



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**NaStEP: PROTEÍNA ESTIGMÁTICA ESENCIAL EN LA  
AUTOINCOMPATIBILIDAD Y REGULADOR POSITIVO DE LA  
ESTABILIDAD DE HT-B EN LOS TUBOS POLÍNICOS DE  
*NICOTIANA***

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**M. en C. KARINA JIMÉNEZ DURÁN**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Felipe Cruz García  
Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Jesús Aguirre Linares  
Instituto de Fisiología Celular (UNAM)  
Dr. Luis Cárdenas Torres  
Instituto de Biotecnología (UNAM)

México, D. F. Noviembre, 2013



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.



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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A los integrantes del Comité Tutorial conformado por: Dr. Luis Cárdenas Torres, Dr. Jesús Aguirre Linares y Dr. Felipe Cruz García.

Al Jurado de Examen Doctoral que estuvo constituido por: Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles, Dr. Eleazar Martínez Barajas, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Dr. José Luis Reyes Taboada y Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo.

Al gran apoyo otorgado por el Dr. Bruce A. McClure durante mi estancia en la University of Missouri en el año 2008.

Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias y en especial a la Dra. Judith Márquez Guzmán por permitirme usar el equipo y el material para procesar y obtener los cortes histológicos utilizados para las pruebas inmunohistoquímicas y sobre todo por su gran apoyo durante toda mi carrera académica.

Al soporte técnico de la M. en F. P. Ana Isabel Bieler Antolín del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Al soporte técnico del Biol. Gabriel Orozco Hoyuela del Laboratorio de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

Al soporte técnico de la M. en C. Teresa de Jesús Olivera Flores y a la Biol. María de Jesús Jiménez Villalobos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química, UNAM.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra por su labor dentro del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres del Laboratorio 113 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química por asesorarme en la purificación de proteínas y en los ensayos de inhibidor de proteasas.

Al apoyo de Leticia García y Adelina González en los trámites realizados durante el desarrollo del trabajo.

A los académicos y alumnos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química por el apoyo brindado durante la realización de la tesis.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (81968) y PAPIIT-UNAM (IN210312). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO POR SER MI ALMA MÁTER.**

## ABREVIATURAS

AC	Autocompatible
ABP	Proteínas de unión a actina
AhSSK1	<i>Anthirrinum hispanicum</i> proteína tipo Skp1- que interacciona con SLF
AI	Autoincompatible
ARC1	Proteína 1 que contiene motivos repetidos de armadillo
APG	Proteínas de Arabinogalactano
AtPUB8	Proteína 8 con caja U de <i>Arabidopsis thaliana</i>
CDPK	Proteína cinasa dependiente de Ca <sup>2+</sup>
CUL 1	Culina 1
eSRK	Dominio extracelular de SRK
GM	Genes modificadores
HT-B	High top band
MAPK	Cinasa de proteína activada por mitógeno
MLPK	Proteína cinasa del locus <i>M</i>
MS	Medio de cultivo Murashigue y Skoog
NaStEP	Proteína específica del estigma de <i>Nicotiana glauca</i>
NaTrxh	Tioredoxina h de <i>Nicotiana glauca</i>
ND	Dominio de asparagina y ácido aspártico
ORF	Marco de lectura abierto
PAN	PAN_Apple domain
PCD	Muerte Celular Programada
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PELP III	Proteína tipo extensina del pistilo
PrsS	Proteína <i>S</i> del stigma de <i>Papaver rhoeas</i>
PspS	Proteína <i>S</i> del polen de <i>Papaver rhoeas</i>
RNAi	RNA de interferencia
SBP	Proteína de unión a la S-RNasa
SCR	Proteína rica en cisteínas del locus <i>S</i>
SFB	Proteína con caja F del locus <i>S</i>
SIE	Sistema de incompatibilidad esporofítico
SIG	Sistema de incompatibilidad gametofítico
SLF	Proteína con caja F del locus <i>S</i>
SLG	Glicoproteína del locus <i>S</i>
SP11	Proteína 11 del locus <i>S</i>
SRK	Receptor cinasa del locus <i>S</i>
S-RNasa	Ribonucleasa del locus <i>S</i>
TGN	Red Trans Golgi
THL1	Tioredoxinas tipo <i>h</i> 1
THL2	Tioredoxinas tipo <i>h</i> 2
TP	Tubo polínico
TTS	Glicoproteína específica del tejido de transmisión

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1.    Sistemas genéticos que controlan el rechazo del polen.....	4
3.1.1.    Factores no ligados al locus <i>S</i> involucrados en la incompatibilidad.....	7
3.2.    Sistema de incompatibilidad esporofítico en Brassicaceae.....	7
3.2.1.    Determinante femenina.....	7
3.2.2.    Determinante masculina.....	8
3.2.3.    Factores <i>S</i> no específicos.....	8
3.2.4.    Mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen.....	9
3.3.    Sistema de incompatibilidad gametofítico.....	11
3.3.1.    Sistema de incompatibilidad en la familia Papaveraceae.....	11
3.3.1.1.    Determinante femenina.....	11
3.3.1.2.    Determinante masculina.....	11
3.3.1.3.    Mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen.....	12
3.3.2.    Sistema de incompatibilidad dependiente de S-RNasa.....	14
3.3.2.1.    Determinante femenina.....	14
3.3.2.2.    Factores <i>S</i> no específicos en el pistilo.....	15
3.3.2.3.    Determinante masculina.....	17
3.3.2.4.    Factores <i>S</i> no específicos en el polen.....	19
3.3.3.    Modelos para el rechazo del polen en sistemas de incompatibilidad basados en S-RNasa.....	20
3.3.3.1.    Modelo de la degradación de la S-RNasa.....	20
3.3.3.2.    Modelo colaborativo.....	21
3.3.3.3.    Modelo de la compartimentalización de la S-RNasa.....	22
3.4.    Sistema de incompatibilidad interespecífica.....	24
4. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	25
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVOS.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
7.1.    Material biológico.....	27
7.2.    Polinizaciones manuales.....	27
7.3.    Silenciamiento de NaStEP en <i>N. alata</i> <i>S</i> <sub>105</sub> <i>S</i> <sub>105</sub> y <i>N. alata</i> <i>S</i> <sub>C10</sub> <i>S</i> <sub>C10</sub> .....	27
7.3.1.    Preparación de partículas de tungsteno.....	27
7.4.    Identificación de plantas transgénicas.....	28

7.5.	Generación de híbridos con niveles de NaStEP no detectados.....	28
7.6.	Expresión de NaStEP en diferentes especies de <i>Nicotiana</i> y en plantas con niveles de NaStEP no detectados.....	29
7.6.1.	Extracción de proteína total de pistilo.....	30
7.6.2.	Inmunodetección de NaStEP, S <sub>C10</sub> -RNasa, S <sub>105</sub> -RNasa 12OK y HT-B.....	30
7.7.	Relaciones de compatibilidad e incompatibilidad en las plantas transgénicas con niveles de NaStEP no detectados .....	31
7.7.1.	Evaluación del crecimiento de tubos polínicos en estilos polinizados mediante su tinción con azul de anilina.....	32
7.7.2.	Producción de frutos en los híbridos transformados.....	32
7.8.	Localización subcelular de NaStEP en pistilos y tubos polínicos en cruzas compatibles e incompatibles.....	32
7.9.	Papel de NaStEP en el transporte de la S-RNasa, HT-B y 12OK.....	34
7.10.	Papel de NaStEP en la estabilidad de HT-B.....	34
7.11.	Amplificación de <i>NaStEP</i> en especies compatibles e incompatibles.....	35
7.12.	Determinación del transcrito de <i>NaStEP</i> en especies compatibles e incompatibles.....	35
8.	RESULTADOS.....	37
8.1.	Silenciamiento de NaStEP en <i>N. alata</i> S <sub>105</sub> S <sub>105</sub> y <i>N. alata</i> S <sub>C10</sub> S <sub>C10</sub> .....	37
8.2.	NaStEP no afecta la expresión de S <sub>105</sub> -RNasa, S <sub>C10</sub> -RNasa, 12OK y HT-B.....	40
8.3.	NaStEP es un gen modificador que participa en el rechazo del polen en <i>Nicotiana</i> .....	40
8.4.	Papel de NaStEP en el rechazo interespecífico del polen.....	44
8.5.	<i>NaStEP</i> es un gen presente en el genoma de especies AC y AI de <i>Nicotiana</i> pero sólo se expresa en pistilos de especies AI.....	49
8.6.	La proteína NaStEP se acumula abundantemente en las células papilares de estigmas maduros de <i>N. alata</i> .....	49
8.7.	NaStEP se transporta desde el exudado estigmático al interior de los tubos polínicos .....	52
8.8.	NaStEP se asocia a las membranas vacuolares en el interior de los tubos polínicos.....	56
8.9.	El transporte de 12OK, HT-B y la S-RNasa no son dependientes de NaStEP.....	56
8.10.	NaStEP es un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en el interior del tubo polínico.....	59
9.	DISCUSIÓN.....	63
9.1.	<i>NaStEP</i> es un gen modificador que participa en el rechazo del polen en <i>Nicotiana</i> .....	63

9.2.	NaStEP participa en el rechazo del polen de <i>N. plumbaginifolia</i> .....	63
9.3.	La expresión de NaStEP es específica de especies AI.....	64
9.4.	NaStEP se acumula abundantemente en las células papilares y se transporta desde el exudado estigmático al interior de los tubos polínicos.....	65
9.5.	NaStEP ingresa a los tubos polínicos sin importar su haplotipo y se asocia al sistema endomembranoso.....	66
9.6.	NaStEP es un regulador positivo en la estabilidad de HT-B en el interior de los tubos polínicos .....	67
10.	MODELO .....	68
11.	CONCLUSIONES.....	70
12.	PERSPECTIVAS.....	71
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	72
14.	APÉNDICES	
14.1.	Apéndice I. Jiménez-Durán K, Mc Clure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G y Cruz-García F. 2013. NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in <i>Nicotiana alata</i> pollen tubes. <i>Plant Physiology</i> . 161:97-107.....	85
14.2.	Apéndice II. Jiménez-Durán K y Cruz-García F. 2011. Incompatibilidad sexual, un mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal. <i>Revista Fitotecnia Mexicana</i> . 34:1-9.....	97
14.3.	Apéndice III. Procedimientos experimentales adicionales.....	107



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Control genético en los sistemas de autoincompatibilidad.....	6
Figura 2. Modelo del sistema de incompatibilidad esporofítico en <i>Brassica</i> .....	10
Figura 3. Modelo del sistema de incompatibilidad gametofítica en <i>Papaver</i> .....	13
Figura 4. Modelo colaborativo de la S-RNasa.....	21
Figura 5. Modelo de la compartimentalización de la S-RNasa.....	23
Figura 6. Diagrama de la generación de híbridos transgénicos.....	29
Figura 7. Amplificación por PCR de la región correspondiente a la región que abarca desde el promotor CAM 35S y el intrón del vector pART27 en diferentes especies de <i>Nicotiana</i> .....	37
Figura 8. Análisis de la expresión de NaStEP en la población K08 ( $S_{105}S_0$ ).....	38
Figura 9. Análisis de la expresión de NaStEP en la población J08.....	39
Figura 10. Análisis de la expresión de la $S_{105}$ -RNasa, $S_{C10}$ -RNasa, HT-B y 120K en la población K08 y J08.....	41
Figura 11. Evaluación de las relaciones de compatibilidad en las plantas de la población K08 con niveles de NaStEP no detectados ( <i>N. plumbaginifolia</i> -RNAi NaStEPX <i>N. alata</i> $S_{105}S_{105}$ ).....	42
Figura 12. Evaluación de las relaciones de compatibilidad en las plantas de la población J08 con niveles de NaStEP no detectados (K08 X <i>N. alata</i> $S_{C10}S_{C10}$ ).....	44
Figura 13. Evaluación de las relaciones de incompatibilidad interespecífica en las plantas de la población K08 ( $S_{105}S_0$ ) con niveles de NaStEP no detectados.....	46
Figura 14. Evaluación de las relaciones de incompatibilidad interespecíficas en las plantas de la población J08 ( $S_{C10}S_0$ ) con niveles de NaStEP no detectados.....	48
Figura 15. Análisis de la expresión de NaStEP. Amplificación por PCR de NaStEP a partir de ADN genómico, ensayo tipo réplica de Northern y análisis de la acumulación de la proteína de NaStEP en especies autocompatibles y autoincompatible de <i>Nicotiana</i> .....	50
Figura 16. Análisis de la acumulación de NaStEP en botones florales y flores en antesis de <i>N. alata</i> .....	51
Figura 17. Análisis de la localización celular de NaStEP en estigmas de <i>N. alata</i> .....	52
Figura 18. Análisis de la localización de NaStEP en el interior de los tubos polínicos después de una cruce compatible ( <i>N. alata</i> $S_{105}S_{105}$ X <i>N. alata</i> $S_{C10}S_{C10}$ ) y de una cruce incompatible ( <i>N. alata</i> $S_{105}S_{105}$ X <i>N. alata</i> $S_{105}S_{105}$ ).....	54
Figura 19. Análisis inmunohistoquímico de NaStEP en estigmas y estilo de pistilos de <i>N. alata</i> $S_{105}S_{105}$ no polinizados o después de una cruce incompatible (polen- $S_{105}$ ) o compatible (polen- $S_{C10}$ ).....	55

Figura 20. Análisis inmunohistoquímico de pistilos de <i>N. alata</i> $S_{C10}S_{C10}$ polinizados con polen $S_{C10}$ marcados con tres anticuerpos, anti NaStEP (1:2000), anti Calosa (1:1000) y anti vPPasa o anti vATPasa (1:100) en pistilos después de una cruce incompatible de 9h.....	57
Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de HT-B, $S_{105}$ -RNasa y 120K en tubos polínicos después de 16 h de polinización.....	58
Figura 22. Análisis inmunohistoquímico para determinar los criterios de intensidad de la señal de HT-B en el interior de los tubos polínicos.....	59
Figura 23. La supresión de <i>NaStEP</i> afecta los niveles de HT-B en el interior de los tubos polínicos compatibles e incompatibles.....	61
Figura 24. NaStEP evita la degradación de HT-B en los tubos polínicos.....	62
Figura 25. Modelo del rechazo <i>S</i> -específico del polen en <i>Nicotiana</i> .....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo y producción de frutos en cruzas compatibles e incompatibles.....	43
Tabla 2. Cuantificación de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo en cruzas compatibles e incompatibles.....	44
Tabla 3. Cuantificación de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo en cruzas interespecíficas con polen de especies AC y AI después de 72h post-polinización en la población K08.....	47
Tabla 4. Cuantificación de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo en cruzas interespecíficas con polen de especies AC y AI después de 72h post-polinización en la población J08.....	47

## 1. RESUMEN

En las angiospermas el sistema de reconocimiento y rechazo de polen es un suceso crucial para prevenir la endogamia y la producción de híbridos con bajo vigor. En la familia Solanaceae el rechazo del polen es consecuencia de las interacciones polen-pistilo, mediante un sistema de reconocimiento y discriminación del polen propio, el cual es conocido como sistema de autoincompatibilidad. En las solanáceas la especificidad del rechazo del polen lo controla el locus *S*, el cual incluye a la determinante masculina (*SLF*= *S*-locus F-box protein) y la femenina (*S-RNasa*). Para que ocurra el rechazo del polen los productos de estos genes deben interactuar de manera haplotipo *S*-específica en el tubo polínico. Sin embargo, existen otros factores independientes al locus *S* que son esenciales en el rechazo del polen y que no han sido identificados en su totalidad. Hasta el momento sólo *HT-B* y *120K* han sido descritos como genes modificadores implicados en el rechazo del polen, ya que su silenciamiento cambia el fenotipo de incompatible a compatible. En este trabajo se evaluó la función de un gen de expresión estigmática específico de especies autoincompatibles de *Nicotiana*, denominado *NaStEP* (*Nicotiana alata* *Stigma* *Expressed* *Protein*, por sus siglas en inglés), en la vía genética y bioquímica del rechazo del polen en *Nicotiana*.

Para lograr esto, se suprimió la expresión *NaStEP* por medio de un RNA de interferente contra *NaStEP* en plantas transgénicas de *Nicotiana*. Los resultados señalan que *NaStEP* es un gen esencial en la vía de reconocimiento y rechazo del polen en *Nicotiana*, el cual no parece ser codificado en el locus *S*. La supresión de *NaStEP* cambia el fenotipo de polinización de plantas incompatibles a plantas compatibles. Asimismo, se determinó que *NaStEP* es un gen que no participa en el rechazo interespecífico del polen independiente de *S*-RNasas, ya que las plantas transgénicas con niveles de *NaStEP* no detectable siguieron rechazando el polen de *N. tabacum*. En plantas tipo silvestre de *N. alata* las polinizaciones compatibles como incompatibles muestran que *NaStEP* ingresa a los tubos polínicos. Las evidencias inmunohistoquímicas indican que *NaStEP* en el interior de los tubos polínicos parece estar asociado a membranas vacuolares con una menor proporción que localiza en el citosol. El silenciamiento de *NaStEP* no interfiere con la expresión de otras proteínas involucradas en el rechazo del polen como la *S*-RNasa, *120K* y *HT-B*. Por otro lado, se encontró que existe una interacción génica entre *NaStEP* y la proteína *HT-B*, ya que los niveles de *HT-B* en los tubos polínicos son reducidos en pistilos con niveles de *NaStEP* no detectables después de una cruce compatible o incompatible; mientras que en plantas autoincompatibles tipo silvestre de *N. alata*, la degradación de *HT-B* ocurre sólo en los tubos polínicos de cruces compatibles.

Los resultados demuestran que *NaStEP* es un gen modificador esencial en el rechazo del polen. La presencia de *NaStEP* es requerida para la estabilidad de *HT-B* dentro del tubo polínico durante la respuesta de rechazo del polen; sin embargo, el mecanismo de como lo hace no se ha dilucidado hasta el momento.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las angiospermas, con aproximadamente 352,000 especies estimadas (The Plant List, 2010), representan el grupo más importante de las plantas vasculares. Su gran diversidad, su amplia distribución y su dominancia sobre cualquier otro grupo vegetal radica en la presencia de su estructura reproductiva sexual, la flor. La flor es evolutivamente una hoja modificada en donde se encuentran los órganos sexuales que producen los gametos femeninos (óvulos) y masculinos (granos de polen). En la flor se llevan a cabo dos de los eventos más importantes para el éxito de las especies vegetales: la polinización y la doble fecundación (Swanson *et al.*, 2004).

La mayoría de las angiospermas producen flores hermafroditas, es decir, incluyen tanto al gineceo (pistilo), constituido por el estigma, estilo y ovario, así como al androceo (conjunto de estambres), formados por el filamento y la antera. La cercanía de estas estructuras aumenta la probabilidad de que ocurra la autopolinización y, por ende, la autofecundación. Sin embargo, el pistilo juega un papel muy importante durante las interacciones polen-pistilo, que ocurren desde que se recibe el polen en la superficie del estigma, se presenta la hidratación y la germinación de los granos de polen y finalmente la conducción y nutrición de los tubos polínicos (TPs) en su camino por el estilo hacia el ovario. Algunos granos de polen tendrán éxito en germinar y elongar sus TPs hasta el ovario para descargar sus células espermáticas y efectuar así la doble fecundación. El pistilo es el responsable de reconocer y discriminar entre los granos de polen que son producidos por la misma planta, por plantas genéticamente relacionadas y por otras especies (Swanson *et al.*, 2004; McClure y Frankling-Tong, 2006).

Algunas especies con flores hermafroditas cuentan con adaptaciones morfológicas que favorecen la polinización cruzada, tales como la separación espacial del pistilo y los estambres (hercogamia), flores con imagen especular en donde se presenta un morfo floral con el estilo desviado hacia la derecha y otro morfo con el pistilo desviado hacia la izquierda (enantiofilia); flores con dos o tres morfos que se diferencian recíprocamente uno del otro por la posición en que las anteras y estigmas están localizados en las flores (heterofilia); plantas en donde los morfos florales muestran un posicionamiento alternativo vertical de los órganos sexuales (inversofilia) y morfos florales que se diferencian en la longitud del pistilo (polimorfismo en el tamaño del pistilo). Entre las adaptaciones fisiológicas encontramos la maduración de los órganos reproductivos en tiempos diferentes (dicogamia), en donde la maduración de los órganos masculinos antes que los femeninos se denomina protandria, y la maduración de los órganos femeninos antes que los masculinos protoginia. Finalmente, un nuevo polimorfismo ha sido descrito, en donde se combina la hercogamia recíproca y la dicogamia (flexifilia). En este caso la población se compone de dos morfos florales uno que funciona primero como femenino y después como masculino y otro morfo floral que funciona al revés (Barrett, 2002; 2010). Estas

adaptaciones disminuyen la posibilidad de la autofecundación; sin embargo, aún existe la posibilidad de cruzarse con los padres o con el resto de la progenie.

Para aumentar la transferencia de polen entre las flores de diferentes individuos, algunas especies vegetales desarrollaron un mecanismo genético-bioquímico de reconocimiento molecular específico del polen, conocido como sistema de autoincompatibilidad. Los sistemas de autoincompatibilidad se definen como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977; 2001), asegurando la polinización cruzada y el intercambio genético. Esto trae como consecuencia un aumento en la diversidad genética de las poblaciones, evita la depresión por endogamia y aumenta la heterocigocidad en las poblaciones que resulta en progenies vigorosas con alta adecuación que favorecen la adaptación de los individuos a cambios en el ambiente. Además, los sistemas de autoincompatibilidad pueden presentar un fuerte control genético restringiendo en gran medida la introgresión con los padres y las cruzas con otros miembros de la progenie.

En varias familias, la especificidad del rechazo del polen está controlada por un locus altamente polimórfico, conocido como el locus *S* (del término esterilidad en inglés; Rea y Nasrallah, 2008). Este locus aloja dos genes fuertemente ligados, uno que codifica para la determinante masculina y otro para la determinante femenina. Por lo tanto, la determinante de especificidad femenina es el producto del locus *S* en el pistilo, la cual identifica e interacciona con su contraparte, la determinante de especificidad masculina, como propia o no. Esta última determinante es el producto *S* del polen y también está codificada en el locus *S*. Además de las determinantes de especificidad, los productos de otros genes no ligados al locus *S*, conocidos como genes modificadores (GM), también son esenciales en la vía bioquímica del rechazo del polen.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Sistemas genéticos que controlan el rechazo del polen

Los sistemas de autoincompatibilidad se distribuyen ampliamente en las angiospermas y se han reportado en 100 de las 271 familias descritas (Dickinson *et al.*, 1992; Russel y Kohn, 2008). Entre las familias que lo presentan se encuentran: las Solanaceae, Poaceae, Asteraceae, Plantaginaceae, Brasicaceae, Rosaceae, Papaveraceae, Malvaceae y Fabaceae (Hiscock y McInnis, 2003; Russel y Kohn, 2008). Sin embargo, en las familias en donde más se conoce el mecanismo de rechazo del polen son las familias Brassicaceae, Papaveraceae y Solanaceae, aunque otras familias como Convolvulaceae, Betulaceae, Caryophyllaceae, Sterculiaceae y Polemoniaceae ya se han comenzado a estudiar (Hiscock y McInnis, 2003).

Los sistemas de autoincompatibilidad están controlados genéticamente por un solo locus (locus *S*) multialélico, aunque existen familias en donde dos o cuatro loci están implicados en la respuesta de reconocimiento y rechazo del polen (de Nettancourt, 2001). El número de alelos *S* puede variar de especie en especie y de población en población. En algunas especies de *Brassica* se han reportado aproximadamente 100 alelos, de 60-80 en *Papaver* y de 150-250 en *Trifolium* (Dickson *et al.*, 1992; Rea y Nasrallah, 2008).

Se ha determinado en *Solanum lycopersicum* y en *Petunia hybrida* que la localización del locus *S* es cercana al centrómero de los cromosomas I y III, respectivamente (Tanksley y Loaiza-Figueroa, 1985; Entani *et al.*, 1999) o en la región subteloamérica cercana a una región de heterocromatina donde el ADN está altamente metilado, como es el caso de la manzana (*Malus X domestica*; Wang *et al.*, 2012). De tal forma que la ubicación del locus *S* cerca del centrómero y la proximidad de las dos determinantes provoca una nula recombinación entre ambos genes, promoviendo su herencia como una sola unidad mendeliana llamada haplotipo (Cruz-García y McClure, 2001).

Los sistemas de autoincompatibilidad se clasifican en dos grupos dependiendo del tiempo de expresión de la determinante masculina en el polen. Siendo estos el sistema de incompatibilidad esporofítico (SIE) y el sistema de incompatibilidad gametofítico (SIG; Newbiggin *et al.*, 1993). En el SIE los productos de los alelos *S* se expresan y sintetizan por la planta madre. La determinante masculina se expresa en una de las capas de la antera ( $2n$ ) conocida como tapete. Las células del tapete sintetizan muchos compuestos esenciales para el desarrollo y reconocimiento del polen, después de la meiosis cuando ya se han formado los granos de polen, las células del tapete se rompen y vierten su contenido en el lóculo de la antera cubriendo a los granos de polen y formando parte de la cubierta del polen (Figura 1A). En el SIG, la expresión y síntesis de la determinante femenina ocurre en el tejido materno, pero la expresión de la determinante masculina ocurre en el interior de los granos de polen ( $n$ ), después de concluida la meiosis de las células madres de las microsporas (Figura 1B). En ambos casos el reconocimiento y rechazo del

polen se presenta cuando el haplotipo  $S$  del polen coincide con uno de los dos haplotipos  $S$  presentes en el pistilo diploide de una planta heterocigota.

Existen algunas características asociadas a cada uno de los sistemas. En el SIE los estigmas son secos, los granos de polen se liberan de manera tricolular y el rechazo del polen se presenta por la inhibición de la germinación de los granos de polen sobre la superficie del estigma o si se presenta, no hay penetración del TP en la cutícula de las papilas estigmáticas. En el caso del SIG, los granos de polen se liberan bicelulares, los estigmas son húmedos, lo cual permite la germinación de la mayoría de los TPs y su crecimiento por el estigma en donde algunos son inhibidos o bien en el estilo en donde la mayoría cesa su crecimiento (Takayama e Isogai, 2005).

En el SIE, una planta heterocigota produce los dos alelos  $S$  que se encontrarán en la cubierta del polen, de tal forma que una planta  $S_1S_2$  producirá granos de polen con genotipo  $S_1$  o  $S_2$ , pero de fenotipo  $S_1S_2$ . Si los granos de polen de esta planta con fenotipo  $S_1S_2$  llega al estigma de una planta  $S_1S_2$  será rechazado, en cuyo caso la respuesta de autoincompatibilidad se manifiesta con la inhibición de la germinación del polen en la superficie del estigma, lo que resulta en una cruce autoincompatible (AI). En el caso en el que un polen  $S_1S_3$  llegará a la superficie del estigma, este grano de polen también será rechazado por la coincidencia del haplotipo  $S_1$ . Pero en una cruce autocompatible (AC), el polen lleva en la cubierta el producto de los alelos  $S_3S_4$ , el polen germinará y el TP crecerá hasta alcanzar los óvulos donde ocurrirá la doble fecundación, produciendo una progenie con los siguientes genotipos  $S_1S_3$ ,  $S_1S_4$ ,  $S_2S_3$  y  $S_2S_4$ , de tal manera que la progenie no llevará a cabo introgresión con sus padres ( $S_1S_2$  y  $S_3S_4$ ) o con sus hermanos, ya que siempre habrá coincidencia con uno de los haplotipos  $S$  (Figura 1A; Cruz-García y McClure, 2001).

En el SIG, una planta heterocigota  $S_1S_2$  produce granos de polen con genotipo y fenotipo  $S_1$  o  $S_2$ . Si los granos de polen de esta planta  $S_1S_2$  (polen  $S_1$  o  $S_2$ ) llegan al estigma, germinarán y un TP emergerá y crecerá; sin embargo, su crecimiento se inhibirá en el estigma y en el primer tercio del estilo. Pero si el haplotipo del polen es  $S_3$ , el polen germinará y TP crecerá a través de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo hasta llegar a los óvulos y alcanzar el saco embrionario para llevar a cabo la doble fecundación, resultando en una progenie con individuos  $S_1S_3$  y  $S_2S_3$ , ya que sólo la mitad de la descendencia podrá introgresar con los padres y con una proporción de la progenie (Figura 1B).



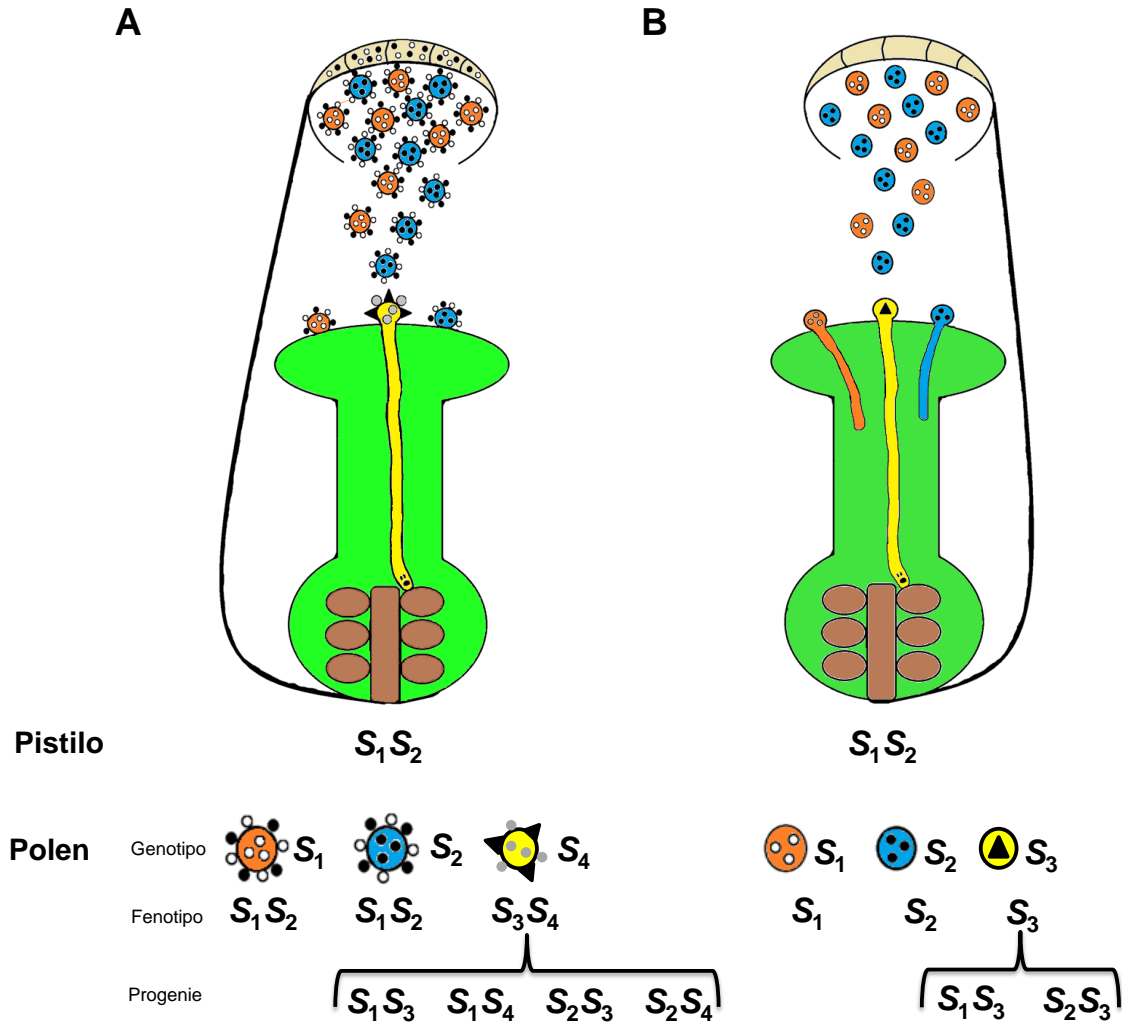


Figura 1. Control genético en los sistemas de autoincompatibilidad.

**A. Sistema de autoincompatibilidad esporofítico.** Plantas diploides  $S_1S_2$  expresan el producto del alelo  $S_1$  y  $S_2$  en el tejido diploide del tapete, que al degenerar vierte su contenido al interior del lóculo de la antera y cubre la pared de los granos de polen. De esta forma los granos de polen provenientes de esta planta serán fenotípicamente  $S_1S_2$ . Los granos de polen al llegar al estigma de un pistilo  $S_1S_2$  o de alguna planta que porte los mismos alelos  $S$  ( $S_1$  o  $S_2$ ), son reconocidos y el polen es rechazado inhibiendo su germinación. Si por el contrario, llega polen con fenotipo  $S_3S_4$  a un pistilo  $S_1S_2$ , estos granos de polen germinan y crecen por el tejido de transmisión del estilo hasta alcanzar los óvulos y fecundarlos para producir una progenie  $S_1S_3$ ,  $S_1S_4$ ,  $S_2S_3$  y  $S_2S_4$ .

**B. Sistema de autoincompatibilidad gametofítico.** Plantas diploides  $S_1S_2$  expresan el producto del alelo  $S_1$  o  $S_2$  en el citoplasma de los granos de polen haploides siendo fenotípicamente  $S_1$  o  $S_2$ . Al llegar los granos de polen al estigma del pistilo  $S_1S_2$  germinan y crecen a través del estigma, pero su crecimiento es inhibido en la parte superior del estilo. Sin embargo, un grano de polen con el alelo  $S_3$  es capaz de germinar y crecer a través del tejido de transmisión del estilo hasta alcanzar el ovario y fecundar los óvulos para producir una progenie  $S_1S_3$  y  $S_2S_3$ .

### 3.1.1. Factores no ligados al locus *S* involucrados en la incompatibilidad

Además de las determinantes codificadas por el locus *S*, existen otros factores no ligados al locus *S* conocidos como genes modificadores (GM). Las evidencias genéticas indican que los productos de los GMs, son esenciales en la vía de reconocimiento y rechazo del polen (Ai *et al.*, 1991; Murfett *et al.*, 1994, 1996; Tsukamoto *et al.*, 2003). Estos factores se han clasificado en tres grupos (McClure *et al.*, 2000):

- I. Incluye GMs cuyos productos regulan la expresión de las determinantes de la especificidad en la respuesta de incompatibilidad.
- II. GMs que regulan la actividad biológica de las determinantes de especificidad; por lo tanto, su función se restringe a la incompatibilidad.
- III. GMs que funcionan en el rechazo del polen y en otros eventos de la interacción polen-pistilo.

### 3.2. Sistema de incompatibilidad esporofítica en Brassicaceae

El sistema de autoincompatibilidad en la familia Brassicaceae opera a nivel de la interacción entre el grano de polen y las papilas estigmáticas. La respuesta es muy rápida y se observa minutos después del contacto entre el polen y el estigma (Rea y Nasrallah, 2008). En *Brassica* el locus *S* es muy complejo, alberga al menos 17 genes; sin embargo, sólo dos genes fuertemente ligados y altamente polimórficos se requieren para el reconocimiento haplotipo *S*-específico. Uno de ellos es la determinante femenina que codifica para un receptor cinasa del locus *S* (*SRK*; Stein *et al.* 1991; Takasaki *et al.*, 2000), y el otro es la determinante masculina conocido como una proteína rica en cisteínas del locus *S* (*SCR*; Schopfer *et al.*, 1999), también fue designado como *SPI1* (proteína 11 del locus *S*; Suzuki *et al.*, 1999).

#### 3.2.1. Determinante femenina

*SRK*, la determinante femenina, codifica para un receptor con actividad de cinasa de serina/treonina que se localiza en la membrana plasmática de las papilas estigmáticas, con un dominio extracelular que se extiende hacia la pared celular (Stein *et al.*, 1996). *SRK* posee un dominio extracelular (eSRK) que es responsable de la unión con su ligando, *SCR* (Kachroo *et al.*, 2001). El eSRK es altamente polimórfico entre los diferentes haplotipos y se ha dividido en tres subdominios:  *$\beta$  Iecitina like*, la región hipervariable y PAN. El análisis bioquímico de cada subdominio muestra que la región hipervariable es responsable de la unión de *SCR* (Kemp y Doughty, 2007).

Mediante experimentos de ganancia de función se demostró que *SRK* es la única proteína necesaria para determinar la respuesta de reconocimiento *S*-específico, aunque la habilidad del

estigma para rechazar el polen incompatible se aumenta por la presencia de un segundo gen estigmático localizado en el locus *S*, conocido como *SLG* (glicoproteína del locus *S*, Takasaki *et al.*, 2000).

*SLG* codifica una glicoproteína que se secreta y se localiza en la pared celular de las papilas estigmáticas (Nasrallah *et al.*, 1985; Kandasamy *et al.*, 1989). *SLG* y el dominio *S* del receptor de SRK presentan hasta un 98% de identidad (Stein *et al.*, 1991). Los experimentos de pérdida de función demuestran que *SLG* no es esencial para el reconocimiento y rechazo del polen, aún cuando su presencia incrementa la fuerza de la respuesta de incompatibilidad (Takasaki *et al.*, 2000).

### 3.2.2. Determinante masculina

*SCR* codifica para una proteína del polen rica en cisteínas, identificada por dos grupos independientemente (Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000), de allí que algunos le llamen SCR y otros SP11. Los alelos de *SCR* son altamente polimórficos, exhibiendo entre un 19-94% de identidad, pero todos poseen un residuo de glicina conservado y usualmente 8 cisteínas, responsables de su estructura 3D (Watanabe *et al.*, 2003), la cual muestra un asa hipervariable propuesta como la responsable de la interacción con las demás SRKs (Mishima *et al.*, 2003).

*SCR* se expresa en las células del tapete del esporofito y en las microsporas del gametofito (Shiba *et al.*, 2001).

### 3.2.3. Factores *S* no específicos

Se han identificado pocos candidatos potenciales como proteínas efectoras en esta vía de señalización y de éstas sólo algunos han mostrado una función en la incompatibilidad. Un ejemplo de ello son dos tiorredoxinas tipo *h* (THL1 y THL2), identificadas como proteínas interactoras de la región citoplasmática de SRK (Bower *et al.*, 1996). Se sugiere que estas tiorredoxinas funcionan como reguladores negativos de la respuesta de incompatibilidad, ya que mantienen a SRK en su forma inactiva (Cabrillac *et al.*, 2001). La supresión de estas proteínas por antisentido causa un bajo nivel de rechazo del polen tanto en polinizaciones compatibles e incompatibles (Haffani *et al.*, 2004). Además, una variante de SRK que es constitutivamente activa, se inhibe por THL1 y esta inhibición es reversible al adicionar proteínas de la cubierta del polen incompatible (Cabrillac *et al.*, 2001). SRK podría formar dímeros en ausencia de SCR independientemente del ligando a través de sus dominios extracelulares, sugiriendo que las proteínas tiorredoxinas tipo *h* funcionan para mantener los dímeros y al receptor en una forma inactiva. Esta interacción se pierde al interaccionar SRK con su SCR específico (Cabrillac *et al.*, 2001; Naithani *et al.*, 2007).

Se ha identificado otros tres efectores positivos que participan en la vía de señalización del rechazo del polen en *Brassica*. Entre ellos se encuentra MLPK (M-locus protein kinase, por sus siglas en inglés), una proteína cinasa citosólica de serina/treonina que fue identificada por clonación posicional en una mutante de *Brassica rapa*, que perdió la capacidad de rechazar el polen incompatible. El gen de *MLPK* exhibe dos transcritos, *MLPKf1* y *MLPKf2*, producto de empalme alternativo. Ambas isoformas sólo difieren en su extremo amino terminal. MLPKf1 se localiza en la membrana plasmática a través de su sitio de miristoilación y MLPKf2 también se sitúa en la membrana plasmática pero a través de su región hidrofóbica localizada en el extremo amino terminal. Ensayos de complementación bimolecular revelan una interacción directa entre SRK y MLPKs *in planta* (Murase *et al.*, 2004; Kakita *et al.*, 2007).

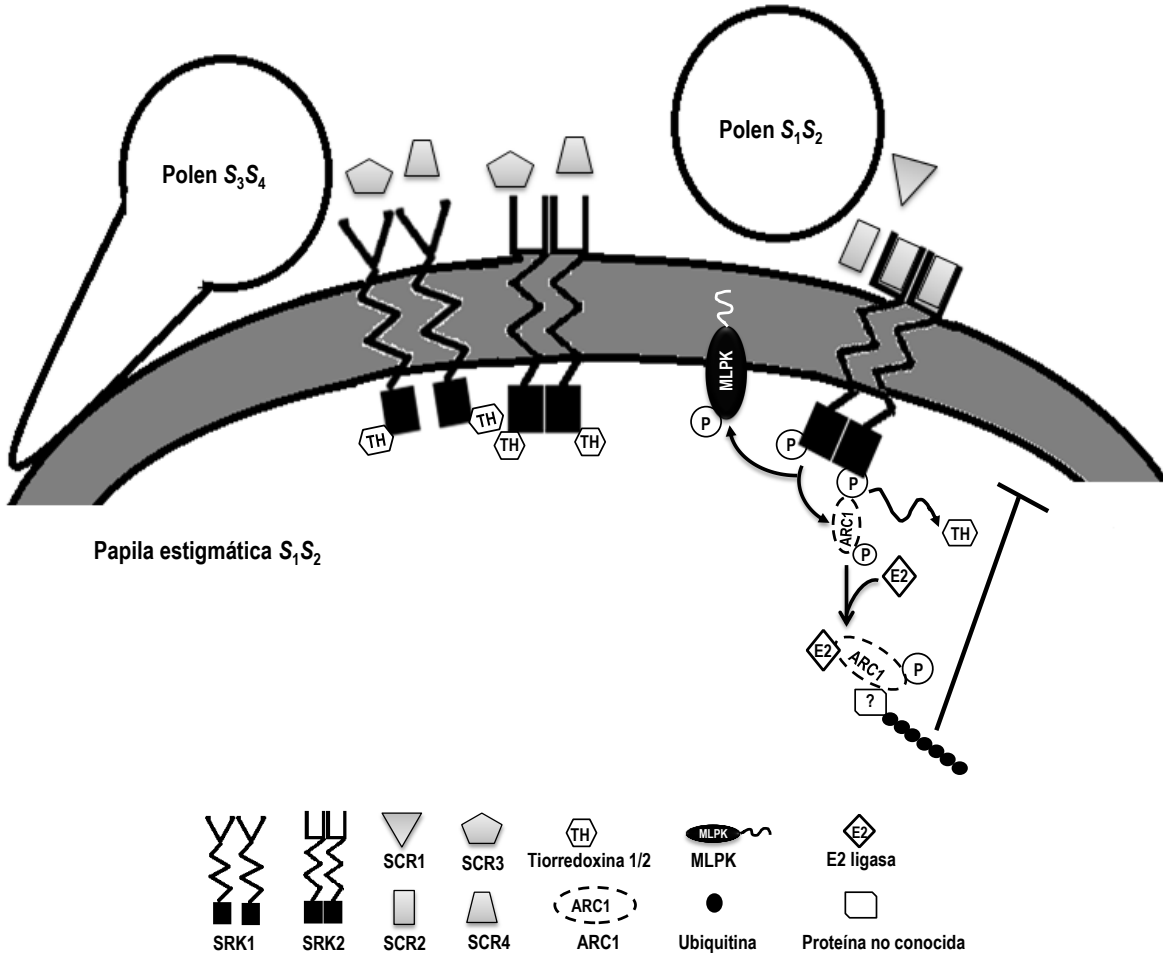
Otro efector positivo es ARC1, una proteína que contiene motivos repetidos de Armadillo (Gu *et al.*, 1998). ARC1 es un miembro de la subfamilia de proteínas con caja U, las cuales presentan actividad de ubiquitin E3 ligasa (Stone *et al.*, 2003). Ensayos bioquímicos demuestran que ARC1 promueve la ubiquitinación de proteínas del estigma durante el rechazo del polen incompatible. ARC1 se expresa sólo en el estigma. A través de ensayos de doble híbrido en levaduras se probó que interacciona exclusivamente con la forma fosforilada de SRK, mediante su dominio cinasa (Gu *et al.*, 1998). Experimentos de pérdida de función de *ARC1* mostraron que se reduce la habilidad del estigma para rechazar eficientemente el polen incompatible (Stone *et al.*, 1999). En la presencia de SRK funcional, ARC1 se asocia al proteosoma y al complejo COP9 (Stone *et al.*, 2003).

Finalmente, se identificó *AtPUB8* (*Arabidopsis thaliana* Plant U-box protein 8) usando plantas transgénicas de *A. thaliana*. *AtPUB8* es un gen que se requiere para la expresión de la incompatibilidad en estados tardíos del desarrollo del estigma, aparentemente, regulando los niveles de transcrito de *SRK* (Liu *et al.*, 2007).

#### 3.2.4. Mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen

El modelo del rechazo del polen en *Brassica* propone que la interacción haplotipo *S*-específica entre SCR y el dominio cinasa de SRK promueve una rápida autofosforilación de los residuos de serina y treonina localizados en el dominio cinasa de SRK, lo que ocasiona la disociación de THL1 y THL2 del dominio cinasa. La forma activa de SRK entonces puede dirigir una respuesta localizada en la papila que culmina con la inhibición del grano de polen incompatible pero sin afectar la germinación de granos de polen compatibles, en donde SCR no se une a SRK. La cascada de señalización que se sigue después de la interacción de las determinantes de especificidad no se conoce, pero se sugiere que los tres efectores positivos, MLPKf1, MLPKf2 y ARC1, pueden ubiquitinar proteínas no conocidas que pueden funcionar como inhibidores de la incompatibilidad o proteínas requeridas para el crecimiento del TP, causando su degradación o su

redistribución subcelular (Rea y Nasrallah, 2008). Entre las proteínas blanco se pueden incluir algunas que participan en la biosíntesis, señalización, organización del citoesqueleto y exocitosis (Figura 2; Samuel *et al.*, 2009).



**Figura 2. Modelo del sistema de incompatibilidad esporofítico en *Brassica*.** En una polinización incompatible un pistilo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> que es polinizado con polen fenotípicamente S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> permite la interacción entre los receptores de cinasa, SRK1 y SRK2 con sus ligandos SCR1 y SCR2 del polen. La interacción haplotipo S específica entre el receptor y ligando activa el dominio cinasa de SRK seguido de la disociación de las tiorredoxinas y la autofosforilación en los residuos de serina y treonina del dominio cinasa de SRK. ARC1 interacciona con el dominio cinasa de manera fosforilación dependiente y funciona como una E3 ubiquitin ligasa, que forma complejo con la E2 ubiquitina para degradar factores del polen que ayudan a su germinación a través de la ubiquitinación de las proteínas y su posterior degradación por el proteosoma y el complejo COP9. La activación del dominio cinasa de SRK también puede activar a MLPK. En una cruce compatible con polen fenotípicamente S<sub>3</sub>S<sub>4</sub> no hay una interacción entre los receptores y el ligando por lo que no hay disociación entre las tiorredoxinas y SRK manteniéndola en su forma inactiva y permitiendo la germinación y crecimiento del tubo polínico (Adaptada de Hiscock y McInnis, 2003 y Rea y Nasrallah, 2000).

### 3.3. Sistema de incompatibilidad gametofítica

Los SIG se han estudiado principalmente en dos familias, Papaveraceae y Solanaceae. En cada una de las familias el mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen es diferente, por lo cual se ha dicho que este sistema no tiene un origen monofilético y que al menos en el curso de la evolución se han originado dos veces de manera independiente.

#### 3.3.1. Sistema de incompatibilidad en la familia Papaveraceae

Este SIG sólo se ha descrito en *Papaver rhoeas*. La respuesta de incompatibilidad se manifiesta durante o posterior a la germinación del TP sobre la superficie estigmática como resultado de la muerte del TP. En 1994, Humphrey y colaboradores clonan la determinante femenina, conocida actualmente como *PrsS* (*Papaver rhoeas* stigma *S* por sus siglas en inglés) y es hasta el 2009 que Wheeler y colaboradores clonaron la determinante masculina llamada *PspS* (*Papaver rhoeas* pollen *S* por sus siglas en inglés).

##### 3.3.1.1. Determinante femenina

El producto del gen *S*, PrsS, en el pistilo es una proteína pequeña de 15kDa que es secretada por el tejido estigmático (Foote *et al.*, 1994; Wheeler *et al.*, 2009). El análisis de la secuencia de *PrsS* no muestra similitud con alguna otra proteína de función conocida (Foote *et al.*, 1994). Su pI varía entre 6.9 y 7.55 y se predice un péptido señal de 19 residuos (Humphrey *et al.*, 1994). Algunas de estas proteínas se encuentran modificadas por *N*-glicosilación (Franklin-Tong y Franklin, 2003; McCubbin y Kao, 2000). Las PrsS son altamente polimórficas y comparten entre 51-63 % de identidad en su secuencia de aminoácidos. Poseen cuatro residuos conservados de cisteínas y una estructura secundaria formada por seis hojas  $\beta$  y dos hélices  $\alpha$  unidas por siete asas (Takayama e Isogai, 2005). Bajo condiciones *in vitro*, la proteína PrsS (o proteína S) recombinante inhibe la germinación del polen de una manera alelo *S*-específica, concluyendo que PrsS es la determinante femenina en *Papaver* (Foote *et al.*, 1994; Frankling *et al.*, 1995).

##### 3.3.1.2. Determinante masculina

Wheeler *et al.* (2009) identificaron que el producto del gen *S* del polen muestra un marco de lectura abierto (ORF) de 457 pares de bases. Mediante un análisis de RT-PCR se demostró que este ORF se transcribe específicamente en el polen durante el desarrollo de la antera. El cDNA de *PrpS1* codifica para una proteína con una masa molecular teórica de 20.5 kDa y un pI de 7.55; sin embargo, PrpS3 y PrpS8 tienen una masa molecular de 21.1 kDa (pI 6.57) y 20.9 kDa (pI

8.51), respectivamente. Mediante un análisis tipo Southern se reveló que *PrpS* sólo se encuentra en una copia en el genoma de *P. rhoeae*. El estudio de segregación, a través de la amplificación de cada uno de los alelos en genotipos diferentes, demostró que el gen *S* del polen co-segrega con el gen *S* del pistilo, sin encontrar eventos de recombinación. Mientras que los datos de divergencia de las secuencias de ambas determinantes sugieren una co-evolución además de un origen temporal común (Wheeler *et al.*, 2009).

PrpS no muestra similitud con alguna otra proteína descrita hasta el momento. Se predice en PrpS la presencia de 3-5 hélices transmembranales y una asa extracelular de 60-100 aminoácidos, que podría estar involucrada con la interacción con PrsS. El análisis por Western detecta a PrpS1 en extractos de polen enriquecidos con membranas; mientras estudios de inmunolocalización lo asocian con la membrana plasmática del TP.

La prueba que determinó que PrpS está directamente implicada en la respuesta de incompatibilidad consistió en un bioensayo *in vitro* de competencia. En este experimento una mezcla de polen *S*<sub>1</sub> y *S*<sub>3</sub> fueron incubados con la determinante femenina PrsS1 y PrpS1. El resultado de este ensayo fue la ausencia del rechazo del polen *S*<sub>1</sub>, concluyendo que PrpS es la determinante masculina en *P. rhoeae* (Wheeler *et al.*, 2009). Otra prueba que fortaleció esta conclusión fue la derivada de experimentos con oligonucleótidos en antisentido para el transcrito de PrpS (as-ODNs). Estos as-ODNs fueron utilizados para transformar de manera transitoria TPs incompatibles, los cuales lograron recuperarse en un 58% después de la transformación, debido a que los as-ODNs redujeron los niveles de PrpS y por ende la respuesta de rechazo del polen (Wheeler *et al.*, 2009).

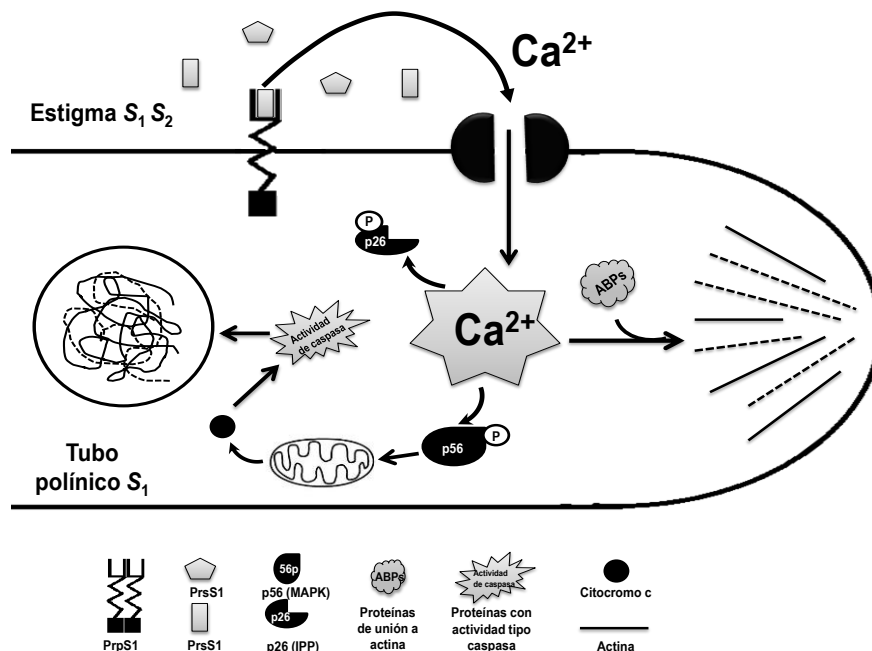
### 3.3.1.3. Mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen

La respuesta de incompatibilidad en este sistema se presenta al interaccionar PrsS con su receptor PrpS de manera haplotipo *S*-específica, activando una cascada de señalización en el interior del TP que conlleva a la inhibición de su crecimiento y a su muerte (McClure y Franklin-Tong, 2006). Esta interacción causa un rápido incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, y un flujo de Ca<sup>2+</sup> extracelular al interior del TP alterando el gradiente de calcio en el interior del TP necesario para su crecimiento apical (Franklin-Tong *et al.*, 2002). Las anomalías en el flujo de Ca<sup>2+</sup> disparan algunos eventos que causan la inhibición del crecimiento del TP unos pocos minutos después de la interacción de las determinantes (McClure y Franklin-Tong, 2006). El evento más temprano, resultado de la respuesta de incompatibilidad, es la despolimerización de actina a través de la acción cooperativa de algunos ABPs (Actin Binding Proteins por sus siglas en inglés) reguladas por Ca<sup>2+</sup> (profilinas y gelsolinas) y la disrupción del citoesqueleto de actina (Snowman *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2006). La profilina regula el ensamblaje entre proteínas del citoesqueleto con proteínas cinasas o con proteínas con actividad de fosfatasa, mientras que la

gelsolina PrABP80 actúa sinérgicamente con la profilina para mediar la despolimerización de la actina F dependiente de  $Ca^{2+}$  (Huang *et al.*, 2004). Al verse afectado el citoesqueleto de actina directamente se afecta el transporte del material hacia y desde la punta del TP lo que repercute en su crecimiento.

Estos eventos son seguidos por la activación de la proteína cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  (CDPK) y por la fosforilación y reducción de la actividad de la pirofosfatasa Pr-p26a y Pr-p26b (Rudd *et al.*, 1996; de Graaf *et al.*, 2006). La disminución en la actividad de Pr-p26a/b inhibe la biosíntesis del TP y el crecimiento del mismo (Figura 3; Revisado en: Rea y Nasrallah, 2008).

Una vez que se detiene el crecimiento del TP, se incrementa la actividad de p56, una MAPK (cinasa de proteína activada por mitógeno; Rudd *et al.*, 2003), y el inicio de la muerte celular programada (PCD; McClure y Franklin-Tong, 2006). La PCD se inicia con la despolarización de la membrana mitocondrial que conduce la liberación del citocromo c hacia el citosol, donde activa proteínas tipo caspasas (Thomas y Franklin-Tong, 2004) y se presenta, como evento culminante, la fragmentación del DNA (Jordan *et al.*, 2000), que conduce a la muerte del TP incompatible (Figura 3).



**Figura 3. Modelo del sistema de incompatibilidad gametofítica en *Papaver*.** En una cruce incompatible el polen  $S_1$  crece en un estigma  $S_1S_2$ . La proteína  $PrsS1$  interacciona con el receptor  $PrpS1$  del polen de manera haplotipo  $S$  específica. Esta interacción permite la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  localizados en la membrana del tubo polínico permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior del tubo polínico. El aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático ocasiona la despolimerización del citoesqueleto de actina con la ayuda de proteínas de unión a actina (ABPs). También ocasiona la fosforilación de  $p56$  que conlleva a la liberación del citocromo c, el cual activa enzimas con actividad de caspasa que ocasionan la fragmentación del ADN e inicia el proceso de muerte celular programada (Adaptado de Rea y Nasrallah, 2008).



### 3.3.2. Sistema de incompatibilidad dependiente de S-RNasa

El SIG dependiente de S-RNasa es de los más representados en las angiospermas y se ha estudiado fundamentalmente en las familias Solanaceae (*Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*), Plantaginaceae (*Antirrhinum*) y Rosaceae (*Prunus*, *Pyrus* y *Malus*; de Nettancourt, 2001; Yamame y Tao, 2009). Los estudios llevados a cabo desde la década de los 80's por varios grupos de investigación han determinado que el locus *S* posee dos genes altamente polimórficos y ligados fuertemente, conocidos como la determinante femenina o S-RNasa (ribonucleasa del locus *S*) y la determinante masculina nombrada como *SLF* (*S*-locus *F* box) o *SFB* (*S*-locus *F* box). Ambas determinantes controlan la especificidad del rechazo del polen (McClure *et al.*, 1989; Sijacic *et al.*, 2004; Hua *et al.*, 2008).

#### 3.3.2.1. Determinante femenina

La determinante femenina es una proteína con actividad de ribonucleasa conocida como S-RNasa (McClure *et al.*, 1989; Kao y McCubbin, 1996). Las S-RNasas son glicoproteínas de alrededor de 30 kD que se expresan en el estigma, en el estilo y en el ovario. Estas ribonucleasas son secretadas a la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo y del ovario (Anderson *et al.*, 1986; Cornish *et al.*, 1988; McClure *et al.*, 1989; Broothaerts *et al.*, 1995; Sassa *et al.*, 1996; Xue *et al.*, 1996).

La corroboración de que la S-RNasa es la determinante femenina se realizó mediante experimentos de ganancia o pérdida de función con plantas transgénicas en *Solanum*, *Petunia* y *Nicotiana*, en donde la expresión de diferentes S-RNasas causó cambios en el fenotipo de polinización, pasando de compatible a incompatible o viceversa. La ganancia de función para la *S*<sub>2</sub>-RNasa o la *S*<sub>C10</sub>-RNasa en híbridos de *Nicotiana langsdorffii* X *N. alata* *S*<sub>105</sub>*S*<sub>105</sub> mostraron el rechazo del polen *S*<sub>A2</sub> o *S*<sub>C10</sub> (Murfett *et al.*, 1994; 1996). En el caso de *Petunia inflata* se realizaron experimentos de pérdida de función, en donde una planta *S*<sub>1</sub>*S*<sub>2</sub> se silenció la *S*<sub>2</sub>-RNasa por antisentido, generando plantas que aceptaron el polen *S*<sub>2</sub> (Lee *et al.*, 1994). En *Prunus*, *Pyrus* y *Malus*, la identificación de la S-RNasa como la determinante femenina se hizo en mutantes naturales AC con mutaciones en el gen *S-RNasa* que inactivaban su producto (Yamame y Tao, 2009).

La evidencia demuestra que las S-RNasas, son ribonucleasas que actúan como agentes citotóxicos *S*-específicos (McClure *et al.*, 1989; Gray *et al.*, 1991), ya que al ser reemplazadas una de las dos histidinas conservadas en el sitio activo de la *S*<sub>3</sub>-RNasa de *P. inflata*, por mutagénesis dirigida, los pistilos de las plantas transgénicas perdieron la capacidad de rechazar el polen incompatible debido a la incapacidad de la *S*<sub>3</sub>-RNasa para degradar el ARN del TP (Huang *et al.*, 1994). Otra

evidencia que apoya esta hipótesis se encontró en una población natural autocompatible de *Solanum peruvianum*. Las plantas de esta población expresan una S-RNasa sin actividad, debido a una mutación puntual que generó un cambio de una histidina por una arginina en su sitio activo (Kowyama *et al.*, 1994; Royo *et al.*, 1994).

Cada uno de los haplotipos codifica para una S-RNasa diferente, la cual se incorpora a los TPs que crecen por la matriz extracelular del tejido de transmisión, de manera inespecífica, es decir tanto en una cruzada compatible como en una incompatible (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006) y degradan el ARN de los TPs después de una cruzada incompatible (McClure, 2006).

En las Solanáceas la secuencia de las S-RNasa muestra 5 regiones conservadas (C1-C5) y dos dominios hipervariables HVa y HVb (Ioerger *et al.*, 1994; Xue *et al.*, 1996). Las regiones C2 y C3 presentan dos histidinas (His 32 y His 91), esenciales para la actividad de ribonucleasa (Green, 1994), junto con la lisina 90 (Ida *et al.*, 2001; Kao y Tsukamoto, 2004). Las regiones conservadas tienen cuatro Cys importantes en la formación de los puentes disulfuro. En contraste, en la familia Plantaginaceae sólo cuatro dominios se conservan (C1, C2, C3 y C5; Ushijima *et al.*, 1998), mientras que en las rosáceas se presentan 5 dominios conservados C1, C2, C3, C4 y C5 y dos dominios catalíticos (Ushijima *et al.*, 1998; Yamame y Tao, 2009).

Asimismo, las S-RNasas muestran un alto potencial para interactuar con proteínas estilares, ya que en ensayos de unión a través de una columna en donde la S-RNasa estaba inmovilizada fue identificado un grupo de proteínas de arabinogalactanos (APGs) y una proteína de 11 kDa de unión a cobre. Entre las más abundantes APGs que se unieron se encuentran PELP III (Pistil Extensin-like Protein III por sus siglas en inglés), TTS (Transmitting Track Specific Glycoprotein por sus siglas en inglés) y 120K (Cruz-García *et al.*, 2005). Se propone que la función de estas APGs es ayudar al crecimiento de los TPs compatibles.

### 3.3.2.2. Factores *S* no específicos en el pistilo

Los genes modificadores más estudiados en *Nicotiana* y *Solanum* son *HT-B* y *120K*. Sus productos génicos ingresan a los TPs cuando crecen por el estilo en *N. alata* (Goldraij *et al.*, 2006). Su papel en la autoincompatibilidad se confirmó mediante experimentos en donde su expresión fue suprimida (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005).

HT-B (High-Top Band por sus siglas en inglés) es una proteína de 8.6 kDa, con un dominio conformado por 20 residuos de asparagina y aspártico (dominio ND) hacia el extremo carboxilo terminal (Kondo y McClure, 2008). El dominio ND está flanqueado por dos motivos de cisteínas, CAACKC y CQTVCC en *N. alata* (Kondo y McClure, 2008). HT-B se expresa sólo en estilos maduros de plantas AI (McClure *et al.*, 1999). *HT-B* es un gen presente en tres géneros de la familia Solanaceae: *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum* (McClure *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002a, b;

O'Brien *et al.*, 2002; Puerta *et al.*, 2009). Al ser silenciado HT-B por ARN en antisentido en plantas transgénicas de *Nicotiana*, éstas expresaron un nivel reducido de HT-B, lo que provocó que fallaran en rechazar el polen de forma haplotipo *S*-específica, aún cuando el nivel de *S*-RNasa presente fuera normal (McClure *et al.*, 1999). En *Petunia* se identificó el homólogo de *HT-B*, cuya expresión se observa tanto en especies AI y AC. La supresión de la expresión de *HT-B* mediante RNA de interferencia (RNAi) resulta en un rompimiento parcial de la autoincompatibilidad (Puerta *et al.*, 2009).

En *Solanum chacoense* se caracterizaron dos genes *HT*: *ScHT-A* y *ScHT-B*. Ambas proteínas se expresan en estilos durante la antesis. Mediante el silenciamiento por RNAi se obtuvieron plantas transformantes con niveles reducidos de *ScHT-A* y *ScHT-B*; sin embargo, sólo la isoforma *ScHT-B* mostró estar involucrada directamente en la respuesta de autoincompatibilidad (Kondo *et al.*, 2002a; O'Brien *et al.*, 2002).

En *Solanum lycopersicon* AC (en sinonimia con *Lycopersicon esculentum*) y *S. peruvianum* AI se clonaron los genes que codifican para HT-A y HT-B, y se designaron como *LeHT-A*, *LeHT-B*, *LpHT-A* y *LpHT-B*, respectivamente. En *LeHT-A* una mutación produce un cambio en el marco de lectura, mientras que en *LeHT-B* se encontró un codón de término prematuro, lo cual concuerda con la ausencia del transcrito de *LeHT-B* en el estilo de *Lycopersicon esculentum* (Kondo *et al.*, 2002a). El análisis del transcrito de *HT-B* en siete especies AC y tres especies AI, mostró que ninguna de las especies AC lo presenta, mientras que las AI sí lo exhiben (Kondo *et al.*, 2002b).

A la fecha se han identificado otros miembros de la familia HT en *Petunia inflata*, designados como proteína tipo HT-A y proteína tipo HT-B (PiHTL-A y PiHTL-B). Los transcritos de *PiHTL-A* y *PiHTL-B* se originan por el procesamiento alternativo de un solo gen. Las proteínas PiHTL poseen un motivo de cisteínas (CXXCXCCXXXCXXXC) similar al presente en HT-A y HT-B, aunque no presentan el motivo ND. Ambas proteínas se expresan en pistilos maduros; no obstante, el silenciamiento de ambas no muestra un efecto en la autoincompatibilidad (Sassa y Hirano, 2006). Experimentos en *Nicotiana* muestran que HT-B se degrada después de la polinización y que la degradación ocurre mayoritariamente en una polinización compatible comparada con las incompatibles (Goldraij *et al.*, 2006).

La proteína 120K es una arabinogalactoproteína que presenta un motivo de extensina. Se localiza en las células del tejido de transmisión del estilo y se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo tanto de especies AC como AI de *Nicotiana* (Lind *et al.*, 1994; Hancock *et al.*, 2005). El silenciamiento de 120K por RNAi en híbridos de *N. plumbaginifolia* AC X *N. alata* AI, abate la capacidad de reconocimiento del polen con el mismo haplotipo *S* que el pistilo en *N. alata* (Hancock *et al.*, 2005). En esta especie, 120K forma complejos con las S-RNasas (Cruz-García *et al.*, 2005) e ingresa a los TPs independientemente de su haplotipo *S* (Lind *et al.*, 1996; Goldraij *et al.*, 2006). En cruzas compatibles y en etapas tempranas de la polinización en cruzas incompatibles, 120K delimita el interior de las vacuolas donde se encuentran contenidas las S-

RNAsas en el TP. No obstante, en etapas tardías (36h) en una polinización incompatible, 120K ya no se detecta en los TPs (Goldraj *et al.*, 2006). Estas evidencias sugieren que 120K podría estar asociada a los sistemas membranosos en el TP y que su participación en el rechazo del polen sería en la liberación de las S-RNAsas de la vacuola al citoplasma del TP en coordinación con HT-B. Dado que en las plantas transgénicas con 120K silenciado, el transporte de las ribonucleasas S no se afecta, se sugiere que 120K funciona una vez que S-RNAsas han ingresado al TP (Hancock *et al.*, 2005; Goldraj *et al.*, 2006).

La asociación de HT-B, 120K y la S-RNasa a sistemas membranosos del TP es muy probable, ya que se les detectó por inmuno análisis en fracciones microsomales de TPs AI, los cuales son recuperados, de estilos densamente polinizados. Experimentos de solubilidad con la fracción microsomal, indican que si los microsomas son tratados con NaCl, se solubilizan la S-RNasa y 120K, pero no HT-B; pero si después de la extracción con sales se trata con un detergente es posible recuperar a esta proteína en el sobrenadante (Goldraj *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que HT-B está asociada a la membrana de la vacuola que secuestra a las S-RNAsas en el TP. Esta hipótesis se refuerza con el hecho que HT-B incluye en su extremo carboxilo motivos de cisteínas (CaaC, CXC y CC) blanco de modificaciones lipídicas (prenilación; Ibarra-Sanchez y Cruz-García, datos no publicados), los cuales poseen un carácter hidrofóbico que anclan proteínas solubles a membranas celulares (Galichet y Gruissem, 2003).

### 3.3.2.3. Determinante masculina

La determinante masculina es el gen *SLF/SFB*, identificada en *P. inflata*, pertenece a una familia de proteínas con caja F localizada hacia el extremo amino (Sijacic *et al.*, 2004, Zhihua y Kao, 2006). Este gen se conoce como *SLF* (S-locus F-box gene por sus siglas en inglés) en Solanaceae y Plantaginaceae o *SFB* (S-haplotype-specific F-box protein por sus siglas en inglés) en Rosaceae. La determinante masculina se identificó mediante un análisis de secuenciación en mutantes de polen de *Prunus* y mediante un análisis de la diversidad de las secuencias en *SLF/SFB*.

La proteína SLF/SFB muestra dos regiones hipervariables (HVa y HVb) hacia el extremo carboxilo, las cuales podrían ser importantes en la especificidad (Ikeda *et al.*, 2004; Kao y Tsukamoto, 2004; Yamame y Tao, 2009). En *Prunus*, hay una mayor diversidad alélica (66-82.5% de identidad; Ikeda *et al.*, 2004) que en Solanaceae (88.4-89.4% de identidad; Sijacic *et al.*, 2004) en el gen *SFB/SLF*.

El locus *S* presenta una gran multiplicidad en genes con caja F. En *Petunia* al menos hay tres genes que codifican proteínas con caja F y que están ligados a la S-RNasa (Kubo *et al.*, 2010), en *Anthirrinum* se han identificado de dos a tres genes con caja F (Zhou *et al.*, 2003), mientras que en *Nicotiana* se han reportado 10 genes con caja F ligados al locus *S* (Wheeler y Newbiggin, 2007).

Los experimentos que llevaron a la comprobación de que *SLF* es la determinante masculina se basaron en los hallazgos de Golz *et al.* (2001). Estos investigadores propusieron el modelo de la interacción competitiva para explicar por qué las mutantes que tienen duplicado el alelo *S* en el polen en *N. alata* no rechazan el polen cuando su haplotipo *S* coincide con el del pistilo diploide. La interacción competitiva ocurre en plantas incompatibles mutantes que codifican y expresan en el polen dos alelos *S* diferentes. Esta situación ocurre en plantas mutantes donde la región del locus *S* que codifica la determinante masculina está duplicada o en plantas tetraploides para la familia Rosaceae subfamilia Maloidea, pero no para la subfamilia Prunoideae en donde la interacción competitiva no ocurre (Sassa *et al.*, 2010). Estas plantas producen granos de polen que segregan con genotipos heteroalélicos u homoalélicos. Si los granos de polen son heteroalélicos son aceptados por un pistilo donde coincida su haplotipo, pero si son homoalélicos serán rechazados (Golz *et al.*, 2001). Para demostrar que *SLF* era la determinante masculina Sijacic *et al.* (2004) ofrecieron una prueba contundente basada en el modelo de la interacción competitiva, de la siguiente manera: transformaron plantas incompatibles de *P. inflata*  $S_1S_1$ ,  $S_1S_2$ , y  $S_2S_3$ , con el transgen *SLF*<sub>2</sub> fusionado a un promotor específico de polen. Las plantas transgénicas resultantes produjeron polen homoalélico (*SLF*<sub>2</sub> +  $S_2$ ) o heteroalélico (*SLF*<sub>2</sub> +  $S_1$  o *SLF*<sub>2</sub> +  $S_3$ ). Cuando las plantas transgénicas de *P. inflata*  $S_1S_1$  + *SLF*<sub>2</sub> ó  $S_2S_3$  + *SLF*<sub>2</sub> fueron polinizadas con polen homoalélico o heteroalélico, solo aceptaron el polen heteroalélico, demostrando que la interacción competitiva ocurrió y que *SLF* es la determinante masculina en los sistemas de incompatibilidad basados en S-RNasa. Otros resultados que confirman que *SLF* es la determinante masculina fueron los reportados por Lai *et al.* (2002) y Qiao *et al.* (2004) en *P. hybrida*. En esta especie, el gen *AhSLF*<sub>2</sub> de *Antirrhinum hispanicum* se clonó y expresó en el polen de plantas autoincompatibles en *P. hybrida*  $S_3S_3$ . Las plantas transgénicas que expresaron a *AhSLF*<sub>2</sub> y produjeron polen heteroalélico  $S_3AhSLF_2$ , fueron incapaces de rechazar el polen  $S_2$ . De esta manera, se concluye que el gen *AhSLF*<sub>2</sub> está implicado en la respuesta de autoincompatibilidad en esta especie (Qiao *et al.*, 2004).

La expresión de *SLF* es haplotipo *S*-específica y se restringe al polen (Sijacic *et al.*, 2004). Inmunolocalizaciones muestran que *AhSLF* se localiza en el citoplasma del TP y en el retículo endoplásmico (Wang y Xue, 2005; McClure, 2006).

Los miembros de la familia de genes con caja F se han involucrado en la vía de degradación de proteínas por el proteosoma 26S (Sullivan *et al.*, 2003) formando parte del complejo de E3 ligasa de ubiquitina (Sijacic *et al.*, 2004), donde su papel es unir específicamente el sustrato (proteína blanco) al complejo y marcarlo para su degradación a través de la adición de poliubiquitina. La proteína *SLF* podría funcionar como una enzima ligasa tipo E3. Las enzimas ligasas E3 representan un paso crucial en el control de la poliubiquitinación de la proteína blanco, ya que son las encargadas de reconocer la señal de ubiquitinación en la proteína seleccionada y coordinar la transferencia de la ubiquitina (proteína de 76 kD) desde la ligasa E2 a un residuo de

lisina de la proteína blanco (Sullivan *et al.*, 2003). El reconocimiento de la proteína blanco y la transferencia de ubiquitina por las ligasas E3 puede ocurrir por la formación de un complejo proteico conocido como SCF-E3, el cual se forma con cuatro proteínas: SKP1, Culina, una proteína con caja F y Rbx1 (Cardozo y Pagano 2004; Smalle y Vierstra, 2004).

Mediante experimentos de doble híbrido y *pull down* se observó que la porción carboxilo terminal de AhSLF<sub>2</sub> es capaz de interactuar con la S-RNasa; sin embargo, la región amino terminal, que contiene la caja F no muestra interacción con la S-RNasa (Qiao *et al.*, 2004). Además, se sabe que en *Antirrhinum*, SLF interactúa con la S-RNasa de manera específica y no específica (Qiao *et al.*, 2004). Mientras que en *P. inflata* la interacción con la S-RNasa específica es más fuerte (Hua y Kao, 2006). Hua *et al.* (2007), realizaron construcciones truncando alguno de los tres dominios funcionales de SLF/SFB (FD1, FD2 y FD3), concluyendo que FD1+FD3 contribuyen a la especificidad de la interacción entre PiSLF y la S-RNasa y que FD2 puede ser la región primaria de la interacción, aunque no necesariamente está involucrada en la especificidad.

#### 3.3.2.4. Factores S no específicos en el polen

Por más de una década se han realizado grandes esfuerzos por identificar factores no ligados al locus S que se requieran durante el reconocimiento y rechazo del polen. Un punto de partida fue encontrar los componentes del complejo SCF (Skp 1, cullina 1 y Rbx) a través de ensayo de doble híbrido, sin resultados concluyentes (Hua y Kao, 2006). Sin embargo, usando al gen *SPB 1*, proteína de unión a la S-RNasa, identificada anteriormente en *S. chacoense* y *P. hybrida* (Sims y Ordanic, 2001; O' Brien *et al.*, 2004) se mostró una unión específica con una cullina-1 llamada PiCUL1-G y una proteína tipo E2 (Hua y Kao, 2006). Hua y Kao (2006) proponen un complejo activo entre la S-RNasa y la E3 ligasa en *P. inflata*, siendo el complejo S-específico integrado por la S-RNasa-SLF-SBP1-CUL1-G y el complejo S-no específico compuesto por S-RNasa-SBP1-CUL1-G, en donde SBP1 cubre el papel de Skp1 y Rbx1.

Mediante doble híbrido se identificó que la proteína SLF de *Anthirrinum* interactúa con una proteína Skp1-like (AhSSK1; *Anthirrinum hispanicum* SLF-interacting Skp1-like1), que a su vez interactúa con una proteína CUL1-like. De tal manera que en *Anthirrinum* si hay formación consistente de un complejo SSK1-CUL1-SLF (Huang *et al.*, 2006).

Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en *A. thaliana* se encontró que SLF forma complejo con una proteína de 23 kDa designada como una proteína tipo AtSKP1 y además con una proteínas de 65 kDa que reconoce el anticuerpo CUL1 de *Arabidopsis* (Qiao *et al.*, 2004).

### 3.3.3. Modelos para el rechazo del polen en sistemas de incompatibilidad basados en *S*-RNasa

Actualmente se han propuesto dos modelos para explicar cómo se lleva a cabo la resistencia de la citotoxicidad de la *S*-RNasa en un TP compatible. Uno de los modelos es por medio de la degradación de la *S*-RNasa en el interior del TP (Hua y Kao, 2006, Hua *et al.*, 2008; Kubo *et al.*, 2010) y el otro es por medio del secuestro de la *S*-RNasa a algún compartimento donde no tenga acceso a su sustrato (Goldraj *et al.*, 2006; McClure, 2006).

#### 3.3.3.1. Modelo de la degradación de la *S*-RNasa

Este modelo trata de explicar a la compatibilidad como el resultado de la degradación de la *S*-RNasa no específica, y al rechazo como la no degradación de la *S*-RNasa específica, que es capaz de rechazar el polen a través de la degradación del ARN del TP (Entani *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2004; Sijacic *et al.*, 2004; Ushijima *et al.*, 2004).

Se parte de que la *S*-RNasa puede interactuar con SFB/SLF por medio de dos dominios: un dominio alelo *S*-específico y un dominio común para todas las *S*-RNasas. Este modelo predice que la interacción entre SFB/SLF y las *S*-RNasas en su dominio común es más fuerte que entre SFB/SLF y el dominio alelo *S*-específico. De tal manera que SFB/SLF y la *S*-RNasa interactúan a través de un dominio alelo *S*-específico, en donde el sitio de ubiquitinación de la *S*-RNasa puede quedar enmascarado permitiendo que la *S*-RNasa evada la degradación. En cambio, cuando SFB/SLF interactúa con la *S*-RNasa no específica en un dominio común para todas las *S*-RNasas y todas las SFB/SLF hay ubiquitinación y degradación de las *S*-RNasas no específicas. El escape de la inhibición se debe a una unión no eficiente entre SLF y la *S*-RNasa, ya que a través de ensayos de *pull-down* se observó una mayor unión entre SLF y su *S*-RNasa no específica que entre SLF y su *S*-RNasa específica (Hua y Kao, 2006).

Bajo este modelo en una polinización incompatible en un pistilo  $S_1S_2$  que es polinizado con polen- $S_1$ ,  $SLF_1$  interactuará con la  $S_2$ -RNasa en su dominio común y mediará específicamente su ubiquitinación y degradación por medio del proteosoma 26S; sin embargo, con la  $S_1$ -RNasa interactuará preferencialmente a través de su dominio alelo *S*-específico que resulta en un complejo inestable que conllevaría a la no ubiquitinación y subsecuente degradación de la  $S_1$ -RNasa y como consecuencia a la inhibición del crecimiento del TP.

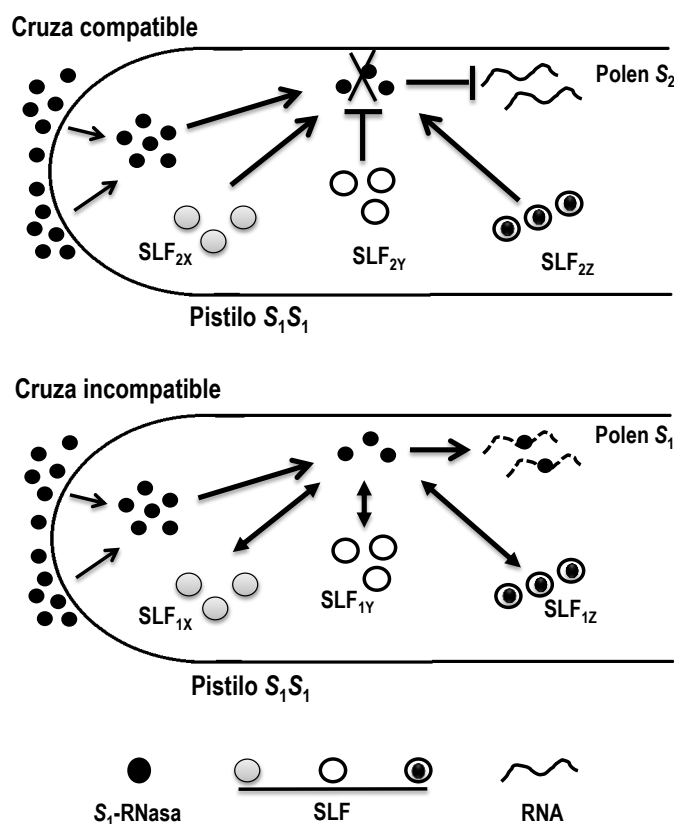
En una polinización compatible en un pistilo  $S_1S_2$  que es polinizado con polen  $S_3$ ,  $SLF_3$  interactuaría fuertemente con ambas *S*-RNasas, a través de su dominio común a todas las *S*-RNasas, permitiendo la ubiquitinación y degradación de ambas *S*-RNasa no específicas y por tanto, la estabilidad del ARN del TP no estaría afectada.

### 3.3.3.2. Modelo colaborativo

En *Petunia*, el factor *S* del polen comprende múltiples tipos de genes *SLF* que colaboran para proveer resistencia a las *S*-RNasas. En el haplotipo *S* el producto de cada tipo de gen *SLF* interacciona con un juego de *S*-RNasas no específicas (Kubo *et al.*, 2010).

En una polinización compatible sólo  $SLF_{2X}$  y  $SLF_{2Z}$  se unen a la  $S_x$ -RNasa previniendo su degradación. En contraste en una polinización incompatible ninguna de los SLFs se unen con su *S*-RNasa específica y el ARN del TP se degrada y por lo tanto se inhibe su crecimiento (Figura 4; Kubo *et al.*, 2010).

Este modelo racionaliza el hallazgo de múltiples genes *SLF* ligados al gen de la *S*-RNasa que resulta en la presencia de uniones variables entre una *S*-RNasa y varias proteínas SLF (Figura 4).



**Figura 4. Modelo colaborativo de la S-RNasa** El panel superior representa una cruce compatible y el inferior una cruce incompatible. El pistilo  $S_1S_1$  es polinizado con polen  $S_2$  (cruza compatible) o con polen  $S_1$  (cruza incompatible). SLF implica múltiples proteínas SLF, derivadas del haplotipo *S*, que colaboran para degradar a la *S*-RNasa. *Cruza compatible*. SLF produce las proteínas  $SLF_{2X}$ ,  $SLF_{2Y}$  y  $SLF_{2Z}$  que interaccionan fuertemente con la  $S_1$ -RNasa permitiendo su ubiquitinación y degradación de la  $S_1$ -RNasa ocasionando la degradación del RNA. *Cruza incompatible*. SLF produce a las proteínas  $SLF_{1X}$ ,  $SLF_{1Y}$  y  $SLF_{1Z}$  que interaccionan de forma inestable con la  $S_1$ -RNasa permitiendo que el RNA del tubo polínico sea degradado y su crecimiento inhibido (Adaptado de McClure *et al.*, 2011).



### 3.3.3.3. Modelo de la compartimentalización de la S-RNasa

Este modelo propone que las S-RNasas ingresan por endocitosis de manera no específica al TP y se alojan dentro de una vacuola, donde quedan fuera del alcance de su sustrato, el ARN del citosol del TP. Este modelo incluye a los GM, 120k y HT-B, como componentes del sistema de rechazo del polen.

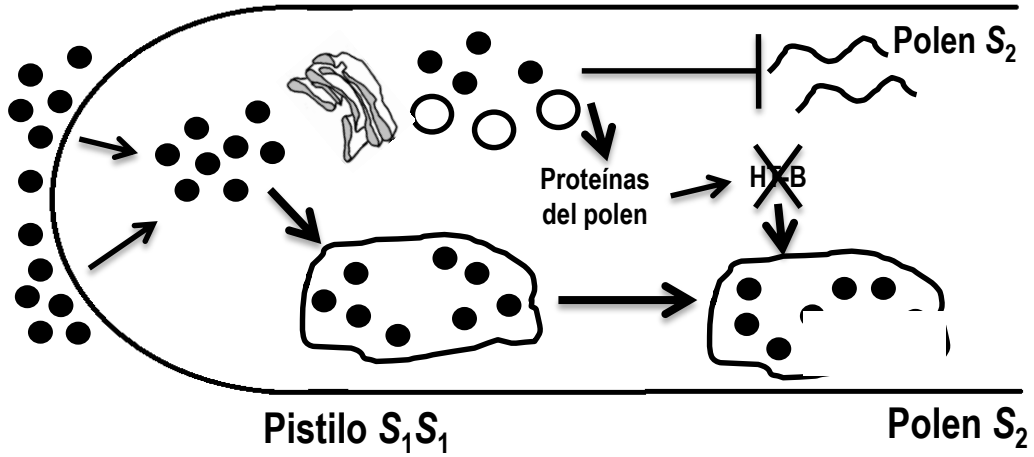
En una cruce compatible, la S-RNasa permanece estable dentro de la vacuola, en donde no puede llevar a cabo su efecto citotóxico. En un pistilo  $S_1S_1$  que es polinizado por polen  $S_2$ , el rechazo se evita debido a que la  $S_1$ -RNasa permanece secuestrada en la vacuola del TP, como consecuencia de la degradación de HT-B en el TP.

En una cruce incompatible, tanto HT-B como las S-RNasa son incorporados a los TPs, sin embargo la interacción específica entre SLF y la S-RNasa estabiliza a HT-B resulta en el rompimiento de la vacuola y la liberación de la S-RNasa al citoplasma en donde degrada el ARN e inhibe el crecimiento del TP. Es decir, en un pistilo  $S_1S_1$  polinizado con polen  $S_1$ , las vacuolas que contienen a las S-RNasas se romperán entre las 16 y 36 h después de la polinización como respuesta a la interacción haplotipo  $S$ -específica.

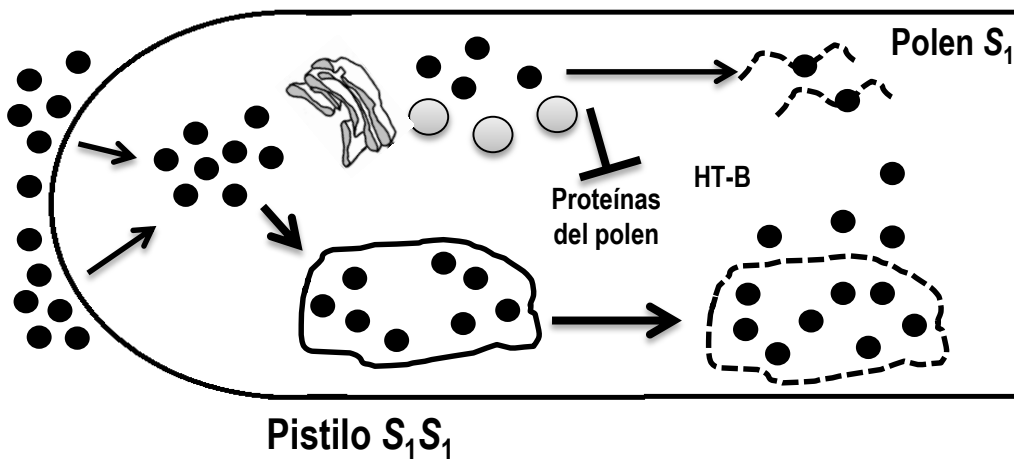
La interacción haplotipo específica o haplotipo inespecífica entre la S-RNasa y SLF debe ocurrir en el citoplasma del TP, ya que las evidencias señalan a SLF como una proteína soluble asociada al retículo endoplásmico (Wang y Xue, 2005); sin embargo, esto no es consistente con el hecho de que la S-RNasa es secuestrada en un compartimento vacuolar. Para explicar esta contradicción, McClure (2006) propone que la S-RNasa, al igual que la toxina ricina, puede seguir un transporte retrógrado. En este caso la S-RNasa entra al citoplasma y es llevada a las vacuolas, pero una porción de ella es transportado retrógradamente a través de la red endosomal hasta llegar a los dictiosomas y de ahí al retículo endoplásmico, de donde puede salir vía el canal SEC61 y puede ser sujeto a la vía de degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico, de tal forma que la S-RNasa en el citosol podría interactuar con SLF.

La compartimentalización de la S-RNasa se observa tanto en TPs compatibles e incompatibles como en pistilos con HT-B y 120K silenciadas y en pistilos con el factor *4936* defectuoso (Goldraj *et al.*, 2006). Estas evidencias señalan que el rompimiento de la vacuola no depende sólo de la interacción entre la determinante del polen y la S-RNasa, sino además requiere de factores adicionales del pistilo. HT-B es de particular interés ya que su estabilidad se requiere para que se dé la respuesta de incompatibilidad, y esta estabilidad depende de la interacción específica entre las determinantes (Figura 5).

### Cruza compatible



### Cruza incompatible



**Figura 5. Modelo de la compartimentalización de la S-RNasa.** El panel superior representa una cruce compatible y el inferior una cruce incompatible. El pistilo  $S_1S_1$  es polinizado con polen  $S_2$  (cruza compatible) o con polen  $S_1$  (cruza incompatible). *Cruza compatible.* La  $S_1$ -RNasa es ingresada al tubo polínico por endocitosis y conducida a una vacuola; sin embargo, una parte sigue un camino retrogrado hacia el retículo endoplásmico donde una porción se escapa al citoplasma donde interacciona con  $SLF_1$  ocasionando la degradación de HT-B (por una vía no conocida) y la estabilidad de la vacuola, manteniendo la  $S$ -RNasa secuestrada. *Cruza incompatible.* La  $S_1$ -RNasa al interaccionar con  $SLF_1$  permite la estabilidad de HT-B que conlleva a la degradación de la vacuola y la liberación de la  $S_1$ -RNasa al citoplasma donde degrada al ARN del tubo polínico e inhibe su crecimiento (Adaptado de McClure *et al.*, 2011).

### 3.4. Sistema de incompatibilidad interespecífica

Estudios en Solanaceae (Chetelat y De Verna, 1991) y en Brassicaceae (Hiscock y Dickinson, 1993) han implicado al locus *S* en el rechazo interespecífico del polen. Estudios genéticos apoyan la hipótesis de que el locus *S* previene la autopolinización entre individuos de la misma especie y además actúa restringiendo el entrecruzamiento a nivel interespecífico.

El rechazo del polen interespecífico en el género *Nicotiana* se presenta por múltiples vías (Murfett *et al.*, 1996). Murfett y colaboradores (1996) realizaron un estudio detallado de polinizaciones en plantas transgénicas expresando a la *S*<sub>A2</sub>-RNasa en especies de *Nicotiana* tanto en un entorno AC como AI. Los resultados de su trabajo demuestran que el rechazo interespecífico del polen en *Nicotiana* sigue tres vías distintas: una vía independiente de S-RNasas en donde las polinizaciones entre un cultivar AC de *N. alata* rechaza el polen de las especies AC de *N. tabacum* y *N. glutinosa*. En esta vía puede estar implicado PELP III (class III Pistil-Extensin-Like Protein por sus siglas en inglés), ya que se ha demostrado su papel en el rechazo interespecífico de *N. obtusifolia* y *N. repanda* en pistilos de *N. tabacum* (Eberle *et al.*, 2013). La segunda vía es dependiente sólo de la S-RNasa en donde la expresión de la *S*<sub>A2</sub>-RNasa en plantas transgénicas AC de *N. tabacum* y *N. plumbaginifolia* adquieren la capacidad de rechazar el polen de *N. tabacum* y de *N. glutinosa* pero no el de *N. plumbaginifolia*. La tercera vía depende tanto de la S-RNasa como de otros factores no ligados al locus *S*. En este caso híbridos entre *N. plumbaginifolia* X AI *N. alata* rechazan el polen de *N. plumbaginifolia*.

#### 4. ANTECEDENTES INMEDIATOS

A pesar de que se han identificado dos GM estilares, uno en *Nicotiana* (120K) y otro en *Nicotiana*, *Solanum* y *Petunia* (HT-B), datos de un análisis genético en una población segregante en plantas AC y AI de *Nicotiana* indican que al menos dos GM estilares adicionales son esenciales para la respuesta de rechazo del polen en *Nicotiana* (Goldraij *et al.*, 2006; Busot, 2009). Asimismo, datos de expresión y de interacción proteína-proteína sugieren que una tiorredoxina h (NaTrxh) en *Nicotiana*, podría ser otro GM, ya que el transcrito de *NaTrxh* se acumula abundantemente en especies AI de *Nicotiana*, y con una baja abundancia en especies AC. Además, NaTrxh interactúa *in vitro* de manera específica con la S-RNasa (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Otro candidato a ser un GM esencial en la incompatibilidad en *Nicotiana* es *NaStEP* (*N. alata* *Stigma* *Expressed* *Protein* por sus siglas en inglés). El cADN de *NaStEP* se recuperó de un tamizado diferencial de bibliotecas de cADN de plantas AC y AI de *Nicotiana*. Su transcrito se detecta de manera abundante sólo en estigmas maduros de especies incompatibles de *Nicotiana*, como *N. alata* y *N. glauca* (Busot *et al.*, 2008, Cisneros, 2010).

*NaStEP* codifica para una proteína ácida con homología a los inhibidores de proteasas tipo Kunitz. Su proteína se localiza abundantemente en las papilas estigmáticas y se acumula en estigmas maduros y después de la polinización. NaStEP es una proteína de alrededor de 25 kDa. Se predice en su secuencia un péptido señal con un sitio de corte entre dos serinas en la posición 24 y 25 (VFS-SS) resultando teóricamente una proteína madura de 24.37 kDa (Busot *et al.*, 2008).

La secuencia de aminoácidos de NaStEP predice, en el extremo amino, una señal de destino vacuolar, NPIVL, de acuerdo con el motivo conservado y degenerado [N/L]-[P/I/L]-[I/P]-[R/N/S] [L/P]. En pistilos no polinizados, NaStEP se localiza asociada a cuerpos proteicos dentro de vacuolas; sin embargo, después de la polinización es liberada dentro del exudado estigmático, aparentemente a través de perforaciones en las paredes celulares de las células de las papilas estigmáticas (Busot *et al.*, 2008).

La expresión de *NaStEP* sólo en el estigma de plantas de *Nicotiana* AI y su presencia en el exudado estigmático, lo hace un excelente gen candidato involucrado en el rechazo del polen en *Nicotiana*, por lo que su silenciamiento en plantas transgénicas permitirá evaluar su participación en el mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen en *Nicotiana*.

## 5. HIPÓTESIS

*NaStEP* es un gen modificador esencial en la vía del rechazo del polen en *Nicotiana*.

## 6. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar si *NaStEP* participa en el rechazo intra e interespecífico del polen en *Nicotiana*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar plantas transgénicas con *NaStEP* silenciado.
2. Evaluar si el silenciamiento de *NaStEP* afecta la expresión de la *S-RNasa*, *HT-B* y *120K*.
3. Evaluar las relaciones de compatibilidad/incompatibilidad en las plantas transgénicas con niveles de *NaStEP* no detectados.
4. Determinar si *NaStEP* contribuye en el rechazo interespecífico del polen en *Nicotiana*.
5. Evaluar la localización subcelular de *NaStEP* en cruzas compatibles e incompatibles.
6. Determinar si *NaStEP* contribuye con el transporte de la *S-RNasa*, *HT-B* y *120K* al tubo polínico.
7. Determinar si existe una interacción genética entre *NaStEP* y genes esenciales en el rechazo del polen como *HT-B*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Material biológico

Se utilizaron pistilos (estigma más estilo) de botones florales en diferentes etapas de desarrollo, flores en antesis y en post-antesis y hojas de *Nicotiana alata* AC [cultivar *Breakthrough* (BT)], *N. tabacum* AC, *N. plumbaginifolia* AC, *N. glauca* AC, *N. longiflora* AC, *N. benthamiana* AC, *N. alata* AI (genotipos  $S_{C10}S_{C10}$ ,  $S_{A2}S_{A2}$  y  $S_{105}S_{105}$ ), *N. rastruensis* AI e híbridos entre *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ . Las plantas se crecieron bajo condiciones de invernadero a 16h luz/8h oscuridad.

### 7.2. Polinizaciones manuales

Para llevar a cabo las polinizaciones manuales, las flores en pre-antesis de las plantas receptoras de polen fueron emasculadas. Dos días después de la emasculación, cuando los estigmas generalmente ya se encuentran receptivos (estado en el que los estigmas están húmedos), se realizaron las polinizaciones. Se usaron flores en antesis sin emasculación como donadoras de polen. Las anteras se colocan sobre el estigma hasta cubrir toda la superficie estigmática con granos de polen.

### 7.3. Silenciamiento de NaStEP en *N. alata* $S_{105}S_{105}$ y *N. alata* $S_{C10}S_{C10}$

Para determinar la función de *NaStEP* en el rechazo del polen en *Nicotiana* se generaron plantas transgénicas de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , en donde se silenció a *NaStEP* mediante la técnica de RNAi. Partiendo de una construcción genética, previamente realizada por Busot (2009), en el vector binario pART 27, que incluyó el promotor constitutivo 35S, *NaStEP* en sentido, una región intergénica, *NaStEP* en antisentido y el terminador NOS. Además, el vector incluía el gen de resistencia a la kanamicina (ver Apéndice III para detalles).

La generación de las plantas transgénicas se llevó a cabo mediante biobalística.

#### 7.3.1. Preparación de partículas de tungsteno

Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno y se cubrieron con 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de ADN plasmídico obtenido del vector binario pART27-*NaStEP*. Con estas partículas se bombardearon los explantes de hoja de *N. plumbaginifolia* para llevar a cabo la transformación a una presión de 8 bar, una distancia de 13 cm y un vacío de 20-21 Hg. Después del bombardeo, los explantes de hoja se mantuvieron en una cámara a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad en medio de

cultivo NAP6. Transcurrida una semana se comenzó la selección de las transformantes por medio de la adición de 150 mg/L de kanamicina en el medio de cultivo NAP6, en donde se transfirieron las hojas bombardeadas. Después de 2 meses de subcultivo los brotes se individualizaron y se colocaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin hormonas y con 150 mg/L de kanamicina. Después de 8 meses de subcultivo las plantas enraizadas se transplantaron a tierra estéril y se crecieron en condiciones de invernadero (ver Apéndice III para detalles).

#### 7.4. Identificación de plantas transgénicas

La identificación de las plantas transgénicas se evaluó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se purificó ADN genómico de 50 plantas usando DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) mediante el protocolo establecido por el proveedor.

El ADN genómico purificado se utilizó como molde para la amplificación del segmento entre el 35S y el intrón, usando los oligonucleótidos: *Forward* 5'AGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACACG3' y *Reverse* 5'CATTCTGCTTCTTCTATTTTCAACTCTCATT3'. La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL (200 ng de ADN genómico, amortiguador de PCR, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, betaína 5%, dNTPs 0.25 mM, mezcla de oligonucleótidos 0.5 µM cada uno, Taq polimerasa y H<sub>2</sub>O) en un termociclador (Gene Amp, PCR System 9700, PE Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 92°C por 5 min, 35 ciclos de temperatura de desnaturalización (92°C) por 1 min, una temperatura de alineamiento de 60°C por 1 min y una temperatura de extensión de 72°C por 1 min. El ADN amplificado se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

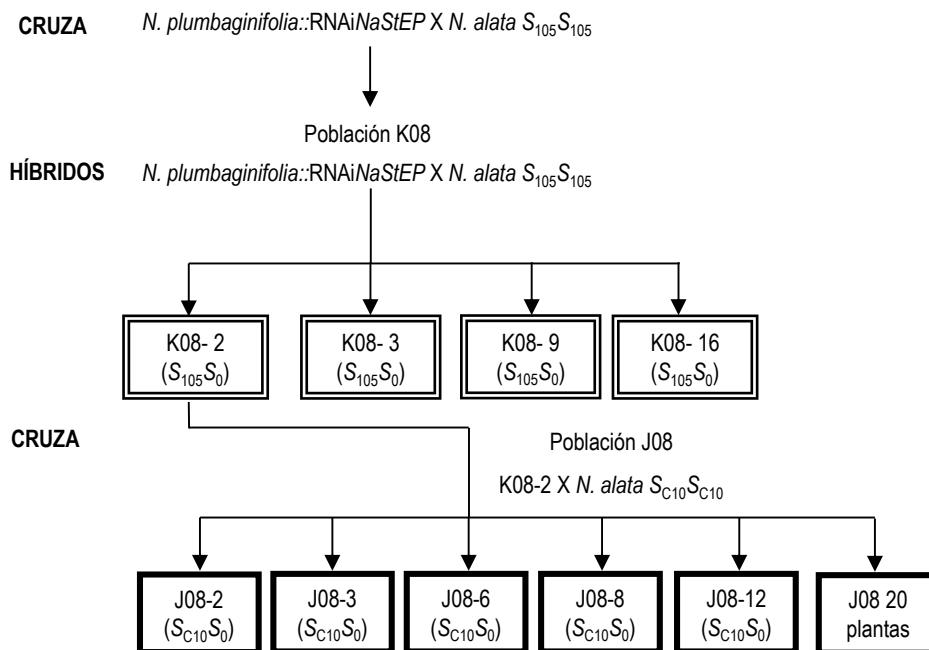
#### 7.5. Generación de híbridos con niveles de NaStEP no detectados

La línea transgénica de *N. plumbaginifolia* portadora del transgen se autopolinizó para obtener la T1 y además se polinizó con *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> AI para generar híbridos de *N. plumbaginifolia*::RNAi NaStEP X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, en donde la expresión de NaStEP se encontrara suprimida. Las semillas obtenidas se germinaron en un medio MS con 150 mg/L de kanamicina para seleccionar sólo las plántulas transgénicas. Se obtuvieron plantas T1 y cuatro plantas de las cruza entre *N. plumbaginifolia*::RNAi NaStEP X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, designados población K08 (plantas 2, 3, 9 y 16; Fig. 6A).

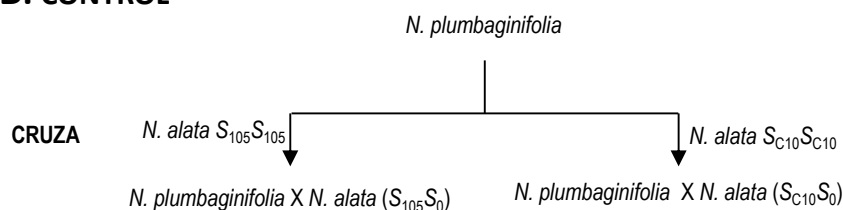
A partir de la planta K08-2 (planta 2 de la población K08) se obtuvo la población J08-2, producto de la cruza entre las plantas K08-2 por *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> AI (Fig. 6A).

Se generaron híbridos no transformados como control positivo entre *N. plumbaginifolia* X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> y *N. plumbaginifolia* X *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> (Fig. 6B).

## A. GENERACIÓN DE HÍBRIDOS TRANSGÉNICOS



## B. CONTROL



**Figura 6. Diagrama de la generación de híbridos transgénicos.** A. Híbridos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> y *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> portadora del transgen para silenciar a NaStEP. B. Generación de híbridos control entre *N. plumbaginifolia* y *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> y *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>.

### 7.6. Expresión de NaStEP en diferentes especies de *Nicotiana* y en plantas con niveles de NaStEP no detectados

Las plantas de *N. longiflora*, *N. glauca*, *N. tabacum*, *N. benthamiana*, *N. plumbaginifolia*, *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>, *N. alata* S<sub>A2</sub>S<sub>A2</sub>, *N. alata* BT, *N. rastruensis*, de la población K08-2, J08 y de los híbridos no transformados se evaluaron en su capacidad de sintetizar a NaStEP, S<sub>C10</sub>-RNasa, 120K y HT-B mediante un ensayo tipo réplica de Western, usando un anticuerpo correspondiente.



### 7.6.1. Extracción de proteína total de pistilos

Para el ensayo de proteínas en la población K08 los pistilos fueron congelados en nitrógeno líquido y cuando se requirió se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta acumular 100 mg de tejido. La extracción de las proteínas totales se realizó pulverizando el tejido congelado en un mortero. El polvo obtenido se agregó en un tubo con 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de extracción de proteína (50mM de Tris pH 8.0, 50mM de NaCl y 1%  $\beta$  mercaptoetanol). Posteriormente, se mezcló perfectamente con un vortex y se clarificó por centrifugación por 10 min a 13,000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se recuperó y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras de proteínas de pistilo de cada una de las plantas se separaron electroforéticamente en un gel SDS-PAGE discontinuo que consiste en un gel apilador a una concentración de acrilamida de 4% y pH de 6.8 y un gel separador a una concentración de acrilamida de 12.5 % y pH de 8.8. Se realizaron geles por duplicado, uno para teñir las proteínas con azul de Coomassie, y otro para transferirlo a una membrana de Immobilon<sup>TM</sup>-P Transfer Membrane con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore) y realizar la inmunodetección por quimioluminiscencia mediante un ensayo tipo réplica de Western de la proteína NaStEP.

Para la población J08 (plantas 2, 2a, 3, 5, 6, 8, 8a, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 25, 27, 29, 30, 34, 36, 40, 41 y 44) los pistilos se pesaron y se les agregó amortiguador de carga (3.75% SDS, 0.05M DTT, 5mM EDTA, 15% sacarosa, 0.0012% azul de bromofenol y 0.15M Tris pH 6.8). Por cada 0.01g de tejido fresco se agrega 100  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga. Los pistilos se maceraron hasta disgregar todo el tejido y se hirvieron por 10 min. Posteriormente, se centrifugaron a 13,000 g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El extracto de proteína total se separó electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 12.5%. Se realizaron geles por duplicado, uno para teñir las proteínas con azul de Coomassie y otro para transferirlo a una membrana y realizar la inmunodetección por un ensayo tipo réplica de Western de la proteína NaStEP. El tiempo de transferencia para NaStEP y  $\text{S}_{\text{C}10}$ -RNasa fue de 45 min, para HT-B de 30 min y de 1 h para 120K a 75 mA.

### 7.6.2. Inmunodetección de NaStEP, $\text{S}_{\text{C}10}$ -RNasa, $\text{S}_{105}$ -RNasa, 120K y HT-B

Para la población K08 y para las diferentes especies de *Nicotiana*, la inmunodetección se realizó por quimioluminiscencia. La membrana se incubó en solución de bloqueo (5% leche en PBS y 0.2% Tween) a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche, la cual se desechó y se agregaron los anticuerpos anti-NaStEP (1:10,000), anti-120K (1:5,000) y anti-HT (1:5,000) y se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS y 0.5% de Tween durante 5 min. Un segundo lavado con PBS, 0.5% de Tween y 0.5 M de NaCl por 5 min. Finalmente, se hizo un tercer lavado con PBS y 0.5% de Tween por 5 min a temperatura

ambiente. Se agregó el anticuerpo secundario (anticuerpo acoplado a la peroxidasa) a una dilución de 1:20,000 que se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con PBS y 0.5% de Tween durante 10 min cada uno a temperatura ambiente y con agitación constante.

Para el revelado de las proteínas se le agregaron 6 ml de la reacción de peroxidasa. La reacción consta de 3 ml de la solución A y 3 ml de la solución B (Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore), se incubó por 5 min y se colocó entre dos acetatos y la película Hyperfilm™ MP (Amersham, Biosciences) del tamaño de la membrana dentro de un casete y se expuso la placa fotográfica por 10 min. La placa fotográfica se reveló sumergiéndola en una solución reveladora (KODAK) inclinando el contenedor suavemente hasta que la señal apareció. Una vez detectada la señal se enjuagó la placa perfectamente con agua y se transfirió a una solución fijadora (KODAK) y se eliminó perfectamente cualquier residuo de la placa.

En el caso de la población J08 la inmunodetección se realizó por fosfatasa alcalina. La membrana se bloqueó en una solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche, se desechó y se agregaron los anticuerpos primario anti-NaStEP (1:15,000), anti- $S_{C10}$ -RNasa (1:5,000), anti- $S_{105}$ -RNasa (1:5,000), anti-120K (1:5,000) y anti-HT-B (1:5,000) y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min cada uno a temperatura ambiente y con agitación constante y se agregó el anticuerpo secundario (anticuerpo acoplado a la fosfatasa alcalina) a una dilución de 1:10,000 con PBS durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación constante. Para el revelado de las proteínas se agregó 10 ml de amortiguador de fosfatasas (100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl pH 9.5) durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación constante y se reveló con una solución de 1% de NBT (33 mg/m), 0.1% BCIP (17 mg/ml) en amortiguador de fosfatasas y se incubaron hasta que apareció la señal púrpura para finalmente parar la reacción con agua y 50mM EDTA (pH 8.0).

#### **7.7. Relaciones de compatibilidad e incompatibilidad en las plantas transgénicas con niveles de NaStEP no detectados**

Para determinar las relaciones de compatibilidad intra e interespecífica en los individuos de la población K08 (plantas 2, 3, 9 y 16) y J08 (plantas 2, 3, 6, 8 y 12) se llevaron a cabo polinizaciones manuales de 72 h con polen de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , *N. plumbaginifolia*, *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *N. glauca*, *N. rastronensis* y *N. longiflora*. Se usaron como controles plantas de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y los híbridos no transformados.

### 7.7.1. Evaluación del crecimiento de tubos polínicos en estilos polinizados mediante su tinción con azul de anilina

Después de 72 h de haber realizado las polinizaciones, los pistilos fueron colectados y se fijaron en una solución de etanol:ácido acético (3:1) por al menos un día. Posteriormente, se aclararon y suavizaron en una solución de sulfito de sodio 10% (p/v) y se colocaron en autoclave por 5 min, después se desechó la solución y se agregó el colorante de azul de anilina, en donde se mantuvieron en obscuridad a 4°C al menos por un día. Los pistilos teñidos se colocaron en un portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos y con los dedos se aplastaron hasta que el tejido se disgregó para ser observados en un microscopio de epifluorescencia (Olympus Provis AX70) en donde se tomaron las microfotografías correspondientes.

### 7.7.2. Producción de frutos en los híbridos transformados

Para evaluar la producción de frutos se realizaron polinizaciones manuales con polen  $S_{105}$  o  $S_{C10}$  en plantas de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , K08-2 y K08-3 e híbridos no transformados. Después de un mes se registró el número de frutos producidos en cada una de las cruzas.

### 7.8. Localización subcelular de NaStEP en pistilos y tubos polínicos en cruzas compatibles e incompatibles

Para determinar la localización subcelular de NaStEP después de polinizaciones compatibles e incompatibles se realizaron ensayos inmunohistoquímicos. Flores en pre-antesis fueron emasculadas. Se realizaron las polinizaciones incompatibles entre *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  por 3, 6, 9, 16 y 36 h, en tanto que las polinizaciones compatibles se realizaron entre *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  por 3, 6, 9, 16 y 36 h. Después de transcurrido el tiempo de la polinización se colectaron y fijaron los pistilos en una solución de paraformaldehído al 4% en amortiguador de PIPES (50mM PIPES, 1mM  $MgCl_2$ , 0.5mM EGTA pH 6.9) y 3% de sacarosa durante 2 h a temperatura ambiente o por 12 h a 4°C. Se realizaron 3 lavados con amortiguador de PIPES durante 10 min cada uno y se deshidrataron los pistilos en una serie gradual de etanoles (10, 25, 35, 50, 70, 96, y 100%) por 30 min en cada uno manteniéndolos en hielo. Posteriormente, se agregó etanol absoluto por 15 min a 37°C. Los pistilos se infiltraron en una mezcla de etanol absoluto-cera de Steedman's wax (Electron Microscopy Sciences) 3:1, 1:1 y 1:3 por 12 h en cada uno a 37°C y finalmente en Steedman's wax pura por 24 h a 37°C. Los pistilos se incluyeron en moldes de plástico con cera Steedman's wax líquida, para lo cual el tejido se orientó con ayuda de una aguja de disección. Los bloques obtenidos se montaron en pedazos de madera y se realizaron cortes de 5-8  $\mu m$  de grosor en un microtomo de rotación. Los cortes se

colocaron en un baño de flotación con agua destilada a temperatura ambiente y se capturaron en portaobjetos que se dejaron secar perfectamente por dos días a temperatura ambiente, antes de guardarlos libres del polvo a 4°C hasta su uso. Para realizar la inmunohistoquímica se eliminó la cera de los cortes en etanol absoluto por 10 min y se repitió tres veces. Después se hidrató el tejido en una serie gradual de etanoles (75, 50, 25%) por 15 min en cada uno y se colocaron las preparaciones en PBS por 15 min. Las preparaciones se secaron con papel filtro o gasa y se marcaron alrededor de los cortes con un plumón hidrofóbico (PAN-PEN, SIGMA) antes de colocarlas en una cámara húmeda y de aplicar 100 µl de solución de bloqueo (5% BSA, 5% de normal goat serum, 0.1% *cold water fish gelatin* y 0.1% de azida de sodio) por cada preparación y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con agitación. Después de eliminar la solución de bloqueo se colocó el anticuerpo primario policlonal hecho en conejo anti-NaStEP (1:2000) y se incubó por 2 h a temperatura ambiente con agitación. Transcurrido el tiempo, se lavó 3 veces con PBS por 10 min cada uno con agitación y se aplicó el anticuerpo secundario (ALEXA Anti-rabbit 488) en una dilución 1:100 y se incubó por 2 h a temperatura ambiente con agitación y en oscuridad. Se lavó tres veces con PBS por 10 min en oscuridad. Finalmente, se incubó con el fluorocromo de azul de anilina por 20 min a temperatura ambiente, con agitación y en oscuridad y se montaron con 0.01% de p-phenyleneamine en 50% de glicerol en PBS. Las preparaciones se guardaron a 4°C en oscuridad. Las observaciones se realizaron en un microscopio ZEISS LSM 510 META.

Para las observaciones de NaStEP en estigmas de pistilos en antesis de *N. alata* BT se siguió el mismo protocolo, pero sólo se utilizó el anticuerpo anti-NaStEP. Las muestras fueron observadas en un microscopio Olympus FV1000.

Para determinar la localización subcelular de NaStEP en el interior de los TPs después de una cruz incompatible se realizaron polinizaciones entre *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  por 9 h. Los pistilos se fijaron y se procesaron para realizar inmunohistoquímicas como se describió anteriormente. Una vez obtenidos los cortes de los pistilos y que éstos fueron hidratados hasta llegar a PBS se realizó lo siguiente para el triple marcaje, utilizando un anticuerpo monoclonal (anti-calosa) y dos anticuerpos policlonales hechos en conejo: anti-NaStEP y anti-vPPasa o anti v-ATPasa. Las preparaciones se colocaron en una cámara húmeda y se aplicaron 100 µl de solución de bloqueo (10% BSA en PBS) por cada preparación y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, se eliminó la solución de bloqueo y se colocó el anticuerpo primario anti-vPPasa a una dilución 1:200 o v-ATPasa (1:50) y se incubó toda la noche a 4°C. Se lavaron 5 veces con PBS por 10 min cada uno con agitación, y se aplicó el anticuerpo secundario anti conejo (ALEXA 633) en una dilución 1:100 y se incubó por 4 h a temperatura ambiente en oscuridad. Es importante mencionar que el resto del procesamiento se realizó en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se lavó 5 veces con PBS por 10 min cada uno. Los cortes fueron fijados nuevamente con 4% de formaldehído en PBS por 1h y se bloquearon con

solución de bloqueo por 45 min. Después se eliminó la solución de bloqueo y se colocaron los anticuerpos primarios anti-NaStEP (1:2000) y anti-calosa (1:1000) y se incubaron toda la noche a 4°C. Se lavaron 5 veces con PBS por 10 min cada uno con agitación y se aplicaron los anticuerpos secundarios ALEXA 488 (anti-conejo) y ALEXA 568 (anti-ratón) en una dilución 1:100 y se incubaron por 4 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron 5 veces con PBS por 10 min cada uno y se montaron con medio de montaje (SIGMA.) Las observaciones se realizaron en un microscopio confocal Olympus FV1000.

### 7.9. Papel de NaStEP en el transporte de la S-RNasa, HT-B y 120K

Para determinar si NaStEP participaba en el transporte de proteínas involucradas en el rechazo del polen, se realizaron polinizaciones en pistilos de las plantas K08-2 y K08-3 con polen  $S_{105}$  y  $S_{C10}$  por 16 h. Se usó como control pistilos de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ . Los pistilos polinizados se procesaron para ser incluidos en cera Steedman' wax como se describió anteriormente. Las secciones del tejido obtenidas se utilizaron para hacer inmunolocalizaciones dobles usando los anticuerpos anti-calosa (1:1000), anti-HT-B (1:2000), anti-120K (1:1000) y anti- $S_{105}$ -RNasa (1:1000). El anticuerpo secundario para la calosa fue Alexa 568 y para las tres proteínas restantes Alexa 488 a una dilución de 1:200. Las observaciones se realizaron en un microscopio confocal Olympus FV1000.

### 7.10. Papel de NaStEP en la estabilidad de HT-B

La función de NaStEP como estabilizador de la proteína HT-B en el interior de los TPs se determinó mediante ensayos tipo réplica de Western e inmunohistoquímicas.

Pistilos emasculados de *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y de la planta J08-2 fueron densamente polinizados con polen de *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  por 16, 36 y 72 h. Los estilos se procesaron como se mencionó y se obtuvieron las proteínas de la forma antes descritas. Las proteínas se separaron electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 15%. Los geles se transfirieron a una membrana y se realizó la inmunodetección de la proteína HT-B (1:5000) y de la  $S_{C10}$ -RNasa (1:5000) mediante la técnica de fosfatasa alcalina.

Para llevar a cabo las pruebas inmunohistoquímicas se realizaron polinizaciones compatibles e incompatibles de 16 y 36 h. Las cruza incompatibles fueron entre K08-2 X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y como control *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y las cruza compatibles entre K08-2 X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ . Para la inmunolocalización de HT-B en TPs, los pistilos polinizados fueron fijados y procesados para realizar la inmunohistoquímica de la forma antes mencionada, utilizando los anticuerpos primarios anti-calosa y anti-HT-B. De cada una de los cruza se realizaron tres réplicas las cuales permitieron cuantificar el número de TPs que

mostraban una señal que cubría más del 60% del interior del TP (alta tinción) y en donde la señal era casi nula (baja o ausencia de tinción). La señal de HT-B en el interior de los TP se analizó estadísticamente mediante una ANOVA y comparación de medias de Tukey a una  $p \geq 0.05$ .

#### 7.11. Amplificación de *NaStEP* en especies compatibles e incompatibles

Para determinar si tanto las especies AC y AI contienen el gen de *NaStEP* se purificó ADN genómico siguiendo el protocolo antes mencionado y se amplificó mediante un PCR usando los oligonucleótidos: forward 5'CTCTGGATCCATGCCCACTACTACTGATGATGA 3' y reverse 5'CGCGGAATTCCTAGGTTACCACAAACCTAA 3'. Las condiciones usadas para la amplificación fueron las señaladas anteriormente. El producto de PCR se separó electroforéticamente como se mencionó anteriormente.

#### 7.12 Determinación del transcrito de *NaStEP* en especies compatibles e incompatibles

Para determinar si el transcrito de *NaStEP* se encontraba presente en especies AC y AI se realizó un ensayo tipo réplica de Northern. El ARN total fue extraído de pistilos de especies AC y AI. El tejido colectado (200mg) fue pulverizado usando  $N_2$  líquido y se adicionó 1 ml de Trizol (INVITROGEN) y se homogeneizó con vortex. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 g durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se incubó a 30°C durante 30 min. Posteriormente se le adicionó 150  $\mu$ l de cloroformo y se agitó durante 15 seg vigorosamente. La mezcla se incubó a 30°C durante 2 h y se centrifugó a 13,000 g durante 15 min. Se recuperó la fase acuosa a la cual se le agregó 350  $\mu$ l de isopropanol frío, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 13,000 g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con etanol al 70%. El botón seco fue resuspendido en  $H_2O$  tratada con 0.043% de DEPC. La concentración del ARN total de todas las muestras se ajustaron a 5  $\mu$ g/ $\mu$ l. Las muestras se desnaturalizaron por 2-3 min a 90°C y se conservaron a -80°C hasta su uso. El ARN total fue separado en un gel de formaldehído agarosa al 2%, 1.11% de formaldehído y 1X de MOPS (0.02M de MOPS, pH 7). La separación electroforética se llevó a cabo a 60 volt por 1 h. El ARN separado electroforéticamente se transfirió a una membrana Hybond N<sup>+</sup> (Amersham) y se unió covalentemente. Las membranas se tiñeron con azul de metileno para corroborar el cargado de las muestras. Los filtros fueron bloqueados con la solución de hibridación (0.3 M amortiguador de fosfato de sodio pH 7.2, 7% SDS y 1 mM EDTA pH 8) por una hora a 68°C y con agitación suave. La solución se desechó y se adicionó 10 ml de la solución de hibridación con la sonda de cADN [<sup>32</sup>P] de *NaStEP* y se incubó durante toda la noche a 68°C con agitación suave. Posteriormente los filtros fueron lavados con una solución de 0.4X SSC y 0.1% SSD por 15 min dos veces y otros dos lavados más astringentes con 0.1 X SSC y 0.1% SDS

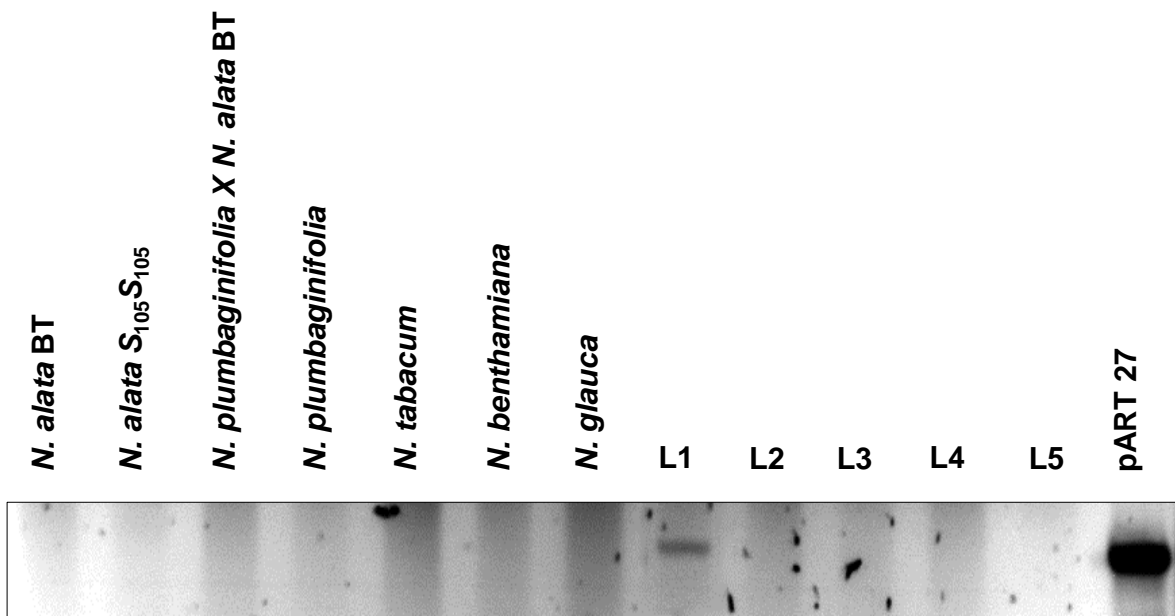
por 15 min. Todos los lavados se desarrollaron a 68°C. Las señales fueron detectadas usando películas autoradiográficas. Los filtros se colocaron en un casete y fueron expuestas con una película de rayos X por 72 h a -80°C.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Silenciamiento de NaStEP en *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> y *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>

La función de *NaStEP* en la vía bioquímica del rechazo del polen en *Nicotiana* se evaluó mediante su silenciamiento en plantas transgénicas de *Nicotiana*. Para este fin, plantas de *N. plumbaginifolia* se transformaron por biobalística con la construcción de RNAi-*NaStEP* bajo el promotor CAM 35S.

Se seleccionaron alrededor de 50 líneas independientes de *N. plumbaginifolia*::RNAi *NaStEP* por medio de cultivo de tejidos vegetales. La corroboración de la inserción del transgen en estas plantas se realizó por medio de PCR, usando los oligonucleótidos diseñados para amplificar una región que abarca desde el promotor CAM 35S hasta el intrón. De las plantas analizadas sólo fue posible amplificar el fragmento de ADN para una de las 50 líneas (Figura 7). La línea transgénica que dió positiva se le denominó línea 1 (L1). La amplificación de esta región también fue probada en diferentes especies y en el híbrido no transformado de *N. plumbaginifolia* X *N. alata* BT, sin obtener señal de amplificación del transgen en ninguna de ellas (Figura 7).

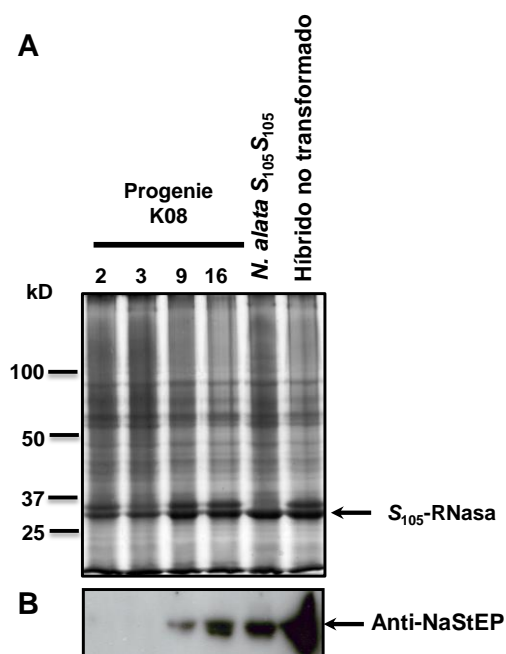


**Figura 7.** Amplificación por PCR de la región correspondiente a la región que abarca desde el promotor CAM 35S y el intrón del vector pART27 en diferentes especies de *Nicotiana* y en algunas líneas independientes de *N. plumbaginifolia*::RNAi-*NaStEP*, dando sólo como positiva la línea L1. El control positivo fue el plásmido que contenía la construcción CAM 35S-*NaStEP*-intron-*NaStEP* en antisentido.



Una vez corroborada la presencia del transgen en la línea L1 de *N.plumbaginifolia*, esta planta se cruzó con la planta AI de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  con la finalidad de suprimir la expresión de NaStEP en un entorno genético de incompatibilidad (Figura 6A). A partir de la cruce de la línea L1 con *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  se obtuvo la progenie K08 (K08-2, K08-3, K08-9 y K08-16) todas con el genotipos  $S_{105}S_0$ , ( $S_0$  significa un alelo S nulo). Además, se generó un híbrido control no transformado entre *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , en donde la presencia de NaStEP es muy abundante (Figuras 8).

La expresión de NaStEP se evaluó mediante un ensayo tipo réplica de Western usando proteína total de pistilos de individuos de la población K08, *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y del híbrido no transformado (*N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ ). De las plantas en la población K08, NaStEP fue detectada en las plantas K08-9 y K08-16 pero no en las plantas K08-2 y K08-3, lo que indica un buen nivel de supresión de NaStEP. La señal de NaStEP en la planta K08-9 fue reducida mientras que en la planta K08-16 se observó una señal equivalente a la planta control *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  (Figura 8). De manera notable se observa en esta figura que los niveles de la  $S_{105}$ -RNasa son similares tanto en las plantas con niveles de NaStEP no detectados (K08-2 y K08-3) como en aquellas donde es posible detectar cantidades de NaStEP (K08-9 y K08-16).

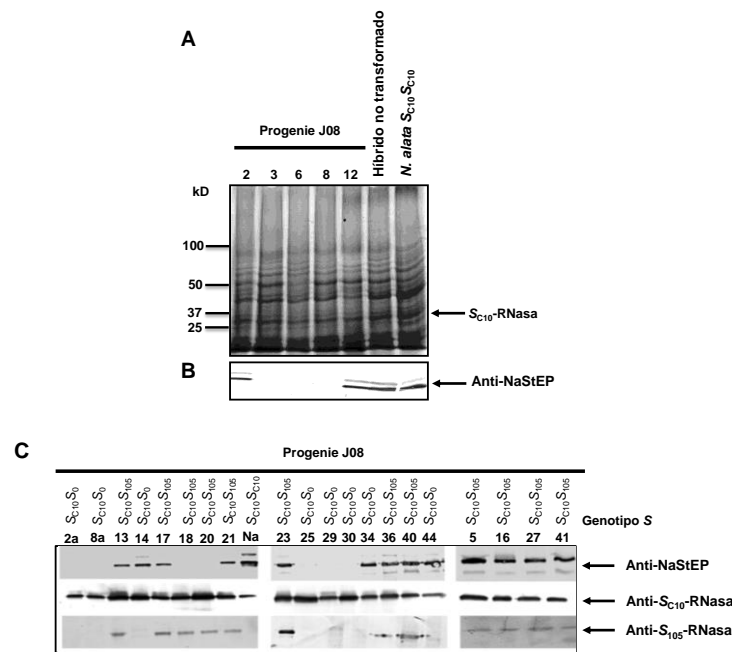


**Figura 8. Análisis de la expresión de NaStEP en la población K08 ( $S_{105}S_0$ ).**

**A.** Extractos proteicos totales de pistilos fueron fraccionados electroforéticamente (SDS-PAGE) y el gel teñido con azul de Coomassie.

**B.** Inmunodetección de NaStEP (Anti-NaStEP 1:10000). Señal de NaStEP en las líneas K08-9 y K08-16. Control positivo *N.alata* $S_{105}S_{105}$  e híbrido no transformado (*N. plumbaginifolia* X *N. alata* $S_{105}S_{105}$ ).

Con el propósito de determinar que el transgen *RNAi-NaStEP* mantuviera una inserción estable en el genoma de los híbridos transgénicos y tenerlo en un entorno genético diferente, el híbrido K08-2 se cruzó con AI *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , generándose una progenie de 25 plantas, cuya población se denominó J08 y estuvo constituida por las plantas J08-2, J08-2a, J08-3, J08-5, J08-6, J08-8, J08-8a, J08-12, J08-13, J08-14, J08-16, J08-17, J08-18, J08-20, J08-21, J08-23, J08-25, J08-27, J08-29, J08-30, J08-34, J08-36, J08-40, J08-41 y J08-44 (Figura 6A). A todos estos individuos se les evaluó la expresión de NaStEP por un ensayo tipo réplica de Western. En 10 plantas de esta progenie no se detectó a NaStEP (J08-2a, J08-3, J08-6, J08-8, J08-8a, J08-18, J08-20, J08-25, J08-29 y J08-30), mientras que en las 15 restantes NaStEP presenta niveles normales y similares al control de *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  (J08-2, J08-5, J08-12, J08-13, J08-14, J08-16, J08-17, J08-21, J08-23, J08-27, J08-34, J08-36, J08-40, J08-41 y J08-44; Figuras 9A-C). El genotipo *S* asociado a las plantas de la población *S* fue evaluado. Las plantas 2a, 8a, 14, 25, 29, 30, 34 y 44 tienen un genotipo  $S_{C10}S_0$ , mientras que las plantas 5, 13, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 27, 36, 40 y 41 son  $S_{C10}S_{105}$ .



**Figura 9. Análisis de la expresión de NaStEP en la población J08.**

**A.** Extractos proteicos totales de pistilos fueron fraccionados electroforéticamente (SDS-PAGE) y los geles teñidos con azul de Coomassie.

**B-C.** Inmuno-detección de NaStEP (anti-NaStEP1:10000),  $S_{C10}$ -RNasa (anti-  $S_{C10}$ -RNasa 1:5000) y  $S_{105}$ -RNasa (anti- $S_{105}$ -RNasa 1:5000). **B.** Señal de NaStEP no detectada en las líneas J08-3 ( $S_{C10}S_0$ ), J08-6 ( $S_{C10}S_0$ ) y J08-8( $S_{C10}S_0$ ). Las líneas J08-2 ( $S_{C10}S_0$ ) y J08-12 ( $S_{C10}S_0$ ) con una expresión similar a *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y al híbrido no transformado (*N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ ). **C.** Individuos de la población J08, de los cuales 7 individuos no presentan señal de NaStEP (J08-2a, J08-8a, J08-18, J08-20, J08-25, J08-29 y J08-30), el resto con una señal similar a *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ .

## 8.2. NaStEP no afecta la expresión de $S_{105}$ -RNasa, $S_{C10}$ -RNasa, 120K y HT-B

Para comprobar si el efecto del silenciamiento fue específico para NaStEP y para determinar si NaStEP interfería con la expresión de otras proteínas del pistilo involucradas en el rechazo del polen, se evaluó la cantidad de 120K, HT-B y la S-RNasa en las poblaciones K08 y J08 por medio de un inmunoanálisis. Las plantas de la población K08 (plantas 2, 3, 9 y 16) y J08 (plantas 2, 3, 6, 8 y 12) se utilizaron para probar la expresión de estas proteínas (Figura 10). La  $S_{105}$ -RNasa muestra una señal ligeramente disminuida en la población K08 con respecto al control positivo *N. alata* $S_{105}S_{105}$  y al híbrido no transformado *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ ; sin embargo, HT-B muestra una señal similar en la plantas de la población K08 analizadas con respecto al control y al híbrido no transformado y 120K presentó una acumulación variable (Figuras 10 A-B). Las plantas de la población J08 muestran una acumulación similar al control *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y al híbrido no transformado *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  para la  $S_{C10}$ -RNasa, HT-B y 120K (Figuras 10 C-D).

Estos resultados demuestran que NaStEP no se encuentra en la vía de regulación de la expresión de la S-RNasa, HT-B y 120K.

## 8.3. NaStEP es un gen modificador que participa en el rechazo del polen en *Nicotiana*

Para evaluar la función la de NaStEP en la vía del rechazo del polen en *Nicotiana* se realizaron cruza compatibles con polen- $S_{C10}$  e incompatibles con polen- $S_{105}$  para las plantas de la población K08 (plantas 2, 3, 9 y 16; con genotipos  $S_{105}S_0$ ). Para la población J08 (plantas 2, 3, 9 y 16; genotipos  $S_{C10}S_0$ ) se usó polen- $S_{C10}$  para una cruce incompatible y polen- $S_{105}$  para una cruce compatible. Aplastados de pistilos polinizados por 72 h se tiñeron con azul de anilina para la observación del crecimiento de los TPs. Pistilos con TPs en su base muestran una cruce compatible, mientras que los tubos detenidos en el estigma y primer tercio del estilo muestran una cruce incompatible y por lo tanto la ausencia de TPs en la base del estilo indica una cruce incompatible.

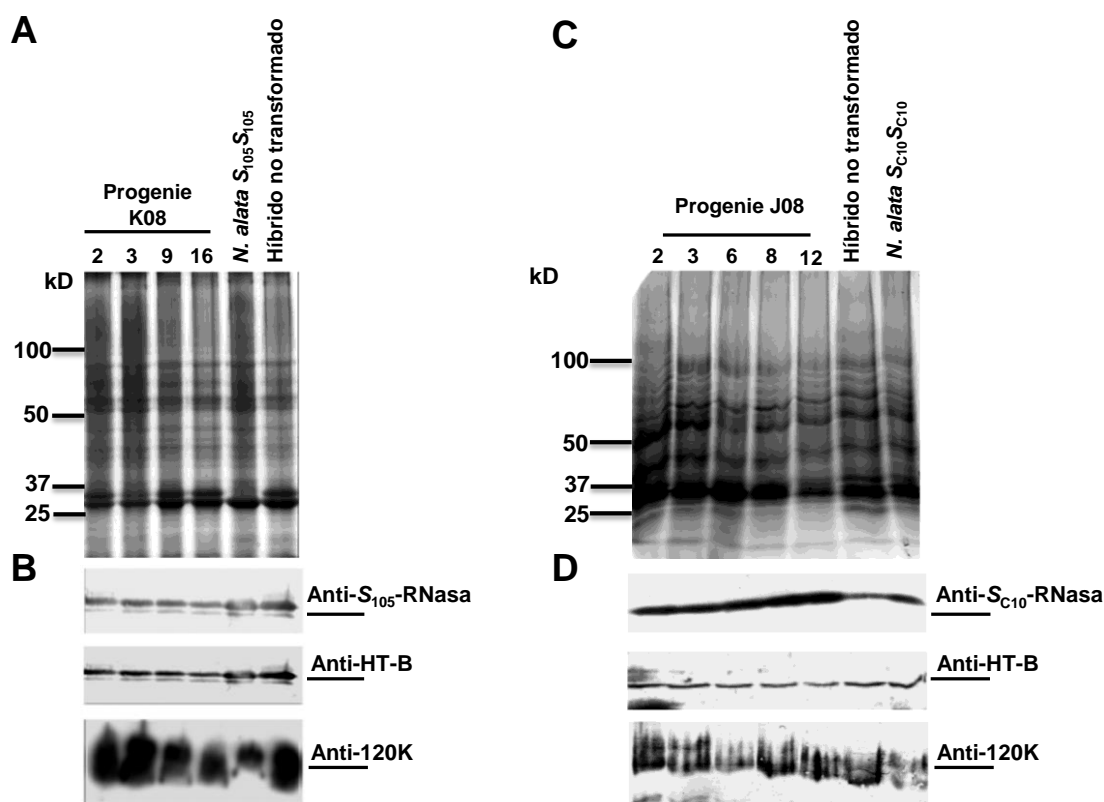
Una cruce incompatible entre *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y entre el híbrido no transformado (*N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ ) X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  no muestran TPs en la base del estilo, ya que el crecimiento del 80% de los TPs se detiene en el estigma y el resto de ellos en el primer tercio del estilo (Figura 11). Sin embargo, en una cruce compatible entre *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y del híbrido no transformado  $S_{105}S_0$  con polen- $S_{C10}$  se observa una gran cantidad de TPs en la base del estilo (Figura 11).

En el caso de las plantas K08-2 ( $S_{105}S_0$ ) y K08-3 ( $S_{105}S_0$ ) tanto en la cruce incompatible con polen- $S_{105}$  como en la compatible con polen- $S_{C10}$ , muestran el crecimiento de los TPs hasta la base del

estilo (Figura 11), lo cual implica que el silenciamiento de NaStEP abate la capacidad de rechazar el polen de manera haplotipo *S* específica.

En la planta K08-9 (*S*<sub>105</sub>*S*<sub>0</sub>), en donde la acumulación de NaStEP disminuye, algunos TPs alcanzan la base del estilo en una cruz incompatible (polen-*S*<sub>105</sub>; Figura 11). Sin embargo, en la planta K08-16, en donde el nivel de expresión es similar al control, un número muy reducido de TPs alcanzan a la base del estilo (Figura 11).

Estos resultados señalan que la respuesta del rechazo del polen que está mediando NaStEP es dosis dependiente y que en ausencia de NaStEP no existe respuesta.



**Figura 10. Análisis de la expresión de la *S*<sub>105</sub>-RNasa, *S*<sub>C10</sub>-RNasa, HT-B y 120K en la población K08 y J08.**

**A-B.** Extracto total de proteínas de pistilo de la población K08 (plantas 2, 3, 9 y 16) fueron separadas electroforéticamente (SDS-PAGE) y los gels teñidos con azul de Coomassie o transferidos a una membrana para la inmunodetección de la *S*<sub>105</sub>-RNasa (anti-*S*<sub>105</sub>-RNasa 1:5000), HT-B (anti-HT-B 1:5000) y 120K (anti-120K 1:5000). **A.** Extracto proteico total de pistilo teñido con azul de Coomassie. **B.** Inmunodetección de *S*<sub>105</sub>-RNasa, HT-B y 120K. **C-D.** Extracto total de proteínas de pistilo de la población J08 (plantas 2, 3, 6, 8 y 12) fueron separadas electroforéticamente (SDS-PAGE) y los gels teñidos con azul de Coomassie o transferidos a una membrana para la inmunodetección de la *S*<sub>C10</sub>-RNasa (anti-*S*<sub>C10</sub>-RNasa 1:5000), HT-B (anti-HT-B 1:5000) y 120K (anti-120K 1:5000). **C.** Extracto proteico total de pistilo teñido con azul de Coomassie. **D.** Inmunodetección de *S*<sub>105</sub>-RNasa, HT-B y 120K.

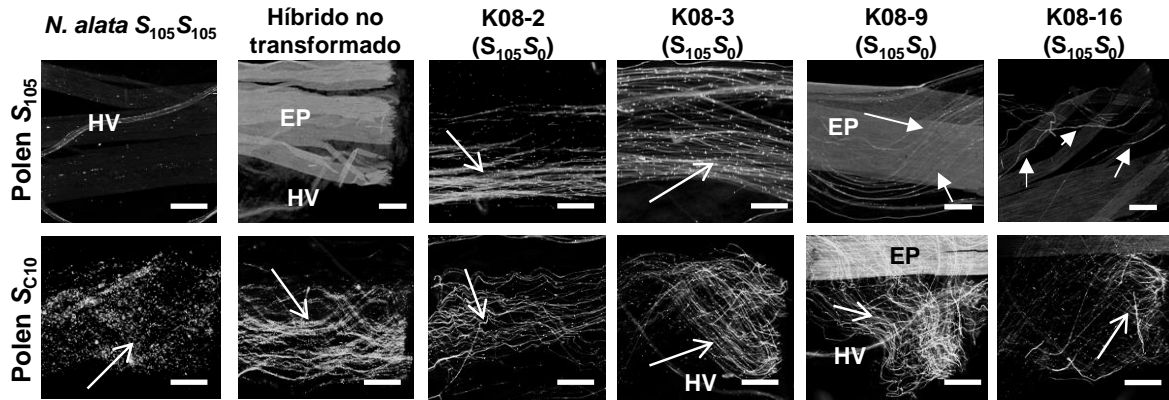


Figura 11. Evaluación de las relaciones de compatibilidad en las plantas de la población K08 con niveles de NaStEP no detectados (*N. plumbaginifolia*-RNAi NaStEP X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>). Aplastados de pistilos polinizados por 72 h, teñidos con azul de anilina y observados por microscopia de fluorescencia se utilizaron para evaluar el crecimiento de tubos polínicos en cruza compatibles e incompatibles. Los tubos polínicos se distinguen por la presencia de tapones de calosa (marcados con una flecha). En una cruz incompatible en *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> y en el híbrido no transformado (*N. plumbaginifolia* X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>) no se observan tubos polínicos en la base del estilo. En las plantas K08-2 (S<sub>105</sub>S<sub>0</sub>) y K08-3 (S<sub>105</sub>S<sub>0</sub>) los tubos polínicos alcanzan la base del estilo después de una cruz compatible (polen-Sc<sub>10</sub>) e incompatible (polen-S<sub>105</sub>). En las plantas K08-9 (S<sub>105</sub>S<sub>0</sub>) y K08-16 (S<sub>105</sub>S<sub>0</sub>) algunos tubos polínicos alcanzan la base del estilo después de una cruz incompatible. EP-epidermis, HV-haz vascular. Barras=50μm.

La cruz de *N. plumbaginifolia* X *N. alata* por naturaleza produce híbridos estériles, ya que *N. plumbaginifolia* tiene 10 cromosomas y *N. alata* 9 en su estado haploide (Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, en algunas ocasiones la regeneración por cultivo de tejidos genera híbridos fértiles. En este caso las plantas K08-2 y K08-3 se volvieron fértiles para la parte femenina, aunque los granos de polen fueron infértiles. Esta ganancia de fertilidad se utilizó para generar frutos que corroboraron el cambio de fenotipo en las plantas K08-2 (S<sub>105</sub>S<sub>0</sub>) y K08-3 (S<sub>105</sub>S<sub>0</sub>), usándolas como aceptoras de polen para cruza compatibles con polen-Sc<sub>10</sub> e incompatibles con polen-S<sub>105</sub> (Tabla 1). Las plantas con niveles de NaStEP no detectadas (plantas K08-2 y K08-3) pierden la capacidad de reconocer y rechazar el polen incompatible (polen-S<sub>105</sub>) y en ambos casos para K08-2 y K08-3 las polinizaciones incompatibles permitieron la formación de frutos (15 frutos de 16 polinizaciones y 9 de 10 respectivamente; Tabla 1), lo cual no ocurrió en *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> y en el híbrido no transformado. Las polinizaciones compatibles (polen-Sc<sub>10</sub>) permitieron la formación de frutos (5 frutos de 5 polinizaciones realizados en ambos casos) de forma similar a los obtenidos a partir de una cruz compatible en *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> (Tabla 1).

En el caso de las plantas K08-9 y K08-16 las polinizaciones tanto compatibles como incompatibles no generaron frutos, por lo que se concluyó que estas plantas son estériles femeninas y masculinos. El mismo caso ocurrió con el híbrido control no transformado en donde no se generaron frutos después de las polinizaciones (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cuantificación de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo y producción de frutos en cruzas compatibles e incompatibles.

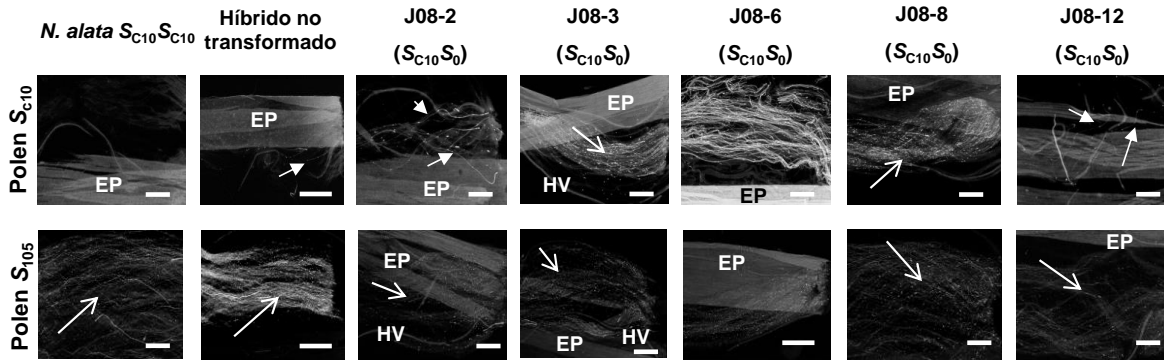
PISTILO		<i>N. alata</i> $S_{105}S_{105}$	Híbrido no transformado	K08-2 ( $S_{105}S_0$ )	K08-3 ( $S_{105}S_0$ )	K08-9 ( $S_{105}S_0$ )	K08-16 ( $S_{105}S_0$ )
POLEN	$S_{105}$	Polinizaciones	-,-,-	+,,+,+,+,+,+,+, +,+,+,+,+,+,+,+, +,+, 25, 35	+,,+,+,+,+,+,+, +,+, 20	50, 45, 30, 17, 8	35, 28, 15, 12, 0
		Frutos	AI	E	15/16	9/10	E
$S_{C10}$		Polinizaciones	+,+,+	+,,+,+,+, ~100	+,,+,+,+,+	+,,+,+,+,+	+,,+,+,+,+
		Frutos	5/5	E	5/5	5/5	E

(-) polinización incompatible (TPs que no alcanzan la base del estilo), (+) polinización compatible (TPs incontables que alcanzan la base del estilo), (#) Número de tubos polínicos cuantificables en la base del estilo. Cada signo +, - o el número de TP contados representa una réplica independiente en cada ensayo de polinización. Número de frutos/número de polinizaciones, AI- autoincompatible, E-estéril.

Para corroborar que el cambio de fenotipo se mantenía en todas las plantas con niveles de NaStEP no detectadas, las relaciones de compatibilidad también fueron analizadas en la descendencia JO8. En las plantas JO8-2 ( $S_{C10}S_0$ ) y JO8-12 ( $S_{C10}S_0$ ) después de una polinización incompatible con polen- $S_{C10}$ , sólo un número muy reducido de TPs alcanzaron la base del estilo, número similar al observado para el híbrido no transformado (Figura 12; Tabla 2), lo cual concuerda con el nulo silenciamiento de NaStEP que se obtuvo en estas dos líneas (Figura 9). Para las plantas JO8-3 ( $S_{C10}S_0$ ), JO8-6 ( $S_{C10}S_0$ ) y JO8-8 ( $S_{C10}S_0$ ) hay una gran cantidad de TPs creciendo por el tejido de transmisión del estilo hasta la base del estilo (Figura 12; Tabla 2). Estas plantas (3, 6 y 8), en donde los TPs alcanzaron la base del estilo en altos porcentajes mostraron una supresión total de NaStEP (Figura 9A).

Las cruzas compatibles con polen  $S_{105}$  para los controles (*N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  e híbrido no transformado), así como para las plantas JO8-2 ( $S_{C10}S_0$ ), JO8-3 ( $S_{C10}S_0$ ), JO8-6 ( $S_{C10}S_0$ ), JO8-8 ( $S_{C10}S_0$ ) y JO8-12 ( $S_{C10}S_0$ ) mostraron un gran número de TPs en la base del estilo (Figura 12; Tabla 2).

El cambio de fenotipo de polinización tanto en la población K08 como JO8 demostró el papel de NaStEP en el rechazo del polen en *Nicotiana*.



**Figura 12.** Evaluación de las relaciones de compatibilidad en las plantas de la población J08 con niveles de NaStEP no detectados (K08 X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ ). Aplastados de pistilos polinizados por 72 h, teñidos con azul de anilina y observados por microscopia de fluorescencia se utilizaron para evaluar el crecimiento de tubos polínicos en cruza compatibles e incompatibles. Los tubos polínicos se distinguen por la presencia de tapones de calosa (marcados con una flecha). En una cruz incompatible en *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  no se observan tubos polínicos en la base del estilo. En las plantas J08-3 ( $S_{C10}S_0$ ), J08-6 ( $S_{C10}S_0$ ) y J08-8 ( $S_{C10}S_0$ ) los tubos polínicos alcanzan la base del estilo después de una cruz compatible (polen- $S_{S105}$ ) e incompatible (polen- $S_{C10}$ ). Algunos tubos polínicos alcanzan la base del estilo después de una cruz incompatible en el híbrido no transformado (*N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ ) y en las plantas J08-2 ( $S_{C10}S_0$ ) y J08-12 ( $S_{C10}S_0$ ). EP-epidermis, HV-haz vascular. Barras=50 $\mu$ m.

**Tabla 2.** Cuantificación de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo en cruza compatibles e incompatibles.

PISTILO	<i>N. alata</i> $S_{C10}S_{C10}$	Híbrido no transformado	J08-2 ( $S_{C10}S_0$ )	J08-3 ( $S_{C10}S_0$ )	J08-6 ( $S_{C10}S_0$ )	J08-8 ( $S_{C10}S_0$ )	J08-12 ( $S_{C10}S_0$ )
<b>POLEN</b>							
$S_{105}$	+,+,+	+,+,+	+,+,20	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
$S_{C10}$	-,-,-	-,-,5,	8, 10, 15	+,+,+,	+,+,+,	+,+	9, 5, 3

(-) polinización incompatible (TPs que no alcanzan la base del estilo), (+) polinización compatible (TPs incontables que alcanzan la base del estilo), (#) Número de tubos polínicos cuantificables en la base del estilo. Cada signo +, - o el número de TP contados representa una réplica independiente en cada ensayo de polinización. Número de frutos/número de polinizaciones, AI- autoincompatible, E-estéril.

#### 8.4. Papel de NaStEP en el rechazo interespecífico del polen

El papel del locus *S* en la incompatibilidad no sólo se restringe al rechazo intraespecífico, sino también se ha reportado su papel en el rechazo interespecífico. Para determinar si NaStEP participa en el rechazo del polen interespecífico se realizaron polinizaciones por 72 h. Los pistilos fueron teñidos y se observó el sitio de inhibición del crecimiento de los TPs. Las cruza se realizaron entre las plantas transgénicas K08-2 ( $S_{105}S_0$ ), K08-3( $S_{105}S_0$ ), K08-16 ( $S_{105}S_0$ ), J08-6( $S_{C10}S_0$ )

y como controles se usaron *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , el híbrido entre *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y el híbrido entre *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ . Todas estas plantas se usaron como receptoras de polen; mientras que las plantas donadoras de polen fueron las especies AC de *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum*, *N. benthamiana*, *N. glauca* y la especie AI de *N. raströensis*.

Las polinizaciones realizadas en un entorno genético de la  $S_{105}$ -RNasa (población K08) mostraron que los híbridos con niveles de NaStEP no detectados (K08-2  $S_{105}S_0$  y K08-3  $S_{105}S_0$ ) mantuvieron su función de rechazo del polen de *N. tabacum*, *N. benthamiana* y *N. glauca*, de forma similar a lo que ocurrió en los controles (*N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ ). Sin embargo, las plantas con niveles de NaStEP detectados K08-2( $S_{105}S_0$ ) y K08-3 ( $S_{105}S_0$ ) permitieron el crecimiento de TPs hasta la base del estilo de *N. longiflora*, *N. raströensis* y *N. plumbaginifolia*. En el caso del polen de *N. longiflora* y *N. raströensis* el crecimiento de los TPs hasta la base de estilo se presentó también en *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , en el híbrido *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , no obstante, en la planta K08-16 solo un 60% de los TPs de *N. longiflora* alcanzaron la base del pistilo (Figura 13, Tabla 3).

El polen de *N. plumbaginifolia* en el estigma de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y en el híbrido *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  presentó una tasa media de germinación (mayor al 50%). El crecimiento de estos TPs fue inhibido en el estigma principalmente, llegando a alcanzar algunos TPs el primer tercio del estilo en todas las cruzas, con excepción de las cruzas con las plantas K08-2 y K08-3, en donde los TPs fueron capaces de llegar a la base del estilo (Figura 13, Tabla 3).

Para el caso de las polinizaciones con *N. tabacum* se presentó una tasa de germinación muy baja (aproximadamente del 20%). Los TPs no crecieron más allá del estigma en todas las cruzas probadas (Figura 13, Tabla 3).

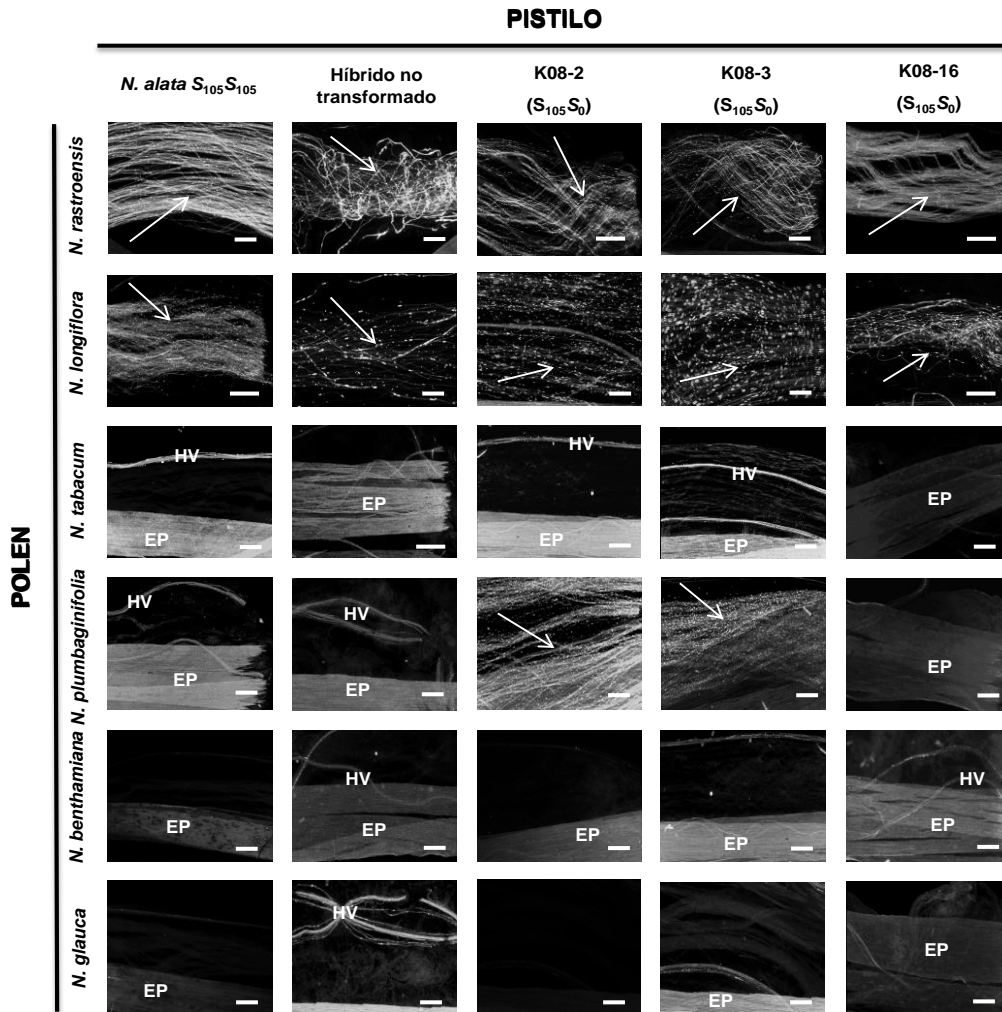
Las cruzas con polen de *N. benthamiana* mostraron que existe un gran porcentaje (aproximadamente del 80%) de granos de polen que no germinan. De los granos de polen que germinan, el crecimiento de los TPS se inhibió en el estigma (Figura 13, Tabla 3).

En el caso de las polinizaciones con polen de *N. glauca*, los granos de polen germinaron y su crecimiento se inhibió en el estigma en *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , mientras que en el híbrido de *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y en las plantas K08-2, K08-3 y K08-16 algunos TPs alcanzaron la mitad del estilo (Figura 13, Tabla 3).

Para el entorno genético de la  $S_{C10}$ -RNasa, en la población J08, sólo el polen de *N. raströensis* fue compatible en las plantas de *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , en el híbrido de *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y la planta J08-6 y el resto de las polinizaciones con polen de *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum*, *N. benthamiana* y *N. glauca* mostraron inhibición del crecimiento de los TPs en *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , en el híbrido de *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y la planta J08-6 (Figura 14, Tabla 4).



Estos datos señalan que en la población K08 ( $S_{105}S_0$ ), NaStEP funciona en el rechazo interespecífico del polen de *N. plumbaginifolia* pero no en el rechazo del polen de las demás especies.



**Figura 13. Evaluación de las relaciones de incompatibilidad interespecífica en las plantas de la población K08 ( $S_{105}S_0$ ) con niveles de NaStEP no detectados.** Aplastados de pistilos polinizados por 72 h, teñidos con azul de anilina y observados por microscopia de fluorescencia se utilizaron para evaluar el crecimiento de tubos polínicos en cruza interespecíficas. Los tubos polínicos se distinguen por la presencia de tapones de calosa (marcados con una flecha). Las especies compatibles donadoras de polen fueron *N. longiflora*, *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *N. benthamiana* y *N. glauca* y la especie incompatible *N. rastronensis*. Los tubos polínicos de *N. rastronensis* y *N. longiflora* alcanzan la base del estilo en la planta silvestre *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , en el híbrido no transformado *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y en las plantas de la población K08 probadas (K08-2, K08-3 y K08-16). Las plantas K08-2 y K08-3 perdieron la capacidad de rechazar el polen de *N. plumbaginifolia*, pero mantuvieron la capacidad para rechazar el polen de *N. tabacum*, *N. benthamiana* y *N. glauca* al igual que el resto de las plantas analizadas. EP-epidermis, HV-haz vascular. Barras=50 $\mu$ m.

**Tabla 3.** Cuantificación de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo en cruzas interespecíficas con polen de especies AC y AI después de 72 h post-polinización en la población K08.

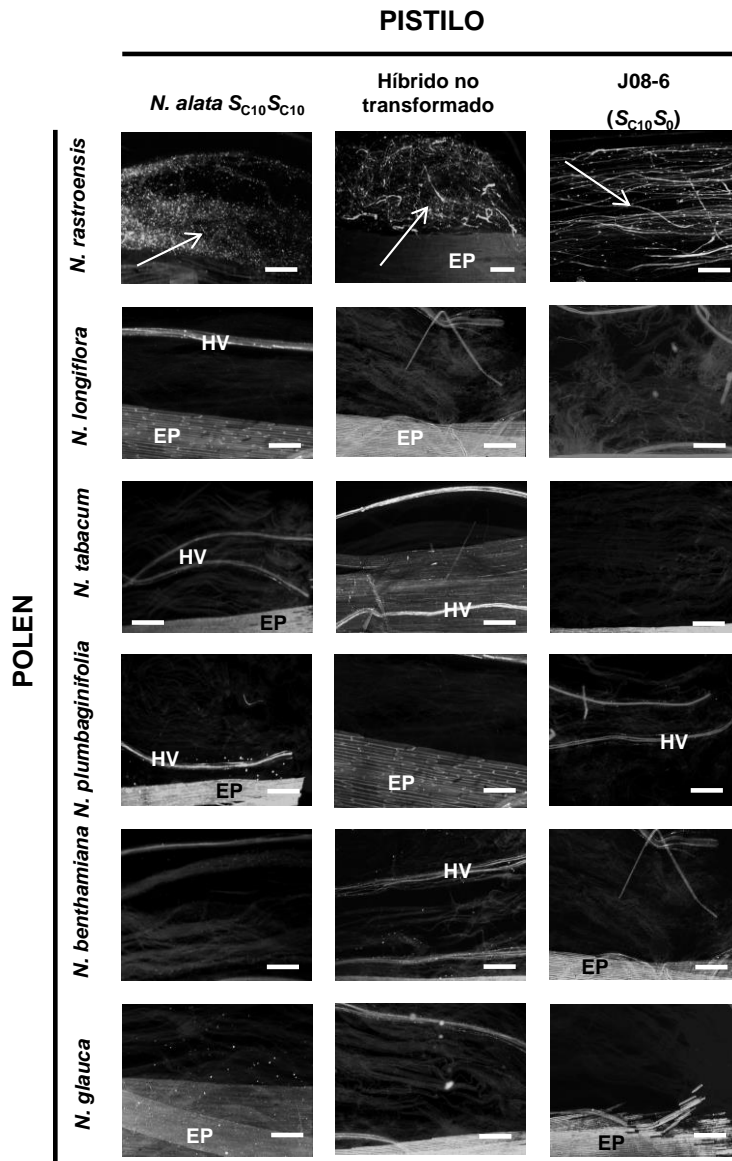
PISTILO	<i>N. alata</i> S <sub>105</sub> S <sub>105</sub>	Híbrido no transformado	K08-2 (S <sub>105</sub> S <sub>0</sub> )	K08-3 (S <sub>105</sub> S <sub>0</sub> )	K08-16 (S <sub>105</sub> S <sub>0</sub> )
<b>POLEN</b>					
<i>AI N. rastroensis</i>	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
<i>AC N. longiflora</i>	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
<i>AC N. tabacum</i>	-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,-
<b>AC</b> <i>N. plumbaginifolia</i>	-,-,-	-,-,-	+,+,+	+,+,+	8,-,-
<i>AC N. bethamiana</i>	-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,-
<i>AC N. glauca</i>	-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,-

(-) polinización incompatible (TPs que no alcanzan la base del estilo), (+) polinización compatible (TPs incontables que alcanzan la base del estilo), (#) Número de tubos polínicos cuantificables en la base del estilo. Cada signo +, - o el número de TP contados representa una réplica independiente en cada ensayo de polinización.

**Tabla 4.** Cuantificación de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo en cruzas interespecíficas con polen de especies AC y AI después de 72 h post-polinización en la población J08.

PISTILO	<i>N. alata</i> S <sub>C10</sub> S <sub>C10</sub>	Híbrido no transformado	J08-6 (S <sub>C10</sub> S <sub>0</sub> )
<b>POLEN</b>			
<i>AI N. rastroensis</i>	+,+,+	+,+,+	+,+,+
<i>AC N. longiflora</i>	-,-,-	-,-,-	-,-,-
<i>AC N. tabacum</i>	-,-,-	-,-,-	-,-,-
<i>AC N. plumbaginifolia</i>	-,-,-	-,-,-	-,-,-
<i>AC N. benthamiana</i>	-,-,-	-,-,-	-,-,-
<i>AC N. glauca</i>	-,-,-	-,-,-	-,-,-

(-) polinización incompatible (TPs que no alcanzan la base del estilo), (+) polinización compatible (TPs incontables que alcanzan la base del estilo), (#) Número de tubos polínicos cuantificables en la base del estilo. Cada signo +, - o el número de TP contados representa una réplica independiente en cada ensayo de polinización.



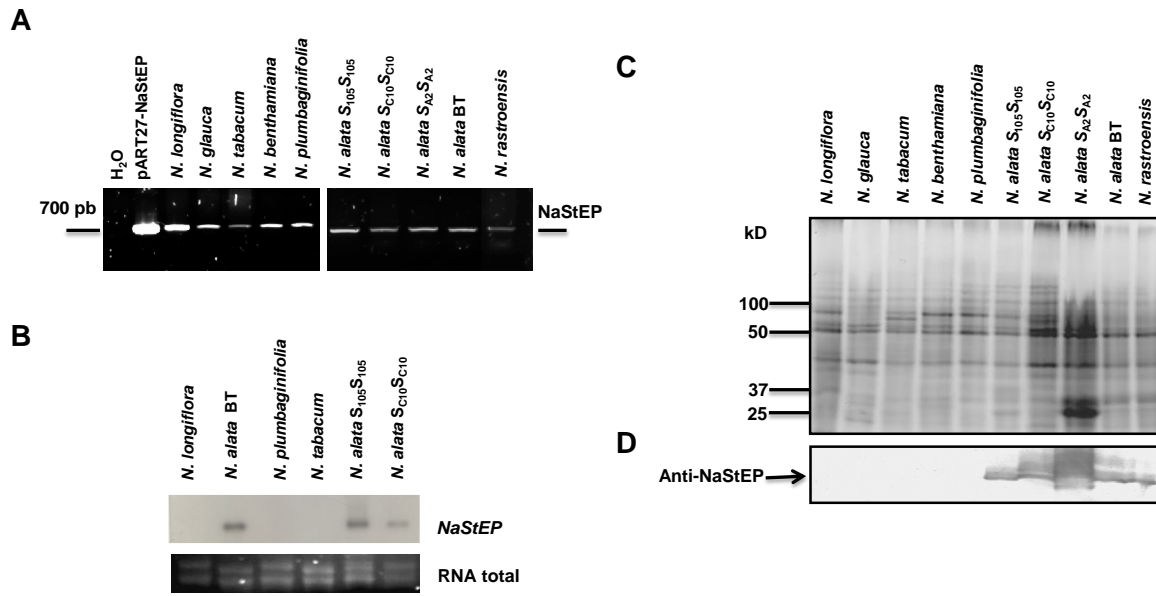
**Figura 14. Evaluación de las relaciones de incompatibilidad interespecíficas en las plantas de la población J08 ( $S_{C10}S_0$ ) con niveles de NaStEP no detectados** Aplastados de pistilos polinizados por 72 h, teñidos con azul de anilina y observados por microscopia de fluorescencia se utilizaron para evaluar el crecimiento de tubos polínicos en cruza interespecíficas. Los tubos polínicos se distinguen por la presencia de tapones de calosa (marcados con una flecha). Las especies compatibles donadoras de polen fueron *N. longiflora*, *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *N. benthamiana* y *N. glauca* y la especie incompatible *N. raströensis*. El polen de *N. raströensis* alcanzan la base del estilo en la planta silvestre *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , en el híbrido no transformado *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y en la planta J08-6 ( $S_{C10}S_0$ ). El polen de las especies AC fue rechazado en la planta silvestre *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , en el híbrido no transformado *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y en la planta J08-6 ( $S_{C10}S_0$ ). EP-epidermis, HV-haz vascular. Barras=50 $\mu$ m.

### **8.5. *NaStEP* es un gen presente en el genoma de especies AC y AI de *Nicotiana* pero sólo se expresa en pistilos de especies AI**

Debido a que *NaStEP* es una proteína que se expresa sólo en pistilos de especies AI (Busot *et al.*, 2008) se decidió determinar si el gen de *NaStEP* se encuentra tanto en especies AC y AI, para lo cual se amplificó este gen mediante PCR con ADN total de especies AI (*N. alata* con genotipo  $S_{105}S_{105}$ ,  $S_{C10}S_{C10}$  y  $S_{A2}S_{A2}$ ) y *N. raströensis* y de especies AC (*N. longiflora*, *N. glauca*, *N. tabacum*, *N. benthamiana*, *N. plumbaginifolia* y *N. alata* BT). El resultado de la amplificación mostró que el gen se encuentra presente tanto en especies AC como AI y que no presenta intrones ya que tiene el mismo tamaño que su cADN (Figura 15A). Mediante un ensayo de réplica tipo Northern se determinó la acumulación del transcrito de *NaStEP* para especies AI (*N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ ) y AC (*N. longiflora*, *N. alata* BT, *N. tabacum* y *N. plumbaginifolia*). La acumulación del transcrito sólo se observó en las especies AI y en *N. alata* BT (Figura 15B). La expresión de la proteína también fue evaluada mediante un ensayo de réplica tipo Western usando extractos proteicos totales de pistilos de las especies AC y AI estudiadas. La expresión de *NaStEP* sólo se encontró en las especies AI analizadas (*N. alata* y *N. raströensis*; Figuras 15 C y D). Estos resultados demuestran que la expresión de *NaStEP* está regulada y sólo se presenta en especies AI.

### **8.6. La proteína *NaStEP* se acumula abundantemente en las células papilares de estigmas maduros de *N. alata***

El patrón de expresión de *NaStEP* en el desarrollo también fue evaluado por inmunodetección usando extractos de proteína total de pistilos de botones florales en diferentes etapas de desarrollo, flores en pre-antesis y antesis. La expresión de *NaStEP* se presenta de manera similar en botones florales, desde los 0.5 cm de longitud hasta un tamaño de 1.5 cm y en flores en pre-antesis; sin embargo, su expresión aumentó considerablemente en flores en antesis (Figura 16A-B). En pistilos de flores en antesis se evaluó la proporción de *NaStEP* presente en el estigma y en el estilo mediante inmunodetección usando extractos proteicos totales de estigmas y estilos de flores en antesis. El estilo fue disectado en tres partes (el primer tercio representa la parte apical del pistilo y el último tercio la base del pistilo) para conocer si existía un gradiente en su expresión. Los resultados en las figuras 16C y 16D mostraron que la proteína *NaStEP* se acumula abundantemente en el estigma, en muy baja cantidad en el estilo, aproximadamente, en una proporción de 30:1. A lo largo del tejido estilar no se observó un gradiente en su acumulación (Figuras 16 C y D).



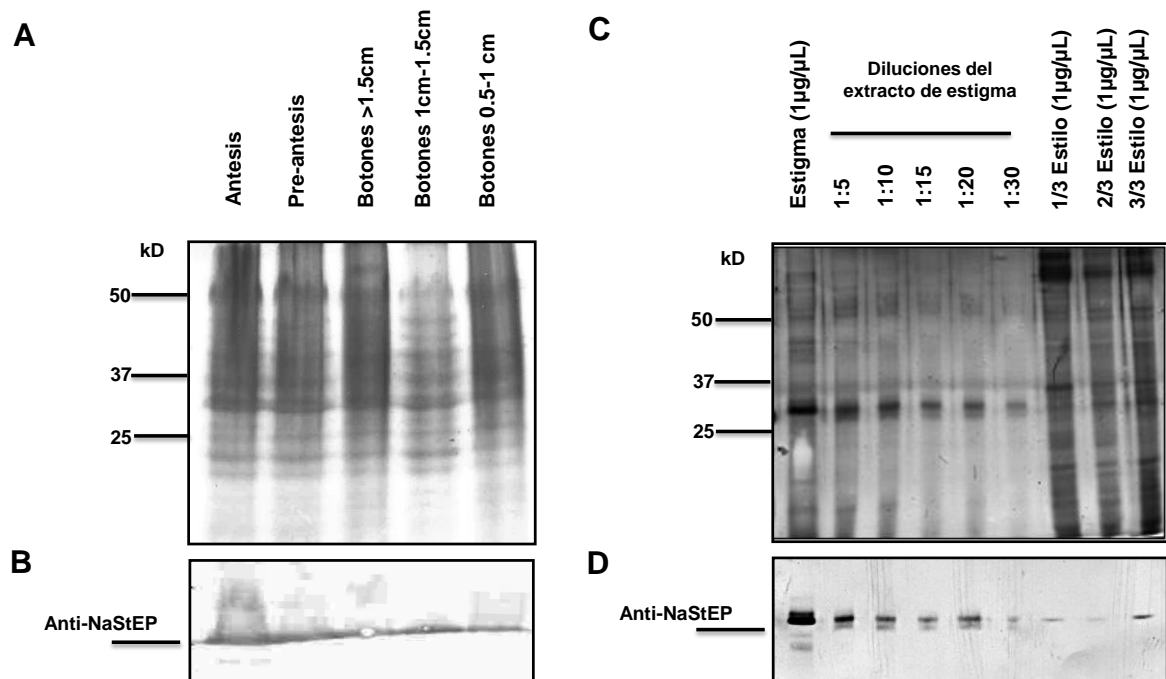
**Figura 15. Análisis de la expresión de NaStEP. Amplificación por PCR de NaStEP a partir de ADN genómico, ensayo tipo réplica de Northern y análisis de la acumulación de la proteína de NaStEP en especies autocompatibles y autoincompatible de *Nicotiana*.**

**A.** Amplificación de *NaStEP* a partir de ADN genómico. El gen se amplificó tanto en especies autocompatibles (*N. longiflora*, *N. glauca*, *N. tabacum*, *N. benthamiana* y *N. plumbaginifolia*) y autoincompatibles (*N. alata* y *N. rastronensis*). Se utilizó como control positivo la construcción en el plásmido pART27 con la secuencia de *NaStEP* (pART27-NaStEP) y un control negativo en donde no se agregó ADN.

**B.** Transcrito de *NaStEP* en especies AC y AI.

**C-D.** Extracto total de proteínas de pistilo de especies autocompatibles (*N. longiflora*, *N. glauca*, *N. tabacum*, *N. benthamiana* y *N. plumbaginifolia*) y autoincompatibles (*N. alata* genotipos S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>, S<sub>A2</sub>S<sub>A2</sub> y BT y *N. rastronensis*). Las proteínas fueron separadas electroforéticamente (SDS-PAGE) y los geles teñidos con azul de Coomassie o transferidos a una membrana de PVDF para la inmunodetección de NaStEP (anti-NaStEP 1:10000). **C.** Extracto proteico total de estigmas teñido con azul de Coomassie. **D.** Inmunodetección de NaStEP.

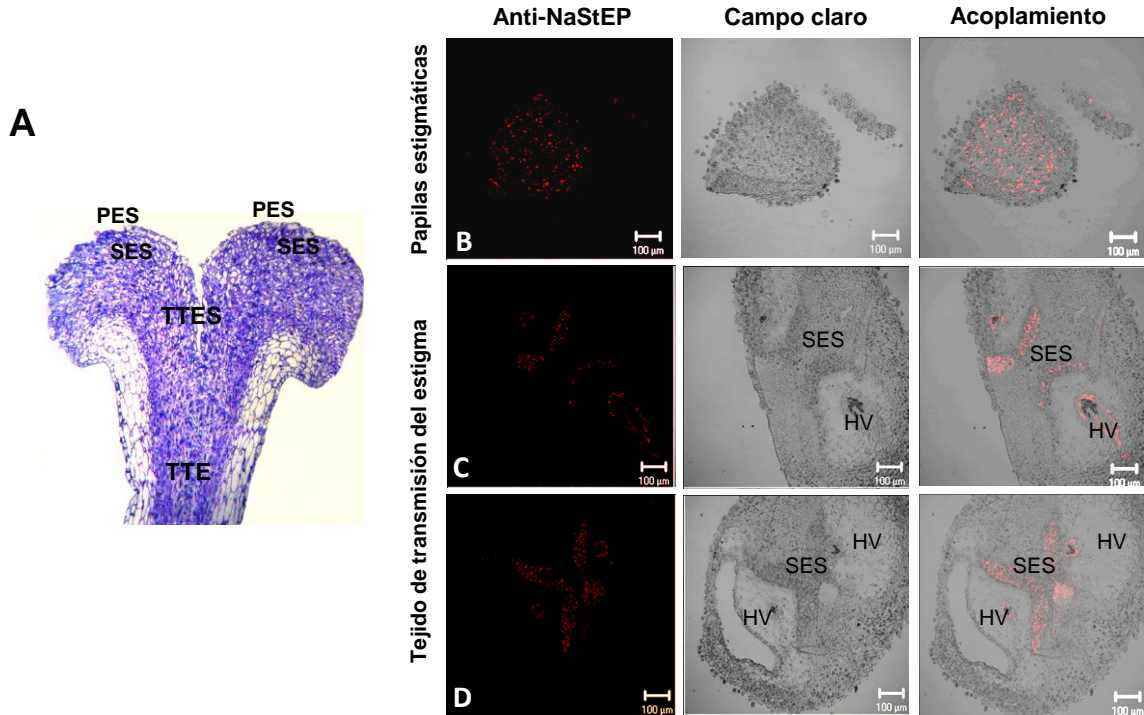
Para determinar la localización celular de NaStEP, se realizaron inmunolocalizaciones en cortes histológicos de estigmas usando el anticuerpo anti-NaStEP (1:2000). El estigma está conformado por varias regiones. La superficie está cubierta por papilas estigmáticas (PES), por debajo se localiza un tejido secretor o sub-epidérmico (SES) que converge formando el tejido de transmisión de estigma (TTES), que posteriormente forma el tejido de transmisión del estilo (TTE). Las inmunolocalizaciones mostraron que NaStEP se acumula abundantemente en las células papilares, en el tejido secretor, en el tejido de transmisión del estigma y asociado al haz vascular (HV; Figura 17).



**Figura 16. Análisis de la acumulación de NaStEP en botones florales y flores en antesis de *N. alata*.**

**A-B.** Extracto total de proteínas de pistilo de diferentes etapas de desarrollo *N. alata* fueron separadas electroforéticamente (SDS-PAGE) y los geles teñidos con azul de Coomassie o transferidos a una membrana de PVDF para la inmunodetección de NaStEP (anti NaStEP 1:10000). **A.** Extracto proteico total de estigmas teñido con Azul de Coomassie. **B.** Inmunodetección de NaStEP.

**C-D.** Extracto total de proteínas de pistilo de estigmas y estilo de *N. alata* fueron separadas electroforéticamente (SDS-PAGE) y los geles teñidos con azul de Coomassie o transferidos a una membrana para la inmunodetección de NaStEP (anti NaStEP 1:10000). **C.** Extracto proteico total de estigmas y estilos teñidos con azul de Coomassie. **D.** Inmunodetección de NaStEP.



**Figura 17. Análisis de la localización celular de NaStEP en estigmas de *N. alata*.**

**A.** Corte longitudinal de pistilo teñido con azul de toluidina que muestra las diferentes regiones que lo conforman. El estigma tiene una superficie estigmática cubierta de papilas estigmáticas (PES), por debajo de las papilas se localiza la zona sub-epidérmica (SES), tejido altamente secretor, que converge en el centro del pistilo formando el tejido de transmisión del estigma (TTES) y posteriormente se convierte en el tejido de transmisión del estilo (TTE).

**B-D.** Cortes transversales del estigma fueron utilizados para determinar la localización de NaStEP a través de una inmunohistoquímica usando al anticuerpo anti-NaStEP (1:2000; rojo). HV- haz vascular, PES-papilas estigmáticas, SES-tejido subepidérmico, TTE-tejido de transmisión del estilo, TTES- tejido de transmisión del estigma. Barras=100µm.

### 8.7 NaStEP se transporta desde el exudado estigmático al interior de los tubos polínicos

NaStEP es una proteína esencial en el rechazo del polen, por lo que hipotetizamos que su localización después de la polinización es en el interior del tubo polínico, como se ha demostrado para la S-RNasa, 120K y HT-B, proteínas que participan en la respuesta de incompatibilidad en *N. alata* (Goldraij *et al.*, 2006).

Observaciones previas probaron que después de la polinización, NaStEP se moviliza desde las vacuolas de las células papilares hacia el exudado estigmático (Busot *et al.*, 2008). Para demostrar

la localización de NaStEP después de la polinización se usaron pistilos polinizados entre *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  X *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y entre *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  a 3, 6, 9, 16 y 36 h.

Los pistilos polinizados fueron fijados y procesados histológicamente usando un doble marcaje con el anticuerpo anti-NaStEP (1:2000; verde) y el colorante de azul de anilina para marcar la calosa de la pared de los tubos polínicos (rojo).

Las observaciones demostraron que en una cruce compatible, la germinación de los granos de polen comenzó antes de las 3 h post-polinización, tiempo en el cual NaStEP ya se ha transportado desde las células del estigma al interior de los TPs. En el pistilo NaStEP se localizó en las células papilares y en las células sub-epidérmicas, mostrando una intensidad comparable a pistilos no polinizados (Figura 19A), y se presentó una cantidad menor pero detectable en el tejido de transmisión del estilo.

Posteriormente (6 h post-polinización), los TPs continuaron creciendo a través de las papilas estigmáticas, hacia la zona sub-epidérmica hasta la región en donde comienza el tejido de transmisión del estilo. La mayoría de los TPs, en donde se detectó a NaStEP, se localizaron entre las papilas estigmáticas y la zona sub-épidermica (Figura 18). La intensidad de NaStEP en el estigma no presentó cambios; sin embargo, en el estilo la cantidad detectada fue casi nula (Figura 19).

A 9 h post-polinización, la mayoría de los TPs alcanzaron la base del estigma. La detección de NaStEP en los TPs disminuyó y sólo se detectó en los TPs ubicados entre las papilas estigmáticas y la zona sub-epidérmica (Figura 18). En los tejidos del pistilo, NaStEP mantuvo un comportamiento similar a pistilos de 6 h de post-polinización (Figura 19).

A 16 h post-polinización los TPs han crecido hasta la mitad del estilo, no obstante, la presencia de NaStEP en el interior de los TPs se ve reducida, estos TPs se ubican entre las papilas estigmáticas y el tejido de transmisión del estigma (Figura 18). De igual forma la presencia de NaStEP en las células del estigma decreció considerablemente (Figura 19).

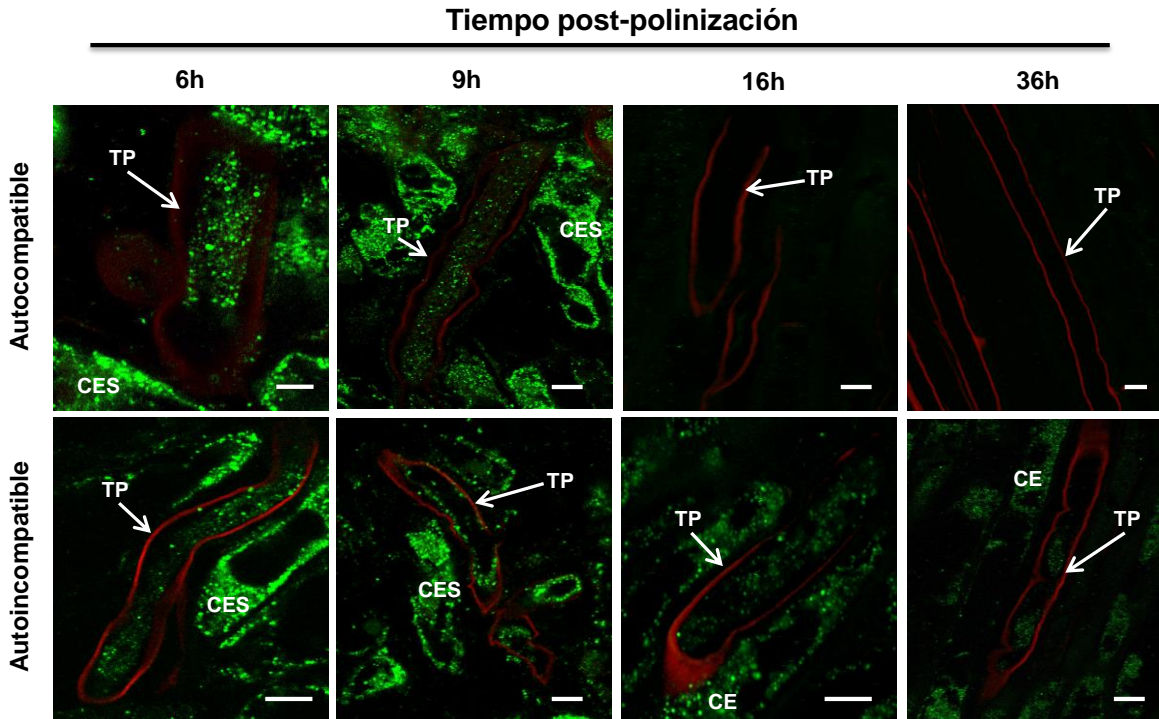
Transcurridas las 36 h post-polinización, los TPs casi alcanzan la base del estilo; sin embargo, NaStEP no se detectó en su interior (Figura 18). NaStEP no se detectó en el estigma o estilo (Figura 19).

En una cruce incompatible a las 3 h post-polinización, los granos de polen todavía no germinan. Hay abundante cantidad de NaStEP en el tejido estigmático y también se detecta en el estilo (Figura 19A).

A las 6 h post-polinización los TPs crecieron sobre las papilas estigmáticas y el tejido subepidérmico. La mayoría de ellos incorporaron a NaStEP en su interior (Figura 18).

Transcurridas las 9 h post-polinización, los TPs alcanzaron un poco más de la mitad del estigma, presentando en su citoplasma la incorporación de NaStEP, en la mayoría de los ellos (Figura 18).



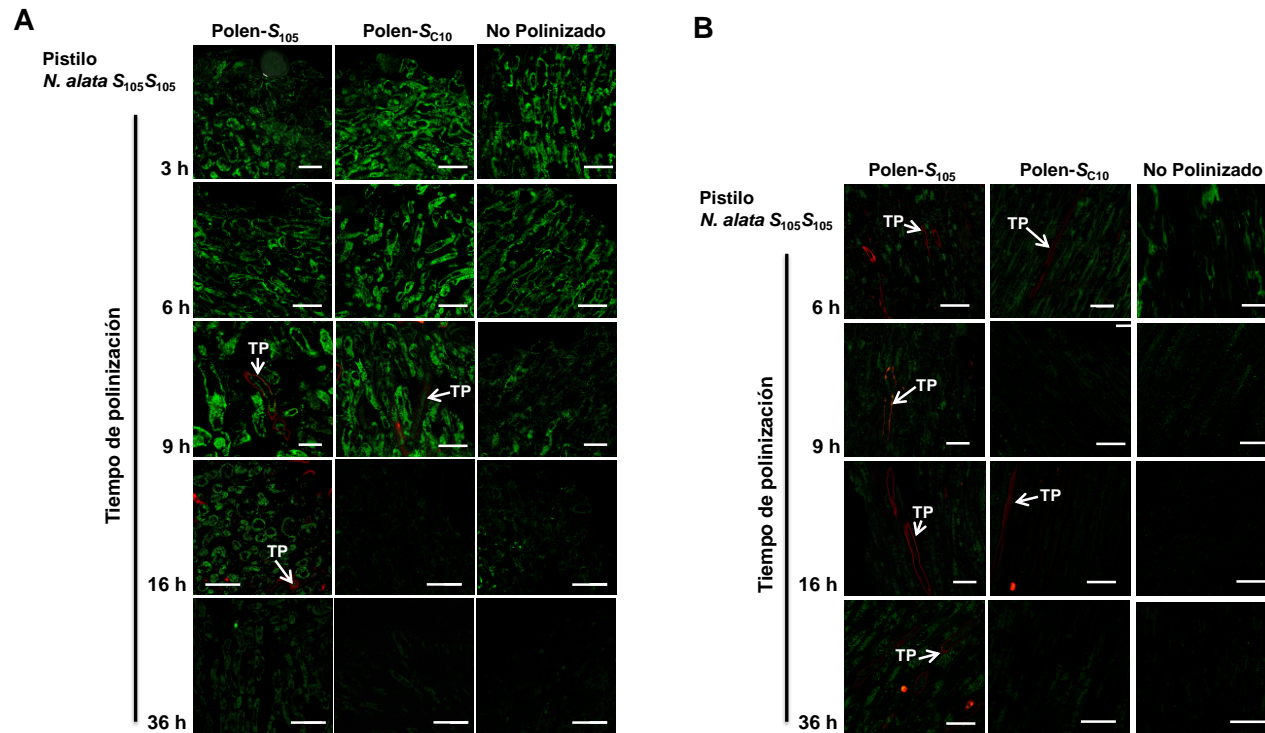


**Figura 18.** Análisis de la localización de NaStEP en el interior de los tubos polínicos después de una cruce compatible (*N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> X *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>; panel superior) y de una cruce incompatible (*N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>; panel inferior). Pistilos polinizados a 6, 9, 16 y 36 h fueron procesados para inmunohistoquímica marcando a NaStEP (verde) con el anticuerpo anti-NaStEP (1:2000) y con el colorante de azul de anilina la calosa (rojo). La presencia de NaStEP en el interior de los tubos polínicos compatibles se observa a las 6 y 9 h post-polinización, pero su presencia es nula durante las 16 y 36 h post-polinización. En una cruce incompatible la señal de NaStEP en el interior de los tubos polínicos se observa desde las 6 h post-polinización hasta las 36 h. CE-células del estilo, CES-células estigmáticas, TP-tubos polínicos. Barras= 5µm.

La cantidad de NaStEP en el pistilo fue equivalente al observado a las 6 h después de la polinización (Figura 19).

Después de 16 h post-polinización, la mayor parte de los TPs se encontraron en la base del estigma y sólo un 30% alcanzaron el primer tercio del estilo. La mayoría de los TPs contuvieron en su interior a NaStEP (Figura 18). NaStEP continuó expresándose de igual forma en el tejido de transmisión del estilo pero disminuyó en el estigma (Figura 19).

Finalmente, a 36 h post-polinización la mayoría de los TPs detuvieron su crecimiento entre el tejido de transmisión del estigma y el estilo, siendo una minoría de TPs los que alcanzaron el primer tercio del estilo. La presencia de NaStEP en el interior de los TPs se vió restringida a la mitad de los TPs observados en el tejido estigmático exclusivamente (Figura 18). Se observó un poco de señal de NaStEP en el pistilo (Figura 19).



**Figura 19. Análisis inmunohistoquímico de NaStEP en estigmas y estilo de pistilos de *N.alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> no polinizados o después de una cruce incompatible (polen-S<sub>105</sub>) o compatible (polen-S<sub>C10</sub>).** Pistilos polinizados a 3, 6, 9, 16 y 36 h fueron procesados para inmunohistoquímicas marcando a NaStEP (verde) con el anticuerpo de NaStEP (1:2000), en rojo se observa la señal de los tubos polínicos (TP).

**A.** Localización de NaStEP en estigmas después de una cruce compatible, incompatible o pistilos no polinizados. En estigmas de pistilos en donde se realizó una cruce incompatible los niveles de NaStEP fueron constantes desde las 3 h hasta las 9 h post-polinización. La señal disminuyó después de las 16h pero fue perceptible. En pistilos en donde se realizó una cruce compatible la señal de NaStEP se observó hasta las 9 h post-polinización. En pistilos no polinizados la señal de NaStEP comenzó a disminuir desde las 9 h post-polinización.

**B.** Localización de NaStEP en estilos después de una cruce compatible, incompatible o pistilos no polinizados. El estilo muestra un poco de señal en todos los casos, sin embargo la señal sólo se percibe en tiempos posteriores a las 9 h post-polinización en una cruce incompatible. Barras=10 μm.

### 8.8. NaStEP se asocia a las membranas vacuolares en el interior de los tubos polínicos

Para determinar la localización final de NaStEP en el interior de los TPs y comprobar si la distribución alargada y no dispersa observada anteriormente correspondía a vacuolas, como se documenta en los datos reportados por Goldraij *et al.* (2006), donde la S-RNasa y 120K están asociados a vacuolas, se realizaron polinizaciones incompatibles en *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  de 9 h, además de una serie de controles negativos en donde alguno de los anticuerpos primarios fue omitido con la finalidad de establecer el cruce de las señales (Datos no mostrados). Los pistilos fueron fijados y procesados para inmunohistoquímicas usando un triple marcaje: NaStEP (anti-NaStEP 1:2000; verde), calosa (anti-Calosa 1:1000; azul) y v-PPasa (anti-Pirofosfatasa vacuolar 1:200; rojo) o v-ATPasa (anti-ATPasa vacuolar 1:200; rojo). La cruce incompatible se realizó con polen  $S_{C10}$ .

Los pistilos después de una cruce incompatible de 9 h mostraron TPs cuya zona apical se encontraba en la base del estigma y en el primer tercio del estilo. La zona apical mostró una gran cantidad de vacuolas de tamaño pequeño. Las observaciones corresponden a la zona distal del TP, la cual presentó abundancia de vacuolas con morfología circular y alargada (Hicks *et al.*, 2004; Goldraij *et al.*, 2006). En esta zona vacuolada se probó la localización tanto de la vPPasa (Figura 20 A-C) como de la vATPasa (Figura 20 D-F), donde la señal evidenció la estructura alargada de las vacuolas que se distribuyen a lo largo de los TPs. Por otro lado, también se observó a NaStEP con una distribución similar (Figuras 20A y 20D). El análisis de microscopía confocal evidenció la colocalización de NaStEP con la vPPasa (Figura 20C) y con la vATPasa (Figura 20F), sugiriendo su asociación con el sistema endomembranoso. La señal de NaStEP también se detectó en el citoplasma del TP y en el lumen vacuolar.

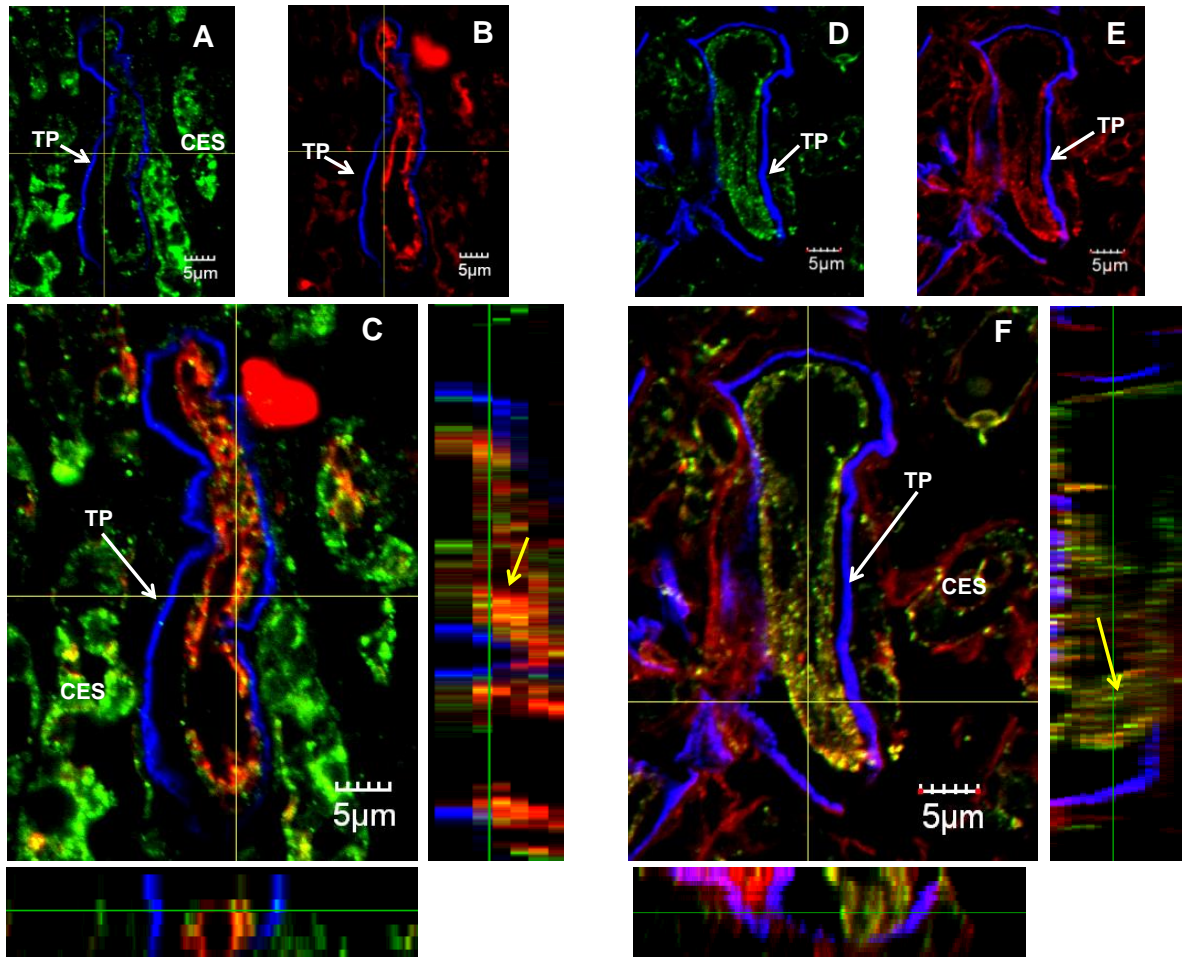
Mediante cortes ortogonales realizados en un apilado de imágenes en el eje Z se demostró la colocalización de NaStEP con la vPPasa y la vATPasa (Figuras 20C y 20F).

### 8.9. El transporte de 120K, HT-B y la S-RNasa no son dependientes de NaStEP

Para descartar la posibilidad de que NaStEP pudiera participar en el transporte de proteínas esenciales para el rechazo del polen al interior del TP, se determinó la presencia de la S-RNasa, HT-B y 120K en el interior de los TPs que crecieron en el pistilo de la planta K08-2.

Pistilos de la planta K08-2 y de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  fueron polinizados por 16 h con polen- $S_{105}$  se fijaron y procesaron para inmunohistoquímica usando el anticuerpo de anti-calosa (1:1000; rojo) y los anticuerpos anti-HT-B (1:1000; verde) o anti-S-RNasa (1:1000; verde) o anti-120K (1:1000; verde). Las observaciones mostraron que las tres proteínas analizadas ingresan al interior de los TPs aún en ausencia de NaStEP, al igual que en una cruce con *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  (Figura 21). Por lo

tanto, se descartó la posibilidad de que NaStEP mediara el transporte de estas proteínas al interior de los TPs.

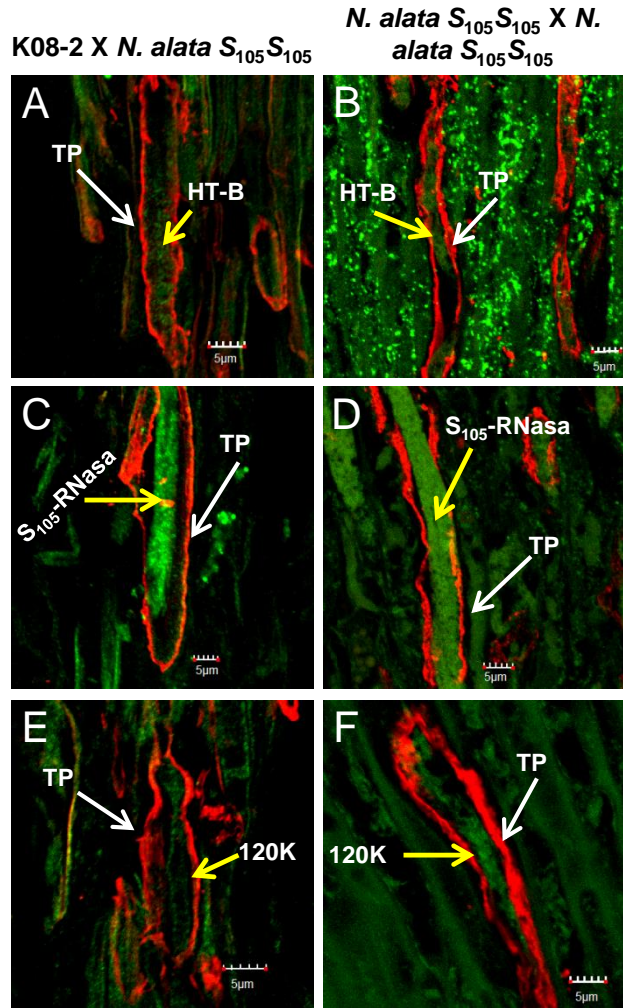


**Figura 20. Análisis inmunohistoquímico de pistilos de *N. alata* Sc<sub>10</sub>Sc<sub>10</sub> polinizados con polen Sc<sub>10</sub> marcados con tres anticuerpos, anti-NaStEP (1:2000; verde), anti-Calosa (1:1000; azul) y anti-vPPasa o anti-vATPasa (1:100; rojo) en pistilos después de una cruce incompatible de 9 h.**

**A-C.** Localización de NaStEP y vPPasa. NaStEP colocaliza con vPPasa a lo largo de una vacuola (Flecha amarilla).

**D-F.** Localización de NaStEP y vATPasa. NaStEP colocaliza con la vATPasa a lo largo de la membrana vacuolar (Flecha amarilla).

Los cortes ortogonales muestran zonas específicas en donde se presenta la colocalización de NaStEP con la vPPasa o vATPasa respectivamente. Barra=5μm.



**Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de HT-B, S<sub>105</sub>-RNasa y 120K en tubos polínicos después de 16 h de polinización.** Pistilos polinizados del híbrido con niveles de NaStEP no detectados K08-2 (S<sub>105</sub>S<sub>0</sub>) y de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> (Na) fueron polinizados con polen S<sub>105</sub> y fueron procesados para determinar la presencia de HT-B, S-RNasa y 120K, mediante el uso de los anticuerpos correspondientes: anti-HT-B (1:1000; verde), anti-S-RNasa (1:1000; verde), anti-120K (1:1000; verde) y anti-calosa (1:1000; rojo).

**A-B.** Localización de HT-B (verde) y calosa (rojo). **A.** Cruza incompatible entre el híbrido con niveles de NaStEP no detectados (K08-2) X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>. **B.** Control de una craza incompatible entre *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>.

**C-D.** Localización de S<sub>105</sub>-RNasa (verde) y calosa (rojo). **C.** Cruza incompatible entre el híbrido con niveles de NaStEP no detectados (K08-2) X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>. **D.** Control de una craza incompatible entre *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>

**E-F.** Localización de 120K (verde) y calosa (rojo). **E.** Cruza incompatible entre el híbrido con niveles de NaStEP no detectados (K08-2) X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>. **F.** Control de una craza incompatible entre *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> X *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>.

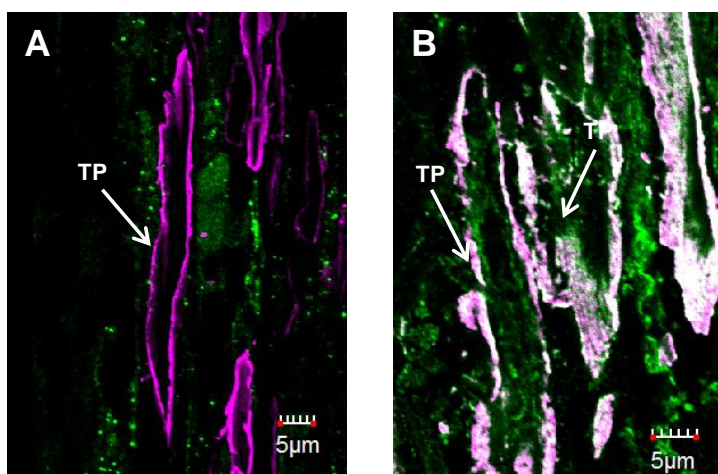
TP-tubos polínicos. Barra=5µm.

### 8.10. NaStEP es un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en el interior del tubo polínico

NaStEP no tiene una función en la regulación de la expresión de proteínas esenciales en el reconocimiento del polen en *Nicotiana* y tampoco en el transporte de éstas al interior del tubo polínico; sin embargo, en estudios previos (Busot *et al.*, 2008) se determinó que su secuencia la agrupa con la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz, por lo que se pensó que su función podría estar contribuyendo a la estabilidad de otras proteínas dentro del TP, como puede ser HT-B, cuya degradación se observa en el interior de los TPs después de una cruz compatible. Para probar esta hipótesis, se llevaron a cabo polinizaciones en el híbrido K08-2 ( $S_{105}S_0$ ), en donde NaStEP presenta niveles no detectados, con polen- $S_{105}$  y polen- $S_{C10}$  y se realizó un control con plantas silvestres de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , en donde se monitoreó el contenido de HT-B en el interior del TP.

Los pistilos polinizados fueron fijados y procesados para realizar una doble inmunolocalización usando los anticuerpos anti-calosa (1:1000; rojo) y anti-HT-B (1:1000; verde).

Para cuantificar la presencia o ausencia de HT-B en el interior de los TPs se fijó un criterio de intensidad en la señal de HT-B (descrito en materiales y métodos). Los TPs se clasificaron en dos grupos: 1) ausencia de tinción o baja tinción (Figura 22A) y 2) alta tinción (Figura 22B).



**Figura 22. Análisis inmunohistoquímico para determinar los criterios de intensidad de la señal de HT-B en el interior de los tubos polínicos.** Pistilos polinizados de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  y de K08-2 ( $S_{105}S_0$ ) fueron polinizados con polen  $S_{105}$  y  $S_{C10}$  por 16 y 36 h. Los pistilos fueron procesados y marcados usando los anticuerpos anti-calosa (1:000; magenta) y anti-HT-B (1:1000; verde). La intensidad de la señal de HT-B fue clasificada en dos criterios para poder cuantificar el número de tubos polínicos que los presentaban.

**A-B.** Criterio de intensidad de HT-B en el interior de los tubos polínicos. **A.** Tubos polínicos con ausencia de tinción o baja tinción de HT-B. **B.** Tubos polínicos con tinción alta de HT-B. TP-tubos polínicos. Barra=5µm.

Con este criterio definido se procedió a contabilizar la cantidad de HT-B en los TPs que crecían en pistilos de la planta K08-2, con niveles de NaStEP no detectados. Las observaciones se hicieron a las 16 y 36 h post-polinización. Asimismo, dado que el genotipo de la planta K08-2 es  $S_{105}S_0$  se realizó una polinización compatible (polen- $S_{C10}$ ) y una incompatible (polen  $S_{105}$ ). Los resultados se compararon con una cruce incompatible y compatible en *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ .

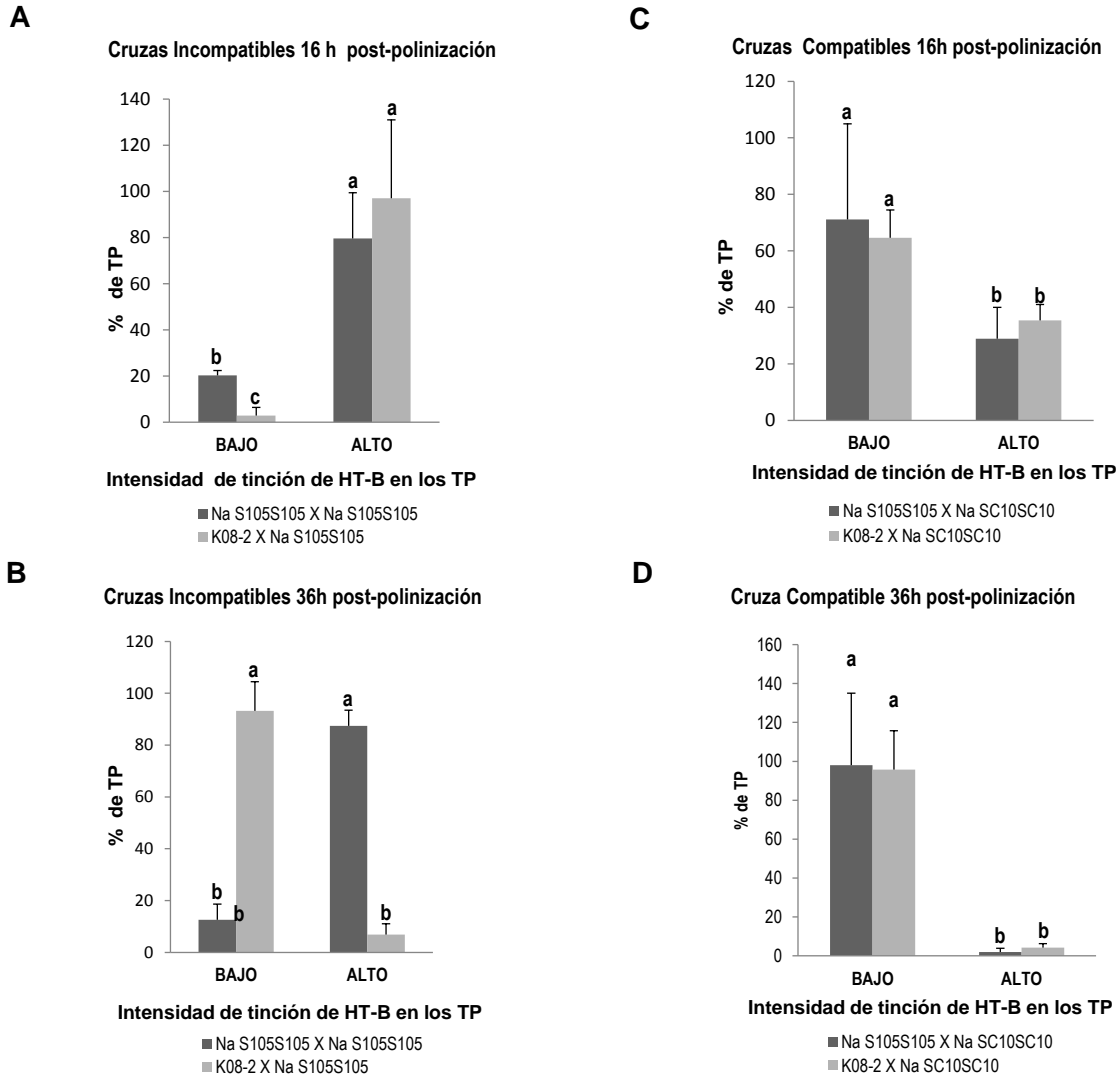
En una cruce incompatible en la planta silvestre (*N. alata*  $S_{105}S_{105}$  X *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ ) se observó a 16 y 36 h post-polinización que el 79.68 y 87.43% de los TPs respectivamente tuvieron un nivel alto de HT-B en su interior, es decir la cantidad de HT-B se mantuvo en el interior de los TPs después de una cruce incompatible (Figuras 23A y 23 B).

Por otro parte, en una cruce compatible en las plantas silvestres de *N. alata* a 16 h de post-polinización solo el 35.35% de los TPs mantuvieron niveles altos de HT-B, mientras que el 64.65% tuvo ausencia o baja cantidad de HT-B en su interior. Esta tendencia se mantuvo a las 36 h de post-polinización, en donde el 98% de los TPs no contuvo HT-B en su interior (Figuras 23C y 23D).

En las plantas con niveles de NaStEP no detectada a las 16 h de post-polinización y polinizadas con polen incompatible  $S_{105}$ , el 97.08% de los TPs presentaron altos niveles de HT-B, lo cual es similar a lo que ocurre en una cruce incompatible en las plantas silvestres de *N. alata* a las 16 h de post-polinización (Figura 23A). Sin embargo, a las 36 h post-polinización solo el 4.26% de los TPs presentaron un alto contenido de HT-B, mientras que el 93.16% no presentaron señal de HT-B en su interior (Figuras 23A y 23B).

Por otro lado, en las cruces compatibles a 16 y 36 h de post-polinización hubo un mayor porcentaje de TPs (64.65 y 95.74% respectivamente) con señal muy baja o ausente de HT-B, siguiendo el mismo patrón observado en una cruce compatible en las plantas silvestres de *N. alata* (Figuras 23C y 23D).

Con estos datos se puede concluir que la supresión de NaStEP interfiere con la estabilidad de HT-B, no importando si la cruce es compatible o incompatible, de manera contraria a lo que ocurrió en la planta silvestre de *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , en donde la degradación de HT-B sólo ocurre en los TPs en una cruce compatible.



**Figura 23. La supresión de *NaStEP* afecta los niveles de HT-B en el interior de los tubos polínicos compatibles e incompatibles.**

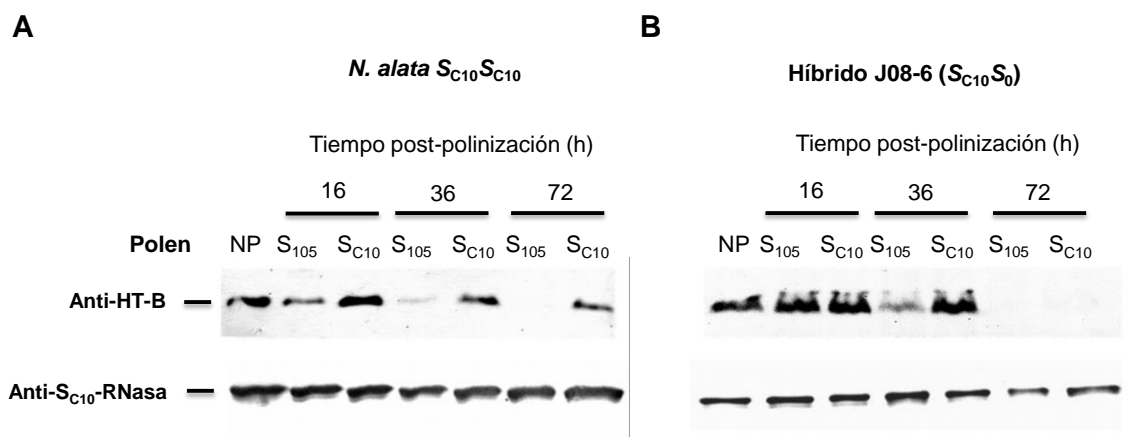
**A-D.** Cuantificación de la intensidad de la señal de HT-B en el interior de los tubos polínicos.

**A-B.** Cruzas Incompatibles. **A.** Cruza incompatible a 16 h post-polinización. Las barras gris oscuras señala el porcentaje de tubos polínicos en plantas silvestres de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, mientras que las barras gris claro representan la cuantificación de tubos polínicos en plantas con niveles de NaStEP no detectados. **B.** Cruza incompatible a 36 h post-polinización tanto de plantas silvestres como de plantas con niveles de NaStEP no detectados.

**C-D.** Cruzas Compatibles. **C.** Cruza compatible a 16 h post-polinización. **D.** Cruza incompatible a 36 h post-polinización. El análisis se llevó a cabo en aproximadamente 200 tubos polínicos en cada polinización. Barras de error indican la Desviación Estándar de tres replicas independientes. Valores con diferentes letras representa diferencias significativas (P<0.05). El análisis estadístico fue hecho por medio de una ANOVA de dos vías y comparación múltiple de Tukey (n=3).



Para confirmar la degradación de HT-B en el interior de los TPs en ausencia de NaStEP, se determinó la cantidad de HT-B mediante ensayos tipo réplica de Western. Los niveles de HT-B se determinaron a partir de extractos de proteína total de pistilos de la planta J08-6 ( $S_{C10}S_0$ ) polinizadas con polen- $S_{C10}$  (cruza incompatible) o polen- $S_{105}$  (cruza compatible) por 16, 36 y 72 h. Asimismo, se utilizó como control a *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  que fue polinizada con polen- $S_{C10}$  (cruza incompatible) o polen- $S_{105}$  (cruza compatible). Los resultados indicaron que en *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  después de la polinización con polen- $S_{105}$  se observa la degradación de HT-B desde las 16 h de post-polinización hasta la ausencia de señal a las 72 h post-polinización, congruente con lo reportado previamente (Figura 24A; Goldraj *et al.*, 2006). En el caso de la cruce compatible en el entorno de la planta J08-6 con niveles de NaStEP no detectados, la degradación de HT-B se detectó después de las 16 h, siendo hasta las 72 h que hubo una ausencia total de la señal (Figura 24B). En el caso de una cruce incompatible en *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , los niveles de HT-B se mantuvieron constantes desde las 16 h hasta las 72 h de post-polinización (Figura 24A). En el caso de las plantas con niveles de NaStEP no detectados la presencia de HT-B se detectó a las 36 h con el mismo patrón que en *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ ; confirmando los datos de inmunolocalización.



**Figura 24. NaStEP evita la degradación de HT-B en los tubos polínicos.**

**A-B.** Inmunodetección de HT-B y de la  $S_{C10}$ -RNasa en extracto de proteína total de pistilo de plantas de *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y de plantas con niveles de NaStEP no detectados (J08-6  $S_{C10}S_0$ ) después de una cruce compatible (polen  $S_{105}$ ) e incompatible (polen  $S_{C10}$ ) a 16, 36 y 72 h. Los extractos de proteínas fueron separados electroforéticamente (SDS-PAGE) y transferidos a una membrana de PVDF para inmunodetectar a HT-B o la  $S_{C10}$ -RNasa.

**A.** Polinizaciones en pistilos de *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ .

**B.** Polinizaciones en pistilos de J08-6.

NP-Pistilos no polinizados. El resultado representa un total de tres replicas independientes.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. *NaStEP* es un gen modificador que participa en el rechazo del polen en *Nicotiana*

El rechazo del polen en la familia Solanaceae es la consecuencia de la interacción haplotipo *S*-específica entre la *S*-RNasa y SLF/SFB; sin embargo, hay evidencias genéticas que indican que otros factores no ligados al locus *S*, a los que se les ha llamado genes modificadores (GM), son esenciales en la vía de reconocimiento y rechazo del polen (Ai *et al.*, 1991; Murfett *et al.*, 1994, 1996; Tsukamoto *et al.*, 2003). En *Nicotiana* spp., *Solanum* spp. y *Petunia* spp. se han identificado mediante ensayos de pérdida de función a dos GM, *HT-B* y *120K*, los cuales son esenciales en la vía de rechazo del polen (McClure *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002a; O' Brien *et al.*, 2002; Hancock *et al.*, 2005; Puerta *et al.*, 2009).

Los resultados de pérdida de función del gen *NaStEP* a través de su silenciamiento por RNAi demostraron que en la ausencia de *NaStEP* en los híbridos AI (población K08) se perdió la inhibición y rechazo del polen incompatible (Figura 11; Tabla 1). Estos mismos resultados fueron confirmados en una segunda población, J08 (Figura 12; Tabla 2). Esta evidencia confirma que la función de *NaStEP* en el reconocimiento y rechazo del polen en *Nicotiana* es esencial, permitiendo asignarle el carácter de GM del estigma en *Nicotiana*.

Adicionalmente, se observó que la respuesta de *NaStEP* en el rechazo del polen es dependiente de la dosis, ya que niveles disminuidos de *NaStEP* muestran sólo un rechazo parcial de los TPs incompatibles (Figuras 11 y 12). Esta respuesta dependiente de la dosis también fue reportada para plantas con niveles de *HT-B* disminuidos (McClure *et al.*, 1999), pero no para plantas con niveles de *120K* disminuidos (Hancock *et al.*, 2005).

Esta función de *NaStEP* en el rechazo del polen en los híbridos con niveles de *NaStEP* no detectados depende exclusivamente de *NaStEP* y no de la *S*-RNasa, ni de *120K* o *HT-B*, ya que los niveles de expresión de estos GM no varía en los híbridos con niveles de *NaStEP* no detectados con respecto a los no transformados o a las plantas tipo silvestres de *N. alata* (Figura 10).

### 9.2. *NaStEP* participa en el rechazo del polen de *N. plumbaginifolia*

Estudios genéticos realizados en algunas especies de la familia Solanaceae (Chetelat y DeVerna, 1991) y Brassicaceae (Hiscocok y Dickinson, 1993) han implicado la participación del locus *S* y de los GM en el rechazo interespecífico

En este trabajo las plantas de *N. alata* *S*<sub>105</sub>*S*<sub>105</sub> al igual que el híbrido control (*N. plumbaginifolia* X *N. alata* *S*<sub>105</sub>*S*<sub>105</sub>) aceptan el polen de la especie AI de *N. rastronensis* y de la especies AC de *N.*

*longiflora*, pero rechazan el polen de las demás especies AC. En el caso de las plantas con niveles de NaStEP no detectados, K08-2 ( $S_{105}S_6$ ) y K08-3 ( $S_{105}S_6$ ) el polen de *N. plumbaginifolia* es aceptado; sin embargo, la planta K08-16 ( $S_{105}S_6$ ), en donde NaStEP sólo se encuentra disminuido, rechazan el polen de *N. plumbaginifolia* al igual que el control de *N. alata* y el híbrido no transformado (Figura 13).

Estos resultados confirman que *NaStEP* es un nuevo GM que participa tanto en la incompatibilidad intraespecífica como en el rechazo del polen de *N. plumbaginifolia*, al igual que *HT-B*, pero no de *120K*, en donde la supresión del gen mantiene la inhibición del crecimiento de los TPs de *N. plumbaginifolia* (Hanconck *et al.*, 2005).

El rechazo del polen en plantas con niveles no detectados de NaStEP demuestra que el mecanismo de acción depende tanto de la S-RNasa como de los GM. Sin embargo, en el caso de PELP III se ha demostrado su papel en el rechazo interespecífico de *N. obtusifolia* y *N. repanda* en pistilos de *N. tabacum*, en donde el sistema es independiente de la S-RNasa (Eberle *et al.*, 2013).

Los resultados de las cruzas interespecíficas muestran que bajo un entorno incompatible, en donde se expresa NaStEP, el rechazo del polen se presenta mayoritariamente con la falta de germinación y en menor proporción con la inhibición del crecimiento de los TPs en el estigma; mientras que en un entorno genético compatible que expresa la  $S_{105}$  o  $S_{C10}$ -RNasa y en donde los niveles de NaStEP no son detectados, la inhibición se presenta en el estilo (Figura 12). Estos datos señalan la acción temprana de NaStEP en el rechazo del polen en *Nicotiana*.

Los sitios de inhibición de los TPs y el tiempo en que se presenta el rechazo del polen en una cruce intraespecífica y una interespecífica señalan una diferencia entre los mecanismos de rechazo del polen. En el reconocimiento intraespecífico en *Nicotiana* el rechazo del polen se presenta desde la zona de transición entre el estigma y estilo, pero mayoritariamente en el primer tercio del estilo (Murfett *et al.*, 1996; de Nettancourt, 2001); sin embargo, para el rechazo interespecífico la zona de rechazo típico se presenta en el estigma (Pandey, 1979). Murfett *et al.* (1996) reportaron que el rechazo del polen de *N. plumbaginifolia* en híbridos de *N. plumbaginifolia* X *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$  se presenta en el estigma después de la emergencia del TP sin presentarse TPs creciendo más allá de la porción superior del estilo. En plantas AC *N. tabacum* expresando la  $S_{A2}$ -RNasa, el polen de *N. tabacum* logra crecer hasta 1 cm del estilo antes de ser rechazado y en el caso de las plantas de *N. tabacum* expresando la  $S_{C10}$ -RNasa el polen de *N. glutinosa* es rechazado en el estilo o en la zona de transición entre el estigma y estilo (Murfett *et al.*, 1996).

### 9.3. La expresión de NaStEP es específica de especies AI

Con la finalidad de determinar el punto de regulación de la expresión de NaStEP se realizó la amplificación de *NaStEP* a través de un PCR utilizando ADN genómico de especies AC y AI (Figura 15A), además se realizó un ensayo tipo réplica de Northern, en donde se observó que el transcrito

no se acumula en especies AC (Figura 15B). Finalmente, el ensayo tipo réplica de Western demostró la acumulación de NaStEP sólo en especies AI (Figura 15C y D). Estos datos señalan que la expresión de NaStEP está altamente regulada y sólo se expresa en especies AI.

Un ensayo tipo replica de Southern mostró que en especies AC como *N. tabacum*, *N. glauca* y *N. plumbaginifolia* presentaron una hibridación positiva con la sonda de *NaStEP*, sugiriendo que estas especies codifican un gen ortólogo para NaStEP (Busot *et al.*, 2008). La amplificación del gen para todas estas especies se encuentra alrededor de las 700 pb, lo cual concuerda con el fragmento de NaStEP recuperado de la biblioteca de cADN, mostrando que no existe alguna delección significativa en las secuencias de las plantas AC que sea la razón aparente por la cual no se acumula el transcrito de NaStEP. La expresión de NaStEP sólo en especies AI puede obedecer a la presencia de codones de término prematuros en las especies AC, como se encontró en *N. tabacum* (datos no mostrados), a una regulación post-traduccional o por alguna regulación a nivel de promotor, ya que una región con alto potencial de ser la región promotora de *NaStEP* presenta una serie de regiones regulatorias en *cis*, muchas de las cuales están involucradas en la respuesta a la luz, además de encontrarse secuencias regulatorias específicas de estigma y estilo altamente similares (caja I, II y III) a las reportadas en *SLG*, gen que participa en el sistema de incompatibilidad de *Brassica* (Soto, 2011).

#### **9.4. NaStEP se acumula abundantemente en las células papilares y se transporta desde el exudado estigmático al interior de los tubos polínicos**

Los resultados de este trabajo sugiere una función de NaStEP durante etapas tempranas de la germinación del polen o del crecimiento del TP. La expresión de NaStEP se restringe mayoritariamente al estigma y, en una porción menor, al estilo de especies AI de *Nicotiana* (Figura 16). Sin embargo, en *Nicotiana* proteínas implicadas en la polinización como TTS (Cheung *et al.*, 1995) y PELP III (de Graff *et al.*, 2003), así como proteínas implicadas en el reconocimiento del polen, como HT-B (McClure *et al.*, 1999), 120K (Lind *et al.*, 1994; Hancock *et al.*, 2005) y la S-RNasa (Anderson *et al.*, 1986; Cornish *et al.*, 1988; McClure *et al.*, 1989; Broothaerts *et al.*, 1995; Sassa *et al.*, 1996; Xue *et al.*, 1996), se expresan en el estilo principalmente. La expresión estigmática específica de *NaStEP* sugiere que este gen está involucrado en las primeras interacciones entre el grano de polen y el pistilo. La acumulación de NaStEP en los pistilos comienza desde etapas tempranas del desarrollo de la flor hasta la antesis (Figura 16A), como es el caso de TTS y PELP III, pero no de HT-B y la S-RNasa que es durante la etapa de pre-antesis y antesis. La acumulación de NaStEP disminuye en estilos polinizados después de 16-36 h post-polinización (Figura 19); sin embargo, para TTS y PELP III la cantidad se mantiene después de 3-4 días de la polinización.

Después de la polinización NaStEP ingresa al interior de los TPs (Figura 18), al igual que la S-RNasa, 120K y HT-B (Goldraij *et al.*, 2006). En el interior de los TPs la cantidad observada de NaStEP después de una cruce compatible es nula, mientras que la acumulación se mantiene en el interior de los TPs en una cruce incompatible, al igual que ocurre con la proteína HT-B pero no para 120K, en donde la degradación de la proteína se presenta tanto en una cruce compatible como incompatible (Goldraij *et al.*, 2006).

#### 9.5. NaStEP ingresa a los tubos polínicos sin importar su haplotipo y se asocia al sistema endomembranoso

Mediante estos resultados se corroboró que después de la polinización NaStEP se libera desde las células del estigma, en donde se almacena en vacuolas, hacia la matriz extracelular donde se transporta al interior de los TPs después de una cruce compatible o incompatible, por lo que su ingreso no es *S*-haplotipo dependiente (Figura 18). Una vez en el interior, la distribución de NaStEP, en algunos de los TPs, es no dispersa a través de todo el citoplasma, sino más bien se muestra contenida en una estructura alargada (Figura 18). Cuando se realiza un marcaje doble entre NaStEP y la vPPasa o la vATPasa se observa la colocalización de ambas proteínas demostrando la asociación de NaStEP a las vacuolas del TP.

La manera en como ingresa NaStEP al interior del TP no se conoce; sin embargo, suponemos que es a través de endocitosis, como ha sido propuesto para la S-RNasa, HT-B y 120K (McClure, 2006; Kumar y McClure, 2010). Estas proteínas han sido asociadas con el sistema endomembranal del TP (Goldraij *et al.*, 2006). Al parecer la asociación de proteínas implicadas en la respuesta del polen con sistemas endomembranales es relevante en los sistemas de incompatibilidad, ya que en el modelo de *Brassica*, Exo70 A1, una subunidad del complejo de exocitosis involucrado en la secreción polarizada en levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*) y animales (Novick *et al.*, 2006), funciona en el transporte polarizado de vesículas en el estigma, que son necesarias para la hidratación, germinación y crecimiento de los TPs compatibles. Durante la respuesta de incompatibilidad la interacción entre SRK y SCR regula negativamente a Exo70 A1, a través de ARC1 que la ubiquitina para su degradación, provocando una desregulación de la exocitosis y el rechazo del polen (Samuel *et al.*, 2009). En el caso de *N. alata*, después de la polinización, la S-RNasa, 120K y HT-B ingresan al TP sin importar su haplotipo *S* y se asocian al sistema endomembranal. Las evidencias demuestran que la S-RNasa es almacenada en una vacuola después de la polinización y en una cruce compatible permanece dentro de ella, mientras que en una cruce incompatible la vacuola se rompe por lo que la S-RNasa se libera al citoplasma (Goldraij *et al.*, 2006). Por otro lado, dobles marcajes inmunológicos entre 120K y la S-RNasa demuestran que 120K se asocia a la membrana vacuolar que contiene a las S-RNasas (Goldraij *et al.*, 2006). Mientras que fraccionamientos bioquímicos demuestran la asociación de HT-B con la

fracción microsomal (Goldraj *et al.*, 2006; Kondo y McClure, 2008). El doble marcaje entre NaStEP y la vPPasa y la vATPasa demuestra que NaStEP, una vez que ingresa al interior del TP, se asocia a la membrana vacuolar; sin embargo, no se ha comprobado si estas vacuolas son las que contendrán a 12OK y a la S-RNasa. El mecanismo por el cual NaStEP se transporta a las vacuolas podría ser similar al que ocurre para la S-RNasa, 12OK y HT-B; sin embargo, este se desconoce. Existen tres posibles vías en el sistema endosomal que lleva a proteínas blanco a las vacuolas: 1) Proteínas endocitadas se empaquetan en vesículas, estas vesículas se fusionan con otras para formar los endosomas tempranos que finalmente se fusiona con la vacuola. 2) Proteínas endocitadas por vesículas dependientes de clatrina llegan al TGN (Trans Golgi Network por sus siglas en inglés) y al aparato de Golgi de donde son enviadas a cuerpos multivesiculares que se dirigen a la vacuola. 3) Proteínas solubles derivadas de vesículas cubiertas de clatrina salen del aparato de Golgi a un compartimento pre-vacuolar que se dirige a la vacuola (Holstein, 2002; Sanderfoot y Raikhel, 2003). En el caso de la S-RNasa, McClure (2006) propone un transporte similar al de algunas toxinas como la ricina, en donde el transporte retrogrado permite su transporte hacia el TGN para llegar al RE en donde una parte puede ser liberado al citosol y quedar disponible para interactuar con SLF. Otras toxinas también ocupan la vía secretora para regresar al citosol mediante la vía retrógrada que les permite llegar al RE (Reticulo Endoplásmico; Pelham *et al.*, 1992).

Aunque no se conoce la vía de transporte de NaStEP a la vacuola, suponemos que NaStEP podría seguir la misma vía que la S-RNasa, 12OK y HT-B.

#### **9.6. NaStEP es un regulador positivo en la estabilidad de HT-B en el interior de los tubos polínicos**

La incorporación de NaStEP a los TPs en tiempos tempranos de la polinización (6 h), tanto en TPs compatibles como incompatibles, su permanencia en los TPs incompatibles, su asociación a las vacuolas y la función de inhibidor de subtilisina (Jiménez-Durán *et al.*, 2013), pueden señalar una función relacionada, directa o indirectamente, con la degradación o estabilidad de proteínas del TP. La degradación de HT-B en ausencia de NaStEP demuestra el papel de esta proteína en la estabilidad de HT-B (Figuras 23 y 24). En plantas AI de *N. alata* los TPs incompatibles tienen a HT-B estabilizado; sin embargo, en TPs compatibles HT-B es degradada (Goldraj *et al.*, 2006; Kondo y McClure, 2008). En cambio en las plantas con niveles de NaStEP no detectados, HT-B permanece estable dentro de los TPs, tanto en una cruce incompatible como compatible. Estos datos concuerdan con el modelo de la compartimentalización de la S-RNasa (Goldraj *et al.*, 2006), ya que este modelo incluye, para explicar el reconocimiento del polen, a las determinantes de especificidad y a GM como 12OK y HT-B. Adicionalmente sitúa a las proteínas que intervienen en el reconocimiento y rechazo del polen asociadas a sistemas endomembranosos como ocurre con NaStEP.

## 10. MODELO

NaStEP se acumula en las vacuolas de las células papilares y del tejido de transmisión del estigma durante la antesis en plantas de *Nicotiana* autoincompatibles. La llegada de los granos de polen promueve la lisis de las células estigmáticas que liberan a NaStEP al exudado estigmático. La incorporación de NaStEP a los tubos polínicos, tanto compatibles como incompatibles, es un evento muy temprano de la polinización. NaStEP en el interior de los tubos polínicos es transportada a las vacuolas de los mismos por un mecanismo desconocido. El transporte de NaStEP se puede llevar a cabo a través de su endocitosis en donde NaStEP se empaca en vesículas, las cuales a su vez se fusionarían con otras para formar endosomas tempranos que finalmente se fusionarían con la vacuola (vía a), o NaStEP puede ser endocitada por vesículas dependientes de clatrina que llegarán al TGN y al aparato de Golgi de donde serían enviadas a cuerpos multivesiculares que se dirigirían a la vacuola (vía b, transporte retrogrado). En la vacuola NaStEP ejercería su función, tempranamente de inhibidor de proteasa, inhibiendo a una o varias proteasas tipo subtilisina. Alguna porción de NaStEP quedaría en el citoplasma en donde podría llevar a cabo otra función. En tiempos posteriores de la polinización se incorporaría la S-RNasa, HT-B y 120K al interior de los TPs. El transporte de estas proteínas a la vacuola no se conoce, pero se sugiere que al menos la S-RNasa sigue un transporte retrogrado que la sitúa en su mayoría en una vacuola; sin embargo, una pequeña porción escaparía del RE y se localizaría en el citoplasma, en donde interaccionaría con SLF.

*Cruza compatible.* En un pistilo  $S_1S_1$  que es polinizado con polen  $S_2$ , la interacción haplotipo  $S$  inespecífica entre la  $S_1$ -RNasa y  $SLF_2$  provocaría la degradación de NaStEP que deja de inhibir a la(s) proteasas de la vacuola que a su vez degradaría a HT-B, permitiendo la estabilización de la vacuola que contiene a la  $S_1$ -RNasa y el crecimiento del tubo polínico.

*Cruza incompatible.* En un pistilo  $S_1S_1$  que es polinizado con polen  $S_1$ , la interacción haplotipo  $S$  específica entre la  $S_1$ -RNasa y  $SLF_1$  provocaría la estabilización de NaStEP y, por lo tanto, continuaría inhibiendo a la(s) proteasas de la vacuolas lo que permitiría la estabilidad de HT-B lo que a su vez conllevaría a la ruptura de la vacuola y la liberación de la  $S_1$ -RNasa al citoplasma del tubo polínico, en donde llevaría a cabo su función citotóxica degradando el RNA e inhibiendo el crecimiento del tubo polínico.

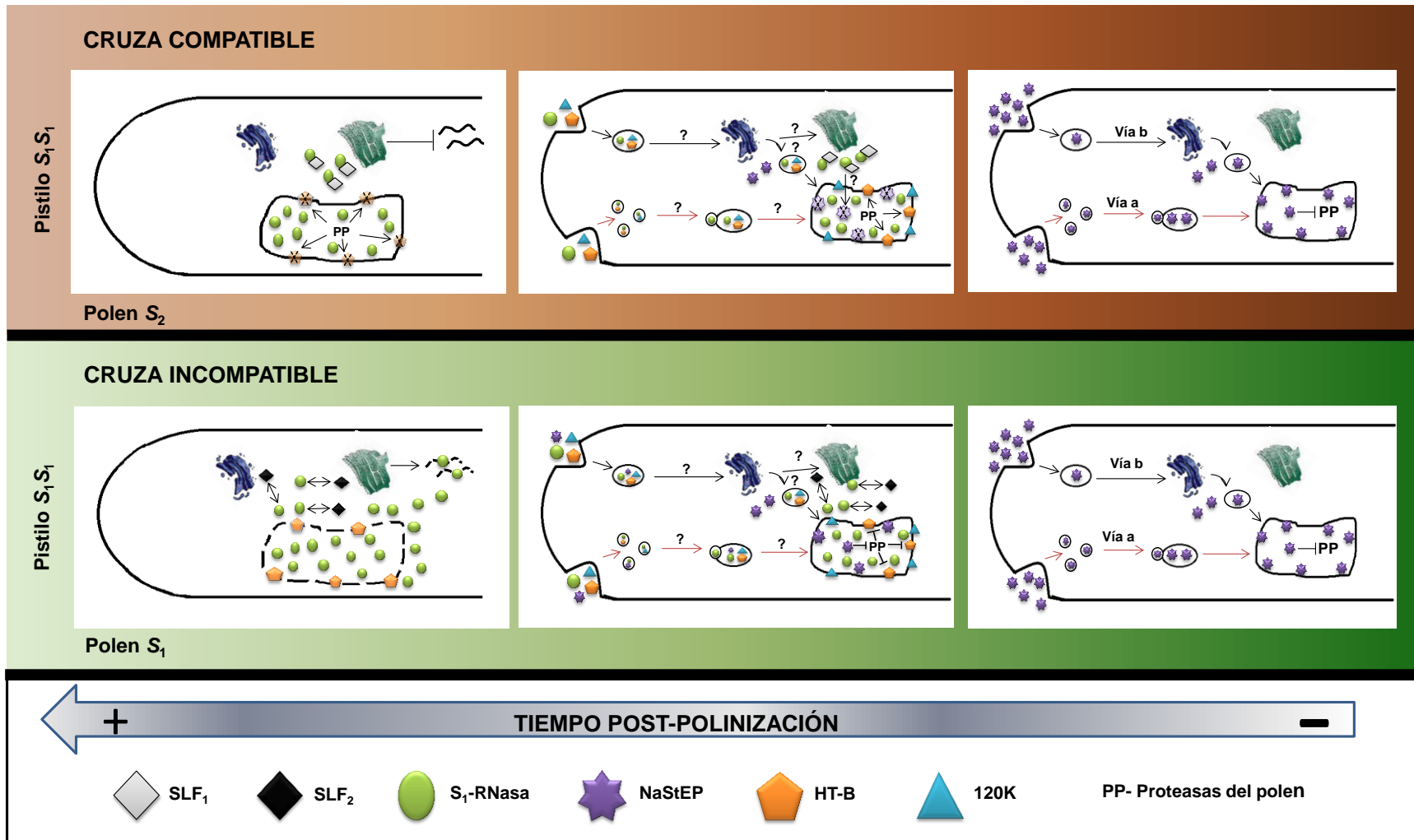


Figura 25. Modelo del rechazo S-específico del polen en *Nicotiana*.



## 11. CONCLUSIÓN

NaStEP es una proteína esencial en la vía del rechazo del polen en *Nicotiana* que participa como un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en los tubos polínicos.

### CONCLUSIONES PARTICULARES

1. NaStEP es un gen con expresión abundante en el estigma que cuando es silenciado las plantas pierden la capacidad de rechazar el polen con el mismo haplotipo *S* del estilo, lo que indica que es un gen esencial en la respuesta del rechazo del polen en *Nicotiana*.
2. NaStEP participa en el reconocimiento interespecífico del polen en *N. plumbaginifolia*.
3. La proteína NaStEP después de la polinización se transporta al interior de los tubos polínicos de manera haplotipo *S* inespecífica y una vez ahí una fracción de NaStEP se asocia al sistema endomembranoso del tubo polínico.
4. NaStEP estabiliza directa o indirectamente a HT-B en el interior de los tubos polínicos.

## 12. PERSPECTIVAS

En este trabajo el silenciamiento de NaStEP en híbridos de *N. plumbaginifolia* X AI *N. alata* demostró que *NaStEP* es un gen modificador esencial en el reconocimiento y rechazo del polen. Así como su localización subcelular dentro del tubo polínico incompatible en donde es un estabilizador positivo para HT-B. Sin embargo, el determinar si la ruta de entrada al interior del tubo polínico y su transporte a la vacuola es similar al de otras proteínas importantes en el sistema de incompatibilidad, como la S-RNasa, 120K y HT-B nos podría ayudar a delimitar mecanismos generales de transporte.

La localización de la S-RNasa dentro de una vacuola coincide con la localización de NaStEP en vacuolas; sin embargo no se ha confirmado que ambas coexistan en la misma vacuola, como se espera que suceda con HT-B.

El papel de NaStEP como estabilizador de HT-B, posiblemente a través de su función de inhibidor de proteasa de subtilisina, permite incrementar nuestro conocimiento en dos vertientes. La primera es si su función de inhibidor de proteasa es específica de proteasas tipo subtilisina o si tiene la capacidad de inhibir otro tipo de proteasas; y la segunda es con respecto al identificar interactores del TP con NaStEP, en donde se espera se encuentre una proteasa.

Finalmente, es importante conocer como se regula este gen dentro del género *Nicotiana*, debido a que este es amplificado por PCR tanto en especies AC como en AI.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

**Ai YJ, Kron E, Kao T-H.** 1991. S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.* **230**:353-358.

**Anderson MA, Cornish EC, Mau SL, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Bönig I, Grego B, Simpson R, Roche PJ, Haley JD, Penschow JD, Niall HD, Tregear GW, Coughlan JP, Crawford RJ, Clarke AE.** 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature.* **321**:38-44.

**Barret SCH.** 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature.* **3**:274-284.

**Barrett SCH.** 2010. Darwin's legacy: the forms, function and diversity of flowers. *Phil. Trans.R. Soc. B.* **365**:351-368.

**Bower MS, Matias DD, Fernandes-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rosthtein SJ, Goring DR.** 1996. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica S* locus receptor kinase. *Plant Cell.* **8**:1641-1650.

**Broothaert W, Janssens GA, Proost P, Broekaert WF.** 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol. Biol.* **27**:499-511.

**Busot GG.** 2009. Genes modificadores requeridos en el rechazo del polen en *Nicotiana*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biquímicas. Facultad de Química, UNAM.

**Busot G, McClure B, Ibarra-Sánchez C, Jiménez-Durán K, Vázquez-Santana S, Cruz-García F.** 2008. Pollinization in *Nicotiana alata* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *J. Exp. Bot.* **59**:3187-3201.

**Cabrillac D, Cock JM, Dumas C, Gaude T.** 2001. The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature.* **410**:220-223.

**Cardozo T, Pagano M.** 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat. Rev. Mol.* **5**:739-751.

- Chetelat RM, De Verna JW.** 1991. Expression of unilateral incompatibility in pollen of *Lycopersicon pennelli* is determined by major loci on chromosomes 1, 6 and 10. *Theor. Appl. Genet.* **82**: 704-712.
- Cheung AY, Wang H, Wu H.** 1995. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell.* **82**:383-393.
- Cisneros SJ.** 2010. Clonación y caracterización molecular de StEP de *Nicotiana glauca* y *Solanum sp.* Tesis de licenciatura para Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, UNAM.
- Cornish EC, Anderson MA, Clarke AE.** 1988. Molecular aspects of fertilization in flowering plants. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**:209-228.
- Cruz-García F, Hancock CN, Kim D, McClure B.** 2005. Styler glycoproteins bind to *S*-RNase *in vitro*. *Plant J.* **42**:295-304.
- Cruz-García F, McClure B.** 2001. Sexual Incompatibility. En: S.S. Bhojwani y W.Y. Soh (Editores). Current Trends in the embryology of Angiosperms. pp167-196. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Dickson HG, Crabbe MJC, Gaude T.** 1992. Sporophytic self-incompatibility systems: *S* gene products. *Int. Rev. Cytol.* **140**:525-561.
- de Graaf BHJ, Knuiman BA, Derksen J, Mariani C.** 2003. Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.* **54**:55-63.
- de Graaf BHJ, Rudd JJ, Wheeler MJ, Perry RM, Bell EM, Osman K, Franklin FCH, Franklin-Tong VE.** 2006. Self-incompatibility in *Papaver* targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen. *Nature.* **444**:490-493.
- de Nettancourt D.** 1977. Incompatibility in angiosperms. *Sex. Plant. Rep.* **10**:185-199.
- de Nettancourt D.** 2001. Incompatibility in Angiosperms: Monographs on theoretical and applied genetics 3. Springer-Verlag. New York.
- Eberle CA, Anderson NO, Clasen BM, Hegeman AD, Smith AG.** 2013. PELP III: the class III pistil – specific extension-like *Nicotiana tabacum* proteins are essential for interspecific incompatibility. *Plant J.* **74**:805-814.

- Entani T, Iwano M, Shiba H, Takayama S, Fukui K, Isogai A.** 1999. Centromeric localization of an *S*-RNase gene in *Petunia hybrida* Vilm. *Theor. Appl. Genet.* **99**:391-397.
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Che FS, Isogai A, Takayama S.** 2003. Comparative analysis of the self-incompatibility (*S*-) locus region of *Frunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes and Cells.* **8**:203-213.
- Foot HC, Ride JP, Franklin-Tong VE, Walker EA, Lawrence MJ, Franklin FC.** 1994. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (*S*) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2265-2269.
- Franklin-Tong VE, Ride JP, Franklin FCH.** 1995. Recombinant stigmatic self-incompatibility (*S*-) protein elicits a Ca<sup>2+</sup> transient in pollen of *Papaver rhoeas*. *Plant J.* **8**:299-307.
- Franklin-Tong VE, Franklin FC.** 2003. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci.* **8**:598-605.
- Franklin-Tong VE, Holdaway-Clarke TL, Straatman KR, Kunkel JG, Hepler PK.** 2002. Involvement of the extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *Plant J.* **29**:33-345.
- Galichet A, Gruissem W.** 2003. Protein farnesylation in plants- conserved mechanisms but different targets. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **6**:530-535.
- Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-García F, McClure B.** 2006. Compartmentalization of *S*-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature.* **439**:805-810.
- Golz JF, Oh HY, Su V, Kusaba M, Newbigin E.** 2001. Genetic analysis of *Nicotiana* pollen-part mutants is consistent with the presence of an *S*-ribonuclease inhibitor at the *S* locus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:15372-15376.
- Gray JE, McClure B, Bönig I, Anderson MA, Clarke AE.** 1991. Action of the style product of self-incompatibility gene of *Nicotiana alata* (*S*-RNase) on *in vitro* grown pollen tube. *Plant Cell.* **3**:271-283.
- Green PJ.** 1994. The ribonucleases of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**:421-445.
- Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias DD, Goring DR.** 1998. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:382-387.

- Haffani YZ, Gaude T, Cock JM, Goring DR.** 2004. Antisense suppression of thioredoxin *h* mRNA in *Brassica napus* cv Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. *Plant Mol. Biol.* **55**:619-630.
- Hancock CN, Kent L, McClure B.** 2005. The stylar 120 kDa glycoprotein is required for *S*-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* **43**:716-723.
- Hicks GR, Rojo E, Hong S, Carter DC, Raikhel NV.** 2004. Germinating pollen has a tubular vacuoles, displays highly dynamic vacuole biogenesis, and requires *VACUOLESS1* for proper function. *Plant Physiol.* **134**:1227-1230.
- Hiscock SJ, Dickinson HG.** 1993. Unilateral incompatibility within Brassicaceae: further evidence for the involvement of the self-incompatibility (S)-locus. *Theor. Appl. Genet.* **86**:744-753.
- Hiscock SJ, McInnis SM.** 2003. Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends Plant Sci.* **8**:606-613.
- Holstein SHE.** 2002. Clathrin and plant endocytosis. *Traffic.* **3**:614-620.
- Hua Z, Kao T-H.** 2006. Identification and characterization of components of a putative *Petunia S*-locus F-Box Containing E3 ligase complex involved in *S*-RNase based self-incompatibility. *Plant Cell.* **18**:2531-2553.
- Hua Z, Meng XY, Kao T-H.** 2007. Comparison of *Petunia inflata S*-locus F-box protein (PiSLF) with PiSLF-like proteins reveals its unique function in *S*-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell.* **19**:3593-3609.
- Hua ZH, Fields A, Kao T-H.** 2008. Biochemical models for *S*-RNase based self-incompatibility. *Mol Plant.* **1**:575-585.
- Huang J, Zhao L, Yang Q, Xue Y.** 2006. AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-Locus F-Box protein SLF. *Plant J.* **46**:780-793.
- Huang S, Lee H-S, Karunananda B, Kao T-H.** 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata S* protein is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell.* **6**:1021-1028.
- Huang S, Blanchoin L, Chaudhry F, Franklin-Tong VE, Staiger CJ.** 2004. A gelsolin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **279**:23364-23375.

Humphrey C, Foote C, Ride JP, Franklin-Tong VE, Walker EA, Lawrrencw MJ, Franklin CH. 1994. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (*S*) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:2265-2269.

Ida K, Norioka S, Yamamoto M, Kumasaka T, Yamashita E, Newbiggin E, Clarke AE, Sakiyama F, Sato M. 2001. The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana alata* S(F11)-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* **314**:103-112.

Ikeda K, Boris I, Ushijima K, Yamame H, Haunck NR, Nakano R, Sassa H, Iezzoni AF, Kohn JR, Tao R. 2004. Primary structural features of the *S*-haplotype-specific F box protein, SFB, in *Prunus*. *Sex. Plant Reprod.* **16**:235-243.

Ioerger TR, Gohlke JR, Xu B, Kao T-H. 1994. Primary structure features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant. Reprod.* **2**: 81-87.

Jiménez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, Cruz-García F. 2013. NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiol.* **161**: 97-107.

Jordan ND, Franklin FCH, Franklin-Tong VE. 2000. Evidence for DNA fragmentation triggered in the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *Plant J.* **23**:471-479.

Juárez-Díaz J, McClure B, Vazquez-Santana S, Guevara-García A, León-Mejía P, Márquez-Guzmán J, Cruz-García F. 2006. A novel Thioredoxin *h* is secreted in *Nicotiana alata* and reduces S-RNase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **281**:3418-3424.

Kachroo A, Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB. 2001. Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Sciences.* **293**:1824-1826.

Kakita M, Murase K, Iwano M, Matsumoto T, Watanabe M, Shiba H, Isogai A, Takayama S. 2007. Two distinct forms of *M*-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with *S*-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell.* **19**:3961-3973.

Kandasamy MK, Paolillo DJ, Faraday CD, Nasrallah JB, Nasrallah ME. 1989. The *S*-locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. *Dev. Biol.* **134**:462-472.

**Kao T-H, McCubbin AG.** 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:12059-12065.

**Kao T-H, Tsukamoto T.** 2004. The molecular and genetic bases of *S*-RNase- based self-incompatibility. *Plant Cell.* **16**:S72-S83.

**Kemp BP, Doughty J.** 2007. *S* cysteine-rich (SCR) binding domain analysis of the *Brassica* self-incompatibility *S*-locus receptor kinase. *New Phytologist.* **175**:619-629.

**Kondo K, McClure B.** 2008. New microsome-associated HT-family proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family. *Mol. Plant.***8**:634-644.

**Kondo K, Yamamoto M, Matton D, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, y Kowyama 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.

**Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, Kowyama Y.** 2002b. Insights into the evolution of self-comaptibility in *Lycopersicum* from a study of stylar factors. *Plant J.* **30**:142-153.

**Kowyama Y, Kunz C, Kewis I, Newbigin E, Clarke AE, Anderson MA.** 1994. Self-compatibility in a *Lycopersicum peruvianum* variant (LA2157) is associated with a lack of style *S*-RNase activity. *Theor. Appli. Genet.* **88**:859-864.

**Kubo K, Entani T, Takara A, Wang N, Fields AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Isogai A, Kao T-H, Takayama S.** 2010. Collaborative non-self recognition system in *S*-RNase-based self –incompatibility. *Science.* **330**:796-799.

**Kumar A, McClure B.** 2010. Pollen-pistil interactions and the endomembrane system. *J. Exp. Bot.* **61**:2001-2013.

**Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y.** 2002. An F-box gene linked to the self-incompatibility (*S*) locus *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant. Mol. Biol.* **50**:29-42.

**Lee B. Page LE, McClure B y Holtsford T.** 2008. Post-pollination hybridization barriers in *Nicotiana* section *Alatae*. *Sex. Plant. Rep.* **21**:183-195.

**Lee HS, Huang S, Kao T-H.** 1994. *S* protein control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature.* **367**:560-563.



- Lind JL, Bacic A, Clarke AE, Anderson MA.** 1994. A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan protein. *Plant J.* **6**:491-502.
- Lind JL, Bönig I, Clarke AE, Anderson MA.** 1996. A style-specific 120 kDA glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana alata* *in vivo*. *Sex. Plant. Rep.* **9**:75-86.
- Liu P, Sherman-Broyles S, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** 2007. A cryptic modifier causing transient self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* **17**:734-740.
- Luu D-T, Xike Q, Morse D, Cappadocia M.** 2000. *S*-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature.* **407**: 649-651.
- McClure B.** 2006. New views of *S*-RNase-based self-incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**:639-646.
- McClure B, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE.** 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature.* **342**:955-957.
- McClure B, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R.** 1999. A small asparagine-rich protein required for *S*-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:13548-13553.
- McClure B, Cruz-García F, Beecher B, Sulaman W.** 2000. Factors affecting inter and intra specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann. Bot. Supplement.* **85** A:113-123.
- McClure B, Frankling-Tong V.** 2006. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in self pollen tube inhibition. *Planta.* **224**:233-245.
- McClure B, Cruz-García F, Romero C.** 2011. Compatibility and incompatibility in *S*-RNase-based systems. *Ann Bot.* **108**:647-658.
- McCubbin AG, Kao T-H.** 2000. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**:333-364.
- Mishima M, Takayama S, Sasaki K, Jee JG, Kojima C, Isogai A, Shirakawa M.** 2003. Structure of the male determinant factor for *Brassica* self-incompatibility. *J. Biol. Chem.* **278**:36389-36395.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* **15**:473-497.

- Murase K, Shiba H, Iwano M, Che F-S, Watanabe M, Isogai A, Takayama S.** 2004. A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science*. **303**:1516-1519.
- Murffet J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure B.** 1994. *S*-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes *S*-allele specific pollen rejection. *Nature*. **367**: 563-566.
- Murffet J, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure B.** 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.
- Naithani S, Chookajorn T, Ripoll DR, Nasrallah JB.** 2007. Structural modules for receptor dimerization in the *S*-locus receptor kinase extracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**:12211-12216.
- Nasrallah JB, Kao TH, Goldberg L, Nasrallah ME.** 1985. A cDNA clone encoding an *S*-locus specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature*. **318**:617-618.
- Newbing E, Anderson AM, Clarke A.** 1993. Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell*. **5**:1315-1324.
- Novick P, Medkova M, Dong G, Hutagalung A, Reinisch K, Grosshans B.** 2006. Interaction between Rabs, tethers, SNAREs and their regulators in exocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:683-686.
- O'Brien M, Kapfer C, Mayor G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, Matton DP.** 2002. Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J*. **32**:985-996.
- O'Brien M, Major G, Chanta S, Matton D.** 2004. Isolation of a *S*-RNase proteins from *Solanum chacoense*: identification of an SBP1 (Ring finger protein) orthologue. *Sex. Plant Rep.* **17**:81-87.
- Pandey KK.** 1979. The genus *Nicotiana*: Evolution of incompatibility in flowering plants. In *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Hawkes HG, Lester RN, Skelding AD (eds). London Academic Press. Pp 421-434.

**Pelham HRB, Roberts LM, Lord JM.** 1992. Toxin entry: how reversible is the secretory pathway?. *Trends in Cell Biology.* **2**:183-185.

**Puerta AR, Ushijima K, Koba T, Sassa H.** 2009. Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor *HT-B* of *Petunia*. *J. Exp. Bot.* **60**: 1309-1318.

**Qiao H, Wang F, Zhao L, Zhou J, Lai Z, Zhang Y, Robbins TP, Xue Y.** 2004. The F-box protein AhSLF-S2 controls the pollen function of *S*-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell.* **16**:2307-2322.

**Rea AC, Nasrallah JB.** 2008. Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. *Int. J. Dev. Biol.* **52**:627-636.

**Royo, Kunz C, Kowiyama Y, Anderson M, Clarke AE, Newbiggin E.** 1994. Loss of a histidine residue at the active site of *S*-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:6511-6514.

**Rudd JJ, Franklin FCH, Lord JM, Franklin-Tong VE.** 1996. Increased phosphorylation of a 26-kD pollen protein is induced by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell.* **8**:713-724.

**Rudd JJ, Osman K, Franklin FCH, Franklin-Tong VE.** 2003. Activation of a putative MAP kinase in pollen is stimulated by the self-incompatibility (SI) response. *FEBS Lett.* **547**:223-227.

**Russel LB, Kohn JR.** 2008. Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *Int. J. Plant Sci.* **1**: 93-104.

**Sanderfoot AA, Raikhel NV.** 2003. The secretory system of *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* book.

**Samuel MA, Chong YT, Haasen KE, Aldea-Brydges MG, Stone SL, Goring DR.** 2009. Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigma intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell.* **21**:2655-2671.

**Sassa H, Hirano H.** 2006. Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Mol. Gen. Genomics.* **275**:97-104.

Sassa H, Nishio T, Kowyama Y, Hirano H, Koba T, 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.

Sassa H, Kakui H, Minamikawa M. 2010. Pollen-expressed F-box gene family and mechanism of *S*-RNase-based gamethophytic self-incompatibility (GSI) in Rosaceae. *Sex Plant Rep.* **23**:39-43.

Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Bassica*. *Sciences.* **286**:1697-1700.

Shiba H, Takayama S, Iwano M, Shimosato H, Funato M, Nakagawa T, Che F-S, Suzuki G, Watanabe M, Hinata K, Isogai A. 2001. A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen *S*-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiol.* **125**:2095-2013.

Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao T-H. 2004. Identification of the pollen determinant of *S*-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature.* **429**:302-305.

Sims TL, Ordanic M. 2001. Identification of a *S*-ribonuclease-binding protein in *Petunia hybrida*. *Plant. Mol. Biol.* **47**:771-783.

Smalle J, Vierstra RD. 2004. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**:555-590.

Soto C. 2011. Análisis molecular de la región promotora del gen *NaStEP* de *Nicotiana alata*. Tesis de licenciatura para Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. UNAM.

Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB. 1991. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:8816-8820.

Stein JC, Dixi R, Nasrallah ME, Nasrallah JB. 1996. SRK, the stigma-specific *S* locus receptor kinase of *Brassica*, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco. *Plant Cell.* **8**:429-445.

Snowman BN, Kovar DR, Shevchenko G, Franklin-Tong VE, Staiger CJ. 2002. Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell*. **14**:2613-2626.

Stone SL, Arnoldo MA, Goring DR. 1999. A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science*. **286**:1729-1731.

Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR. 2003. ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell*. **15**:885-898.

Sullivan JA, Shirasu K, Deng XW. 2003. The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat. Rev. Genet.* **4**:948-958.

Suzuki G, Kai N, Hirose T, Fukui K, Nishio T, Takayama S, Isogai A, Watanabe M, Hinata K. 1999. Genomic organization of the *S*-locus: identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of the *S9* haplotype of *Brassica campestris* (syn *rapa*). *Genetics*. **153**:391-400.

Swanson R, Edlund AF, Preuss D. 2004. Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annu. Rev. Genet.* **38**:793-818.

Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K. 2000. The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*. **403**:913-916.

Takayama S, Isogai A. 2005. Self-incompatibility in plant. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**:467-489.

Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che FS, Kai N, Watanabe M, Iwano M, Isogai A. 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**:1920-1925.

Tanksley SD, Loaiza-Figueroa F. 1985. Gametophytic self-incompatibility is controlled by a single major locus on chromosome 1 in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc. Natl Acad. Sci.* **82**: 5093-5096.

Thomas SG, Franklin-Tong VE. 2004. Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature*. **429**:305-309.

Thomas SG, Huang S, Li S, Staiger CJ, Franklin-Tong VE. 2006. Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatibility pollen. *J. Cell. Biol.* **174**:221-229.

Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Sato T, Masada M, Marchesi E, Kao T-H. 2003. Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by a modifier locus that suppresses the expression of an *S*-RNase gene. *Sex. Plant. Rep.* **15**:255-263.

Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamame H, Dandekar AM, Gradziel TM, Hirano H. 1998. Cloning and characterization of cDNA encoding *S*-RNase from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the *S*-RNase in Rosaceae. *Mol. Gen. Genet.* **260**:261-268.

Ushijima K, Yamame H, Watari A, Kakehi E, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R. 2004. The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* **39**:573-586.

Wang HY, Xue YB. 2005. Subcellular localization of the *S*-locus F-box protein AhSLF<sub>2</sub> in pollen and pollen tubes of self-incompatible *Antirrhinum*. *J. Integrat. Plant Biol.* **47**:76-83.

Wang S, Kakui H, Kikuchi S, Koba T, Sassa H. 2012. Interhaplotypic heterogeneity and heterochromatic features may contribute to recombination suppression at the *S* locus in Apple (*Malus X domestica*). *J. Exp. Bot.* **63**:4983-4990.

Watanabe M, Takayama S, Isogai A, Hinata K. 2003. Recent progress on self-incompatibility research in *Brassica* species. *Breed. Sci.* **53**: 199-208.

Wheeler D, Newbigin E. 2007. Expression of ten *S* class *SLF*-like genes in *Nicotiana glauca* pollen and its implications for understanding the pollen factor of the *S*-locus. *Genetics*. **177**:2171-2180.

Wheeler M, de Graaf BHJ, Hadjiosif N, Perry RM, Poulter NS, Osman K, Vatovec S, Harper A, Franklin FCH, Franklin-Tong VE. 2009. Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature*. **459**:992-995.

**Xue YB, Carpenter R, Dickinson HG, Coen ES.** 1996. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum S* locus RNase. *Plant Cell.* **8**:805-814.

**Yamame H, Tao R.** 2009. Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of *S*-genotyping in Rosaceous fruit trees. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **78**:137-157.

**Zhihua H, Kao T-H.** 2006. Identification and characterization of components of a putative *Petunia S*-locus F box containing E3 ligase complex involved in *S*-RNase based self incompatibility. *Plant Cell.* **18**:2531-2553.

**Zhou J, Wang F, Ma W, Zhang Y, Han B, Xue Y.** 2003. Structural and transcriptional analysis of *S*-locus F box genes in *Anthirrinum*. *Sex. Plant. Rep.* **16**:165-177.

Página en red

The Plant List: [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org) Fecha de consulta: 05/12/2012.

## 14. APÉNDICES

### 14.1. APÉNDICE I

**Jiménez-Durán K**, Mc Clure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J. Busot G y Cruz-García F. 2013. NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiology*. 161:97-107.



# NaStEP: A Proteinase Inhibitor Essential to Self-Incompatibility and a Positive Regulator of HT-B Stability in *Nicotiana alata* Pollen Tubes<sup>1[W][OA]</sup>

Karina Jiménez-Durán, Bruce McClure, Florenda García-Campusano, Rogelio Rodríguez-Sobres, Jesús Cisneros, Grethel Busot, and Felipe Cruz-García\*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City DF 04510, Mexico (K.J.-D., F.G.-C., R.R.-S., J.C., G.B., F.C.-G.); and Department of Biochemistry, University of Missouri, Columbia, Missouri 65211 (B.M.)

In Solanaceae, the self-incompatibility S-RNase and S-locus F-box interactions define self-pollen recognition and rejection in an S-specific manner. This interaction triggers a cascade of events involving other gene products unlinked to the S-locus that are crucial to the self-incompatibility response. To date, two essential pistil-modifier genes, *120K* and *High Top-Broad (HT-B)*, have been identified in *Nicotiana* species. However, biochemistry and genetics indicate that additional modifier genes are required. We recently reported a Kunitz-type proteinase inhibitor, named NaStEP (for *Nicotiana alata* Stigma-Expressed Protein), that is highly expressed in the stigmas of self-incompatible *Nicotiana* species. Here, we report the proteinase inhibitor activity of NaStEP. NaStEP is taken up by both compatible and incompatible pollen tubes, but its suppression in *Nicotiana* spp. transgenic plants disrupts S-specific pollen rejection; therefore, NaStEP is a novel pistil-modifier gene. Furthermore, HT-B levels within the pollen tubes are reduced when NaStEP-suppressed pistils are pollinated with either compatible or incompatible pollen. In wild-type self-incompatible *N. alata*, in contrast, HT-B degradation occurs preferentially in compatible pollinations. Taken together, these data show that the presence of NaStEP is required for the stability of HT-B inside pollen tubes during the rejection response, but the underlying mechanism is currently unknown.

To avoid low-fitness progeny, many plants have developed a cell-cell interaction mechanism to promote outcrossing, through the recognition and discrimination of both self and nonself pollen. This recognition system is controlled by the highly polymorphic self-incompatibility S-locus, which determines pollination specificity in both the pollen and pistil. Pollen is rejected when male and female S-haplotypes coincide (de Nettancourt, 1977, 2001; Franklin et al., 1995).

In Solanaceae, Plantaginaceae, and Rosaceae, the S-locus product in the pistil is an extracellular glycoprotein named S-RNase (Anderson et al., 1986; McClure et al., 1989). During pollination, S-RNase is taken up by both compatible and incompatible pollen tubes (Lui et al.,

2000) and targeted to a vacuole (Goldraij et al., 2006). In the later stages of an incompatible cross, the S-RNase-containing vacuole is disrupted and the S-RNases are released to the pollen tube cytoplasm, where RNA degradation can occur (McClure et al., 2011).

The S-pollen gene encodes an SLF or SFB (SLF/SFB for S-locus F-box) protein, which is a member of the F-box protein family (Entari et al., 2003; Sijacic et al., 2004). In vitro binding assays show that PSLF in *Petunia inflata* physically interacts with S-RNases, although this interaction is stronger with nonself S-RNases than with self S-RNases (Hua and Kao, 2006). Additional protein-protein interaction assays suggest that SLF/SFB may be a component of an SCF (for Skp1-Cullin1-F-box) or SCF-like complex (Qiao et al., 2004; Hua and Kao, 2006). Notably, data from Zhao et al. (2010) in *Petunia hybrida* show that reduction of PhSSK1 (for *P. hybrida* SLF-interacting Skp-like1) and its *Antirrhinum hispanicum* ortholog, AhSSK1, is also required for cross-pollen compatibility.

Although S-RNase and SLF/SFB define pollen rejection S-specificity, modifier genes unlinked to the S-locus are required for self-incompatibility (St. Martin, 1968; Ai et al., 1991; Murfett et al., 1996; Tsukamoto et al., 1999).

To date, only two pistil-modifier genes have been identified: *High Top-Broad (HT-B)* and *120K*. In *Nicotiana* spp., HT-B is an 8.6-kD acidic protein with a domain consisting of 20 Asn and Asp residues toward its C terminus (McClure et al., 1999; Kondo and McClure,

<sup>1</sup> This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-Universidad Nacional Autónoma de México (grant nos. IN20509 and 210312 to K.J.-D., J.C., and G.B.), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant nos. 102142 and 81968 to K.J.-D., J.C., and G.B.), and the National Science Foundation (grant no. IOB 0614962 to B.M.).

\* Corresponding author; e-mail fcg@umex.mx.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is Felipe Cruz-García (fcg@umex.mx).

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

<sup>[OA]</sup> Open Access articles can be viewed online without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.112.198440](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.112.198440)

2008). Loss-of-function assays prove *HT-B* to be essential for pollen rejection in *Nicotiana* spp., *Solanum* spp., and *Petunia* spp. (McClure et al., 1999; Kondo et al., 2002; O'Brien et al., 2002; Sassa and Hirano, 2006; Puerta et al., 2009), although it is not expressed in SI *Solanum tuberosum*, prompting the speculation that in this species a related gene, *HT-A*, may function as a substitute (Covey et al., 2010). Immunolocalization shows that *HT-B* is readily taken up by pollen tubes during pollination. Its steady-state levels decrease slightly in pollen tubes from incompatible pollinations. However, in compatible crosses, *HT-B* levels decrease 75% to 97%, probably as a result of protein degradation (Goldraij et al., 2006).

120K is a style-specific 120-kD arabinogalactan protein (Schultz et al., 1997) that is taken up by pollen tubes (Lind et al., 1996) and appears to be associated with S-RNase-containing vacuoles (Goldraij et al., 2006). 120K forms complexes with S-RNases and other proteins (Cruz-García et al., 2005) *in vitro*, and suppression of 120K expression prevents S-specific pollen rejection (Hancock et al., 2005). Protein-protein interaction assays demonstrate that 120K interacts with the pollen-specific protein NaPCCP (a pollen C2 domain-containing protein), a protein that binds phosphatidylinositol 3-phosphate and is associated with the pollen tube endomembrane system (Lee et al., 2008, 2009).

Two models have been proposed to explain pollen rejection in Solanaceae. (1) The S-RNase degradation model (Hua and Kao, 2006; Hua et al., 2007, 2008; Kubo et al., 2010) focuses on S-RNase-SLF interactions that bring about preferential nonself S-RNase degradation. In this model, strong nonself S-RNase-SLF interactions lead to the degradation of nonself S-RNases by the ubiquitin-26S proteasome system, allowing pollen tubes to escape from its cytotoxic effect. Weak self S-RNase-SLF interactions, in contrast, permit the persistence of sufficient free S-RNase that pollen tube RNA is degraded, resulting in self-pollen rejection. Notably, by functional and protein-protein interaction assays in *Petunia* spp., Kubo et al. (2010) found at least three types of divergent SLF proteins encoded at the *S*-locus, each recognizing a subgroup of nonself S-RNases. The authors proposed the collaborative nonself recognition model, where multiple SLF proteins interact with nonself S-RNases to protect nonself pollen from degradation (Kubo et al., 2010). (2) The compartmentalization model incorporates the observations that pollen tubes internalize both self and nonself S-RNases and targets them to vacuoles and that *HT-B* is degraded in compatible crosses but is stable in incompatible crosses (Goldraij et al., 2006). In incompatible crosses, the S-RNase-containing vacuoles are ultimately disrupted and S-RNases are released to the cytoplasm, where they degrade RNA, leading to rejection of self-pollen. In compatible crosses, the integrity of the S-RNase-containing vacuoles is preserved, allowing pollen tube growth to continue. Thus, in this model, self or nonself S-RNase-SLF interactions determine the specificity of pollen rejection indirectly.

Biochemical and genetic data show that pistil-modifier genes apart from *HT-B* and 120K are required for SI. We recently described NaStEP (for *N. alata* Stigma-Expressed Protein), an abundant, pistil-specific stigma protein found in SI *Nicotiana* spp. (Busot et al., 2008). Its abundance in SI species made NaStEP a strong modifier gene candidate. Here, we demonstrate that NaStEP is taken up by pollen tubes, has subtilisin inhibitory activity, and that suppressing its expression in transgenic hybrids disrupts pollen rejection. Moreover, when NaStEP-suppressed hybrids are pollinated, *HT-B* protein is degraded in both compatible and incompatible pollen tubes, while in wild-type SI *N. alata*, *HT-B* is preferentially stabilized in incompatible pollen tubes.

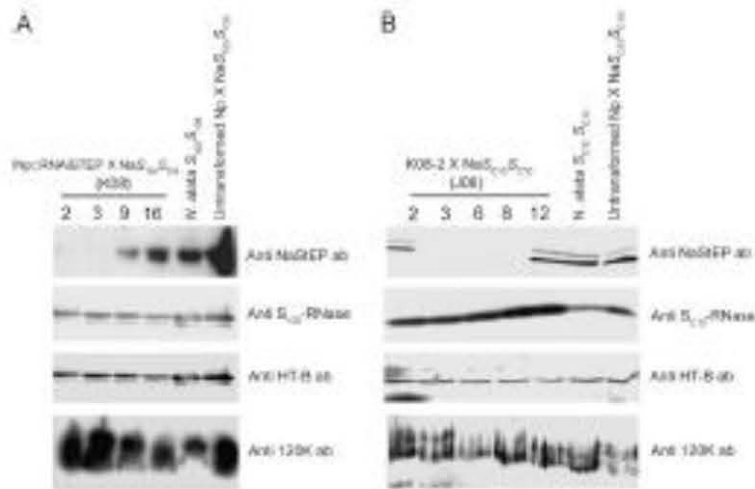
## RESULTS

### NaStEP Suppression

To test whether NaStEP is required for S-specific pollen rejection, we introduced an RNA interference (RNAi)-NaStEP construct into self-compatible (SC) *Nicotiana glauca* (i.e.  $S_0S_0$ ) and crossed to T0 transformants with SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  to generate  $S_{105}S_0$  T1 progeny family K08. Figure 1A shows an analysis of pistil extracts from two hybrids with no detectable NaStEP, K08-2 and K08-3; a partially suppressed hybrid, K08-9; and an unsuppressed hybrid, K08-16. Population J08 was obtained by crossing hybrid K08-2 to SI *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ . This second population enabled testing the effects of NaStEP suppression on a second S-haplotype in a further generation. The entire J08 population consisted of 25 plants (13  $S_{C10}S_0$  and 12  $S_{C10}S_{105}$ ). Ten J08 plants showed suppression and 15 expressed normal levels of NaStEP (Fig. 1B; Supplemental Fig. S1A). Five representatives are shown in Figure 1B. Plants J08-3, J08-6, and J08-8 showed no detectable NaStEP, while plants J08-2 and -12, with nearly normal expression levels, were used as controls (Fig. 1B). The RNAi effect was specific to NaStEP in both the K08 and J08 populations, as little or no change in S-RNase, *HT-B*, or 120K levels was observed (Fig. 1).

### NaStEP Is Required for S-Specific Pollen Rejection

Pollination tests showed that NaStEP expression is essential for S-specific pollen rejection in *Nicotiana* spp. The effect on pollination phenotype was assessed by observing pollen tubes at the base of the style (Fig. 2C) 72 h post pollination after challenging with  $S_{C10}$  or  $S_{105}$  pollen (Fig. 2, A and B; Supplemental Tables S1 and S2). As expected, untransformed control  $S_{105}S_0$  and  $S_{C10}S_0$  hybrids (i.e. *N. glauca* × SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  or *N. glauca* × SI *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  hybrids expressing  $S_{105}$ -RNase or  $S_{C10}$ -RNase, respectively) displayed S-specific pollen rejection by only rejecting pollen with a matching S-haplotype (Fig. 2, A and B, top panels). In contrast, fully suppressed hybrids (K08-2, K08-3, J08-3, J08-6, and J08-8) showed many (more than 50) pollen tubes at the base of the



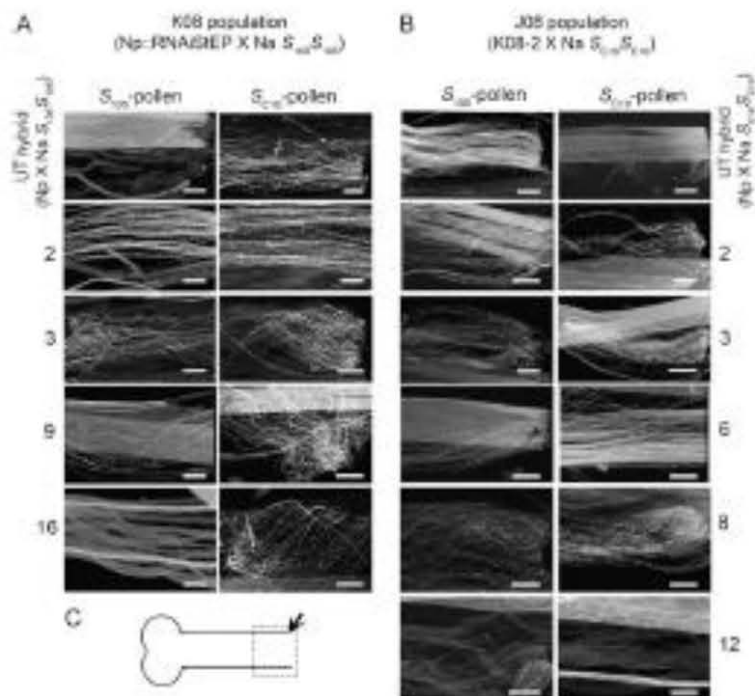
**Figure 1.** NaStEP suppression in *Nicotiana* spp. **A**, Ten-milligram total protein extracts from pistil in transformed SC *N. plumbaginifolia* × SI *N. alata* ( $S_{105}S_{105}$ ) hybrids. NaStEP is not detectable in plants K08-2 and K08-3 and is partially detectable in K08-9. S-RNase, HT-8, and 120K protein levels were not greatly affected. **B**, Ten-milligram total protein extracts from pistil in K08-2 × SI *N. alata* ( $S_{120}S_{120}$ ) property. NaStEP is not detectable in plants J08-3, J08-4, and J08-8. S-RNase, HT-8, and 120K protein levels were not greatly affected. The untransformed control is SC *N. plumbaginifolia* × SI *N. alata* ( $S_{105}S_{105}$  or  $S_{120}S_{120}$ ).

style, regardless of the pollen *S*-haplotype, and thus did not display *S*-specific pollen rejection (Fig. 2, A and B; Supplemental Tables S1 and S2). Moreover, the  $S_{105}S_{105}$  K08-9 hybrid that displayed partially suppressed NaStEP allowed a few pollen tubes to reach the base of the style (Fig. 2A).

#### NaStEP in Interspecific Pollen Rejection

To test the role of NaStEP in interspecific pollen rejection, fully suppressed  $S_{105}S_{105}$  hybrids were pollinated

with SI *Rastroensis* (*Nicotiana rastroensis*), SC *N. longiflora*, SC *N. plumbaginifolia*, SC *N. tabacum*, SC *N. lehrmanniana*, or SC *N. glauca* pollen. Table I shows that untransformed  $S_{105}S_{105}$  hybrids and SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  accepted pollen from SI *Rastroensis* and SC *N. longiflora* but rejected pollen from all other SC species. NaStEP-suppressed hybrids behaved the same with one notable exception, *N. plumbaginifolia*. Fully suppressed hybrids accepted *N. plumbaginifolia* pollen, and the partially suppressed hybrid showed partial compatibility (Table I). Thus, NaStEP is required



**Figure 2.** NaStEP suppression disrupts *S*-specific pollen rejection. **A**, NaStEP RNAi *N. plumbaginifolia* × SI *N. alata* ( $S_{105}S_{105}$ ) hybrids were pollinated with  $S_{105}$  or  $S_{120}$  pollen and prepared for imaging after 72 h. Images were taken at or near the base of the style (arrow in C). The plants K08-2 ( $S_{105}S_{105}$ ) and K08-3 ( $S_{105}S_{105}$ ) show both  $S_{105}$  and  $S_{120}$  pollen tubes reaching the base of the style. **B**, Plants from the J08 population were pollinated with  $S_{105}$  or  $S_{120}$  pollen. The plants J08-3 ( $S_{120}S_{120}$ ), J08-6 ( $S_{120}S_{120}$ ), and J08-8 ( $S_{120}S_{120}$ ) show both  $S_{105}$  and  $S_{120}$  pollen tubes reaching the base of the style. Untransformed (UT) hybrid (*N. plumbaginifolia* × SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  or  $S_{120}S_{120}$ ) pollinated with  $S_{105}$  or  $S_{120}$  pollen was used as a control. Bars = 50  $\mu$ m. Results represent a replicate of three pollination assays. **C**, Pistil diagram showing the observation area for pollen tube growth.

**Table 1.** NaStEP does not account for interspecific pollen rejection

Transformed K08-2 ( $S_{105}S_0$ ), K08-3 ( $S_{105}S_0$ ), and K08-16 ( $S_{105}S_0$ ) hybrids were pollinated with SI *N. glauca* (R), SC *N. longiflor* (Nl), SC *N. plumbaginifolia* (Np), SC *N. tabacum* (Nt), SC *N. lanthaniana* (Nl), and SC *N. glauca* (Ng) pollen. After 72 h of pollination, styles were prepared for imaging. Images were taken at or near the base of the style. Compatible (+), incompatible (-), and semicompatible (+/-) pollinations are indicated. Each symbol (+ or -) represents a replicate of such pollination assay.

Pistil	SI R	SC Nl	SC Np	SC Nt	SC Nl	SC Ng
SI <i>N. glauca</i> $S_{105}S_0$	+,+,+	+,+,+	-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,-
Untransformed hybrid						
Np × <i>N. glauca</i> $S_{105}S_0$	+,+,+	+,+,+	-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,-
K08-2 $S_{105}S_0$	+,+,+	+,+,+	+,+,+	-,-,-	-,-,-	-,-,-
K08-3 $S_{105}S_0$	+,+,+	+,+,+	+,+,+	-,-,-	-,-,-	-,-,-
K08-16 $S_{105}S_0$	+,+,+	+,+,+	+/-,-,-	-,-,-	-,-,-	-,-,-

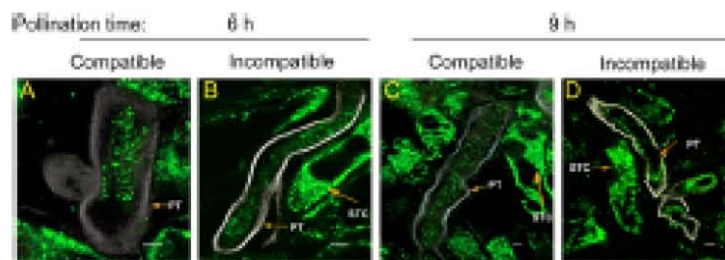
for interspecific rejection of *N. plumbaginifolia* pollen but not for the rejection of pollen from the other SC species that were tested.

#### NaStEP Is Taken Up by Pollen Tubes

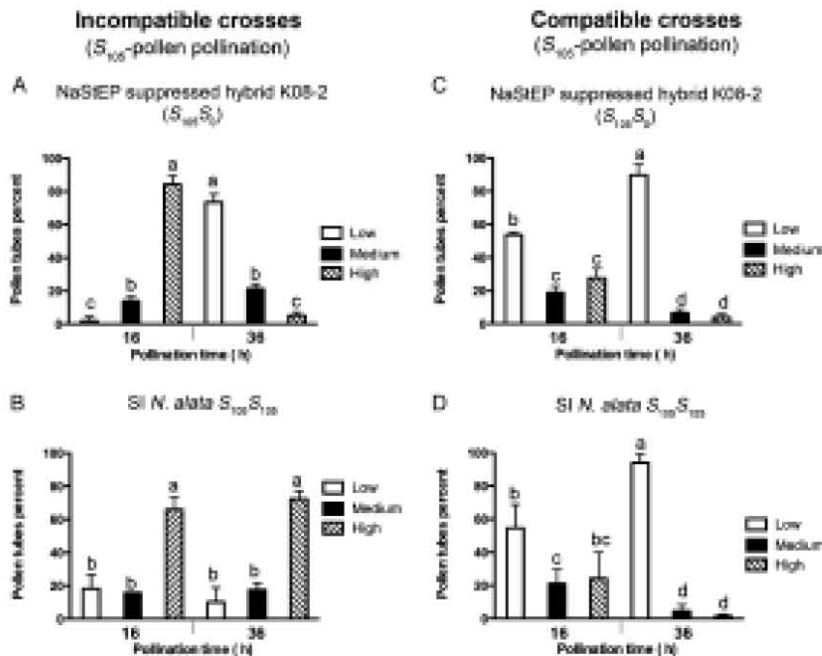
We recently demonstrated that NaStEP is sorted to a vacuole in mature papillary stigmatic cells. Upon pollination, the papillar cell wall becomes perforated and NaStEP is relocated onto the stigma apoplast (Busot et al., 2008). Since NaStEP is essential for pollen rejection (Fig. 2), we hypothesized that it might be taken up and function inside the pollen tube. We performed double-label experiments using antibodies for callose and NaStEP in compatible (*N. alata*  $S_{105}S_{105}$  × *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ ) and incompatible (*N. alata*  $S_{105}S_{105}$  × *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ ) crosses 6 and 9 h after pollination (Fig. 3, green signal). At these times, pollen grains had germinated and pollen tubes had entered the upper style. Figure 3 shows that NaStEP accumulates abundantly in the stigmatic cells. Figure 3 also reveals that NaStEP enters both compatible and incompatible pollen tubes, and once there, its appearance looks like small dots. Relocalization of NaStEP from the stigma surface to the pollen tube would position it to function in internal pollen tube processes.

#### NaStEP Positively Regulates HT-B Stability in Pollen Tubes

NaStEP is a Kuritz-type proteinase inhibitor family member (Busot et al., 2008) and could modulate the stability of other proteins in the pollen tubes. HT-B is of special interest since it shows differential stability in compatible versus incompatible pollen tubes (Goldraij et al., 2006). To test this possibility, we carried out immunolocalization experiments to evaluate HT-B levels in compatible and incompatible pollen tubes. HT-B levels were classified by staining intensity as low or not stained, medium, or high (sample images are shown in Supplemental Fig. S2). In suppressed  $S_{105}S_0$  hybrid challenged with  $S_{105}$  pollen, most pollen tubes contained high levels of HT-B 16 h post pollination, but by 36 h, a striking shift occurred and HT-B was almost undetectable in most pollen tubes (RNAi  $S_{105}S_0$  ×  $S_{105}$  pollen; Fig. 4A). As reported previously (Goldraij et al., 2006), no such shift occurred in control crosses where SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  was challenged with  $S_{105}$  pollen, as HT-B is stabilized in incompatible crosses (SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  ×  $S_{105}$  pollen; Fig. 4B). Compatible crosses also behaved as expected and displayed HT-B degradation. When suppressed  $S_{105}S_0$  hybrid or SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  plants were challenged with  $S_{C10}$  pollen, most pollen tubes showed little or no detectable HT-B by 36 h



**Figure 3.** NaStEP is taken up by pollen tubes. A and B, Six-hours-postpollination pistils. A, SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  pistils pollinated with  $S_{105}$  pollen (compatible). B, SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  pistils pollinated with  $S_{105}$  pollen (incompatible). C and D, Nine-hours-postpollination pistils. C, SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  pistils pollinated with  $S_{C10}$  pollen (compatible). D, SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  pistils pollinated with  $S_{C10}$  pollen (incompatible). Sections from pollinated pistils were simultaneously probed with anti-NaStEP (green) or anti-callose (white) antibodies. PT, Pollen tube; STC, stigmatic cell. Bars = 5 mm.



**Figure 4.** NaStEP suppression negatively affects HT-B levels in both compatible and incompatible pollen tubes. **A**, Hybrid K08-2 ( $S_{C10}S_0$ ; no detectable NaStEP) was pollinated with  $S_{C10}$  or  $S_{C10}$  pollen (**C**). **B**, Wild-type SI *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  was pollinated with  $S_{C10}$  or  $S_{C10}$  pollen (**D**). Analyses were performed at 16 and 36 h post-pollination. Results reflect analysis of 200 pollen tubes. Error bars indicate  $\pm$  of three biological replicates. Values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Analysis was made by Tukey's multiple comparison test after two-way ANOVA ( $\alpha = 3$ ). To perform both analyses, the results expressed as percentages were arcsin transformed in order to have data normally distributed.

(Fig. 4, C and D, respectively). Thus, NaStEP suppression interferes with  $S$ -specific stabilization of HT-B in otherwise incompatible pollen tubes; HT-B degradation occurred regardless of  $S$ -haplotype. These results are consistent with a role for NaStEP in HT-B stability.

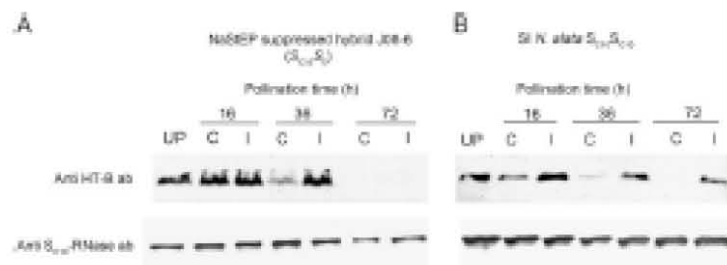
Experiments on pistil extracts also showed HT-B degradation regardless of pollen  $S$ -genotype in suppressed hybrids. Figure 5 shows immunoblot analyses of extracts prepared 16, 36, and 72 h post-pollination. SI *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  controls showed preferential degradation of HT-B after compatible pollination, as reported previously (Fig. 5B; Goldraï et al., 2006). Compatible pollination of NaStEP-suppressed hybrid ( $S_{C10}S_0$ ) showed very similar results (Fig. 5A;  $S_{C10}$  pollen). Incompatible  $S_{C10}$  pollen gave similar results as controls at 36 h, but HT-B was undetectable after 72 h. Thus, degradation of HT-B occurred regardless of pollen  $S$ -genotype in the NaStEP-suppressed hybrid, although the effect at the whole-organ level was delayed compared with observations of HT-B inside pollen tubes (Fig. 4 versus Fig. 5).

#### Model of the NaStEP Three-Dimensional Structure

A model for the NaStEP three-dimensional structure was produced and used for structure-based comparisons with other Kunitz-type inhibitors to infer its possible function. Per-residue GROMOS energies revealed a well-refined final three-dimensional model (Fig. 6). The Rd.HMM score (Martínez-Castilla and Rodríguez-Sotres, 2010) for the NaStEP amino acid sequence was nearly 0.3 times the sequence length

before relaxation (E value of  $1.8 \times 10^{-6}$ ) and 0.92 after relaxation (E value of  $6.4 \times 10^{-8}$ ). The Rd.HMM structurally aware alignment (Martínez-Castilla and Rodríguez-Sotres, 2010) of the model was in frame with the NaStEP amino acid sequence, and no other sequence in the National Center for Biotechnology Information nonredundant database had a higher score. Using a cutoff E value of 10, only orthologs from *N. alata* (GenBank accession no. ABX76298.1) and *N. glutinosa* (GenBank accession no. AAP15901.1) were identified as possible sequence fits with the proposed three-dimensional model. However, the scores for these sequences were only one-half of the score obtained with the NaStEP sequence. Molecular dynamics (MD) simulations (data not shown) also indicate that the proposed structure is very high quality.

Rd.HMM hits with poor scores suggested structural similarity with the barley (*Hordeum vulgare*) subtilisin/ amylase inhibitor. Superimposition of the three-dimensional structure of the barley subtilisin/ amylase inhibitor and the NaStEP three-dimensional model using STAMP (Russell and Barton, 1992) confirmed the close structural relationship. The barley subtilisin/ amylase inhibitor structure was used to model the disulfide bridging pattern and to locate a putative subtilisin inhibitor reactive site in NaStEP (F130-K136). This site is shown in purple in Figure 6, A and B, and is boxed in Figure 6C. Comparison of the reactive sites reveals important sequence differences that could affect specificity. Both sequences have a basic residue (Fig. 6C), although its position differs. Importantly, STAMP does not align the TTCLC sequence in NaStEP with the TTCLC sequence in the



**Figure 5.** HT-B levels decrease after pollination of an RNAi NaStEP-suppressed hybrid. **A**, Hybrid J08-6 ( $S_{120}S_{120}$ ; no detectable NaStEP) plants from not detectable NaStEP RNAi hybrid were heavily pollinated with  $S_{120}$  or  $S_{120}$  pollen and probed to evaluate HT-B and  $S_{120}$ -RNase levels at 16, 36, and 72 h after pollination. **B**, Wild-type *N. glauca*  $S_{120}S_{120}$  plants were heavily pollinated with  $S_{120}$  or  $S_{120}$  pollen and probed to evaluate HT-B and  $S_{120}$ -RNase levels at 16, 36, and 72 h after pollination. Representative results from three totally independent assays are shown. UP, Unpollinated; C, compatible pollination with  $S_{120}$  pollen; I, incompatible pollination with  $S_{120}$  pollen. Ten-milligram total protein extracts were SDS-PAGE fractionated and blotted onto a membrane in each assay.

barley inhibitor, and this indicates a difference in conformation for these important residues. In particular, Thr-134 is not in the same conformation as the essential Thr-88 in the barley protein. In addition, the barley subtilisin/amylose inhibitor binds to subtilisin, forming a tetramer with 2:2 stoichiometry. The complex has two different contact interfaces between the inhibitor and the enzyme: one blocks the enzyme active site, and the other accounts for dimerization.

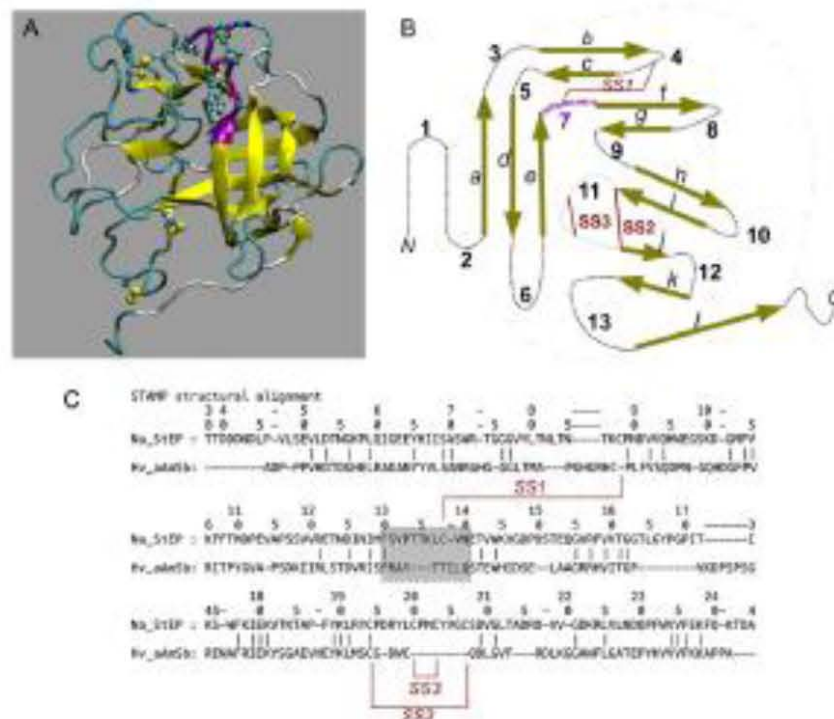
#### NaStEP Is a Subtilisin Inhibitor

NaStEP was purified by ammonium sulfate precipitation and anion-exchange chromatography and tested for its ability to inhibit subtilisin. Fractions were analyzed by SDS-PAGE, and those enriched in NaStEP (Supplemental Fig. S3, A and B) were tested for activity. The results showed that the major Coomassie blue-stainable bands corresponded to anti-NaStEP reactive bands. Active bands were also excised, fragmented, and sequenced by mass spectrometry. The results showed greater than 60% coverage and perfect agreement with the predicted NaStEP sequence (Supplemental Fig. S3C, red letters).

A reverse zymogram assay was used to test NaStEP for subtilisin inhibition activity. In this assay, proteins migrate through the gel and subtilisin inhibition is reflected by preventing the degradation of gelatin. Figure 7 shows two subtilisin inhibition bands with approximate molecular masses between 20 and 35 kD in the enriched NaStEP fractions. The  $\alpha$ -proteinin control ran near 15 kD and also showed strong inhibitory activity. An immunoblot of this gel stained with anti-NaStEP detected both inhibition bands, confirming the subtilisin inhibitory activity of this protein (Fig. 7, A and B versus C). It is not clear why NaStEP runs as multiple bands in these assays, but it may be related to protein oxidation or oligomerization.

#### DISCUSSION

Pollen rejection in *Nicotiana* spp. depends on *S*-specific interactions between *S*-RNase and SLF/STP as well as other modifier genes. Until now, HT-B and 120K were the only identified modifier genes functionally tested in pollen rejection in *Solanum* spp., *Nicotiana* spp., and *Athous* spp. (McCure et al., 1999; Kondo et al., 2002; O'Brien et al., 2002; Hancock et al., 2005; Sassa and Hirano, 2006; Puerta et al., 2009). Here, loss-of-function assays implicate NaStEP as a third modifier gene essential for the *S* pollen rejection response in *Nicotiana* spp., since the suppressed hybrid (SC *N. plumbaginifolia* × SI *N. glauca*) loses the ability to reject pollen in an *S*-specific manner. Likewise, we present data supporting NaStEP involvement in interspecific pollen rejection. Previous studies had shown undetectable transcript and protein levels of NaStEP in the SC species *N. plumbaginifolia* and *N. tabacum* but abundant expression in the mature stigmas of SI *Nicotiana* spp., where it is targeted to a vacuole in the papillar cells and released into the exudate upon pollination (Busot et al., 2008). The accumulation of NaStEP in stigmas suggests a function for this protein during the early stages of pollen germination or pollen tube growth. The roles of stigma-specific proteins in pollination are diverse and may or may not include a function in SI. As an example, the *Brassica* *S*-receptor kinase (SRK) protein functions at early pollination times and is essential to the pollen-rejection response (Stein et al., 1991; Takasaki et al., 2000), while LeSTIG1, a stigma protein from tomato (*Solanum lycopersicum*), interacts with the extracellular domain of the tomato pollen-specific receptor kinases LePRK1 and LePRK2 and stimulates pollen tube growth in vitro (Tang et al., 2004). However, because in the transgenic NaStEP-suppressed hybrids, pollen grains germinate on the stigmatic surface and grow down to the base of the style in high densities, a general role for NaStEP in pollen recognition and pollen

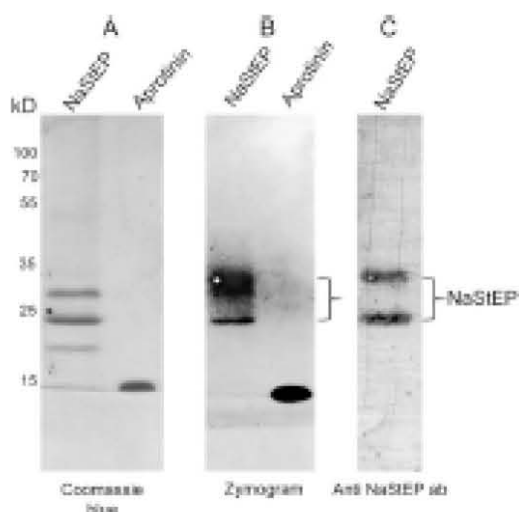


**Figure 4.** Model of the three-dimensional structure for NaStEP. **A**, Overall structure shown as cartoon with yellow  $\beta$ -strands. The putative subtilisin inhibition reactive site is shown in purple (atoms (shadowed) with side chains in balls-and-sticks format (the coloring scheme of the representation as defined in the visualized software: carbon, dark cyan; oxygen, red; nitrogen, blue; sulfur, yellow). Disulfide bridges are shown per the coloring scheme. SS1 appears at the top and SS3 at the bottom. This image was prepared using the visual MD software VMD. **B**, Topology of the model in **A**, showing the classic connectivity of the Kuritz superfamily. Termini are labeled as N and C,  $\beta$ -strands are labeled with lowercase letters, turns/loops/coils (dotted black lines) are labeled with numbers, and disulfide bonds are indicated as red lines. In three dimensions, strand *a* pairs with strand *l* (cyan dotted-dashed lines). The putative subtilisin inhibitor reactive site is at loop 7, shown in purple. **C**, The STAMP plugin in VMD (Russell and Barton, 1992) of the model in **A** to the barley subtilisin-inhibitor in Protein Data Bank entry 3BX1, chain C. In the STAMP comparison, amino acids are aligned if their backbones nearly overlap. The numbers at the top correspond to the NaStEP amino acid sequence. Disulfide bonds are indicated with red lines. The gray box encloses the subtilisin inhibitor barley reactive site motif and its corresponding NaStEP sequence, shown in purple in **A** and **B**.

tube growth may be excluded. Therefore, NaStEP suppression disrupts pollen rejection in an *S*-specific manner, and at least one main function of this gene is required for pollen rejection.

NaStEP function appears to be restricted to *S*-RNase-based self as well as interspecific pollen rejection, because its suppression in *Nicotiana* spp. did not result in any other evident phenotype changes. Interspecific pollen rejection occurs through multiple and complex mechanisms, which in *Nicotiana* spp. happen in both an *S*-RNase-dependent and an *S*-RNase-independent manner (Pandey, 1981; Murfett et al., 1996). Interspecific pollen rejection mediated by *S*-RNases has been shown in some instances to depend strictly on modifier genes common to SI, such as *HT-B* and *I20K* (McClure et al., 1999; Hancock et al., 2005). Suppressed *HT-B* or *I20K* transgenic hybrids of *Nicotiana* spp. (*N. plumbaginifolia*  $\times$  SI *N. glauca*) accept

pollen from the SC *N. plumbaginifolia*, which are otherwise rejected by the untransformed control hybrids (SC *N. plumbaginifolia*  $\times$  SI *N. glauca*; Hancock et al., 2005). Our results using the NaStEP RNAi-silenced hybrid and pollen from different *Nicotiana* species (Table I) highlight the inability of NaStEP-suppressed hybrids to reject *N. plumbaginifolia* or *N. glauca* pollen, in spite of normal *S*-RNase levels. These results show that NaStEP is required for *S*-specific pollen rejection and for rejecting pollen from *N. plumbaginifolia* and further highlight the similarity between the intraspecific SI mechanism and this type of interspecific pollen rejection. However, pollen from other SC species (*N. tabacum*, *N. glauca*, and *N. benthamiana*) clearly does not require NaStEP. This is consistent with other studies showing that multiple mechanisms contribute to interspecific pollen rejection (Murfett et al., 1996). Taken together, our results are congruent with a role for NaStEP as a



**Figure 7.** NaStEP is a subtilisin inhibitor. A, Coomassie blue staining of a NaStEP-purified fraction. B, Reverse zymography revealing NaStEP inhibition of subtilisin proteolytic activity. C, Immunoblotting against NaStEP after zymography.

pistil-modifier gene in SI and point to its involvement in an S-RNase interspecific pollen-rejection pathway dependent on modifier genes, as shown for HT-B and 120K.

Upon pollination, NaStEP is taken up by pollen tubes regardless of their S-haplotype. Although the subcellular destination of NaStEP within the pollen tube is currently unknown, in the S-RNase-based pollen-rejection systems, pistil proteins essential to SI and exerting their function within the pollen tube, such as S-RNases, HT-B, and 120K, have been shown to associate with the pollen tube endomembrane system (Goldraij et al., 2006). Although the molecular mechanism leading to pollen rejection is completely different between gametophytic and sporophytic systems, the events that occur in association with the endomembrane system seem to be relevant to the pollen-rejection response in both systems. Samuel et al. (2009) showed in *Brassica* spp. that Exo70 A1, a subunit of an exocyst complex involved in polarized secretion in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and animals (Novick et al., 2006; Zárský et al., 2009), functions in the polarized transport of vesicles in the stigma and is necessary for the hydration, germination, and growth of compatible pollen tubes. During the SI response, the S-specificity determinants SRK-SCR negatively regulate Exo70 A1, through the activation of ARC1 (for ARM repeat-containing1 protein), an E3 ubiquitin ligase. ARC1 targets Exo70 A1 for degradation, provoking a deregulation of the exocyst function, thereby promoting pollen rejection.

In *N. alata*, following both compatible and incompatible pollinations, S-RNases, HT-B, and 120K are taken up by the pollen tube and become associated

with the endomembrane system. S-RNases are sequestered into a vacuole, where they remain contained until its destabilization releases them into the cytoplasm (Goldraij et al., 2006; McClure et al., 2011). Similarly, biochemical fractionation experiments give evidence of the HT-B association with the microsomal fraction (Kondo and McClure, 2008). Furthermore, immunolocalization studies show the colocalization of 120K with the S-RNases in the pollen tube vacuole (Goldraij et al., 2006). The incorporation of NaStEP into the pollen tube occurs early in pollination (6 h), and its function might be related, directly or indirectly, with the pollen tube endomembrane system. This is supported by the preservation of HT-B from degradation, once inside the pollen tube, when NaStEP is present, disclosing a link between NaStEP and HT-B stability. In wild-type *S. N. alata*, the HT-B remains stabilized in incompatible pollen tubes, even at times when pollen rejection has been effective, whereas it disappears from compatible pollen tubes (Goldraij et al., 2006; Kondo and McClure, 2008). By contrast, in the absence of NaStEP, HT-B signal loss was similar in both compatible and incompatible pollen tubes, which, according to the S-RNase compartmentalization model (Goldraij et al., 2006), would maintain the S-RNase vacuole stable, allowing pollen tube growth.

However, the mechanism by which NaStEP stabilizes HT-B remains to be elucidated. NaStEP is homologous to Kunitz-type protease inhibitors (Busot et al., 2008) and exhibits a subtilisin inhibition activity. A reasonable model could contemplate the inhibitory role of NaStEP on a subtilisin-like component of a proteolytic cascade targeting HT-B during compatible pollen tube growth. However, the putative subtilisin-like component has yet to be identified, and a control mechanism for the NaStEP action remains unknown, since this protein is also present during SI pollination events, where rejection does take place. Besides their possible involvement in SI, plant proteases and protease inhibitors have been increasingly associated with several developmental processes such as plant-pathogen-insect interactions (Li et al., 2008; Harf et al., 2010) and more recently in program cell death (Chichkova et al., 2010), which makes it a very intense field of study.

Our results have led us to consider the timing of the events during the pollen-rejection response. We propose that NaStEP accumulates in the stigmatic exudate during pollination (Busot et al., 2008) and is taken in to the pollen tubes soon after germination in order to protect HT-B (directly or indirectly) in pollen tubes from degradation through its protease inhibitor activity. The HT-B protein is incorporated at later times, once the pollen tube has reached the transmitting tissue in the style. This temporal offset in the incorporation of stilar proteins would allow HT-B to avoid premature degradation and prevent the breakdown of the SI response, since this protein mediates in the rupture of the S-RNase-containing vacuole in the incompatible pollen tubes. This hypothesis is consistent with our observations in the NaStEP-suppressed



hybrids that, in the majority of the pollen tubes from incompatible crosses, HT-B is not detected after 36 h. Likewise, our data show that HT-B might exert its function in pollen rejection around 16 h post pollination, which is when it reaches high levels of accumulation in both compatible and incompatible pollen tubes, and after which its levels decline until they become undetectable. Although the exact time in which the S-RNase-SLF/SPB interaction occurs within the pollen tube and the destabilization of the S-RNase-containing vacuole are not known, we propose that these occur before HT-B degradation is set.

Finally, the development of a reliable and biologically appropriate three-dimensional model was particularly useful to interpret three pieces of experimental data: (1) the increased efficiency of the transit signal in the full protein, compared with the  $\beta$ -region alone, is consistent with a role for the NaStEP C terminus in the stability of the N terminus found in the three-dimensional model; (2) the role of the  $\beta$ -segment as a secretory signal sequence and (3) the activity of NaStEP as a subtilisin inhibitor are both in agreement with the intrinsically disordered nature of these regions and their high solvent accessibility, as deduced from the model. In addition, the model suggests a divergence between the barley subtilisin inhibitor and NaStEP, which suggests a process of subfunctionalization of an ancestral protein during the evolution of the SI mechanisms in *Nicotiana* spp. Accordingly, a similar process of divergence might have taken place on its target protease, and this information could be useful in the search for this putative component.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Materials

SI *Nicotiana glauca* ( $S_{glauca}$ ), SI *Nicotiana glauca*, and SI *Nicotiana glauca* ( $S_{glauca}$ ) have been described previously (Murrett et al., 1994, 1996; Beecher and McClure, 2011). SI *Nicotiana glauca* ( $S_{glauca}$ ) (Inventory no. TW107, accession 438) and SI *Nicotiana glauca* (Inventory no. TW79, accession 184) were obtained from the U.S. Tobacco Germplasm Collection (Crop Research Laboratory). SI *Nicotiana glauca* ( $S_{glauca}$ ) and SI *Nicotiana glauca* ( $S_{glauca}$ ) have been described previously (Jain-Dier et al., 2010; Lee et al., 2009). All plant materials were grown under greenhouse conditions.

### RNAi Construct, Plant Transformation, and Transgenic Hybrid Generation

The complementary DNAs for the sense and antisense NaStEP were amplified as follows: sense oligonucleotide forward primer, 5'-CGCCLTCGAGATGAAATCCCTTTATTTTCAGCTTCTCTTGG-3'; reverse, 5'-CGCCCGGTACTCTCAGGACATAACCTTAACTTGG-3'; antisense oligonucleotide forward primer, 5'-CGC CGCATCCATGAAATCCCTTTATTTTCAGCTTCTCTTGG-3'; reverse, 5'-CGCCCATCCATTCAGGACAAATACCTTAACTCTGTTAGA-3'. The PCR products were cloned into a pMANNINGAL vector (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Plant Industry; Wesley et al., 2011). *N. glauca* was transformed as described (Murrett et al., 1992). Thirty independent lines were analyzed as primary transformants. We recovered one transformed *N. glauca* line, which was crossed with SI *N. glauca*. Four transgenic hybrids (*N. glauca* × SI *N. glauca*) were obtained and designated as K08-2 ( $S_{glauca}$ ), K08-3 ( $S_{glauca}$ ), K08-9 ( $S_{glauca}$ ), and K08-16 ( $S_{glauca}$ ). To generate an advanced hybrid transgenic

population (K08), we crossed the SI fertile hybrid K08-2 (presumably tetraploid) *N. glauca* × SI *N. glauca* with SI *N. glauca*.

### Pollination Phenotype

Mature flowers were pollinated with SI *N. glauca*, SI *N. glauca*, SI *N. glauca*, SI *N. glauca*, SI *N. glauca*, SI *N. glauca*, and SI *N. glauca* ( $S_{glauca}$ ) pollen. Pollen tubes were stained with decolorized aniline blue as described (Ito and Ito, 1968) and counted at the base of the style 72 h after pollination, using an Olympus Provis A300 microscope (Supplemental Tables S1 and S2). Pollinations were repeated at least three times as indicated. When the number of pollen tubes reaching the base of the style was over 200, the cross was considered as compatible (+); when less than 50 pollen tubes were observed at the base of the style, it was considered as incompatible (-); when over 50 but less than 200 pollen tubes were counted at the base of the style, the cross was considered as partially compatible (+/-).

### Protein Isolation and Purification

Pistils were homogenized with extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, and 1% 2-mercaptoethanol). Extracts were clarified by centrifugation, and supernatants were stored at -80°C until use. Protein concentration was estimated using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin as the standard.

### Comparative Modeling of the NaStEP Three-Dimensional Structure

From BLAST analysis, NaStEP belonged to the Kazir superfamily of protein inhibitors. However, the sequence homology of NaStEP to a protein with known three-dimensional structure was low. Therefore, we used the SAM-T08 server (Kaplan, 2009) to obtain a starting three-dimensional model for NaStEP. Only amino acids 38 to 206 of the sequence in GenBank accession A8302871 were included in the model. Structural defects may be present in SAM-T08 models (Chavakis-Adams et al., 2011), and this model was refined using a slow-convergence molecular mechanics (Hypocrite 7.5, AMBER 99 forcefield) minimization scheme described elsewhere (Rosales-Lain et al., 2012). The resulting model was superimposed to the barley (*N Hordeum vulgare*) subtilisin/α-amylase inhibitor (Michelsen et al., 2008; Protein Data Bank entry 2B02, chain C) using STRAP (Rusell and Barton, 1992) as implemented in MULTISEC (Roberts et al., 2006). The structural alignment allowed us to predict two disulfide bonds (Cys-88 to Cys-138 and Cys-194 to Cys-207). The minimal model was further refined using MD simulations in GROMACS 4.5 (Lille et al., 2008) under the GROMOS 53a6 forcefield (Oostenbrink et al., 2004). MD simulations were run in a mass-pressure-temperature conservative ensemble, under octahedral periodicity, with explicit solvent (single-point charge water model) and with NaCl to make the system electrostatically and roughly 0.15 M salt. Electrostatics was handled using the particle-mesh Ewald summations, temperature was 313 K (Berendsen, velocity-rescaled thermal bath), with 1 bar constant pressure (Berendsen Barostat). The integration interval was 2 ps, and the simulation was extended for 25 ns. After 3- to 4-ns simulations, the structure root mean squared deviation and radius of gyration reached a plateau. Cluster analysis of the simulation indicated a third disulfide bond between residues Cys-208 and Cys-193, because their S atoms reached a disulfide bond-compatible geometry with a significant frequency. MD simulations of the fully reduced protein showed a modest impact on the overall folding stability, but with increased fluctuations in the putative subtilisin inhibitor reactive site. The most representative conformation of the model was obtained from a 10-ns MD simulation of the fully oxidized protein. After a final energy minimization, the model was relaxed with the ROSETTA backbone protocol (Jain et al., 2009) and scored for approximation with the Rd. FM protocol (Martinez-Castilla and Rodriguez-Sotres, 2010), both before and after ROSETTA relaxation.

### NaStEP Purification

For NaStEP purification, pistils were ground in liquid N<sub>2</sub> and proteins were extracted with extraction buffer (with 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 5 mM EDTA). The extract was clarified (7,000g, 10 min, 4°C) to eliminate cellular debris, and ammonium sulfate (45% (w/v)) was added to the supernatant in order to precipitate the protein. After 1 h of incubation, the extract

was centrifuged (20,000g, 30 min, 4°C), the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in column buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 100 mM NaCl). Dialysis was performed overnight using the column buffer. The extract was loaded onto an HPLC system (1 mL min<sup>-1</sup>) using a 15-min Source-Q column (GE Healthcare) pre-equilibrated with column buffer, and a linear NaCl elution gradient (200–600 mM) was used. Most of NaSIP eluted gradually before the NaCl gradient was initiated.

### Protein Gel-Blot Analysis

Equal amounts of protein were separated using 12% or 15% SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose. Immunoblotting was performed essentially as described (Cruz-García et al., 2005). Primary antibody dilutions were as follows: anti-20S (1:10,000), anti-HIT-8 (1:5,000), anti-NaSIP (0.1:15,000), anti-S<sub>19</sub>-S<sub>19</sub>Nase (1:10,000), and anti-S<sub>19</sub>-S<sub>19</sub>Nase (1:10,000; Supplemental Fig. S1) as described (Cruz-García et al., 2005; Goldraj et al., 2006; Bucci et al., 2008).

### Zymogram Analysis

Reverse zymograms were performed as suggested by Lantz and Ciborowski (1994). Two sets of gels were used, one without and one including gelatin (0.1% [w/v] copolymerized with the polyacrylamide). After electrophoresis, the gels without gelatin were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 or blotted onto nitrocellulose to be immunostained with anti-NaSIP antibodies as described above. The gelatin gel was fixed twice with 2.5% (v/v) Triton X-100 solution, twice with 2.5% (v/v) Triton X-100 + 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, solution, and twice with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, each for 10 min, in order to remove SEK. The gelatin gel was incubated for 2 h at 37°C in a buffer solution (50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl) to which 2 μg mL<sup>-1</sup> aprotinin was added. Gels were fixed (10% methanol, 10% acetic acid solution) and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Destaining of the gels revealed the inhibition bands at sites where gelatin was not digested by the protease. Confirmation of NaSIP presence at these sites was obtained by immunostaining with anti-NaSIP antibodies as described above. Aprotinin was used as a positive control, because it is a commonly employed Ser protease inhibitor, generally used at a working concentration of 5 μg mL<sup>-1</sup> (Deutscher, 1990). For the zymogram, we loaded 5 μg of aprotinin (Sigma).

### Immunolocalization

Pollinated pistils were harvested and fixed in 4% (v/v) formaldehyde in phosphate-buffered saline after 6, 9, 14, and 36 h, dehydrated in an ethanol series, and embedded in Snowman's wax (Electron Microscopy Sciences). Sections of 6 to 7 μm thickness were incubated with primary rabbit anti-NaSIP antibody (1:2,000; Bucci et al., 2008) or primary anti-HIT-8 antibody (1:1,000; Goldraj et al., 2006) plus mouse anti-callose antibody (Bouquippie Australia 1:1,000). They were then incubated with the secondary antibodies goat anti-rabbit Alexa 488 fluorochrome (1:200; Molecular Probes) for HIT-8 or NaSIP and goat anti-mouse Alexa 568 (1:200; Molecular Probes) for callose for 4 h at room temperature. HIT-8 amount in each pollen tube was classified as low when little or no fluorescence was observed, levels were considered as medium when fluorescence was intermediate, and levels were considered high when the staining was heavy (Supplemental Fig. S2). The fluorescence percentage was calculated taking the total fluorescent area between the pollen tube total area, delimited by the anti-callose antibody signal and using Image Pro Plus 5 software (Media Cybernetics). One hundred percent was taken as the highest immunostaining intensity. All sections were observed using a confocal fluorescence microscope (Olympus FV1000).

### Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Immunoblot analysis of NaSIP, S<sub>19</sub>-S<sub>19</sub>Nase, and S<sub>19</sub>-S<sub>19</sub>Nase in pistils of J08 plants.

Supplemental Figure S2. HIT-8 staining intensity criteria.

Supplemental Figure S3. NaSIP purification.

Supplemental Table S1. Pollen tubes at the base of the style 72 h post-pollination in a NaSIP-suppressed hybrid from the J08 population.

Supplemental Table S2. Pollen tubes at the base of the style 72 h post-pollination in a NaSIP-suppressed hybrid from the J08 population.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Anabel Bales-Antón for her assistance with fluorescence microscopy, to Gabriel Ochoa-Hoyos for confocal microscopy help, to María Teresa Ochoa-Piñero and Laurel Pabla-Saura for plant transformation and greenhouse support, and to Guillermo Mendona for mass spectrometry analysis. We particularly thank the anonymous reviewers for comments to a previous version of the manuscript.

Received April 9, 2012; accepted November 12, 2012; published November 23, 2012.

### LITERATURE CITED

- AI YJ, Kwon E, Kuo TH (1991) S-Alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Phaseolus hybridus*. *Mol Gen Genet* 230: 353–358
- Anderson MA, Comish EC, May SL, Williams RT, Hoggart R, Atkinson A, Bosting I, Gang B, Simpson RJ, Roche PJ, et al (1996) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 381: 39–44
- Beecher B, McClure BA (2001) Effects of S-RNases on rejection of pollen from *Nicotiana glauca* and *N. plumbaginifolia*. *Sex Plant Reprod* 14: 69–76
- 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
- Bucci GY, McClure B, Irujo-Sánchez CP, Jiménez-Durán K, Vázquez-Santana S, Cruz-García F (2008) Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaSIP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homolog. *J Exp Bot* 59: 3187–3201
- Charvátuk-Adams EA, Hernández-Domínguez HE, Gaytán-Mondrangón S, Rosales-Ledón L, Valencia-Turcoate I, Rodríguez-Sotoca R (2011) A hitherto's guide to the modeling of the three-dimensional structure of proteins. *Int Biotechnol Color J* 1: 26–35
- Chirkova NV, Shaw J, Gallullina RA, Deary GJ, Tuzhilkov AI, Kim SH, Kalkin M, Hong TB, Goshkova EN, Yomano L, et al (2010) Phytasease, a localizable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *EMBO J* 29: 1149–1161
- Covey PA, Kondo K, Welsh L, Frank E, Slants S, Kumar A, Nudler B, Lopez-Casado G, van der Knaap E, Rose JK, et al (2010) Multiple features that distinguish unilateral incongruity and self-incompatibility in the tomato clade. *Plant J* 64: 367–378
- Cruz-García F, Hancock CN, Kim D, McClure B (2005) Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *Plant J* 42: 295–304
- de Nettancourt D (1977) Incompatibility in *Angiosperms*. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 3. Springer-Verlag, New York
- de Nettancourt D (2001) Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. Springer-Verlag, New York
- Deutscher MF (1990) Maintaining protein stability. *Methods Enzymol* 182: 83–89
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Cho PS, Inagaki A, 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. *Genes Cells* 8: 203–213
- Franklin FCJ, Lawrence MJ, Franklin-Tong VE (1993) Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int Rev Cytol* 158: 1–64
- Goldraj A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vázquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-García F, McClure BA (2006) Compartmentalization of S-RNase and HIT-8 degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* 439: 805–810
- Hancock CN, Kent L, McClure BA (2005) The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J* 43: 716–723
- Hartl M, Glöckner AF, Kaur H, Balducci IT (2010) Serine protease inhibitors specifically defend *Solanum rigatum* against generalist herbivores but do not influence plant growth and development. *Plant Cell* 22: 4156–4175
- Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Urdahl H (2008) GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput* 4: 435–447

- Hua ZH, Fields A, Kao TH (2008) Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Mol Plant* 1: 575–585
- Hua ZH, Kao TH (2008) Identification and characterization of components of a putative Petunia S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 20: 2531–2553
- Hua ZH, Meng XY, Kao TH (2007) Comparison of Petunia inflata S-locus F-box protein (F1SLF) with F1SLF like proteins reveals its unique function in S-RNase based self-incompatibility. *Plant Cell* 19: 3693–3699
- Jalón-Díaz JA, McClure B, Vázquez-Santana S, Guzmán-García A, Ledesma-Mejía F, Márquez-Guzmán J, Cruz-García F (2006) A novel thiorodotin h is secreted in Nicotiana glauca and reduces S-RNase in vitro. *J Biol Chem* 281: 3418–3424
- Karplus K (2009) SAM-T08, I-TASSER-based protein structure prediction. *Nucleic Acids Res* 37: W602–W607
- Kho YO, Baser J (1968) Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Biochimica* 17: 298–302
- Kondo K, McClure B (2008) New microarray-associated HT-family proteins from Nicotiana respond to pollination and define an HT/WOOD24 protein family. *Mol Plant* 1: 634–644
- Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, Koyama Y (2002) Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant J* 29: 627–636
- Kubo K, Inatani T, Takami A, Wang N, Fields AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Inagai A, et al (2010) Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science* 330: 796–799
- Lantz MS, Chiswick F (1994) Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods Enzymol* 250: 305–394
- Lee CB, Kim S, McClure B (2009) A pollen protein, NaPCCP, that binds plant ambigolactin proteins also binds phosphatidylinositol 3-phosphate and associates with the pollen tube endomembrane system. *Plant Physiol* 149: 79–92
- Lee CB, Swatek KN, McClure B (2008) Pollen proteins bind to the C-terminal domain of Nicotiana glauca plant ambigolactin proteins. *J Biol Chem* 283: 26925–26933
- Li J, Bender G, Palva ET (2008) Kinase tyrosine inhibitor: an antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin b1 in Arabidopsis. *Mol Plant* 1: 482–495
- Lind JL, Wang J, Clarke AE, Anderson MA (1996) A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of Nicotiana glauca in vitro. *Sex Plant Reprod* 9: 75–86
- Liu D-T, Qin X, Mousse D, Cappadocia M (2000) S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* 407: 649–651
- Martin FW (1968) The behavior of Lycopodium incompatibility alleles in an alien genetic milieu. *Genetics* 60: 101–109
- Martín-Castilla LP, Rodríguez-Sotres R (2010) A score of the ability of a three-dimensional protein model to reflect its own sequence as a quantitative measure of its quality and appropriateness. *PLoS ONE* 5: e12405
- McClure BA, Cruz-García F, Romero C (2011) Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann Bot (Lond)* 108: 647–658
- McClure BA, Haring V, Ebert FR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakhyama T, Clarke AE (1989) Style self-incompatibility gene products of Nicotiana glauca are chondroases. *Nature* 342: 952–957
- McClure BA, Mou B, Casaraccia S, Benavidez R (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in Nicotiana. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13548–13553
- Michaelsen FO, Wroblewski J, De Maria L, Ontogan de FR, Felle EF, Wilson K, Skjott M (2008) Structural and mutational analyses of the interaction between the barley alpha-amylase/subtilisin inhibitor and the subtilisin serine protease reveal a novel mode of inhibition. *J Mol Biol* 367: 681–690
- Murlett J, Atherton TI, Mou B, Gasser CS, McClure BA (1994) S-RNase expressed in transgenic Nicotiana causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* 367: 563–566
- Murlett J, Comish EC, Ebert FR, Bonig J, McClure BA, Clarke AE (1992) Isolation of a self-incompatibility glycoprotein (S2-chondroase) from Nicotiana glauca in transgenic Nicotiana tabacum. *Plant Cell* 4: 1063–1074
- Murlett J, Strahala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, 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
- Novick F, Medkova M, Dong G, Hutagalung A, Reinisch K, Grosham B (2006) Interactions between Rab, Rabex, SNAREs and their regulators in eocytosis. *Biochim Soc Trans* 34: 683–686
- O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurent M, Bertrand C, Kondo K, Koyama Y, Matton DP (2002) Molecular analysis of the style-expressed Solanum chacoense small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in Nicotiana. *Plant J* 32: 985–996
- Oostenbrink C, Villa A, Mark AE, van Gunsteren WF (2004) A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A6 and 53A6. *J Comput Chem* 25: 1656–1676
- Pandey KK (1981) Evolution of unilateral incompatibility in flowering plants: further evidence in favor of twin apodictic controlling intra- and interspecific incompatibility. *New Phytol* 89: 703–728
- Puente AR, Ishijima K, Koba T, Sassa H (2009) Identification and functional analysis of plant self-incompatibility factor HT-B of Petunia. *J Exp Bot* 60: 1309–1318
- Qiao H, Wang F, Zhao L, Zhou J, Lai Z, Zhang Y, Robbins TF, Nee Y (2004) The F-box protein ANSLF-52 controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 16: 2307–2322
- Raman S, Vemon R, Thompson J, Tyka M, Sadayappan R, Pei J, Kim D, Kellogg E, DiMello F, Lange O, et al (2009) Structure prediction for CASP9 with all-atom refinement using Rosetta. *Protein (Suppl)* 9: 99–99
- Roberts E, Eargle J, Wright D, Luthy-Schulten Z (2006) MultiSeq: analyzing sequence and structure data for evolutionary analysis. *BMC Bioinformatics* 7: 382
- Rosalba-León I, Hernández-Domínguez EE, Gaytán-Méndez G, Rodríguez-Sotres R (2012) Metal binding site in plant soluble inorganic pyrophosphatase: an example of the use of ROSETTA design and hidden Markov models to guide the homology modeling of proteins. *J Mex Chem Soc* 56: 2–31
- Russell RB, Barton GJ (1992) Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Protein* 14: 309–323
- Samael MA, Cheng YT, Hansen KE, Alder-Brydges MG, Stone SL, Goring DR (2009) Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis thaliana* tissues. *Plant Cell* 21: 2655–2671
- Sassa H, Hiramoto H (2006) Identification of a new class of plant-specific proteins of Petunia inflata that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Mol Genet Genomics* 275: 97–104
- Schultz CJ, Hausen K, Lind JL, Atkinson AH, Fu Z-Y, Anderson MA, Clarke AE (1997) Molecular characterization of a cDNA sequence encoding the backbone of a style-specific 120 kDa glycoprotein which has features of both extensins and ambigolactin proteins. *Plant Mol Biol* 35: 833–845
- Shacle F, Wang X, Skjott AM, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao TH (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429: 302–305
- Skott JC, Howlett B, Boyce DC, Nazzari ME, Nazzari JB (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8816–8820
- Takanashi T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Inagai A, Hinata K (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Nature* 403: 913–916
- Tang W, Kelley D, Encarna I, Cotter R, McCormick S (2004) LeTTG1, an extracellular binding partner for the pollen receptor kinases LePRK1 and LePRK2, promotes pollen tube growth in vitro. *Plant J* 39: 345–353
- Tanakaoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Masada M, Zhu X, Marchese E, Kao T (1999) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanales) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. *Sex Plant Reprod* 12: 6–13
- Wesley SV, Hellwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouze DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stouffer JK PA, et al (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 381–390
- Zinkov V, Cvrckova F, Polovsky M, Hala M (2009) Eocytosis and oil polarity in plants: eocytosis and recycling domains. *New Phytol* 183: 255–272
- Zhao L, Huang J, Zhao X, Li Q, Sassa H, Nee Y (2010) The Ssp1-like protein SSK1 is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant J* 62: 52–60

## 14.2. APÉNDICE II

**Jiménez-Durán K** y Cruz-García F. 2011. Incompatibilidad sexual, un mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34:1-9

## INCOMPATIBILIDAD SEXUAL, UN MECANISMO GENÉTICO QUE EVITA LA AUTOFECONDACIÓN Y CONTRIBUYE A LA DIVERSIDAD VEGETAL

### SEXUAL INCOMPATIBILITY, A GENETIC MECHANISM THAT PREVENTS SELF-FERTILIZATION AND CONTRIBUTES TO PLANT DIVERSITY

Karina Jiménez-Durán y Felipe Cruz-García\*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Col. Cegales, 04510, México D.F. Tel: 55 56224379, Fax: 56225329.

\*Autor para correspondencia (fcg@qsan.unam.mx)

#### RESUMEN

La proximidad de los órganos sexuales en las flores hermafroditas incrementa considerablemente la probabilidad de la autofecundación. Para evitarla, varias especies desarrollaron el sistema de incompatibilidad sexual (SI), mecanismo presente en varias familias de angiospermas que permite al pistilo rechazar el polen propio y aceptar el de plantas genéticamente diferentes. Esto evita la endogamia y favorece la polinización cruzada. La SI está controlada por un locus muy polimórfico llamado locus S que incluye dos unidades transcripcionales estrechamente ligadas. Una de ellas codifica la determinante masculina y la otra a la determinante femenina. En esta revisión se discuten los avances en el control molecular del SI gametofítico presente en las familias Solanaceae, Rosaceae y Brassicaceae, en las que la especificidad del rechazo del polen se ejerce la interacción S-específica de la S-RNasa (determinante femenina) en el pistilo y la proteína SLF (determinante masculino) en el polen. Además, se revisan los posibles mecanismos bioquímicos que conducen al rechazo del polen propio en sistemas basados en S-RNasa, y se propone un modelo combinado.

**Palabras clave:** Sistema de incompatibilidad, rechazo del polen, locus S, S-RNasa, SLF.

#### SUMMARY

Proximity between sexual organs in hermaphrodite flowers highly increases the likelihood of self-fertilization. To avoid it, several species evolved the sexual incompatibility (SI) system, a mechanism present in several angiosperm families which allows the pistil to reject self-pollen and to accept non-self-pollen, thus encouraging outcrossing to prevent inbreeding. The SI is genetically controlled by male and female determinants, both encoded in the highly polymorphic S-locus. In this paper we review and discuss the current advances in the molecular control of the gametophytic SI, present in the Solanaceae, Rosaceae and Brassicaceae families, in which the specificity of pollen rejection is determined by the S-specific interaction between the S-RNase (female determinant) and SLF (S locus F-like protein; male determinant). In addition, we discuss the potential biochemical leading to pollen rejection in S-RNase based systems, and we propose a combined model.

Recibido: 22 de Junio del 2010.

Aceptado: 01 de Marzo del 2011.

**Index words:** Self-incompatibility system, pollen rejection, S locus, S-RNase, SLF.

#### INTRODUCCIÓN

Las angiospermas representan el grupo más importante de las plantas vasculares. Su gran diversidad, amplia masculino (estambres) en la misma flor. La cercanía de estas estructuras aumenta la probabilidad de autopolinización y, por ende, de autofecundación. Para regularla, el pistilo juega un papel esencial, ya que además de recibir al polen en la superficie de su estigma, permitir su hidratación, su germinación y la nutrición y conducción de los tubos polínicos al ovario, también sintetiza factores que ayudan a reconocer y discriminar el polen producido por la misma planta de aquel que proviene de individuos genéticamente relacionados y de otras especies (McClure y Franking-Tong, 2006).

Para promover la polinización cruzada, varias especies hermafroditas desarrollaron adaptaciones morfológicas como la separación espacial del pistilo y los estambres (hercogamia), y fisiológicas, como la maduración diferencial de los órganos reproductivos (dicogamia). Si bien estas modificaciones evitan en gran medida la autofecundación y promueven la polinización cruzada, aún existe la posibilidad de flujo génico a través del polen con los padres o con otros individuos de la progenie. Para contender con esto, un gran número de especies desarrollaron un mecanismo genético-bioquímico de reconocimiento del polen, conocido como sistema de incompatibilidad sexual (AI), el cual se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para

producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977; 2001).

El fuerte control genético que ejercen los sistemas de AI restringe grandemente la introgresión con los padres y las cruza con otros miembros de la progenie. De esta manera la polinización cruzada aumenta la capacidad de sobrevivencia y reproducción, y contribuye así a la diversidad genética de la siguiente generación. En varias familias la AI está controlada genéticamente por un solo locus multialélico conocido como locus *S*, el cual incluye dos genes estrechamente ligados. Una unidad transcripcional codifica la determinante masculina con expresión específica en el polen, y la otra codifica a la femenina con expresión exclusiva en el pistilo. Esta revisión se enfoca al sistema de incompatibilidad gametofítico, para describir el avance logrado en la identificación de los genes que controlan la vía del rechazo del polen, así como de los mecanismos propuestos que la regulan.

Los datos derivados del estudio del mecanismo que controla el rechazo del polen, podrían ser utilizados en programas de mejoramiento genético de especies de importancia agrícola en las familias Solanaceae, Rosaceae y Poaceae, las cuales incluyen especies incompatibles. Por ejemplo, serviría para caracterizar las vías de flujo de polen entre especies silvestres y cultivables, y así determinar si existen barreras reproductivas que eviten la incorporación de alelos de resistencia a enfermedades o a condiciones ambientales adversas. Este conocimiento permitiría establecer esquemas de cruza dirigidas que impacten positivamente a la agricultura.

#### Sistemas genéticos que controlan el rechazo del polen

Los sistemas de AI se distribuyen ampliamente en las angiospermas y están presentes en 91 de las 271 familias descritas (Dickinson *et al.*, 1992). El número de alelos *S* presentes en una población puede ser muy grande y variar de especie a especie; en algunas especies de *Brassica* existen más de 60 alelos, de 60 a 80 en *Papaver* y de 150 a 250 en *Trifolium* (Dickinson *et al.*, 1992). La AI es un ejemplo clásico de un sistema genético que se encuentra bajo selección balanceadora, para mantener los polimorfismos genéticos dentro de una población (Charlesworth *et al.*, 2005; Newbigin y Uyenoyama, 2005).

En especies de la familia Solanaceae, como *Solanum lycopersicum* (*Lycopersicon esculentum* L.) y *Solanum tuberosum* L., el locus *S* se localiza cerca del centrómero del cromosoma I (Tankley y Loainza-Figueroa, 1985), mientras que en *Penunia hybrida* está en la región

pericentromérica del cromosoma III (Entani *et al.*, 1999). La ubicación del locus *S* cerca del centrómero y la proximidad de las dos determinantes provoca que no haya recombinación entre ambos genes, lo que promueve su herencia como una sola unidad mendeliana llamada haplotipo (Cruz-García y McClure, 2001).

En función del tiempo de expresión de la determinante masculina en el polen, los tipos de *S* se clasifican en gametofítico (*SIG*) y esporofítico (*SIS*) (Newbigin *et al.*, 1993). En los sistemas *SIG* los componentes que determinan la incompatibilidad son expresados por el genotipo haploide del grano de polen (gametofito masculino; por eso el nombre de incompatibilidad gametofítica; Figura 1A). En este caso el rechazo del polen ocurre cuando el haplotipo *S* del polen coincide con uno de los dos haplotipos *S* presentes en el pistilo diploide de una planta heterocigota receptora, lo que provoca que el crecimiento del tubo polínico (TP) se inhiba generalmente a nivel del estilo. Por ejemplo, una planta diploide *S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>* producirá granos de polen genética y fenotípicamente *S<sub>1</sub>* o *S<sub>2</sub>*. Cuando los granos de polen con el haplotipo *S<sub>1</sub>* o *S<sub>2</sub>* lleguen a un pistilo *S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>*, germinarán y producirán un TP. Sin embargo, como la cruz es incompatible su crecimiento será inhibido a nivel del estilo. Pero si el haplotipo del polen es *S<sub>3</sub>*, el polen será aceptado y el TP alcanzará el saco embrionario para llevar a cabo la fecundación, lo que resultará en una progenie con individuos *S<sub>1</sub>S<sub>3</sub>* y *S<sub>2</sub>S<sub>3</sub>* (Cruz-García y McClure, 2001) como se ilustra en la Figura 1A).

En los sistemas *SIS* la incompatibilidad está determinada por los productos de los alelos *S* que son expresados y sistematizados por los tejidos diploides de la planta madre, como el tapete, los cuales son incorporados a la cubierta del grano de polen durante su maduración en la antera. En una planta madre heterocigota los dos productos de los alelos *S* estarán presentes en la cubierta del polen (Figura 1B); en este caso una planta *S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>* producirá granos de polen con genotipos *S<sub>1</sub>* o *S<sub>2</sub>*, pero todo el polen producido tendrá el fenotipo *S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>*. Si los granos de polen cubiertos en su superficie con proteínas *S<sub>1</sub>* y *S<sub>2</sub>* caen sobre el estigma de una planta *S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>* el polen será rechazado, en cuyo caso la respuesta de incompatibilidad se manifiesta con inhibición de la germinación del polen en la superficie del estigma. Pero si el polen lleva el producto de los alelos *S<sub>1</sub>S<sub>3</sub>* en su superficie (pero con un genotipo *S<sub>1</sub>* o *S<sub>2</sub>*), el polen germinará y el TP crecerá hasta el óvulo donde ocurrirá la fecundación, para producir una progenie con individuos *S<sub>1</sub>S<sub>3</sub>*, *S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>*, *S<sub>2</sub>S<sub>3</sub>* y *S<sub>2</sub>S<sub>2</sub>*; en este caso toda la progenie producirá polen con las proteínas *S<sub>1</sub>S<sub>1</sub>*, *S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>*, *S<sub>2</sub>S<sub>1</sub>* y *S<sub>2</sub>S<sub>2</sub>* en su superficie, lo que evitará la introgresión con los padres cuyos genotipos son *S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>* y *S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>*, o con sus

hermanos, ya que siempre habrá coincidencia con uno de los haplotipos S. Lo anterior no ocurre en especies SIG, ya que la progenie puede introgresar parcialmente con los padres y con algunos individuos de la progenie (Cruzarcía y McClure, 2001).

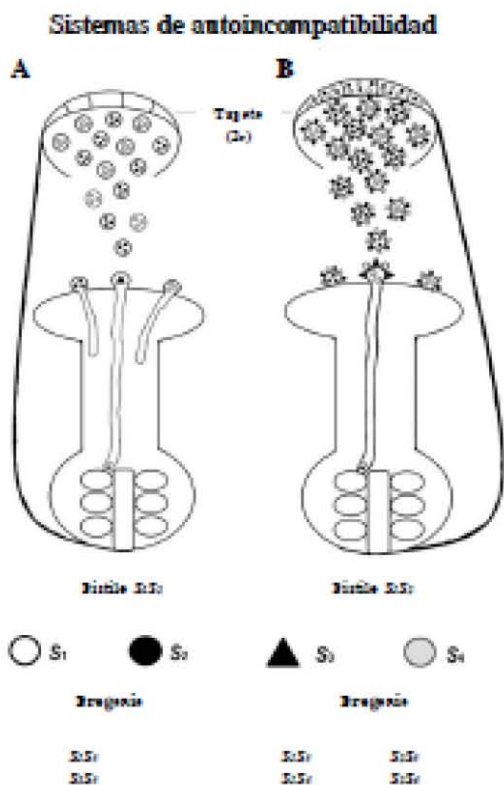


Figura 1. Control genético en los sistemas de incompatibilidad hemaméricos. A) Control gametofítico. Los granos de polen contienen en su citoplasma el producto del alelo S<sub>1</sub> o S<sub>2</sub>. Al llegar al estigma del pistilo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>, germinan y crecen a través del estigma, pero su crecimiento se inhibe en la parte superior del estilo. Sin embargo, un grano de polen con el alelo S<sub>1</sub> es capaz de germinar y crecer a través del tejido de transmisión del estilo hasta alcanzar el ovario y fecundar los óvulos, lo que producirá una progenie S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub>S<sub>1</sub>. B) Control esporofítico. El producto del alelo S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> se expresa en el tejido diploide del tapete, que al degenerar vierte su contenido al interior del lóculo de la antera y cubre la pared de los granos de polen. De esta forma cada grano de polen presenta los productos de los dos alelos S en su cubierta. Los granos de polen al llegar al estigma de un pistilo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> son reconocidos como propios y su germinación se inhibe. Si, por el contrario, llega polen heterocigotamente S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>, estos granos de polen germinan y crecen por el tejido de transmisión del estilo hasta alcanzar los óvulos y fecundarlos, para producir una progenie S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> y S<sub>2</sub>S<sub>2</sub>.

**Sistemas de autoincompatibilidad gametofíticos dependientes de S-RNasa**

El sistema AIG es de los más representados en las angiospermas y se ha estudiado fundamentalmente en las familias Solanaceae (*Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*), Plantaginaceae (*Antirrhinum*) y Rosaceae (*Prunus*, *Pyrus* y *Malus*) (de Nettancourt, 2001; Yamame y Tao, 2009).

S-RNasa es la determinante femenina. El producto génico de la determinante femenina en las familias Rosaceae, Plantaginaceae y Solanaceae, es una proteína con actividad de ribonucleasa conocida como S-RNasa (McClure *et al.*, 1989; Kao y McCubbin, 1996). Las S-RNasas son glicoproteínas de aproximadamente 30 KD que se expresan en estigma, y ovario, y se localizan en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo (Anderson *et al.*, 1986; Cornish *et al.*, 1988; McClure *et al.*, 1989; Sassa *et al.*, 1996; Xue *et al.*, 1996).

Experimentos de ganancia o pérdida de función con plantas transgénicas en *Solanum*, *Petunia* y *Nicotiana*, demuestran que la expresión de diferentes S-RNasas, causa cambios en el fenotipo de polinización, para pasar de compatible a incompatible o viceversa. Por ejemplo, la transformación de los híbridos de *Nicotiana longisloriffii* x *N. glauca* S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S<sub>3</sub> que expresan los transgenes que codifican a la S-RNasa o a la S<sub>1</sub>-RNasa, rechazan el polen S<sub>1</sub> o S<sub>2</sub>, fenotipo que las plantas sin transformar no presentan (Murfett *et al.*, 1994; 1996). En las especies *Prunus*, *Pyrus* y *Malus* de la familia Rosaceae, la identificación de la S-RNasa como la determinante femenina, se hizo en mutantes naturales autocompatibles (AC) con mutaciones en el gen S-RNasa que inactivaban su producto (Yamame y Tao, 2009).

Al respecto, se ha propuesto que las S-RNasas actúan como agentes citotóxicos S-específicos (McClure *et al.*, 1989). Estas ribonucleasas se incorporan a los TP durante su crecimiento por la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, independientemente de si éstos son compatibles o incompatibles (Goldraij *et al.*, 2006). Un dato importante que apoya que las S-RNasas se comportan como citotoxinas fue brindado por Huang *et al.* (1994), quienes por mutagénesis dirigida reemplazaron una de las dos histidinas conservadas en el sitio activo de la S-RNasa de *Petunia inflata*; el resultado fue que los pistilos de las plantas transgénicas fueron incapaces de rechazar el polen S<sub>1</sub> debido a la incapacidad de la S-RNasa para degradar el ARN del TP.

**SFB/SLF es la determinante masculina.** El producto del alelo *S* del polen se identificó recientemente en *Penstemon inflatus* (Sijacic *et al.*, 2004). Este gen se conoce como *SLF* (*S*-locus F-box gene) en solanáceas o *SFB* (*S*-haplotype-specific F-box protein) en Rosaceae, y es miembro de una familia de proteínas que contiene una caja F hacia su extremo amino terminal. En general, esta proteína presenta dos dominios variables (Va y Vb) y dos dominios hipervariables (HVa y HVb) hacia el extremo carboxilo terminal (Ikeda *et al.*, 2004; Yamane y Tao, 2009). De aquí en adelante la determinante masculina será referida como *SLF*.

Los miembros de la familia de proteínas con caja F se asocian con la vía de degradación de proteínas por el proteosoma 26S (Sullivan *et al.*, 2003). La expresión de *SLF* es haplotipo *S*-específica, y se restringe al polen (Sijacic *et al.*, 2004). Para demostrar que *SLF* es la determinante masculina, Sijacic *et al.* (2004) ofrecieron una prueba contundente basada en el modelo de la interacción competitiva (Golz *et al.*, 2001), el cual predice que el polen heteroalélico es aceptado por un estilo incompatible. En esta investigación se transformaron plantas incompatibles de *P. inflatus* *S*<sub>1</sub>*S*<sub>2</sub>, *S*<sub>1</sub>*S*<sub>3</sub> y *S*<sub>2</sub>*S*<sub>3</sub>, con el transgen *SLF*<sup>-</sup> fusionado a un promotor específico de polen. Las plantas transgénicas resultantes produjeron polen homoalélico (*SLF*<sup>-</sup> + *S*<sub>1</sub>) o heteroalélico (*SLF*<sup>-</sup> + *S*<sub>1</sub> o *SLF*<sup>-</sup> + *S*<sub>2</sub>). Cuando las plantas transgénicas de *P. inflatus* *S*<sub>1</sub>*S*<sub>2</sub> + *SLF*<sup>-</sup> o *S*<sub>2</sub>*S*<sub>3</sub> + *SLF*<sup>-</sup> fueron polinizadas con polen homoalélico o heteroalélico, sólo aceptaron el polen heteroalélico; esto demostró que hubo interacción competitiva (Figura 2) y que por, tanto *SLF* es la determinante masculina.

La proteína *SLF* podría funcionar como una enzima ligasa tipo E3 (Sijacic *et al.*, 2004). La degradación de proteínas vía el proteosoma 26S involucra el marcaje por polibiquitinación de las proteínas que se van a degradar. En este proceso las enzimas ligasas E3 representan un paso crucial en el control de la polibiquitinación de la proteína blanco (target), ya que reconocen la señal de ubiquitinación en la proteína seleccionada y coordinan la transferencia de la ubiquitina (proteína de 76 kD) desde la ligasa E2 a un residuo de lisina de la proteína blanco (Sullivan *et al.*, 2003). El reconocimiento de la proteína blanco y la transferencia de ubiquitina por las ligasas E3, puede ocurrir por la formación de un complejo proteico conocido como SCF-E3, el cual se conforma de cuatro proteínas: SKP1, culina, una proteína con caja F y RBX1 (Cardozo y Pagano 2004; Smalle y Vierstra, 2004).

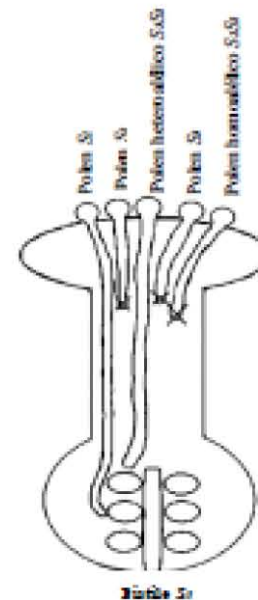


Figura 2. Interacción competitiva. Plantas heterocigoto *S*<sub>1</sub>*S*<sub>2</sub> que al ser polinizadas con polen homoalélico *S*<sub>1</sub>*S*<sub>1</sub> inhiben el crecimiento de los tubos polínicos. Sin embargo, el polen heteroalélico *S*<sub>1</sub>*S*<sub>2</sub> es capaz de crecer por el estilo hasta alcanzar el ovario, al igual que polen *S*<sub>2</sub>.

#### Factores no ligados al locus *S* involucrados en el rechazo del polen

A pesar de que las *S*-RNasas y *SLF* determinan la especificidad de la incompatibilidad, evidencias genéticas indican que los productos de genes modificadores (GM) no ligados al locus *S*, son esenciales en la vía bioquímica del rechazo del polen (Ai *et al.*, 1991; Murfet *et al.*, 1996; Tsukamoto *et al.*, 1999).

Los GM se clasifican 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). Un ejemplo de este grupo de genes lo describieron Tsukamoto *et al.* (1999; 2003) en una población silvestre de *Penstemon axillaris* que segrega plantas autocompatibles y autoincompatibles; estos autores encontraron que la expresión de la *S*-RNasa está suprimida en las plantas AC por una mutación en el locus *MDF*.

El Grupo II comprende GM que regulan la actividad biológica de las determinantes de especificidad y, por tanto, su función se restringe a la incompatibilidad. De este grupo sólo dos GM han sido identificados con función confirmada en el rechazo del polen. Estos GM



codifican a las proteínas HT-B y 120K (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005).

En el Grupo III se encuentran los genes que funcionan en el rechazo del polen y en otros procesos de la interacción polen-pistilo. En este grupo podrían estar *PT5*, *PELP III*, *Nop11*, *NuTnA*, *NuSEP* y *SBP* (O'Brien *et al.*, 2004; Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Busot *et al.*, 2008).

Por obvias razones, los GM más estudiados son HT-B y 120K. Sus productos génicos ingresan a los TP cuando crecen por el estilo en *N. glauca* (Goldraij *et al.*, 2006). HT-B es una proteína de 8.6 kD, con un dominio constituido por 20 residuos de asparagina y ácido aspártico (dominio ND) hacia el extremo carboxilo (Kondo y McClure, 2008). El dominio ND está flanqueado por dos motivos de cisteínas, CAACKC y CQTVCC en *N. glauca* (Kondo y McClure, 2008). HT-B se expresa sólo en estilos maduros de plantas AI (McClure *et al.*, 1999). El gen HT-B está presente en tres géneros de la familia Solanaceae, *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum* (McClure *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002a, b; O'Brien *et al.*, 2002; Sassa y Hirano, 2006). Su papel en la AI se confirmó mediante experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas, las cuales perdieron la capacidad de rechazar su propio polen cuando HT-B fue silenciado (McClure *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2002; Puerta *et al.*, 2009).

La proteína 120K es una arabinogalactoproteína con un motivo de extensina, que se localiza en las células del tejido de transmisión del estilo y es secretada a la matriz extracelular de este tejido tanto de especies autocompatibles como en autoincompatibles de *Nicotiana* (Hancock *et al.*, 2005). El silenciamiento del gen 120K por RNA interferente (RNAi) en híbridos de *N. glauca* x *N. glauca*, abate la capacidad de reconocimiento del polen con el mismo haplotipo S que el pistilo en *N. glauca* (Hancock *et al.*, 2005). En esta especie, 120K forma complejos con las S-RNasas (Cruz-García *et al.*, 2005) e ingresa a los TP independientemente de su haplotipo S (Lind *et al.*, 1996; Goldraij *et al.*, 2006). En cruza compatibles y en etapas tempranas de la polinización de cruza incompatibles, 120K delimita el interior de las vacuolas del TP donde se encuentran contenidas las S-RNasas. No obstante, en etapas tardías (36 h) de una polinización incompatible, 120K ya no se detecta en los TP (Goldraij *et al.*, 2006). Estas evidencias sugieren que 120K podría estar asociada con los sistemas membranosos en el TP y que su participación en el rechazo del polen sería en la liberación de las S-RNasas de la vacuola al citoplasma del TP, en coordinación con HT-B. Dado que en las plantas

transgénicas con el gen 120K silenciado no se afecta el transporte de las S-RNasas al TP, se ha sugerido que esta proteína funciona hasta que ha ingresado al TP (Hancock *et al.*, 2005).

#### Modelos para el rechazo del polen en sistemas de incompatibilidad basados en S-RNasa

En la actualidad existen dos modelos que tratan de explicar cómo las S-RNasas pueden llevar a cabo la inhibición del TP en cruza incompatibles. Uno de ellos involucra la degradación de estas ribonucleasas (Hua *et al.*, 2008) y el segundo su compartimentalización en vacuolas del TP (Goldraij *et al.*, 2006; McClure, 2006).

**Modelo de la degradación de las S-RNasas.** Este modelo se basa fundamentalmente en la potencialidad que tiene SLE por su caja F, para participar en la vía de degradación de proteínas vía el proteosoma 26S. Muchas proteínas con caja F se caracterizan por ser componentes del complejo E3 de ligasa de ubiquitina, llamado SCF (Skp1, Cullin-F box), constituido por Skp1, cullin-1 una proteína con caja f y Rbx1. El complejo SCF está involucrado en la ubiquitinación específica y en la degradación de proteínas blanco mediante el proteosoma 26S, de forma que SLE podría ser parte de un complejo SCF (Moon *et al.*, 2004).

Con base en lo anterior, Hua y Kao (2008) propusieron el modelo de la degradación de la S-RNasa. Para describir este modelo supondremos que un estilo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> es polinizado con polen S<sub>1</sub>, ejemplo en el que tanto la S<sub>1</sub> como la S-RNasa producidas por el estilo son transportadas al interior del TP. En este caso la determinante masculina en el TP es SLE<sub>1</sub>, la cual mediará específicamente la ubiquitinación y la degradación de la S-RNasa por el proteosoma 26S, pero no de la S-RNasa, por lo que esta ribonucleasa ejercerá su efecto citotóxico e inhibirá el crecimiento del TP S<sub>1</sub>. En este modelo se sugiere que la interacción S-no específica entre SLE<sub>1</sub> y la S-RNasa es más fuerte que la interacción SLE<sub>1</sub> con la S-RNasa S-específica. Lo anterior se cumple muy bien en una cruce compatible; por ejemplo, si la polinización ocurre entre un estilo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> y polen S<sub>1</sub>, en el interior del TP se formarían complejos estables S-RNasa-SLE<sub>1</sub> y S-RNasa-SLE<sub>2</sub>, que provocarían la degradación de ambas S-RNasas y la estabilidad del ARN del TP no se vería afectada, de modo que TP alcanzaría el ovario (Figura 3).

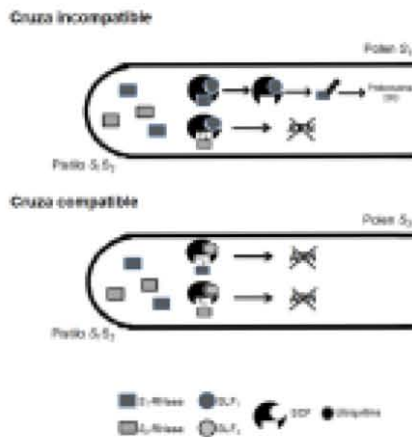


Figura 3. Modelo de la degradación de las S-RNasas. SLE forma parte del complejo SCE encargado de polibiquitar proteínas dianas a su degradación vía el proteasoma 26S. SLE posee un sitio de reconocimiento para todas las S-RNasas y un sitio alole específico. En una cruce incompatible en un tubo polínico Si la interacción entre SLEs y la S-RNasa conduce a la degradación de la S-RNasa. Sin embargo, la interacción alole específica entre SLEs y la S-RNasa no es estable, por lo que la S-RNasa queda libre en el citoplasma para promover la degradación del ARN. En una cruce compatible la interacción no específica entre SLEs y las S-RNasas y S-RNasas ocasiona la degradación de las dos S-RNasas, lo que permite el crecimiento del tubo polínico.

**Modelo de la compartimentalización de las S-RNasas**

Un modelo alternativo para explicar el rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasa fue el propuesto por Goldraij *et al.* (2006), el cual sugiere que las S-RNasas ingresan a los TP por endocitosis sin importar su haplotipo S, y se almacenan en una vacuola. Este modelo, además de la S-RNasa y SLE, incluye a los factores estilares 120K y HT-B como componentes de un sistema selectivo del rechazo del polen secretado a la matriz extracelular del estilo. En esta situación, en una cruce compatible en donde un TP Si crece en un pistilo heterocigoto SiSi, el rechazo se evita debido a que tanto las Si-RNasas como la S-RNasa permanecen secuestradas en la vacuola del TP, como consecuencia de la degradación de HT-B en el TP.

Por otro lado, en el caso de un polen Si o Si cuyos TP se desarrollen en un estilo SiSi, las vacuolas que contienen a las S-RNasas en el TP se romperán entre las 16 y 36 h de polinización, como respuesta a la interacción haplotipo S-específica entre SLE y la S-RNasa. La proteína HT-B, que ha ingresado al TP también y que probablemente se aloja en la misma vacuola donde están almacenadas las S-RNasas, permanecerá estable y

mediará directa o indirectamente en que la vacuola se degrade y libere a las ribonucleasas al citoplasma del TP (Figura 4), en donde ejercerán su efecto citotóxico e inhibirá el crecimiento del TP (Goldraij *et al.*, 2006).

**PROPUESTA DE UN MODELO MIXTO**

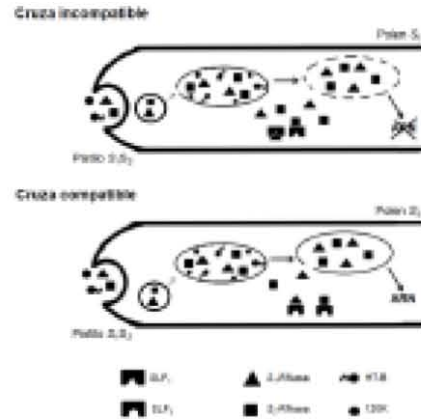


Figura 4. Modelo de la compartimentalización de las S-RNasas. Las S-RNasas ingresan al tubo polínico por endocitosis sin importar su haplotipo S. En una cruce incompatible con un pistilo SiSi las S-RNasas son almacenadas en una vacuola junto con 120K y HT-B. La interacción alole específica entre SLEs y S-RNasas y S-RNasas, conduce a la estabilización de HT-B y al rompimiento de la vacuola del tubo polínico, y dejan libres a las S-RNasas en su citosol para que libere a cabo su efecto citotóxico. En una cruce compatible la interacción no específica entre SLEs, S-RNasas y S-RNasas, produce la degradación de HT-B y la estabilización de la vacuola, por lo que las S-RNasas permanecen almacenadas en la vacuola y el tubo polínico puede crecer hasta alcanzar el ovario.

Los dos modelos anteriores reflejan en gran medida los logros alcanzados en el entendimiento del mecanismo molecular del rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasa. Sin embargo, la información molecular vertida en ambos casos deja muchas incógnitas por resolver, lo que es resultado del desconocimiento de otros genes fuera del locus S, tanto del pistilo como del polen que completan la vía.

Otro aspecto que se deriva de los modelos es la aparente controversia que existe entre ambos, ya que mientras el modelo de la degradación de las S-RNasas establece que SLE es una proteína esencial que protege al tubo polínico de la acción citotóxica de las S-RNasas, y como no se han podido recuperar mutantes nulas para

este gen en algunas solanáceas (Golz *et al.*, 2001; McClure, 2009), el modelo de la compartimentalización propone que SLF causa el rechazo del polen, lo cual es consistente con las mutantes anlas para *SLF* en *Prunus* (Sonneveld *et al.*, 2005).

Si bien en apariencia estos modelos podrían ser irreconciliables, aquí se considera que podrían ser complementarios. Una mezcla de ambos modelos podría ser la siguiente: el proceso podría empezar con la formación de complejos entre SLF y la 5-RNasa en el citoplasma del TP. En el ejemplo que se ilustra en la Figura 5, se presenta un pistilo homocigoto *S<sub>1</sub>S<sub>1</sub>* que es polinizado con el polen *S<sub>1</sub>* (cruza incompatible) o *S<sub>2</sub>* (cruza compatible).

En la cruce incompatible (Figura 5A) se formarían complejos específicos *S<sub>1</sub>*-RNasa-SLF, que permitirían que la proteína HT-B permaneciera estable y activa en el TP para desencadenar la desestabilización y ruptura de la membrana de la vacuola que contiene las 5-RNasas en el TP. Si esto ocurre, las 5-RNasas se liberarían de forma masiva al citoplasma donde degradarían el ARN. Por otra parte, en una cruce compatible (Figura 5B) con polen *S<sub>2</sub>* se formarían los complejos *S<sub>2</sub>*-noespecíficos *S<sub>1</sub>*-RNasa-SLF, los cuales serían re-ensamblados en el complejo SCP-SLF para permitir la polibiquitinación de la 5-RNasa citoplasmática y que ésta sea degradada por el

proteosoma 26S. Notablemente, este nuevo modelo propone también que la proteína HT-B podría ser un blanco del complejo SCP-SLF, que la ubiquitinaria para ser degradada por el proteosoma 26S. Alternativamente, la proteína HT-B podría ser degradada por una proteasa de síntesis *de novo* en el tubo polínico, ya que su programa de síntesis de proteínas sigue activo. Cualquiera que sea la vía de degradación de HT-B, lo importante es que esta proteína no estaría disponible para mediar la ruptura de la vacuola con las 5-RNasas en el tubo polínico, la cual permanecería intacta y bloquearía así la actividad citotóxica de las 5-RNasas para permitir el crecimiento del TP al ovario.

En este modelo unificado la actividad de la 5-RNasa que no se degrada por el proteosoma 26S no sería suficiente para provocar la muerte de los tubos polínicos, y sólo funcionaría para darle especificidad a la respuesta de incompatibilidad.

Sin embargo, para disponer de un modelo que describa con más detalle el mecanismo molecular del rechazo del polen en sistemas basados en 5-RNasas, la investigación futura deberá estar dirigida a responder algunas preguntas, como: ¿Cuáles son las proteínas estilares y del polen que integran la vía bioquímica del rechazo del polen? ¿Cómo se degrada la proteína HT-B en el tubo polínico y si depende de la interacción *S*-específica entre

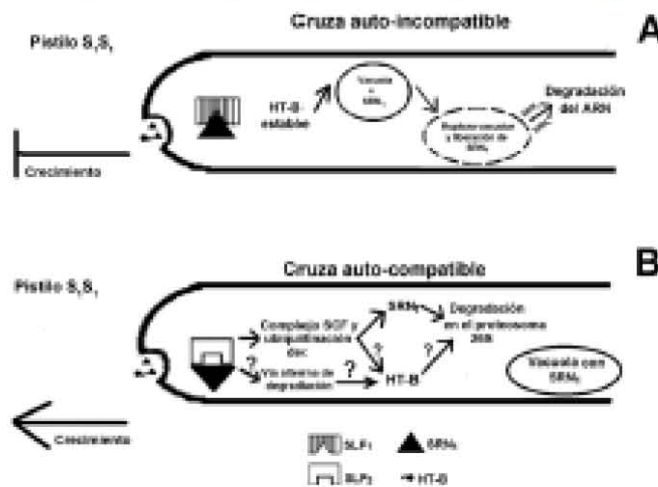


Figura 5. Modelo unificado del rechazo del polen en sistemas basados en 5-RNasas. En este modelo se integran los mecanismos propuestos por Hua y Kas (2000; degradación de la 5-RNasa) y por Goldraij *et al.* (2006; compartimentalización de la 5-RNasa). Aquí se propone que la interacción específica permitiría que la proteína HT-B permaneciera estable y activa en el TP de una cruce incompatible (A), para desencadenar la ruptura de la vacuola que contiene a las 5-RNasas (SRN), y que su liberación masiva inhibiera el crecimiento del TP. En una cruce compatible (B) el escenario sería diferente, ya que la interacción no específica propiciaría el ensamblaje de un complejo SCP-SLF que polibiquitinara a la RNasa y probablemente a HT-B, para ser degradada por el proteosoma 26S. Alternativamente, HT-B podría ser degradada por una proteasa de síntesis *de novo*. En cualquier caso, la degradación de HT-B inhibiría la ruptura de la vacuola con las RNasas, lo que evitaría su actividad citotóxica y permitiría el crecimiento del TP.

SLF y la S-RNasa? ¿Cuáles son las señales que promueven la liberación de las S-RNasas de las vacuolas de TP en cruzas incompatibles? y ¿Cuál es el mecanismo molecular mediante el cual HT-B propicia la desestabilización de la vacuola que contiene a las S-RNasas en el TP en cruzas incompatibles?

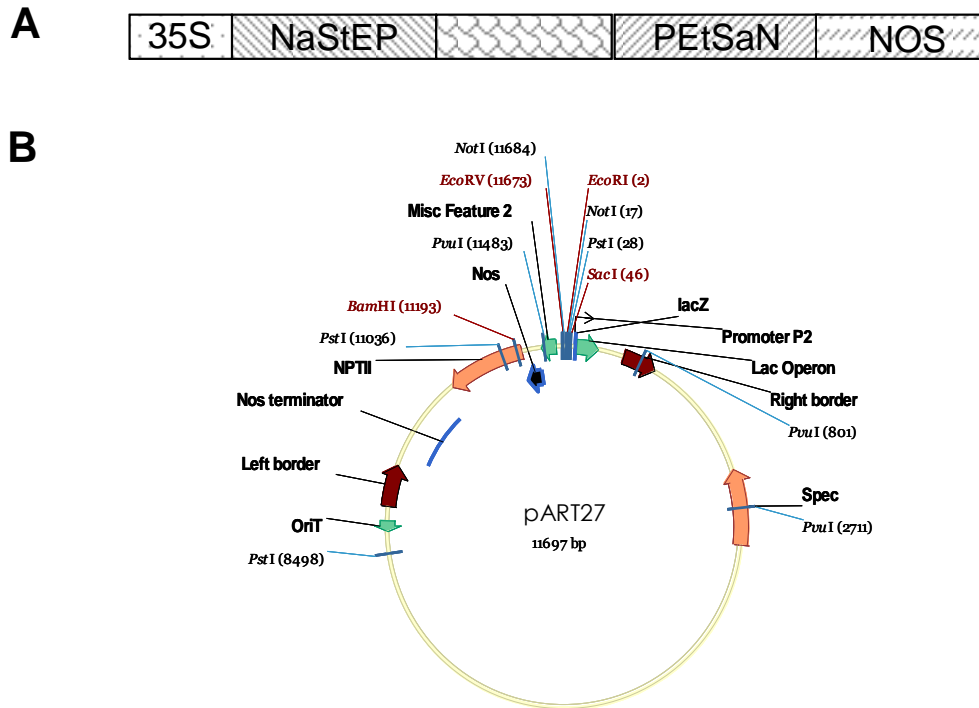
## BIBLIOGRAFÍA

- Ai Y, E Kreis, T-A Kae (1991) S-alleles are retained and expressed in a self-compatible culture of *Penicillium hybridum*. *Mol. Gen. Genet.* 250:353-358.
- Anderson M, A E C Cervink, S L Max, E G Williams, R Haggart, A Arkness, E König, E Grege, R Simpson, J J Reeks, J B Haley, J B Beuchow, H B Niell, G W Trognar, J B Coughlan, R J Crawford, A E Clarke (1996) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 381:50-54.
- Ennet G, E McClure, C Barra-Sánchez, K Jiménez-Barón, S Viquez-Santana, F Cruz-García (2006) Polliniferin in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NtS2B3, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homolog. *J. Exp. Bot.* 58:3187-3200.
- Cardoso T, M Bagnas (2004) The SCP stigmata ligase: insights into a molecular machine. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5:756-751.
- Charltonswath B, X Velamuri, V Castro, S Gilmán (2005) Plant self-incompatibility systems: a molecular evolutionary perspective. *New Phytol.* 162:61-69.
- Cervink E C, M A Anderson, A E Clarke (1995) Molecular aspects of fertilization in flowering plants. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 11:209-228.
- Cruz-García F, E McClure (2001) Sexual incompatibility. In: *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. S S Bajwa, WY Suk (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 11-167-196.
- Cruz-García F, C N Hancock, B Kim, E McClure (2005) Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *The Plant J.* 42:295-302.
- de Nettancourt (1977) Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reprod.* 10:155-199.
- de Nettancourt (2002) Incompatibility in Angiosperms: Managesia as Theoretical and Applied Genetics 3. Springer-Verlag, New York. 312 p.
- Hickman H G, M J C Crabb, T Gaud (1992) Sporophytic self-incompatibility system: 3 gene products. *Internat. Rev. Cytol.* 140:525-561.
- Imai T, M Deura, H Sakai, S Takayama, K Takai, A Inagi (1999) Centromeric localization of an S-RNase gene in *Penicillium hybridum*. *Theor. Appl. Genet.* 99:391-397.
- Goldraj A, K Kaneda, C E Lee, C N Hancock, M Srivastava, S Viquez-Santana, S Kim, T E Phillips, F Cruz-García, E McClure (2006) Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* 439:505-510.
- Gala J E, H Y Oh, V Sa, M Kusaba, E Newthiga (2002) Genetic analysis of *Nicotiana glauca* pollen-pistil mutants is consistent with the presence of a sex S-ribonuclease inhibitor at the S locus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99:15572-15576.
- Hancock C N, L Kist, E McClure (2005) The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant J.* 43:716-723.
- Hsu Z, T-A Kae (2000) Identification of major lysine residues of S-RNase of *Penicillium inflatum* involved in stigmata-2B5 protease-mediated degradation in vitro. *The Plant J.* 24:1094-1104.
- Hsu Z H, A Field, T-A Kae (2000) Biochemical models for S-RNase based self-incompatibility. *Mol. Plant* 1:575-585.
- Huang S, H-S Lee, E Karanamandam, T-A Kae (1994) Ribonuclease activity of *Penicillium inflatum* S protein is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell* 6:1021-1028.
- Iwata K, I Terai, K Ushijima, H Yamano, N R Hancock, R Nakano, H Sano, A I Demeri, J R Kato, R Tuo (2004) Primary structural features of the S-allele-specific F box protein, SFB, in *Prunus*. *Sexual Plant Reprod.* 16:235-245.
- Juárez-Díaz J, E McClure, S Viquez-Santana, A Gasvares-García, F León-Mejía, F Márquez-González, F Cruz-García (2006) A novel Thioridazin B is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase in vitro. *J. Biol. Chem.* 281:5410-5424.
- Kae T-A, A G McCubbin (1996) How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93:12059-12065.
- Kaneda K, E McClure (2000) New nicotiana-associated HT-family proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOB-2a protein family. *Mol. Plant* 2:652-662.
- Kaneda K, M Yamamoto, R Imahashi, T Sato, H Iguchi, T Hattori, T Kawayama (2002a) Insights into the evolution of self-incompatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors. *The Plant J.* 30:142-153.
- Kaneda K, M Yamamoto, B Matsumoto, T Sato, M Hirai, S Nishida, T Hattori, T Kawayama (2002b) Calibrated terms are not defined in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *The Plant J.* 29:627-636.
- Lind J L, I König, A E Clarke, M A Anderson (1996) A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo. *Sexual Plant Reprod.* 9:75-80.
- McClure E (2004) New views of S-RNase-based self-incompatibility. *Curr. Op. Plant Biol.* 9:579-585.
- McClure E (2007) Darwin's foundation for investigating self-incompatibility and the progress toward a physiological model for S-RNase-based SI. *J. Exp. Bot.* 58:1069-1081.
- McClure E, V Haring, E R Short, M A Anderson, R J Simpson, T Sakigawa, A E Clarke (1999) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 392:655-657.
- McClure E, E Max, S Casarmanici, R Bernasconi (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96:15545-15551.
- McClure E, F Cruz-García, E Beecher, W Salzman (2000) Factors affecting inter and intra specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann. Bot. Suppl.* 25A:115-123.
- McClure E, V Trankling-Teag (2004) Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in self pollen tube inhibition. *Plants* 224:253-265.
- Max J, G Barry, M Bartsch (2004) The stigmata-2B3 pathway and plant development. *The Plant Cell* 16:3181-3195.
- Marble J, T L Arkharis, E Max, C S Ganser, E McClure (1994) S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes S-allele specific pollen rejection. *Nature* 367:565-568.
- Marble J, T J Strabala, D M Zurek, E Max, E Beecher, E McClure (1996) S-RNase and inter-specific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *The Plant Cell* 8:845-852.
- Newthiga E, A M Anderson, A Clarke (1993) Gametophytic self-incompatibility system. *The Plant Cell* 5:1515-1524.
- Newthiga E, M K Uppasayama (2005) The evolutionary dynamics of self-incompatibility system. *Trends Genet.* 21:300-305.
- O'Brien M, C Kayler, G Mayer, M Laurin, C Bertrand, K Kaneda, T Kawayama, B E Matsumoto (2002) Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich

- protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *The Plant J.* 32:825-836.
- O'Brien M, G Major, S Chanda, B Mamas (2004) Isolation of a S-RNase protein from *Solanum chacoense*: identification of an SSI1 (King Finger protein) ortholog. *Sexual Plant Reprod.* 17:51-57.
- Parera A R, K Ushijima, T Koba, H Sano (2009) Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-S of *Fuchsia*. *J. Exp. Bot.* 60:1309-1318.
- Sano H, T Niimi, T Kawayama, H Hirano, T Koba, H Ishikawa (1996) Self-incompatibility (S) alleles of the Ranunculaceae exceed members of a distinct class of the T2/S ribonuclease super family. *Mol. Gen. Genet.* 27:222.
- Sano H, H Hirano (2006) Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Fuchsia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from the self-incompatibility factor HT. *Mol. Genet. Genom.* 275:97-102.
- Sijacic B, X Wang, A L Shinya, T Wang, B E Dewd, A G McCubbin, S Huang, T-A Koo (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429:302-305.
- Szmidt J, R B Vierstra (2002) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:525-590.
- Szevenold T, K R Takam, S J Vaughan, T J Rebbin (2005) Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S-qualifying P-box gene. *The Plant Cell* 17:37-51.
- Sullivan J A, K Shirasu, X W Dong (2005) The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Rev. Genet.* 6:425-439.
- Tackxley S D, F Lemus-Figueroa (1985) Gametophytic self-incompatibility is controlled by a single major locus on chromosome 1 in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82:3093-3096.
- Takahashi T, T Aoda, H Kakuhara, H Watanabe, M Masuda, X Zhu, I Marchioni, T-A Koo (1999) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Fuchsia andicola* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. *Sexual Plant Reprod.* 12:1432-1445.
- Takahashi T, T Aoda, H Kakuhara, H Watanabe, T Sato, M Masuda, I Marchioni, T-A Koo (2003) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Fuchsia andicola* caused by a modifier locus that suppresses the expression of an S-RNase gene. *Sexual Plant Reprod.* 15:255-263.
- Xue Y B, R Carpenter, H G Dickinson, E S Coen (1996) Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus RNase. *The Plant Cell* 8:1005-1012.
- Yasuno H, R Tao (2009) Molecular basis of self-incompatibility and current status of S-genotyping in Rosaceae fruit trees. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 78:137-157.

### 14.3. APÉNDICE III. Procedimientos experimentales

Construcción utilizada para el silenciamiento de *NaStEP* mediante RNAi.



**A.** Esquema de la construcción utilizada para el silenciamiento de *NaStEP*. **B.** Mapa del vector binario pART 27.

Transformación mediante biobalística

La metodología utilizada para la obtención de plantas transformadas es la siguiente:

- Preparación de partículas de tungsteno
1. Pesar 60 mg de partículas de tungsteno de 0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro (M10) y colocarlas en un tubo de centrifuga de 15 mL.
  2. Agregar 2 mL de  $\text{HNO}_3$  0.1M y sonicar en hielo 20 min.
  3. Eliminar el  $\text{HNO}_3$ , agregar 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada estéril, transferir la muestra a un tubo de 2 mL y sonicar brevemente.
  4. Centrifugar las micropartículas 30 seg a 13,000 g.
  5. Eliminar el agua, agregar 1 mL de etanol absoluto y sonicar brevemente.
  6. Centrifugar las micropartículas de 30 seg a 13,000 g.

7. Eliminar el etanol, agregar 1 mL de H<sub>2</sub>O desionizada estéril y sonicar brevemente.
8. Colocar 200 µL de la suspensión en tubos de centrifuga.
9. Agregar 750 µL de H<sub>2</sub>O desionizada estéril a cada tubo.
10. Almacenar los tubos a -20°C.

- Precipitación de partículas con DNA

1. Tomar 50 µL de partículas de tungsteno.
2. Agregar 5 µL de la construcción pART 27-NaStEP (1 µg/µL).
3. Agregar 50 µL de CaCl<sub>2</sub>.
4. Agregar 20 µL de espermidina.
5. Agitar con vórtex brevemente.
6. Centrifugar 10 seg a 13,000 g.
7. Eliminar 100 µL de sobrenadante.
8. Resuspender las partículas en el líquido remanente (25 µL).
9. Tomar de 5 µL de las micropartículas cubiertas con el ADN y colocarlas en el centro del filtro del bombardeo para cada disparo.

- Bombardeo con micropartículas de tungsteno con pistola de baja presión

1. Hojas de *N. plumbaginifolia* previamente esterilizadas y cortadas en cuadros de 1.5 cm por lado se utilizaron para transformación. La transformación se llevo a cabo a una presión de 8 bar a una distancia de 13 cm entre el filtro y el tejido blanco, en un vacío de 20 a 21 Hg.
2. El bombardeo con el plásmido pART27 (1 µg/µL) se realizó en 25 cajas petri.
3. Una vez bombardeadas los explantes, se sellaron las cajas y se mantuvieron en una cámara a 25±2°C con un fotoperiodo de 16hr luz/8hr oscuridad.
4. Una semana después del bombardeo las hojas se transfirieron a un medio NAP6 adicionado con 150 mg/L de kanamicina para la selección de las células transformadas.