupredoxinas, específicamente con las fitocianinas.

En plantas existen diferentes tipos de proteínas que unen cobre, como las plastocianinas, las cuales están involucradas en la transferencia de electrones en reacciones de fotosíntesis y las fitocianinas que pueden estar involucradas en reacciones de óxido-reducción (Nersisian *et al.*, 1985; 1991; 1998).

Las fitocianinas son proteínas que contienen un solo ión de cobre en configuración tipo 1 o “azul” y absorben la luz a 600 y 450 nm, lo que les da un color azul o azul verdoso característico (Ryden y Hunt, 1993). Poseen una estructura terciaria conservada, en la cual el dominio de unión a Cu (DUC) está formado por dos histidinas (H), una cisteína (C) y una metionina (M) o glutamina (Q) (Nerssian *et al.*, 1998). Otra característica es que presentan dos cisteínas conservadas que podrían estar formando un puente disulfuro, el cual probablemente es importante para mantener la estructura terciaria de la proteína. A diferencia de las plastocianinas en donde el DUC se encuentra en la parte hidrofóbica de la proteína, en las fitocianinas se localiza expuesto en la superficie, lo que permitiría una fácil interacción con moléculas pequeñas. Por lo anterior, y por la rapidez con que reaccionan con complejos inorgánicos pequeños, se sugiere que las fitocianinas están involucradas en reacciones de óxido-reducción con moléculas pequeñas (Hart *et al.*, 1996; Nerssian *et al.*, 1996).

Las fitocianinas a su vez se dividen en plantacianinas, uclacianinas y estelacianinas, de acuerdo a los diferentes dominios que las conforman y a la naturaleza del residuo de aminoácido que es coordinado en el sitio axial del cobre (Nerssian *et al.*, 1998).

Las plantacianinas son proteínas básicas no glicosiladas que contienen un DUC en donde los aminoácidos que coordinan al cobre son 2 His, 1 Cys y 1 Met.

Las uclacianinas están formadas por un DUC semejante al de las plantacianinas y por otro dominio rico en serina y prolina.

Las estelacianinas presentan un DUC similar a los antes mencionados, únicamente cambia una Q por una M. Además, contienen un extremo carboxilo hidrofóbico que se modifica post-traduccionalmente por la adición de un GPI (glucosil-fosfatidil-inositol). La mayoría de las fitocianinas contienen un péptido señal que podría dirigirlas hacia el retículo endoplásmico, de donde se transportarían a la matriz extracelular (Nerssian *et al.*, 1998).

### **Hipótesis**

En condiciones *in vitro* Nap11 está formando complejos con proteínas estilares como la S-RNasa, 120K y NaTTS, lo que apoyaría la propuesta de que dichos complejos existan *in planta*, participando en la polinización de *N. alata*.

### **Objetivo general**

Estudiar si Nap11 se asocia *in vivo* con proteínas del estilo de *N. alata*.

### **Objetivos particulares**

1. Purificar a Nap11 a homogeneidad a partir de estilos de *N. alata*.
2. Producir anticuerpos policlonales contra la proteína Nap11.
3. Corroborar si el cDNA de Nap11 codifica la misma proteína que se retiene en la columna de S-RNasa.
4. Determinar los patrones de expresión y localización subcelular de Nap11 en plantas de *N. alata*.
5. Analizar las relaciones filogenéticas de Nap11 con otras fitocianinas.

## Materiales y métodos

### *Material vegetal*

*N. alata* es una planta originaria de Brasil, que crece en forma vertical, produce flores de colores sólidos variados (rojo, rosa, lavanda, blanco, amarillo y lima), localizadas en los ápices, es resistente al calor y presenta un periodo de vida anual. Las flores tienen una ligera fragancia que se detecta mayoritariamente por la tarde.

El nombre *Nicotiana* se lo dio el francés Jean Nicot en el siglo XVI cuando introdujo a Francia la planta del tabaco. El término *alata*, traducido al español como alado, se refiere a la forma de los peciolos de las especies que tienen extensiones laterales, lo cual es menos obvio en los cultivares modernos.

*Nicotiana* sección *alatae* es un grupo monofilético formado por 7 especies con al menos 3 síndromes de polinización. Los principales polinizadores de este grupo son colibríes y palomillas, dependiendo de la longitud del estilo.

Para la purificación de la proteína Nap11, se colectaron estilos tanto maduros como inmaduros (etapa I de desarrollo) de plantas de *N. alata* cultivar BT; este cultivar no expresa a ninguna S-RNasa. En cambio, para la purificación las S-RNasas se colectaron estilos maduros de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> o S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>. Todas las plantas fueron cultivadas bajo un fotoperíodo de luz/obscuridad de 16/8 h en condiciones de invernadero.

### *Purificación de la proteína Nap11 a partir de estilos maduros*

Se utilizaron 2.6 g de tejido fresco de estilos maduros de *N. alata* BT, los cuales fueron pulverizados con nitrógeno líquido. Se adicionó 15 ml de amortiguador de extracción (Tris-HCl 0.05M pH 8.0, NaCl 0.05M, β-mercaptoetanol 1%) y se centrifugó a 2980 g durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante fue filtrado con gasa en un tubo limpio.

Para este protocolo se emplearon 0.65 ml de la resina SP-Sepharosa (Sigma) los cuales fueron incubados junto con el extracto crudo durante 1 h con movimiento giratorio constante a 4°C. Pasado el tiempo y cuidando de recuperar la mayor cantidad de resina posible, ésta fue transferida a una columna vacía y se colectó por gravedad la fracción no unida. La columna fue lavada dos veces con 10 vol. cama de amortiguador de extracción sin β-mercaptoetanol.

Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con un gradiente discontinuo de NaCl de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.7 M. Las fracciones recuperadas con 0.4, 0.5 y 1 M fueron desaladas utilizando una columna de filtración molecular con límite de exclusión hasta 6,000 Da (Sephadex G25 de Bio-Rad, Econo-Pac

10DG). La columna fue equilibrada con el amortiguador AE (Tris 0.05M pH 8) y cada muestra fue aforada a 3 ml con el mismo buffer. La muestra se aplicó a la columna y se eliminaron los primeros 3 ml (vol. vacío). Se adicionaron 4 ml de AE y fueron recuperados. En esta fracción eluyeron las proteínas de alto peso molecular. Finalmente, se agregaron 8 ml más de AE y se eluyeron el resto de las proteínas. Ambas muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en 1 ml de agua desionizada.

Todas las fracciones obtenidas hasta este punto fueron analizadas por SDS-PAGE 15% y en réplica tipo Western contra Nap11.

Las fracciones en donde se inmunodetectó a Nap11 se concentraron por cartucho de centración con una exclusión de 50 kDa y ambas fracciones se analizaron por SDS-PAGE y réplica en Western anti Nap11.

#### ***Purificación de Nap11 a partir de estilos en etapa I de desarrollo.***

Los estilos de *N. alata* fueron colectados en diferentes etapas de desarrollo, dividiéndolos en categorías tomando en cuenta su longitud. La etapa I comprende estilos de 0.5 -1 c, la II incluye estilos de 1.1-2.5 cm, la III son de 2.6-3.5 cm, la IV la forman estilos de 3.6-5.0 cm y, finalmente, la V comprende estilos maduros de 5.1-6.0 cm.

Para la purificación de Nap11, utilizando estilos en la etapa I de desarrollo, se introdujeron algunas variaciones a la metodología usada para la purificación de la proteína Nap11 a partir de estilos maduros: se partió de 1.5 g de estilos colectados en etapa I de desarrollo de *N. alata* BT; para la elución de proteínas se aplicó un gradiente discontinuo de pH desde 8.0 hasta 11.5 en incrementos de 0.5 unidades de pH y tomando en cuenta al pH 8.9 (amortiguador para los pHs 8.0, 8.5 y 8.9: Tris-HCl 0.05 M NaCl 0.05 M; amortiguador para los pHs 9.0, 9.5, 10.0, 10.5: NaCl 0.05 M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.025 M, glicina 0.025 M; para pH 11.0 y 11.5: NaCl 0.05 M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.015 M, glicina 0.015 M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.020 M). Se realizaron 2 eluciones de 0.5 ml para cada valor de pH. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE 15% y por réplica en Western anti Nap11, anti NaTTS y anti 120K.

#### ***Identificación de proteínas que copurifican con Nap11***

Para identificar las proteínas que copurificaron con Nap11, se partió de estilos de la planta homóciga de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, los cuales fueron pulverizados con nitrógeno líquido y resuspendidos en amortiguador de extracción (Tris-HCl 0.05M pH 8.0, NaCl 0.05M, β-mercaptoetanol 1%). Se centrifugó a 2980 g por 5 min. a 4° C; el sobrenadante fue transferido a otro tubo a través de una gasa sencilla.

La muestra resultante fue sometida a una cromatografía de intercambio iónico; se incubó con la resina

SP-Sepharosa (SIGMA) durante 1 h a 4° C con movimiento giratorio constante. Se realizaron las eluciones con 0.3, 0.4 y 0.5M de NaCl. Las muestras fueron directamente concentradas en un cartucho de centración con un límite de exclusión de 50 kDa.

La muestra correspondiente a proteínas de mayor de 50 kDa fue concentrada hasta un vol. De 200 µl e inyectada a una columna Superdex 200. Se recuperaron 60 fracciones de 500 µl cada una, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE 15% y por ensayo tipo Western utilizando anticuerpos contra NaTTS, 120K, S<sub>105</sub>-RNasa y contra Nap11.

#### *Extracción secuencial de proteínas de ME de estilos*

Se colectaron y cortaron longitudinalmente estilos de las plantas homocigas de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>. Después fueron sumergidos en el amortiguador BE1 (Tris-HCl 0.10 M pH 8.0) frío (0.200 ml por cada 15 mg de tejido) durante 2 h a 4 °C con ligera agitación ocasional. Se recuperó la fracción soluble y se agregaron otros 11 ml del BE1 a los estilos. Se agitaron enérgicamente y el sobrenadante se juntó con el anterior. Se adicionaron 11 ml del amortiguador BE2 (Tris-HCl 0.04 M, NaCl 0.4 M) y se incubó a 4 °C durante dos h. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 11 ml más de BE2. Se agitaron y el sobrenadante fue colectado y juntado con el anterior. El tejido restante fue triturado con nitrógeno líquido y homogenizado con el amortiguador BE3 (BE2 más Tritón x-100 1%); se centrifugó a 11920g por 30 min. a 4 °C. Todos los sobrenadantes fueron analizados por SDS-PAGE 12.5% y réplica en Western anti Nap11, anti S<sub>105</sub>-RNasa y anti NaTTS.

#### *Cuantificación de proteína total*

Para la cuantificación de proteína se utilizó el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). La curva patrón se construyó con albúmina sérica bovina (BSA).

El rendimiento de purificación de la proteína S<sub>105</sub>-RNasa y de la semipurificación de Nap11 se evaluó a través de cuadros de purificación (apéndice A).

#### *Electroforesis desnaturizante en geles discontinuos de poliacrilamida*

El método empleado para la separación de proteínas fue el de Laemmli (citado en Ausubel, *et al.*, 1997). Se hicieron geles al 12, 12.5% y 15% de poliacrilamida.

***Tinción con Azul Brillante de Coomassie Coloidal***

Después de la electroforesis, los geles fueron lavados con agua desionizada 3 veces durante 10 min. Se agregó la solución de Coomassie (Etanol 20%, ácido fosfórico 1.6%, sulfato de amonio 8%, azul brillante de Coomassie coloidal G-250 0.08%) hasta cubrir el gel y se incubó a temperatura ambiente, con agitación constante por un mínimo de 6 h. La solución se decantó y el fondo fue eliminado destiñendo el gel con agua desionizada durante aproximadamente 4 h.

***Tinción con nitrato de plata***

Al finalizar la electroforesis, el gel se incubó con metanol al 50% durante 1.5 h. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con H<sub>2</sub>O desionizada de 10 min. cada uno y se volvió a incubar en 100 ml de metanol al 50% con 100 µl de formaldehído al 37% durante 1.5 h. Pasado el tiempo, se decantó la solución de metanol y se hicieron 3 lavados con H<sub>2</sub>O, decantando rápidamente el H<sub>2</sub>O. Se dejó el gel en H<sub>2</sub>O mientras se prepararon las soluciones A, B y C (A, 0.8 g de nitrato de plata (SIGMA) disuelto en 4 ml de H<sub>2</sub>O; B, 1.4 ml de NH<sub>4</sub>OH en 21 ml de NaOH al 0.36%; C, la solución A se agregó por goteo a la solución B con agitación constante y se aforó a 100 ml con H<sub>2</sub>O).

Se decantó el H<sub>2</sub>O y se incubó el gel en la solución C, por 15 min. Después, se realizaron 3 lavados con abundante H<sub>2</sub>O de 5 min. cada uno. Para revelar el gel, se sumergió el gel en la solución D (2.5 ml C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> y 0.25 ml de formaldehído al 37% aforado a 500 ml con H<sub>2</sub>O) hasta visualizar las proteínas. La reacción se paró con ácido acético al 10% y metanol al 50%.

***Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa***

Después de la electroforesis, el gel fue lavado con amortiguador de transferencia (Tris 0.02 M, glicina 0.191 M, SDS 0.0035 M, metanol 20%) durante 15 min. con agitación constante. Se cortó un pedazo de membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño que el gel y se hidrató con amortiguador de transferencia durante 15 min.

Para transferir las proteínas a la membrana, se utilizó el método semi-seco de transferencia: primero se colocaron 3 pedazos de papel filtro Whatman 3MM cortados del mismo tamaño que la membrana y previamente humedecidos con amortiguador de transferencia (Tris Glicina SDS Metanol), después se tendió la membrana hidratada y sobre ésta el gel lavado con amortiguador de transferencia; finalmente, otros tres pedazos de papel filtro fueron tendidos sobre el gel. La transferencia se llevó a cabo a 75 mA. El tiempo de transferencia varió dependiendo de la proteína: para Nap11 y cualquiera de las dos S-RNasas, se realizó por 50 min. y, para NaTTS y 120K el tiempo se extendió a 75 min.

***Producción de anticuerpos policlonales anti Nap11 en conejo***

Se cortó del gel y se trituró con 0.750 ml de PBS la banda correspondiente a Nap11. Se recuperaron 0.500 ml, los cuales fueron inyectados directamente al conejo M535 con adyuvante incompleto de Freud. Se obtuvieron 8 ml del suero pre-inmune. Después de 4 inmunizaciones el conejo fue sangrado y el suero parcialmente purificado por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% de saturación, luego la fracción resultante fue resuspendida, desalada y titulada (1:50, 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000) con extractos crudos de proteínas estilares de *N. alata* BT. La dilución final que se empleó para todos los ensayos tipo Western realizados en este trabajo fue de 1:1000.

***Inmunodetección por actividad de peroxidasa de rábano***

Finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con leche baja en grasa 5 %, Tween-20 0.1 %, disuelta en buffer salino de fosfatos PBS (diluído de una solución concentrada 10X: 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 14 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH 7.3 ajustado con NaOH, y esterilizado en autoclave), a temperatura ambiente, mínima de 1 h. Se desechó la solución y se agregó solución de bloqueo nueva con el anticuerpo a la dilución adecuada. La dilución para Nap11 fue de 1:1000; para NaTTS, 120K y la S-RNasa fue de 1:10,000. La incubación se hizo por 12 h a 4 °C con agitación constante.

Se realizaron dos lavados con PBS, el primero por cinco min. y el segundo por 10 min. A la membrana se le adicionó el anticuerpo secundario (1:40,000) disuelto en solución de bloqueo y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Se eliminó la solución y se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min. cada uno.

Finalmente, se reveló por el método de quimioluminiscencia, siguiendo el protocolo del proveedor (ECL Western blotting Detection Reagents RPN2209 de Amersham).

***Inmunodetección por actividad de fosfatasa alcalina***

El procedimiento fue el mismo que el anterior hasta los últimos lavados. Después del tercer lavado, la membrana se incubó con amortiguador pH 9.5 (Tris 12.1 g/L, NaCl 5.8 g/L,  $\text{MgCl}_2$  10 g/L, ajustar a pH 9.5) durante 10 min.

Para el revelado, a 10 ml de amortiguador pH 9.5 se le agregaron 100  $\mu\text{l}$  de NBT (NBT 33 mg/ml en 70% DMSO) y 100  $\mu\text{l}$  de  $\beta\text{CIP}$  ( $\beta\text{CIP}$  17 mg/ml en 100% DMSO), se mezclaron perfectamente y se sumergió la membrana con agitación constante. Se dejó revelando hasta su visualización. El revelado se detuvo reemplazando la solución por agua y 20  $\mu\text{l}$  de solución de EDTA 0.5 M pH 8.

### **Purificación de la S-RNasa**

La purificación de la  $S_{C10}$ -RNasa y de la  $S_{105}$ -RNasa se llevó a cabo empleando dos resinas de intercambio catiónico, CM-Sepharosa y SP-Sepharosa (SIGMA). La primera es una resina que tiene como grupo de intercambio un carboximetilo (-O-CH<sub>2</sub>-COO-), por lo que el grado de disociación de las proteínas unidas, varía marcadamente con el pH. En cambio, la resina SP-Sepharosa cuyo grupo de intercambio es un sulfopropilo (-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-) es completamente ionizable dentro de un intervalo de pH muy amplio.

Se utilizaron 0.25 ml de resina por cada gramo de tejido. Previo a su utilización, ambas resinas fueron empacadas en una columna vacía de Bio-Rad y fueron lavadas con 10 vols. cama de los siguientes compuestos, en el orden indicado: 2 M NaOH, 5 M NaCl, agua desionizada, un vol. cama de amortiguador de columna 10 (MES 0.5 M pH 6.5 para la resina CM-Sepharosa y HEPES 0.5 M pH 8.0 para SP-Sepharosa) y 5 vol. de amortiguador de columna 1 (MES 0.05 M pH 6.5 para CM-Sepharosa y HEPES 0.05 M pH 8.0 para SP-Sepharosa).

Se utilizaron estilos de plantas homocigas  $S_{105}S_{105}$  o de  $S_{C10}S_{C10}$  de *N. alata*, los cuales fueron pulverizados con nitrógeno líquido. Inmediatamente se les agregó 15 ml de amortiguador de extracción (MES 0.05 M pH 6.5, EDTA 0.005 M, ascorbato de sodio 0.05M, β-mercaptoetanol 1%; 5 ml por cada gramo de tejido) y se agitó en vortex. La muestra siempre se mantuvo en hielo. Se homogeneizó el tejido con politrón, a máxima velocidad, durante 60 s, evitando generar espuma. El extracto se centrifugó a 11920 g durante 5 min. a 4 °C.

Se removió la capa de lípidos formada en la superficie del extracto con un hisopo, posteriormente, el extracto fue filtrado a otro tubo a través de 2 capas de gasa para volver a ser centrifugado a 11920g durante 10 min. a 4 °C. Nuevamente se retiró la película de lípidos y, finalmente, el sobrenadante se filtró empleando 2 capas de gasa.

El extracto proteico final se aplicó a la columna con la resina CM-Sepharosa. La fracción no unida se colectó por gravedad. La columna con la resina y el extracto crudo fue lavada con tres vols. cama del amortiguador de columna 1; después, las proteínas fueron eluidas con 1.0 ml de diferentes concentraciones de NaCl, dependiendo de la S-RNasa que se estaba purificando; para la  $S_{C10}$ -RNasa se utilizaron las siguientes concentraciones de NaCl: 0.175, 0.35 y 0.7 M y para la  $S_{105}$ -RNasa fueron 0.075, 0.175, 0.35 y 0.7M (amortiguadas con MES pH 6.5).

Todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE en geles al 12.5% y teñidos con azul de Coomassie. La fracción en donde se observó más enriquecida a la glicoproteína fue la correspondiente a 0.35 M de NaCl para la  $S_{C10}$ -RNasa y la de 0.175 M de NaCl para la  $S_{105}$ -RNasa.

Las fracciones fueron concentradas empleando un centrífugo con corte de 10 kDa y el amortiguador fue intercambiado por el de columna uno para la resina SP-sepharosa (HEPES 0.05 M pH 8.0).

El concentrado proteico se aplicó a la columna de SP-Sepharosa previamente equilibrada y se lavó con tres vol cama de amortiguador de columna uno para SP-Sepharosa. Se recuperó la fracción no unida.

Para la elución de las proteínas se utilizaron las siguientes concentraciones de NaCl: para la S<sub>C10</sub>-RNasa fueron 0.06, 0.12, 0.24 y 0.72 M y para la S<sub>105</sub>-RNasa 0.04, 0.12, 0.24, y 0.72 M.

Analizando todas las fracciones por SDS-PAGE, se encontró que la fracción con mayor pureza fue la eluida con 0.12M de NaCl para ambas S-RNAsas. Finalmente, esta fracción fue concentrada hasta 200 µl en un cartucho de centrífugo con corte de 10 kDa (Tris 0.05M pH 8.0), filtrada e inyectada a una columna de Superdex 200 de exclusión molecular por la técnica de FPLC. De esta última purificación se obtuvieron 60 fracciones de 500 µl cada una. Todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE en geles al 12.5% y fueron teñidas con nitrato de plata siguiendo el protocolo de Shevchenko *et al.* (1996). Por su masa molecular, se reveló que la S-RNasa fue recuperada en las fracciones 34 a la 39 sin ningún contaminante. Estas fracciones fueron concentradas en un cartucho de centrífugo con corte de 10 kDa (Tris 0.05 M pH 8.0). Para corroborar su identidad, se realizó una inmunodetección anti S<sub>105</sub>-RNasa y anti S<sub>C10</sub>-RNasa.

#### ***Preparación de la columna de Affigel***

La matriz de 1.0 ml de Affigel-10 (Bio Rad) fue lavada con agua fría. Se mezclaron 0.500 mg de cada una de las S-RNAsas junto con 0.1 M de MOPS, pH 7.5 y se incubó durante toda la noche a 4 °C con movimiento rotacional constante. Los ésteres activos fueron bloqueados agregando 0.1 ml de etanolamina 1 M.

La columna control de etanolamina se preparó de la misma forma pero sin agregar proteína.

Las matrices fueron transferidas a columnas y lavadas para eliminar los reactivos no unidos. La eficiencia de unión fue calculada cuantificando la proteína total antes de incubarla con la resina, así como la fracción no unida a ésta. La eficiencia de unión fue del 80%.

#### ***Ensayo de interacción proteína-proteína***

Las columnas con las matrices de Affigel (0.5 ml) se equilibraron con amortiguador de unión (BU) (Tris-HCl 0.05 M PH 8.8, NaCl 0.05 M , 2-mercaptoethanol 1% (v/v) ) en columnas. Para los ensayos de interacción proteína-proteína se prepararon extractos crudos en BU (200 mg peso fresco/ml) y se centrifugó a 11920g durante 15 min. a 4 °C. Con un hisopo se removió la película de lípidos. Estos

extractos se aplicaron a las matrices de afinidad Affigel-RNasa y se colectó la fracción de proteínas no unidas. Las columnas se lavaron con 10 vol. cama del BU agregando 1% de Tween-20.

La elución de las proteínas se llevó a cabo con 1.5 ml de glicina 0.01 M pH 2.8, NaCl 0.01 M y precipitadas con 2.5 vols. de acetona durante toda la noche a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las muestras fueron centrifugadas a 20146g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el botón fue resuspendido en 30  $\mu\text{l}$  de agua. Para desnaturalizarlo, se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de amortiguador de carga para SDS, calentándose por 3 min. a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  para analizarlo en geles de poliacrilamida al 12.5 %.

#### *Análisis filogenético*

La secuencia de varias plantacianinas fueron alineadas utilizando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Basados en este alineamiento, se construyó un árbol filogenético utilizando el método de "neighbour-joining" (Saitou y Nei, 1987). Se llevó a cabo una prueba estadística basada en 1000 réplicas de bootstrap. El análisis filogenético se concluyó usando el programa MEGA versión 2.0 (Kumar *et al.*, 2001).

## Resultados

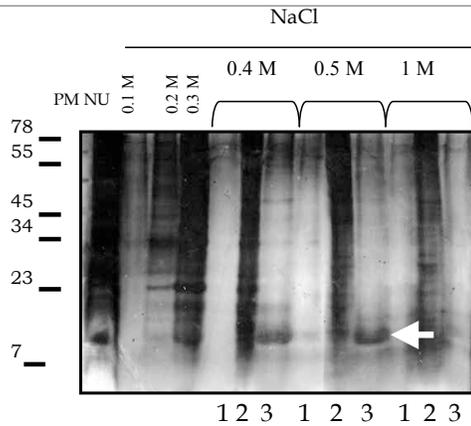
Nap11 es una proteína de aproximadamente 11 kDa que es retenida específicamente junto con otras glicoproteínas de extractos estilares en una columna de Affigel unida a S-RNasa como ligando. Mediante un protocolo de purificación, básicamente por cromatografía de intercambio iónico fue posible purificar parcialmente a Nap11, la cual eluyó de la resina con un amortiguador a pH 10.0, denotando su carácter básico.

Dada la poca información acerca de Nap11 en estilos de *N. alata*, fue preciso retomar su purificación haciendo modificaciones al método reportado por Cruz-García *et al.* (2005), con 3 propósitos: 1) obtener fracciones de Nap11 con un aceptable grado de purificación para utilizar a Nap11 como antígeno y generar anticuerpos policlonales contra ésta; 2) confirmar que el cDNA clonado previamente de Nap11 era el correcto y 3) analizar sus patrones de expresión en *N. alata*.

### *Purificación de Nap11 a partir de estilos maduros de N. alata*

La purificación parcial de p11 descrita por Cruz-García *et al.* (2005) resulta en la obtención de fracciones donde Nap11 co-purificaba con proteínas de alto peso molecular que fueron identificadas por inmunodetección como las glicoproteínas 120K, NaTTS y PELPIII.

En esta investigación, para facilitar la purificación de Nap11 de estilos de *N. alata*, se modificó el protocolo de purificación. Uno de los cambios fue utilizar un extracto crudo (EC) de estilos maduros de *N. alata* BT en lugar de estilos provenientes de plantas de *N. alata* AI, ya que esta línea es autocompatible, puesto que no expresa a la S-RNasa, una proteína de alta abundancia en el estilo (15-30% de la proteína total de este órgano) (Anderson *et al.*, 1989). Además de la modificación anterior, los EC de estilos de esta variedad fueron unidos a SP-Sepharosa (resina catiónica) y la fracción unida específicamente fue recuperada al aplicar un gradiente de NaCl (0.1 – 1 M). Los resultados obtenidos de esta nueva purificación se muestran en la figura 1. Como se puede ver en esta figura las fracciones proteicas que eluyeron con 0.4 y 0.5 M de NaCl contienen una proteína con masa molecular similar a la de Nap11 y una fracción altamente enriquecida puede obtenerse al desalar con la columna EconoPac 10DG. Sin embargo, en ninguna fracción se observó a la proteína Nap11 pura, ya que en todas las fracciones se distinguen proteínas de alto peso molecular.



**Figura 1.** Purificación parcial de la proteína Nap11 a partir de estilos maduros de *N. alata* BT. Patrón electroforético de las fracciones de proteínas estilares después de incubar el extracto crudo con la resina SP-Sepharosa y eluir con diferentes concentraciones de NaCl. Las proteínas fueron fraccionadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 15 %, los cuales fueron teñidos con nitrato de plata. PM, marcador de peso molecular; NU, fase no unida a la resina SP-Sepharosa, 1) primeros 3 ml eluidos de la columna para desalar, 2) siguientes 4ml colectados y 3) últimos 8 ml obtenidos de la elución.

Para eliminar estas proteínas contaminantes, se realizó una filtración molecular utilizando un cartucho centrífugo con capacidad de exclusión de 50 kDa. Las fracciones empleadas en este paso fueron aquellas correspondientes a los 8 ml colectados después de desalar las fracciones eluidas con 0.4 y 0.5 M de NaCl.

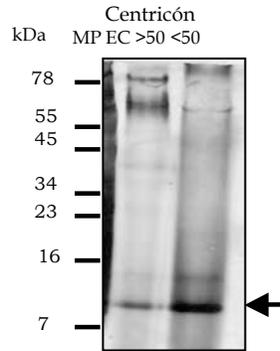
En la figura 2 se observa el resultado de este experimento. Contrario a lo esperado, Nap11 fue retenida tanto en la fracción correspondiente a proteínas de masa molecular menores a 50 kDa, como en la de proteínas con masa molecular mayor de 50 kDa. Sin embargo, como se puede observar en la figura 2, en ambas fracciones se presentan proteínas de alto peso molecular.

De la fracción menor a 50 kDa proveniente del paso de filtración molecular y después de su separación electroforética por SDS-PAGE, la banda proteica con masa molecular similar a Nap11 (Fig. 2) fue recuperada del gel y homogeneizada con adyuvante de Freud para ser inyectada a un conejo e inducir la formación de anticuerpos policlonales.

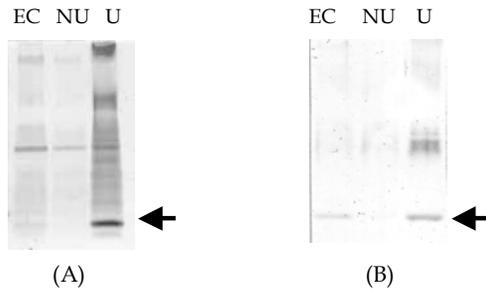
#### **Validación de los anticuerpos anti Nap11**

Los anticuerpos anti Nap11 fueron evaluados por su capacidad de reconocer a la proteína de alrededor de 11 kDa retenida en la columna de S-RNasa. Para esto, se construyó una matriz de afinidad en donde el ligando fue la S<sub>C10</sub>-RNasa, como está descrito en Cruz-García *et al.* (2005). Por la

columna Affigel- $S_{C10}$ -RNasa se pasó un EC de *N. alata*  $S_{C10}$  y se recuperó la fracción de proteínas retenidas específicamente a la columna. El resultado se muestra en la figura 3, en donde se observa que el anticuerpo reconoce a Nap11 en el EC y en la fracción unida a la  $S_{C10}$ -RNasa. Por otro lado, la identidad de Nap11 se confirmó con su secuenciación por espectrometría de masas (Fig. 8). Estos resultados indican que los anticuerpos reconocen específicamente a Nap11.

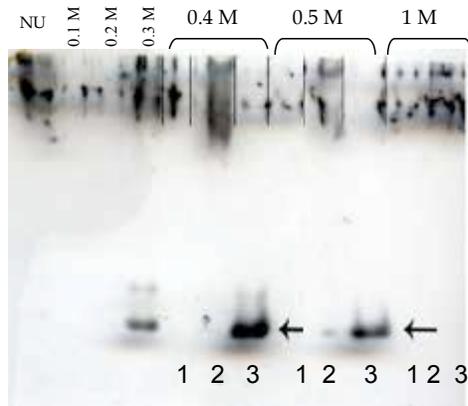


**Figura 2.** Nap11 copurifica con fracciones de alto peso molecular. Las proteínas fueron fraccionadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 15 % y posteriormente teñidos con nitrato de plata. En este experimento la filtración molecular se realizó utilizando una matriz con exclusión molecular de 50 kDa. >50, fracción correspondiente a proteínas mayores de 50 kDa. <50, fracción correspondiente a proteínas menores de 50 kDa.



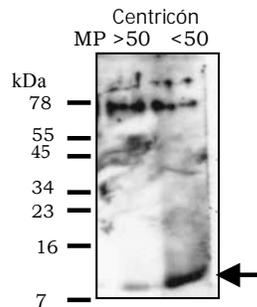
**Figura 3.** El suero anti Nap11 reconoce específicamente a la proteína de aproximadamente 11 kDa del EC que se une a la  $S_{C10}$ -RNasa. Tanto las fracciones no unidas y retenidas específicamente fueron separadas electroforéticamente por medio de SDS PAGE, 12.5 %. El gel fue transferido a membrana de nitrocelulosa para inmunoanálisis por réplica en Western con el suero anti Nap11 (1:1000). (A) SDS-PAGE teñido con nitrato de plata (B) Inmunodetección anti Nap11. EC, Extracto Crudo; NU, Fracción no unida a la columna; U, Fracción unida a la  $S_{C10}$ -RNasa.

Confirmado lo anterior, se hizo un ensayo tipo Western usando el suero anti Nap11 de las fracciones obtenidas de la purificación parcial de Nap11 visualizadas en la figura 1. Los resultados se muestran en la figura 4. Se observa que el anticuerpo detecta la misma proteína de bajo peso molecular purificada que se utilizó como antígeno para inmunizar a los conejos.



**Figura 4. Inmunodetección de Nap11 en las fracciones semipurificadas por cromatografía de intercambio iónico eluidas con 0.4 y 0.5 M de NaCl en los últimos 8 ml de la elución. La inmunodetección se llevó a cabo por ensayo tipo Western empleando el anticuerpo contra Nap11. UN, fracción no unida.**

De igual manera, las fracciones recuperadas de la cromatografía de intercambio iónico donde se inmunodetectó a Nap11 fueron sometidas a una ultrafiltración molecular mediante un cartucho de centración (corte mayor a 50 kDa), corroborando que Nap11 se encuentra tanto en las fracciones con masas moleculares aparentes < 50 kDa y > 50 kDa. (Figura 5).



**Figura 5. Inmunodetección de Nap11 en fracciones obtenidas por filtración molecular. >50, fracción correspondiente a proteínas mayores de 50 kDa; <50, fracción correspondiente a proteínas menores de 50 kDa.**

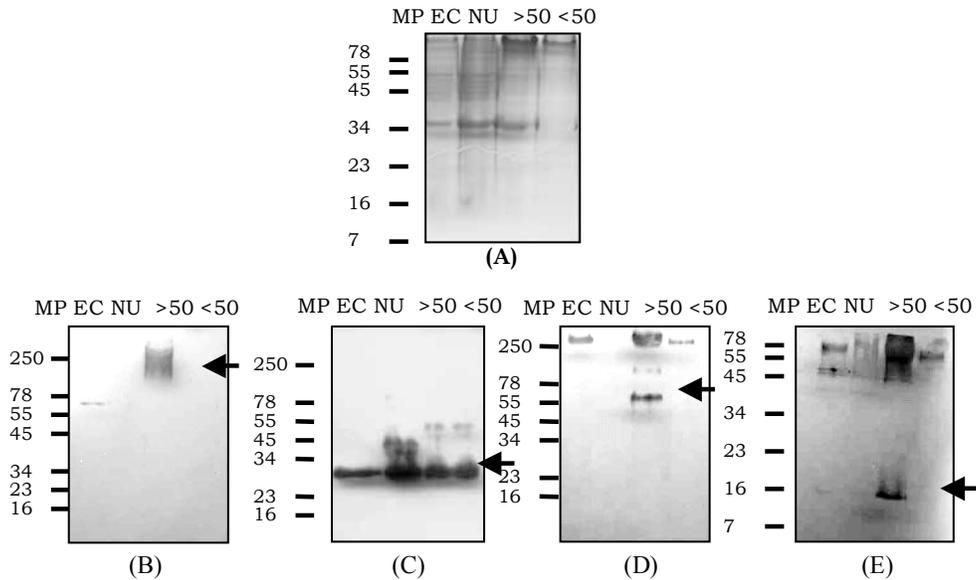
Para verificar que el poro del cartucho del centrifón estuviese funcionando de manera adecuada y que además los resultados anteriores se reprodujeran de la misma forma en estilos de *N. alata* AI, se preparó un nuevo extracto empleando estilos maduros de una planta AI de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>. Este nuevo extracto fue semipurificado por cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración, obteniendo al final dos fracciones: la fracción con proteínas mayores a 50 kDa y la fracción con proteínas menores a 50 kDa. Ambas fracciones fueron analizadas por ensayo tipo Western utilizando anticuerpos contra las glicoproteínas de alto peso molecular NaTTS, 120K, S<sub>105</sub>-RNasa y contra Nap11. Cabe mencionar, que las primeras dos glicoproteínas tienen un peso molecular entre 70-120 kDa, dependiendo del grado de glicosilación, mientras que la S<sub>105</sub>-RNasa y Nap11 presentan pesos inferiores a 50 kDa (32 y 10.5 kDa, respectivamente).

Las proteínas NaTTS y 120K fueron inmunodetectadas en la fracción correspondiente a su peso, mientras que la S<sub>105</sub>-RNasa y Nap11 se identificaron en ambas fracciones. Estos resultados se muestran en la figura 6, en donde se confirman dos cosas: la primera es que la ultracentrifugación por cartucho de centrifón está funcionando correctamente, ya que tanto NaTTS (Figura 6B) como 120K (Figura 6D) son retenidas en la fracción de proteínas de alto peso molecular. El segundo punto es que Nap11 (Figura 6E) y la S<sub>105</sub>-RNasa (Figura 6C) están siendo inmunodetectadas de manera clara en fracciones de peso molecular mayor a 50 kDa. Estos resultados sugieren que Nap11 es una proteína con facilidad para asociarse con otras proteínas.

La posibilidad de Nap11 de formar complejos con otras proteínas se evaluó mediante estudios más finos por cromatografía de exclusión molecular. En este experimento se utilizó una fracción proveniente de un extracto crudo de estilos maduros de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, el cual fue fraccionado por un centrifón de corte molecular mayor a 50 kDa. La fracción mayor a 50 kDa fue sometida a cromatografía de filtración molecular utilizando la columna Superdex 200 (resolución entre 6,000 y 1,300 000 Da).

Los resultados de este experimento se muestran en el cromatograma de la figura 7. Aquí se aprecia que la mayor parte de las proteínas eluyeron en un solo pico dentro de un intervalo de tiempo de 30 a 50 min., con la absorbancia a 280 nm más alta entre los 40 y 45 minutos (Figura 7A, panel izquierdo). Este tiempo de retención corresponde a los tiempos de elución de un estándar de peso molecular de 25 kDa. Para determinar si Nap11 coeluye con proteínas de alto peso molecular, las fracciones 33, 42, 43 y 52 fueron transferidas electroforéticamente y sometidas a un inmunoanálisis utilizando suero anti NaTTS (PM= 55-110 kDa), anti S<sub>105</sub>-RNasa (PM= 32 kDa), anti 120K (PM= 70 a 120 kDa) y anti Nap11 (PM= 10.5 kDa). En la figura 7B se observa que todas las proteínas inmunodetectadas eluyeron en el pico de mayor absorbancia a 280 nm (fracciones 42 y 43).

La proteína Nap11 eluyó en la fracción 43 junto con NaTTS, la S<sub>105</sub>-RNasa y 120K. No obstante, si se comparan los tiempos de retención a los que eluyeron estas proteínas con los estándares de PM, no concuerda que proteínas como 120K, NaTTS y la S<sub>105</sub>-RNasa eluyan a estos tiempos de retención ya que corresponden a proteínas de menor masa molecular. Estos resultados fortalecen la posibilidad de que los complejos moleculares entre S-RNasas, 120K y Nap11 existan *in vivo*.

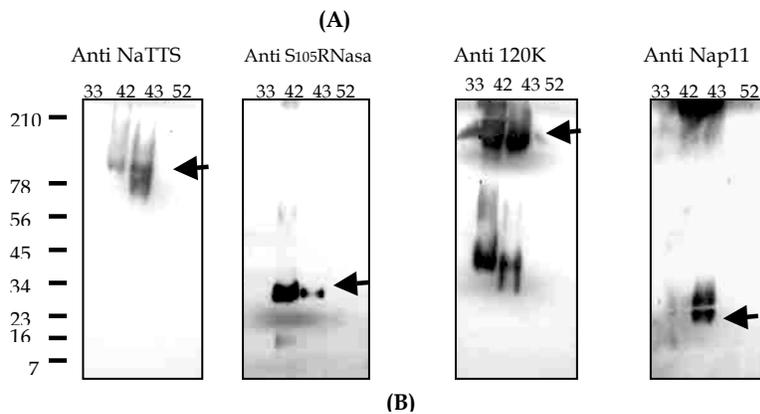
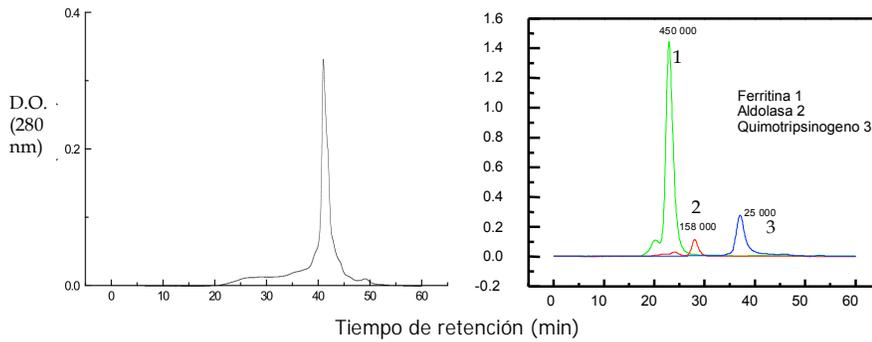


**Figura 6.** Nap11 es inmunodetectada en fracciones de alto peso molecular junto con las glicoproteínas S<sub>105</sub>-RNasa, NaTTS y 120K. Las fracciones correspondientes a masas moleculares aparentes >50 kDa y <50 kDa fueron separadas electroforéticamente por SDS-PAGE y teñidas con azul de coomassie (A) o transferidas a membranas de NITROCELULOSA para el inmunoanálisis con B) anti NaTTS, C) anti S<sub>105</sub>-RNasa, D) anti 120K y E) anti Nap11.

#### *Microsecuenciación por MALDI MS/MS de fragmentos de la proteína Nap11*

El cDNA clonado de Nap11 por Cruz-García *et al.* (2005) codifica únicamente a los primeros 18 aminoácidos de la proteína correspondiente. Para corroborar que se trata de la misma secuencia que codifica la proteína nativa de Nap11, las fracciones obtenidas de la purificación de Nap11 por filtración molecular y a partir de estilos maduros, fueron separados electroforéticamente por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. A la par, se transfirió un gel duplicado y se realizó una

inmunodetección tipo Western utilizando anticuerpos anti Nap11. La banda susceptible de ser inmunodetectada como Nap11 fue escindida del gel teñido con azul de Coomassie.



**Figura 7. Nap11 es inmunodetectada en fracciones exclusivas de proteínas de alto peso molecular junto con NaTTS, la  $S_{105}$ -RNasa y 120K. La filtración molecular se llevó a cabo por la técnica de HPLC utilizando una columna de exclusión molecular entre 6,000 y 1,300,000 Da. Se obtuvieron 60 fracciones de 0.5 ml cada una, las cuales fueron separadas por SDS-PAGE y Western blot. (A) Patrones de elución de la columna de filtración molecular de la muestra y de los marcadores moleculares. (B) Las fracciones aquí mostradas son la 33, 42, 43 y 52. Las flechas indican la proteína inmunodetectada en cada caso.**

La muestra fue sometida a varios lavados y después se realizó una digestión alcalina con tripsina para obtener péptidos de Nap11 madura y la identificación de éstos por espectrometría de masas (EM) en la Universidad de Missouri-Columbia, EUA.

La tripsina hidroliza el extremo carboxilo de una proteína cuando el aminoácido es Arg o una Lys, siempre y cuando el aminoácido siguiente no sea una Pro (Pappin *et al.*, 1993). La ocurrencia de estos dos aminoácidos es estadísticamente alta, por lo que al emplear tripsina, se genera una amplia gama de fragmentos, incrementando la probabilidad de identificar sin ambigüedad una proteína, siempre y cuando la secuencia sea conocida.

Los péptidos obtenidos fueron ionizados, separados y detectados por la técnica de MALDI MS/MS. El resultado fue un espectro de masas que, comparado con la secuencia reportada, coincide en un 80% al de Nap11. El ión con mayor relación masa : carga ( $m/z$ ) en el espectro difiere del valor teórico por exactamente 1 dalton. Lo anterior se justifica dado que bajo condiciones de digestión alcalina con tripsina, es muy común la conversión de los aminoácidos Asx-Gly en un péptido a Asp-Gly, lo que ocasiona el incremento de 1 dalton. Los iones más intensos que se observan en el espectro, corresponden a Nap11 (Figura 8).

#### ***El cDNA de Nap11 codifica una proteína que comparte un 70% de similitud con la quimocianina de *L. longiflorum****

Una vez determinado que el cDNA clonado previamente correspondía efectivamente a Nap11, se procedió a analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína madura. Previamente, se sabía que Nap11 pertenecía a la familia de las fitocianinas (Cruz-García *et al.*, 2005), las cuales son proteínas con un DUC que se encuentra conservado en toda la familia. Un análisis filogenético basado en el DUC se muestra en la figura 9. Aquí se aprecia con una confiabilidad aceptable (valores de bootstrap mayores a 50), que las fitocianinas forman 5 grupos claros (I-V). De manera interesante, se ve que el grupo V incluye a las fitocianinas de un mayor número de especies, comparado con el resto de los grupos que fundamentalmente comprenden a las fitocianinas de *Arabidopsis thaliana*. Notablemente, el grupo V que incluye a Nap11, está compuesto por las fitocianinas que sólo comprenden el dominio de unión a cobre, sin ningún otro dominio como el de modificación por GPI que presentan las estelacianinas (van Gysel *et al.*, 1993; Borner *et al.*, 2002). Nap11 tiene una similitud del 70% con la quimocianina de *L. longiflorum*, la cual se ha demostrado que funciona como un agente quimiotáctico *in vitro* para el crecimiento de tubos polínicos y cuya sobreexpresión en *A. thaliana* afecta al crecimiento del TP *in vivo* (Kim *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2005).

```

M S G K Q G S A I L W V I F M V L F
ATG TCA GGA AAA CAA GGG TCT GCA ATT TTA TGG GTC ATA TTT ATG GTG TTG TTT
                                     2353.10
A I Y N V G D G N G
T I Q I T N A A I Y N V G D G N G
ACT ATT CAA ATA ACT AAT GCT GCT ATT TAC AAT GTT GGA GAT GGT AAT GGC

W T F G V S N W P N G K A G
W T F G V S N W P N G K N F K A G
TGG ACT TTT GGT GTT AGC AAC TGG CCT AAT GGC AAG AAT TTC AAA GCT GGC

D V L V F K G V H N V V I V N
D V L V F K Y P K G V H N V V I V N
GAT GTG CTT GTA TTT AAA TAT CCT AAA GGT GTT CAT AAT GTG GTG ATA GTG AAC

K A N Y G T C N A S G R T L S S G
K A N Y G T C N A S G R T L S S G
AAG GCT AAT TAC GGT ACT TGC AAT GCT TCA GGG AGA ACA CTT AGT TCT GGA

N D R G T Y Y C G I
N D R V T L G K G T Y Y F I C G I
AAT GAC AGA GTA ACC CTT GGC AAG GGC ACA TAC TAT TTT ATT TGC GGC ATT

P G H C N G G Q K I S V T A K L T
CCT GGT CAT TGT AAT GGT GGC CAA AAG ATT TCA GTT ACT GCT AAG TTA ACA
N K
AAC AAA

```

(A)

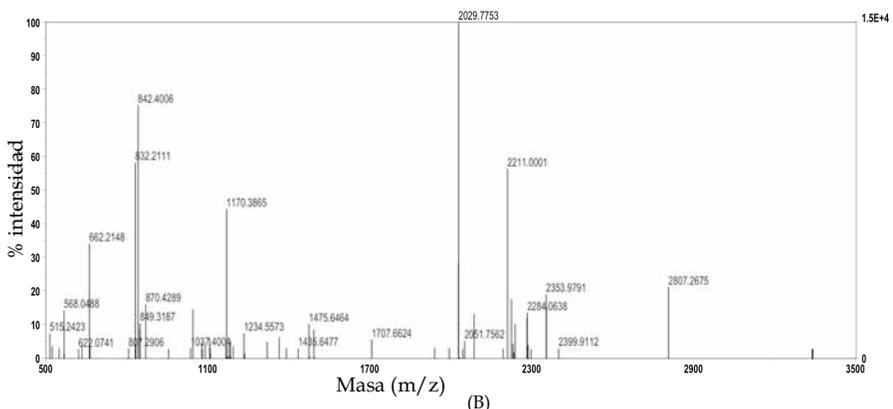
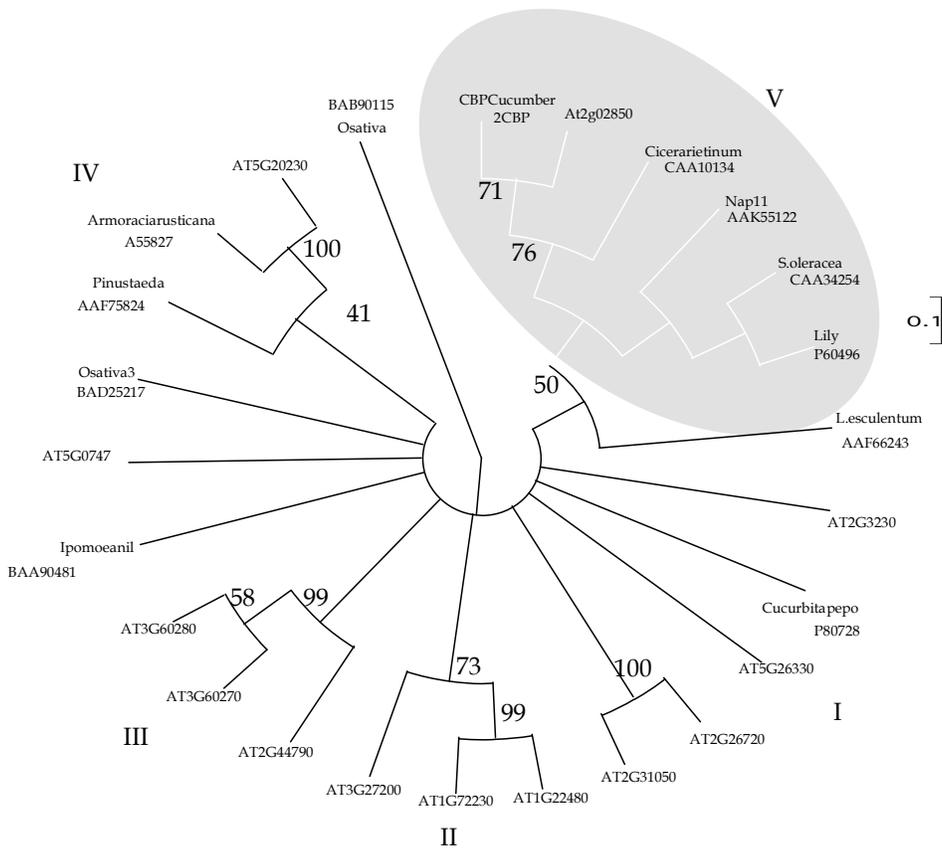


Figura 8. Los péptidos coinciden con los deducidos del cDNA de Nap11. (A) Comparación de la secuencia del cDNA de Nap11 con los péptidos obtenidos por MALDI MS/MS derivados de la proteína madura de Nap11. En negritas se encuentran los péptidos obtenidos después de la digestión alcalina con tripsina. Los números indican los valores teóricos para cada péptido. Los asteriscos señalan el DUC \* ; el recuadro sólido el NH<sub>2</sub> □ ; péptido señal :..... (B) Espectro de MALDI de Nap11. Se muestran los valores experimentales del espectro de Nap11.



**Figura 9. Arbol filogenético de la familia de las fitocianinas. El análisis se hizo utilizando el programa Mega 2.0 (Kumar *et al.*, 2001) mediante el método de Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987) con 1000 réplicas de Bootstrap.**

***Patrón de expresión de Nap11 en plantas de N. alata.***

Nap11 es una proteína específica de estilos de *N. alata*. Se prepararon extractos crudos de diferentes órganos maduros de *N. alata* (tallo, hoja, sépalo, pétalo, antera, estigma, estilo y ovario). En la figura 10 se observa que el anticuerpo anti Nap11 sólo detecta a Nap11 en el pistilo. En este órgano, la señal de Nap11 es mayoritaria en el estigma, disminuyendo progresivamente hacia la región del ovario.

Una de las características que se ha observado en las proteínas que participan en la polinización es que se expresan al final del desarrollo del pistilo. Sin embargo, la expresión de Nap11 es diferente, ya que esta fitocianina está presente desde etapas muy tempranas del desarrollo de los pistilos (figura 11),

permaneciendo sin fluctuaciones importantes hasta el final de su desarrollo. Al contrario de Nap11, la expresión de la S-RNasa va en aumento hacia el final del desarrollo del estilo con la mayor abundancia en estilos maduros de flores recién abiertas (McClure *et al.*, 1999).

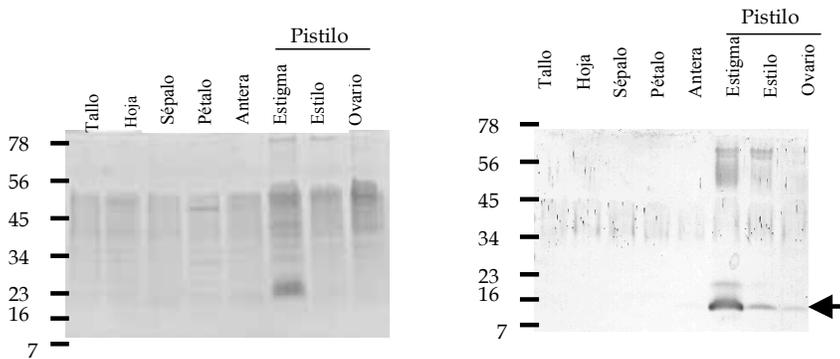


Figura 10. Nap11 es una proteína exclusiva del pistilo y se expresa en forma de gradiente. Se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE 15  $\mu$ g de proteína total de cada órgano y fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa para ser inmunoteñida con el anticuerpo contra Nap11.

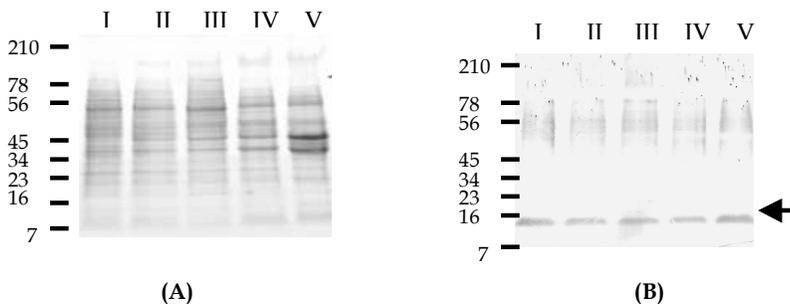
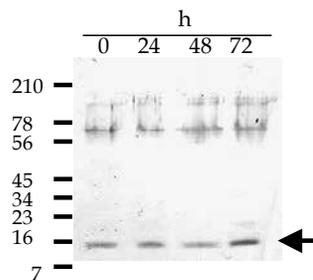


Figura 11. Nap11 se expresa desde etapas tempranas del desarrollo en estilos de *N. alata*. Se colectaron pistilos en diferente grado de maduración, los cuales fueron divididos en 5 categorías según su longitud: I= 0.5-1 cm II= 1.1-2.5 cm III= 2.6-3.5 cm IV= 3.6-5.0 cm V= 5.1-6.0 cm. Quince  $\mu$ g de proteína total de cada etapa de desarrollo fueron fraccionadas electroforéticamente por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa para su inmunoanálisis por ensayo tipo Western con el anticuerpo anti Nap11. (A) Tinción con azul de Coomassie, (B) Réplica en Western usando anti Nap11.

La expresión de Nap11 no cambia con la polinización de estilos. Se prepararon extractos proteicos de estilos de *N. alata* polinizados manualmente por 24, 48 y 72 h. En la figura 12 se muestran los resultados de la inmunodetección, observando que la cantidad de Nap11 no se ve alterada por la polinización.



**Figura 12.** Expresión de Nap11 durante la polinización de *N. alata*. Se llevaron a cabo tres polinizaciones manuales utilizando el polen de una planta AC de *N. alata*. Los estilos se colectaron a 24, 48 y 72 h. Veinte  $\mu$ g de proteína total fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a una membrana para su inmunodetección con el anticuerpo anti Nap11.

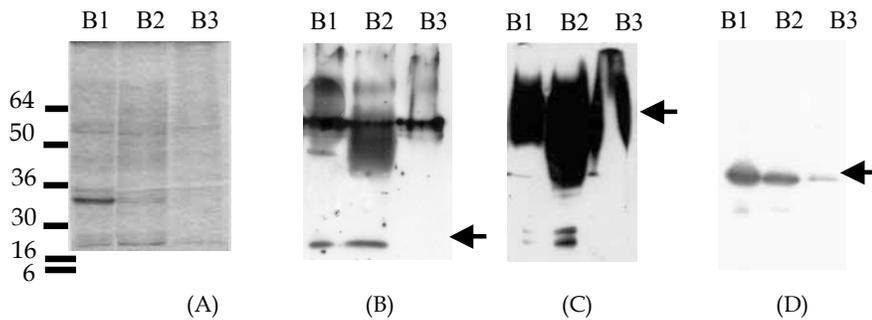
#### *Nap11 es una proteína de matriz extracelular del tejido de transmisión*

En la secuencia de aminoácidos codificada por Nap11 se predice un péptido señal de 20 aminoácidos a través del algoritmo Signal P (Nielsen *et al.*, 1997; Henrik *et al.*, 2004). El sitio de corte se predice entre los aminoácidos Ala 26 y Ala 27. Después del sitio de corte predicho por SignalP el primer aminoácido es la alanina, el cual corresponde al primer aminoácido de la proteína Nap11 madura según los resultados de su microsecuenciación (Cruz-García *et al.*, 2005). Estos datos sugieren fuertemente que Nap11 podría ser una proteína de matriz extracelular (MEC) del tejido de transmisión (TTS) del estilo. La localización de Nap11 en la MEC del TTE, podría directamente evaluarse con una inmunolocalización *in situ*. Sin embargo, el suero anti Nap11 presenta reacción cruzada con otras proteínas de alto peso molecular (Figuras 3 y 5). Para evitar esto y brindar una evidencia de su localización extracelular, se siguió un protocolo que permitiera extraer proteínas de MEC de una manera secuencial, cambiando las concentraciones de sales en el amortiguador de extracción (Wu *et al.*, 2000).

Por tal motivo, estilos de *N. alata* fueron cortados longitudinalmente y sumergidos en un amortiguador de extracción bajo en sales. En este primer paso se recuperaron las proteínas más solubles de la MEC; después los estilos fueron pasados a un amortiguador con mayor concentración de sales, el cual libera a las proteínas más fuertemente unidas a la pared celular. Finalmente, se agregó al amortiguador de extracción un detergente (Tritón X-100) y el tejido fue triturado con nitrógeno líquido para recuperar todas las proteínas restantes.

En la figura 13B se aprecia que Nap11 eluye tanto en la fracción de bajo y alto contenido en sales (carriles B1 y B2), pero no en la fracción enriquecida con proteínas citoplasmáticas (carril B3). El perfil

de elución de Nap11 coincide con el de la S-RNasa y NaTTS, las cuales se encuentran más abundantes en la fracción B1 (Figura 13). De esta forma, los resultados permiten concluir que es muy probable que Nap11 sea una proteína de MEC.

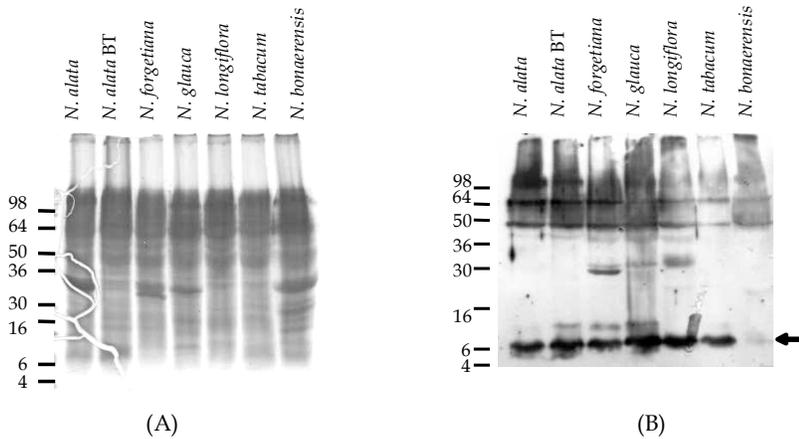


**Figura 13.** Nap11 se inmunodetecta en la fracción soluble de la MEC de estilos de *N. alata*. (A) SDS-PAGE de los diferentes pasos de la extracción: B1, Tris 100mM pH 8; B2, Tris 40 mM +NaCl 400 mM pH 8; B3, B2 +Tritón X-100 1%. (B) Inmunodetección de Nap11, (C) de NaTTS y (D) de la S<sub>105</sub>-RNasa.

#### *Nap11 se expresa en plantas AI y AC*

El proceso de incompatibilidad sexual se puede dividir en autoincompatibilidad (rechazo del polen propio) e incompatibilidad interespecífica (IE; rechazo de polen de diferentes especies). En *Nicotiana*, Murffet *et al.*, (1996) comprobaron que en ambos tipos de incompatibilidad, las S-RNasas participan en el rechazo del polen; sin embargo, en la IE también el polen puede ser rechazado de manera independiente al locus S. Para evaluar la distribución de Nap11 en diferentes especies de *Nicotiana*, se prepararon extractos crudos de *N. alata* 110-18 (AI), *N. alata* BT (AC), *N. forgetiana* (AI), *N. glauca* (AC), *N. longiflorum* (AC), *N. tabacum* (AC) y *N. bonaerensis* (AI) los cuales fueron separados electroforéticamente por SDS-PAGE e inmunodetectados por ensayo tipo Western usando anticuerpo contra Nap11.

La figura 14 muestra los resultados de la inmunodetección donde es posible observar que Nap11 se expresa tanto en especies AI como en AC. El nivel de expresión de Nap11 es constante en todas las especies evaluadas, excepto en *N. bonaerensis*, en el que se observa una baja señal (Figura 14 B), a pesar de haber cargado aproximadamente 10 µg de proteína de cada especie (Figura 14A).



**Figura 14.** Nap11 se expresa en especies AC y AI de *Nicotiana*. En (A) se muestra el SDS-PAGE del EC de 6 especies distintas de *Nicotiana*. (B) Inmunodetección de Nap11 en especies de *Nicotiana*. Especies AI: *N. bonaerensis*, *N. forgetiana*, *N. alata*.

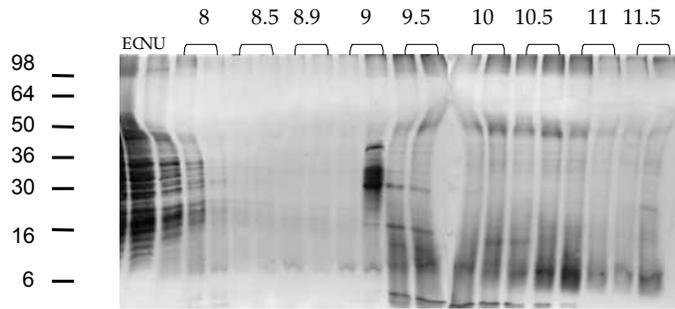
#### *Purificación de Nap11 utilizando estilos jóvenes de N. alata*

Con la intención de mejorar la purificación de Nap11, se aplicó una nueva estrategia utilizando estilos inmaduros de *N. alata* de 0.3-0.5 cm de longitud, que se designará como la etapa I del desarrollo del estilo. La elección de esta etapa se fundamenta en que las glicoproteínas identificadas de alto peso molecular con las que Nap11 copurifica son sintetizadas en etapas de desarrollo del pistilo posteriores (Wang *et al.*, 1993).

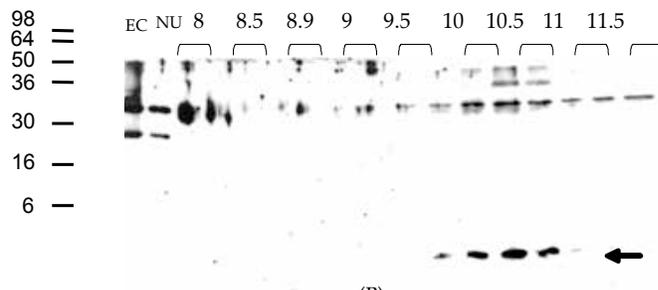
La variante que sufrió el protocolo de purificación anterior, además de la etapa de desarrollo del estilo, fue que se utilizó un gradiente de pH que partió de 8.0 hasta 11.5, aumentando 0.5 unidades de pH para eluir las proteínas unidas a la resina SP-Sepharosa, en lugar de emplear un gradiente de NaCl. Esta modificación se debe a que Nap11 tiene un pI teórico de 10.6. Todas las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE (Figura 15A) y ensayo tipo Western contra Nap11 (Figura 15B).

En la figura 15B se observa que la proteína Nap11 comienza a eluir desde pH 10.0 hasta pH 11.5, presentando la señal más intensa en la fracción correspondiente con su pI teórico (10.5). Sin embargo, con esta estrategia tampoco se obtuvieron fracciones completamente puras de Nap11, puesto que en la fracción donde eluyó esta proteína también copurificaron proteínas mayores a 50 kDa. Para descartar la posibilidad de que estas proteínas fueran 120K y/o NaTTS, la misma membrana fue lavada y reutilizada para inmunodetectar a 120K y a NaTTS, encontrándose que estas proteínas no son

sintetizadas en etapas tempranas del desarrollo del pistilo (datos no mostrados), por lo tanto se desconoce la identidad de las proteínas que copurifican con Nap11 en esta etapa, aunque no se descarta la posibilidad de que sean oligómeros fuertemente unidos entre sí de Nap11.



(A)



(B)

**Figura 15. Purificación de Nap11 a partir de estilos en etapa I de desarrollo de *N. alata* BT. (A) SDS-PAGE de las fracciones eluidas con un gradiente de pH. La tinción de proteínas se realizó con nitrato de plata. (B) Inmunodetección por réplica en Western con el suero anti Nap11 en dilución 1:1000. EC, extracto crudo; NU, fracción no unida a SP-Sepharosa.**

## Discusión

La especificidad del rechazo del polen en el sistema gametofítico de las familias Solanaceae, Rosaceae y Scrophularaceae, depende de la interacción genética de las determinantes masculina (SLF) y femenina (S-RNasa) (McClure *et al.*, 1989; Newbigin *et al.*, 1993; Kao y McCubbin, 1996; Sijacic *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que se requiere de otros factores estilares (genes modificadores, GM) no ligados al locus *S*, que al igual que las S-RNasas, son transportados desde la matriz extracelular del estilo al citoplasma de los tubos polínicos sin importar su haplotipo (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006). Hasta el momento se han identificado por estudios de expresión diferencial y funcional dos GM (HT-B y 120K), que al ser silenciados por RNA de interferencia en plantas transgénicas de *Nicotiana*, producen plantas con fenotipo de aceptación al polen propio (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005). Tanto HT-B como 120K son GM del tipo II, es decir, sólo participan en la respuesta de AI, pero no en otros procesos de interacción polen-pistilo (McClure *et al.*, 2000). No obstante, hay estudios genéticos que indican que otros GM son requeridos para que el rechazo del polen se lleve a cabo de manera adecuada (Cruz-García comunicación personal).

Una de las alternativas experimentales para identificar estos GM, fue usar un protocolo de interacción proteína-proteína *in vitro*. Esta estrategia consistió en evaluar las interacciones físicas entre proteínas estilares y la S-RNasa, mediante cromatografía de afinidad, donde el ligando fue la S<sub>C10</sub>-RNasa. Las proteínas en interacción más conspicua fueron inmunoidentificadas como: NaTTS, 120K y PELPIII. Además de éstas, una proteína de masa molecular aparente de 11 kDa (Nap11) fue repetidamente retenida en la columna de afinidad (Cruz-García *et al.*, 2005). Todas estas proteínas, a excepción de Nap11, se ha demostrado que interactúan directamente con el tubo polínico en *Nicotiana* (Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995, 2000; Bosch *et al.*, 2003; de Graaf *et al.*, 2003).

La proteína Nap11 resultó ser una proteína no descrita en estilos de *N. alata* y sólo se sabía por estudios preliminares, que podría estar relacionada con la familia de las fitocianinas (Cruz-García *et al.*, 2005).

Para profundizar más en el conocimiento de Nap11 y su posible papel en procesos de polinización, en este trabajo se intentó purificar a homogeneidad a Nap11 a partir de estilos maduros de *N. alata*. Sin embargo, de todos los protocolos probados aquí, siempre se obtuvieron fracciones de Nap11 copurificando con otras proteínas, algunas de ellas inmunoidentificadas como NaTTS, 120K y la S-RNasa (Fig. 6, 7).

Las modificaciones que se realizaron al protocolo de purificación utilizado por Cruz-García (2005) dieron como resultado fracciones más puras de Nap11 en un menor número de pasos de purificación.

Por otro lado, las ultracentrifugaciones realizadas con cartucho de centrífuga con corte de 50 kDa no son del todo confiables ya que en la fracción correspondiente a proteínas menores de 50 kDa se observan proteínas de mayor masa molecular a la esperada, sin embargo, nunca se inmunodetectaron en esa fracción a 120K ni a NaTTS (Fig. 6).

La posibilidad de la existencia *in vivo* de los complejos entre Nap11 y las demás glicoproteínas estilares se exploró por cromatografía de filtración molecular utilizando la técnica de HPLC (Fig. 7). Se encontró que Nap11 coeluye de la columna en los mismos tiempos de retención donde se inmunodetecta la S-RNasa, NaTTS y 120K. De acuerdo con estos resultados, se sugiere que: 1) es posible la existencia *in vivo* de estos complejos y 2) que los complejos se forman en ausencia de la S-RNasa. De esta manera, contrastando nuestros resultados con los de Cruz-García *et al.* (2005) se podría sugerir que las proteínas 120K, NaTTS y Nap11 que son retenidas en la columna de afinidad affigel-S-RNasa, ya vienen asociadas como lo demuestran los datos de filtración molecular cuando se utilizó un extracto crudo de proteínas estilares de *N. alata* BT (Fig. 2). De acuerdo con esto, se consideramos que los complejos (120K-NaTTS-Nap11) se pueden retener en la columna de S-RNasa, porque en su forma natural en plantas AI, la S-RNasa es parte de los complejos, como lo demuestran nuestros resultados de filtración molecular (Fig. 7). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que Nap11 se esté asociando con otras proteínas aún no identificadas.

#### ***Nap11 es una fitocianina***

En su secuencia de aminoácidos, Nap11 incluye una señal hacia el extremo amino terminal que se predice codifica un péptido señal de 26 aminoácidos con el sitio de corte entre la Ala 26 y la Ala 27 (Henrik *et al.*, 2004). De esta manera, la secuencia de la proteína de Nap11 madura inicia con la Ala. Otro dato que refuerza su localización subcelular son los datos del fraccionamiento de proteínas de la matriz extracelular (MEC) del estilo. Las extracciones secuenciales del estilo señalan que Nap11 se detecta en las fracciones más solubles de la MEC, junto con la S-RNasa. Este es un resultado que coteja bastante bien con la localización extracelular de la mayoría de las fitocianinas de *Arabidopsis* y de otras especies. Las fitocianinas se caracterizan por ser proteínas que unen cobre a través de dos His, una Cys y una Met en el dominio de unión a cobre (DUC) (Nersissian *et al.*, 1998). El DUC presenta una estructura terciaria con una superficie común formada por 4 residuos de aminoácidos (Asp, Tyr/Phe, His/Tyr y Lys), que se piensa está involucrada en interacciones proteína-proteína. Estos 4 residuos se encuentran conservados a excepción de la Tyr en la secuencia de Nap11 y al igual que en toda la

familia de fitocianinas, ésta es una zona que se encuentra expuesta al solvente (Greene *et al.*, 1998). Hasta el momento, se desconoce si el DUC de Nap11 es funcional.

El análisis filogenético (Fig. 9) evidenció que Nap11 presenta un 70% de similitud con una proteína de *Lilium longiflorum* (lili), la cual por su capacidad de atracción de tubos polínicos *in vitro*, fue llamada quimiocianina (Kim *et al.*, 2003). En lili, esta proteína se expresa en varios órganos de la planta, pero con preferencia en los ovarios, a diferencia de Nap11 que es específica del estilo y con una expresión primordial en el estigma en *N. alata* (Fig. 10). No sabemos si Nap11 presenta actividad de quimiocianina como la quimiocianina de lili, ya que no hemos podido purificarla a homogeneidad y evaluar si posee o no actividad quimiotáctica. Si contrastamos nuestros resultados con los de Kim *et al.* (2003), deducimos que si Nap11 tuviera actividad de quimiocianina, ésta no sería la única responsable de la atracción de los tubos polínicos al ovario en *N. alata*, ya que nuestros datos demuestran que al menos podría estar asociada con la proteína NaTTS, la cual se ha probado que es un atrayente de tubos polínicos tanto en estilos de *N. alata* (Wu *et al.*, 2000) como de *N. tabacum* (Cheung *et al.*, 1995). No obstante, a nuestro juicio no queda claro si la quimiocianina de lili es la única proteína responsable de la atracción de los tubos polínicos, ya que al igual que en *N. alata* no se ha purificado a homogeneidad (Lord, comunicación personal). Lo que sí se ha probado es que la sobreexpresión de un ortólogo de la quimiocianina en *Arabidopsis thaliana* provoca severas alteraciones en el crecimiento del tubo polínico (Dong *et al.*, 2005).

El análisis de la expresión de Nap11 en *N. alata* sugiere que no es una proteína exclusiva de AI, ya que se expresa tanto en especies AI como en AC (Fig. 14); además, su expresión no se induce por polinización (Fig. 12) ni aumenta durante el crecimiento del estilo (Fig. 11). Estas características sugerirían que Nap11 pertenece al tipo III de genes modificadores, dado que puede estar participando tanto en las interacciones polen-pistilo como en algún otro proceso.

A las fitocianinas se les ha encontrado modificando su expresión bajo diferentes procesos fisiológicos, tales como estrés por calor, la infección por patógenos (Mori y Schroeder, 2004) y recientemente en el crecimiento del tubo polínico (Dong *et al.*, 2005).

El análisis de la expresión de Nap11 en *N. alata* sugiere que no es una proteína exclusiva de AI, ya que se expresa tanto en especies AI como en AC (Fig. 14); además, su expresión no se induce por polinización (Fig. 12) ni aumenta durante el crecimiento del estilo (Fig. 11). Estas características sugerirían que Nap11 pertenece al tipo III de genes modificadores, dado que puede estar participando tanto en las interacciones polen-pistilo como en algún otro proceso.

A las fitocianinas se les ha encontrado modificando su expresión bajo diferentes procesos fisiológicos, tales como estrés por calor, la infección por patógenos (Mori y Schroeder, 2004) y recientemente en el crecimiento del tubo polínico (Dong *et al.*, 2005).

#### ***Posible papel de Nap11 en las interacciones polen-pistilo***

Dadas las características de Nap11 existen varias posibilidades de cómo esta proteína podría estar funcionando en procesos de polinización:

1) Nap11 podría tener actividad quimiotáctica como la quimiocianina de Lili; sin embargo, con los datos que contamos solo se puede decir que Nap11 sólo podría contribuir en parte a esta actividad, ya que se asocia con NaTTS, una proteína abundante que claramente atrae a los tubos polínicos.

2) Podría funcionar como acarreador de la S-RNasa o 120K para interactuar con el tubo polínico e ingresar a su citoplasma donde la reacción del rechazo del polen debe ocurrir. En cualquiera de estas opciones Nap11 debería interactuar con algún componente de la superficie del tubo polínico, como una proteína, lo cual es muy plausible porque Nap11 posee el DUC que se ha sugerido tiene muchas posibilidades de interactuar con otras proteínas.

3) Por su capacidad de unir cobre en su superficie podría estar participando en reacciones redox en la MEC, ya que a otras plantacianinas se les ha involucrado en el estallido oxidativo durante el ataque de patógenos (Guss, *et al.*, 1996; Einsle *et al.*, 2000; Niersissian *et al.*, 1988). El estallido oxidativo permite la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales pueden inhibir el ataque de patógenos (Peng y Kuc, 1992) actuando como un microbicida o restringiendo la penetración de patógenos promoviendo el entrecruzamiento de glicoproteínas de pared celular (Bradley *et al.*, 1992), o por la inducción de la expresión de genes de defensa (Desikan *et al.*, 2001) y por la activación de la síntesis de ácido salicílico (León *et al.*, 1995). Al parecer, las ERO activan segundos mensajeros a través de la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular.

En pelos radicales (Foreman *et al.*, 2003) y estomas (Pei *et al.*, 2000). Una de las ERO que se ha reportado activan a los canales de calcio de membranas plasmáticas es el  $\text{H}_2\text{O}_2$  acumulado en la matriz extracelular de células vegetales.

Las ERO pueden producirse y acumularse en la MEC por la acción de la NADPH oxidasa (NOX) membranal (Lamb y Dixon, 1997). Esta enzima produce  $\cdot\text{O}_2^-$ , que rápidamente dismuta a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El peróxido de hidrógeno es la más estable de las ROS y puede difundir las membranas celulares a través de canales de agua (Henzler y Steudle, 2000). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  forma  $\cdot\text{OH}$  en la presencia de metales de transición como el hierro y el cobre por la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1999).

¿Cómo se acoplan las ERO, la NOX y el crecimiento polar en las células? La evidencia que parcialmente podría responder esta pregunta viene de la mutante *rhd2* de *A. thaliana* que es defectuosa en la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  (Foreman *et al.*, 2003), lo que afecta la expansión celular. Las mutantes presentan pelos radicales muy cortos. El gen afectado en esta mutante codifica una NADPH oxidasa. Tratamientos de esta mutante con ROS parcialmente suprime el fenotipo de la mutante y estimula la hiperpolarización de la membrana plasmática activada por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto indica que la NOX controla el desarrollo por la generación de ROS que regulan la expansión celular mediante la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos resultados son de suma trascendencia si se considera que el tubo polínico es también una célula en expansión con crecimiento polar y que se requiere un gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ápice para su crecimiento (Malhó *et al.*, 2000; Hepler *et al.*, 2001). De esta manera, podríamos hipotetizar que el  $\text{Cu}^{2+}$  de Nap11 estuviera participando en la producción de  $\cdot\text{OH}$ , por la reacción de Fenton, a partir del  $\cdot\text{O}_2^-$  producido por una supuesta NOX ubicada en la membrana celular de los tubos polínicos, lo cual a su vez activaría canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que promovieran su crecimiento polar.

## Conclusiones

1. La secuencia de aminoácidos revela que Nap11 es una fitocianina con un 70% de similitud con otra fitocianina llamada quimocianina de *L. longiflorum*.
2. Al parecer, Nap11 es una proteína de secreción exclusiva del pistilo y cuya expresión es continua desde etapas muy tempranas del desarrollo.
3. Nap11 es capaz de unirse a glicoproteínas de mayor peso molecular como 120K y NaTTS.

## Perspectivas

- ⊙ Evaluar si Nap11 interacciona con proteínas otras proteínas del estilo y/o del tubo polínico.
- ⊙ Esclarecer el papel fisiológico de Nap11 en la polinización de *N. alata* utilizando la técnica de RNA de interferencia.
- ⊙ Realizar ensayos de quimiotactismo para probar si Nap11 posee las mismas propiedades que la quimiocianina de *L. longiflorum*.

## Apéndice A

### Cuadro de purificación de la S<sub>105</sub>-RNasa

Se partió de 1 g de tejido de estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> congelados.

<i>Muestra</i>	<i>mg de proteína total</i>	<i>Porcentaje</i>
Homogenado	9.640	100
Cromatografía de intercambio iónico, resina CM-Sepharosa. Elución con 0.175M de NaCl.	1.600	16.59
Desalada	0.944	9.79
Cromatografía de intercambio iónico, resina SP-Sepharosa. Elución con 0.12M de NaCl.	0.372	3.85
Ultrafiltración utilizando un cartucho de centrífuga. Fracción < 50 kDa	0.072	0.74
Ultrafiltración utilizando un cartucho de centrífuga. Fracción >10 kDa	0.06	0.62
Rendimiento	0.05	0.51

### Cuadro de purificación parcial de Nap11

Se partió de 1.5g de tejido de estilos de *N. alata* cultivar BT congelados.

<i>Muestra</i>	<i>mg de proteína total</i>	<i>Porcentaje</i>
Homogenado	10.91	100
Cromatografía de intercambio iónico. Elución con 0.4 M de NaCl	0.604	5.53
Elución con 0.5 M de NaCl	1.22	11.18
Fracción >50 kDa	0.119	1.09
Fracción <50 kDa	0.034	0.311

## Referencias

- Ai Y., Krun E. and Kao T.H. (1991). S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of petunia hybrida. *Mol Genet.* 230: 353-358.
- Anderson E, de Winton D. (1931). The genetic analysis of an unusual relationship between self-sterility and self-fertile in *Nicotiana*. *Ann. Mo. Bot. Grad.* 18: 97-116.
- Anderson MA., Cornish EC., Mau SL., Williams EG., Hoggart R., Atkinson A., Boing I., Grego B., Simpson R., Roche PJ., Haley JD., Penschow JD., Niall HD., Tregear G., Coghlan JP., Crawford RJ. and Clarke AE. (1986). Cloning of cDNA for a stilar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature* 321: 38-44.
- Anderson, MA., McFadden GI., Bernatzky R., Atkinson A., Orpin T. and Dedman H. (1989). Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata*. *Plant Cell.* 1: 483-491.
- Borner GHH., Sherrier DJ., Stevens TJ., Arkin IT. and Dupree P. (2002). Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis. *Plant Physiol.* 129: 486-499.
- Bosch, M., Sommer-Knudsen, J., Derksen, J. and Mariani, C. (2001). Class III pistil-specific extensin-like proteins from tobacco have characteristics of arabinogalactan proteins. *Plant Physiol.* 125: 2180-2188.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem.* 72: 248-254.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. and Lamb, C.J. (1992). Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell*, 70: 21-30.
- Broothaerts WJ., Janssens GA., Proost P. and Broekaert WF. (1995). cDNA cloning and molecular analyses of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol Biol.* 27: 499-511.
- Bui, Q.A. and O'Neill, S.D. (1998). Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. *Plant Physiol.* 116: 419-28.
- Cheung AY. and Wu HM. (1999). Arabinogalactan proteins in plant sexual reproduction. *Protoplasma* 208: 87-98.
- Cheung, A. Y., Wang, H. and Wu, H. (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell*, 82: 383-389.
- Cornish E.C., Pettitt J.M., Borning I. and Clarke A.E. (1987). Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature* 326: 99.
- Cruz-García F., Hancock CN. and McClure BA. (2003). S-RNase complexes and pollen rejection. *J. Exp. Bot.* 54: 123-130.
- Cruz-García F., Hancock CN., Kim D. and McClure B. (2005). Stilar glycoproteins bind to S-RNase *in vitro*. *Plant J.* 42: 295-304.
- Cruz-García, F. and McClure BA. Sexual incompatibility. En *Current Trends in the Embriology of Angiosperms*. (2001). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 167-196.
- Darwin, C. (1876). *The effect of cross and self fertilization in the plant kingdom*. John Murray, London.
- de Graff, BHJ., Knuiman, BA., Derksen, J. and Mariani, C. (2003). Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.* 54: 55-63.

- de Nettancourt D. (2001). Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Berlin: Springer-Verlag, Germany.
- de Nettancourt, D. (1977). *Incompatibility in Angiosperms*. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 3, Springer-Verlag, Berlin.
- Desikan, R., A.-H.- Mackerness, S., Hancock, J.T. and Neill, S.J. (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127: 159-172.
- Dickinson HG., Crabbe MJ. and Gaude T. (1992). Sporophytic Self-Incompatibility Systems: S genes products. *Int. Rev. Cytol.* 140: 525-561.
- Dong J., Kin ST. and Lord EM. (2005). Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138: 778-789.
- Doughty J., Hedderson F., McCubbin A and Dickinson H. (1993). Interaction between a coating-borne peptide of the Brassica pollen grain and stigmatic S (self-incompatibility)-locus-specific glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 467-71.
- Edlund AF., Swanson R. and Preuss D. (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination, *The Plant Cell* 16: S84-S97.
- Eingle O., Mehrabian Z., Nabandyan R. and Messerschmidt A. (2000). Crystal structure of plantacyanin, a basic blue cupredoxin from spinach. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5: 666-672.
- Entani, T., Iwano, M., Shiba, H., Che F-S., Isogai, A and Takayama, S. (2003). Comparative analysis of the self-incompatibility (S) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Gene Cells.* 8: 203-213.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C. Jones, J.D. Davies JM. and Dolan M. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422: 442-446.
- Franklin-Tong, V.E., Ride, J.P. and Franklin, F.C.H. (1995). Recombinant stigmatic self-incompatibility (S) protein elicits a Ca<sup>2+</sup> transient in pollen of *Papaver rhoeas*, *Plant J.* 8: 299-307.
- Gagne, JM., Downes, BP., Shiu, S-H., Durski, A. and Vierstra, RD. (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 11519-24.
- Goldman MHS, Goldberg RB and Mariani C. (1994). Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO J.* 13: 2976-84.
- Goldraij A., Kondo K., Lee CB., Hancock CN., Sivaguru M., Vazquez-Santana S., Kim S., Phillips TE., Cruz-García F. and McClure B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatibility Nicotiana. *Nature* 439: 805-810.
- Graham LE., Graham JM. and Wilcox L. (2002). Plant biology. Ed. Prentice Hall. 608 pp.
- Green PJ. (1994). The ribonucleases of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 45: 421-445.
- Greene EA., Erard M., Dedieu A. and Baker DG. (1998). MtENOD16 and 20 are members of a family of phytoeyanin-related early nodulins. *Plant Mol. Biol.* 36: 775-783.
- Guss JM., Merrill EA., Phizackerley RP and Freeman HC. (1996). The structure of a phytoeyanins the basic blue protein from cucumber, refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 262: 686-705.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York.
- Hancock N., Kent L. and McClure B.A. (2005). The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in Nicotiana. *Plant J.* 43: 716-723.
- Hart PJ, Nersissian AM, Henmann RG, Nalbandyan RM, Valentine JS. and Eisenberg D. (1996). A missing link in cupredoxin-Crystal structure of cucumber stellacyanin at 1.6 Å resolution. *Protein Sci.* 5: 2175-2183.
- Henrik, N., Gunnar von H., Jannick Dyrlov Bendtsen and Søren B. (2004). Improved

- prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783-795.
- Henzler, T. and Steudle, E. (2000). Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in Chara coralline: Model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *J. Exp. Bot.* 51: 2053-2066.
  - Hepler, P.K., Vidali, L. and Cheung, A.Y. (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 17: 159-187.
  - Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. (2001). Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1480-1483.
  - Hiscock SJ., Doughty J., Willis AC. and Dickinson HG. (1995). A 7-KDa pollen coating-borne peptide from *Brassica napus* interacts with S-locus glycoprotein and S-locus-related glycoprotein. *Planta*. 196: 367-74.
  - Huang, S., Lee, H.-S., Karunanandaa, B., and Kao, T.H. (1994). Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* 6: 1021-1028.
  - Ioerger, TR., Gohlke, JR., Xu, B ad Kao T-h. (1991). Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* 4: 81-87.
  - Johnson MA and Preuss D. (2002). Plotting a course : Multiple signals guide pollen tubes to their targets. *Dev. Cell.* 2: 273-281.
  - Juárez-Díaz J., McClure B., Vázquez-Santana S., Guevara-García A., León-Mejía P., Márquez-Guzmán J. and Cruz-García F. (2006). A novel extracellular thioredoxin h from *Nicotiana glauca* reduces S-RNase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 281: 3418-3424.
  - Kao TH. and McCubbin AG. (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 12059-12065.
  - Kim S., Mollet JC., Dong J., Zhang, Kangling, Park S-Y and Lord EM. (2003). Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23: 16125-16130.
  - Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T. and Kowiyama Y. (2002b). Insights into the evolution of self compatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors. *Plant J.* 30:143-153.
  - Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T. and Kowiyama Y. (2002a). Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self incompatibility. *Plant J.* 29: 627-636.
  - Kumar S., Tamra K., Jakobson IB. and Nei M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 12: 1244-1245.
  - Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang Y., Hong G. and Xue Y. (2002). An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* 50: 29-42.
  - Lamb, C. and Dixon. R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant. Physiol Plant Mol Biol.*, 48: 251-275.
  - Lee H-S., Huang, S and Kao, T-h. (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature.* 367: 560-563.
  - León, J., Lawton, M.A. and Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108: 1673-1678.
  - Lord EM. (2000). Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends Plant Sci.* 59: 368-373.
  - Lord EM. (2001). Adhesion molecules in lily pollination. *Sex Plant Reprod.* 14: 57-62.
  - Lord EM. (2003). Adhesion and guidance in compatible pollination. *J. Exp. Bot.* 54: 47-54.
  - Luu DT., Heizmann P., Dumas C., Trick M. and Cappadocia M. (1997). Involvement of SRL1 genes in pollen adhesion to the stigmatic surface in Brassicaceae. *Sex Plant Reprod.* 10: 227-35.
  - Luu DT., Marty-Mazars, D. Trick M., Dumas C. and Heizmann P. (1999). Pollen-stigma adhesion in Brassica spp. Involves SLG and SLR1 glycoproteins. *Plant Cell.* 11: 251-62.

- Luu DT., Qin X., Morse D. and Cappadocia M. (2000). S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*. 407: 649-651.
- Malhó R., Camacho L. and Moutinho A. (2000). Signaling pathways in pollen tube growth and re-orientation. *Ann Bot.*, 85: 59-68.
- Martin FW (1968). The system of self-incompatibility in *Ipomea*. *Genetics* 60: 101-109.
- Mather K (1943). Specific differences in *Petunia* I. J. *Genetics*. 45: 215-235.
- Matton DP., Maes O., Laublin G., Xike Q., Bertrand C, Morse D. and Cappadocia M. (1997). Hypervariable domains of self-incompatibility Rnases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell*. 9: 1757-66.
- Mauseth JD. (2003). 3a Ed. Botany an introduction to plant biology. University of Texas press. 868 pp.
- Mayfield JA and Preuss D. (2000). Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nat. Cell Biol.* 2: 128-130.
- Mayfield JA., Fiebig A., Johnstone SE and Preuss D. (2001). Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science*. 292: 2482-85.
- McClure BA, Cruz-Garcia F, Beecher BS. and Sulaman W. (2000). Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Annals of Bot.* 85: 113-123.
- McClure BA., Du H., Lui Y.H. and Clarke AE. (1993). S-locus products in *Nicotiana alata* pistils are subject to organ-specific post-translational processing but not post-translational process. *Plant mol biol.* 22: 177-187.
- McClure BA., Gray JE., Anderson MA. Y Clarke AE. (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. *Letters to Nature* 347: 757-760.
- McClure BA., Haring V., Ebert PR., Anderson MA., Simpson RJ., Sakiyama F. and Clarke AE. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Letters to Nature* 355-357.
- McClure, B, Mou B., Canevascini S and Bernatzky R. (1999). A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 9: 13548-13553.
- Mori IC. and Schroeder JI. (2004). Reactive oxygen species activation of plant Ca<sup>2+</sup> channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol.* 135: 702-708.
- Murfett JM, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B. and McClure BA. (1996). S RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: Multiple pollen rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *Plant Cell* 8: 943-958.
- Murfett, J., Atherton, TL., Mou, B., Gasser, CS and McClure BA. (1994). S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*. 367: 563-66.
- Nersissian AM, Babayan MA, Sarkissian LKh, Sarukhanian EG and Nalbandyan RM. (1985). Studies on plantacyanin. NMR data, redox properties, reaction with nitrite and the formation of complex with plastocyanin. *Biochim Biophys Acta* 830: 195-205.
- Nersissian AM, Mehrabian ZB, Nalbandyan RM, Hart PJ, Fraczkiewicz G, Czernuszewicz RS, Bender CJ, Peisach J, Herrmann RG. and Valentine JS. (1996). Cloning, expression, and spectroscopic characterization of *Cucumis Nisbiyama* M, Suzuki J, Ohnuki T, Chang HC, Horinouchi S, Turley S, Adman *sativus* stellacyanin in its non-glycosylated form. *Protein Sci* 5: 2184-2192.
- Nersissian AM., Immos C., Hill MG, Hart PJ., Williams G., Herrmann RG. and Valentine JS. (1998). Uclacyanins, stellacyanins and plantacyanins are distinct subfamilies of phytocyanins: plant-specific mononuclear blue copper proteins. *Protein Sci* 7: 1915-1929.
- Newbiggin E, Anderson MA, Clarke AE (1993). Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* 5: 1315-1324.

- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. 1997. SignalP algorithm. *Protein Eng.* 10: 1–6.
- Nothnagel, E.A. Proteoglycans and related components in plant cells. (1997). *Int. Rev. Cytol.* 174: 195-291.
- O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowiyama Y. and Matton DP. (2002). Molecular analysis of the stilar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J.* 32: 985-996.
- Pappin, DJC., Hojrup, P and Bleasby, AJ. 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.*1993, 3: 327-32.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill. E. and Schroeder, J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, 406: 731-734.
- Peng, M. and Kuc, J. (1992). Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathology*, 82: 696-699.
- Qiao H., Wang H., Zhao L., Zhov J., Huang J., Zhang Y. and Xue Y. (2004). The F-Box protein AhSLF-S<sub>2</sub> physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* 1-14.
- Ryden LG and Hunt LT. (1993). Evolution of protein complexity: The blue copper-containing oxidases and related proteins. *J. Mol. Evol.* 36: 41-66.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sánchez AM., Bosch, M., Bots, M., Nieuwland, J., Feron, R. and Mariani, C. (2004). Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell.* 16: S98-S106.
- Sassa H, Nishio T, Kowiyama Y, Hirano H, Koba T. and Ikehashi H.(1996). 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.
- Showalter, AM. and Varner, JE. (1989). plant hydroxyproline-rich glycoproteins. *Biochem. Plants.* 15: 485-520.
- Shultz, C., Hauser, K., Lind JL., Atkinson, AH., Pu, Z-Y., Anderson, MA. and Clarke AE. 1997. Molecular characterisation of a cDNA sequence encoding the backbone of a style-specific 120kDa glycoprotein which has features of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant Mol. Biol.* 35: 833-845.
- Sijacic P., Wang X., Skirpan AL., Wang Y., Dowd PE., McCubbin AG., Huang S. y Kao TH. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429: 302-305.
- Stanley, R. G. (1974). Pollen: Biology, biochemistry, management. Ed. Springer. 307 pp.
- Swanson R., Edlund AF. and Preuss D. (2004). Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annu. Rev. Genet.* 38: 793-818.
- Takayama S. and Isogai A. (2005). Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56: 467-489.
- Thompson JD., Gibson TJ., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins DG. (1997). The clustal X windows interface: flexible strategies analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Masada M, Zhu X, Marchesi E. and Kao T-h. (1999). Breakdown on self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. *Sex Plant Reprod.* 12: 6-13.
- Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun H, Marchesi E. and Kao TH. (2003). Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia*

- axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiol.* 131: 1903-1912.
- van Gysel A, Van Montagu M. and Inzé D. (1993). A negatively light-regulated gene from *Arabidopsis* encodes a protein showing high similarity to blue copper-binding proteins. *Gene* 136: 79-85.
  - Wang H., Wu HM. and Cheung AY. (1993). Development and pollination regulated accumulation and glycosylation of a stylar transmitting tissue-specific praline-rich protein. *Plant Cell* 5: 1639-1650.
  - Woodward, JR, Bacic, A., Jahnen, W and Clarke AE. (1989). *Plant Cell*. 1: 511-514.
  - Wu H., Wong E., Ogdahl J. and Cheung AY. (2000). A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant Journal* 22: 165-176.
  - Wu HM., Wang H. and Cheung AY. (1995). A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell*. 82: 395-403.
  - Xue Y, Carpenter R, Dickinson HG and Coen ES. (1996). Origin of allelic diversity in *Antirrhinum S* locus RNases. *Plant Cell* 8: 805-814.
  - Zinkl GM., Zwiebel BI., Grier DG. and Preuss D. (1999). Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development* 126: 5431-40.