



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“LOCALIZACIÓN SUBCELULAR *IN VIVO* DE LA PROTEÍNA
NASIPP EN TUBOS POLÍNICOS DE *ARABIDOPSIS
THALIANA*”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Edgar Nájera Torres



MÉXICO, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre
VOCAL	Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas
SECRETARIO	Profesor: Felipe Cruz García
1er. SUPLENTE	Profesor: María Elena Ibarra Rubio
2º SUPLENTE	Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, LABORATORIO 104
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Felipe Cruz García

SUPERVISOR TÉCNICO:

M en C. Yuridia Cruz González Zamora

SUSTENTANTE:

Edgar Nájera Torres

Índice

Contenido

RESUMEN	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1 Procesos de polinización y crecimiento del tubo polínico en <i>Nicotiana</i>	2
1.2 Sistemas de autoincompatibilidad (AI) en plantas.....	5
1.3 Sistema AI Esporofítico (AIE)	9
1.4 Sistema AI gametofítico (AIG)	10
1.5 AIE en <i>Brassicaceae</i>	11
1.6 AIG en <i>Papaveraceae</i>	11
1.7 AIG en <i>Solanaceae</i>	13
1.8 Genes Modificadores.....	17
1.9 NaSiPP	19
2. HIPOTESIS.....	20
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo general.....	20
3.2 Objetivo particular.....	20
4. METODOLOGÍA.....	21
4.1 Construcción de <i>NaSiPP</i> en el vector de clonación <i>pGEM[®]-T</i> Easy Vector:	21

4.2	Construcción de <i>NaSiPP</i> en el vector <i>pNGC</i> y <i>pEarleyGate 103</i> : 25
4.3	Transformación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> DH5a con las construcciones <i>pNGC:NaSiPP</i> y <i>pEarleyGate103:NaSiPP</i> : 28
4.4	Transformación de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> con las construcciones <i>pNGC:NaSiPP</i> y <i>pEarleyGate103:NaSiPP</i> : 30
4.5	Infección y transformación de plantas tipo silvestre de <i>A. thaliana</i> vía <i>A. tumefaciens</i> 33
	Cultivo de las células transformantes de <i>A. tumefaciens</i> : 33
	Preparación de las plantas de <i>A. thaliana</i> : 33
	Método de transformación <i>Floral-Dip</i> : 34
	Recolección y esterilización de semillas transformantes: 34
	Germinación de semillas transformantes de <i>A. thaliana</i> : 34
	Crecimiento y mantenimiento de las plantas transformantes de <i>A. thaliana</i> : 35
	Análisis de plantas transformantes por PCR directo de hoja: 35
	Análisis por microscopia confocal de tubos polínicos de <i>A. thaliana</i> : . 36
	Recolección y germinación <i>in vitro</i> de granos de polen de plantas transgénicas <i>A. thaliana</i> 37
5.	RESULTADOS 39
5.1	Construcción de <i>NaSiPP</i> en el vector de clonación <i>pGEM[®]-T</i> Easy Vector: 39
5.2	Construcción de <i>NaSiPP</i> en el vector <i>pNGC</i> y <i>pEarleyGate103</i> : . 42
5.3	Transformación de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i> con las construcciones <i>pNGC:NaSiPP</i> y <i>pEarleyGate103:NaSiPP</i> : 45

5.4	Infección y transformación de plantas tipo silvestre de <i>A.thaliana</i> mediante <i>A. tumefaciens</i>	50
5.5	Análisis por microscopia confocal de tubos polínicos de <i>A. thaliana</i>	54
6.	Discusión	58
7.	Conclusiones	64
8.	Perspectivas	64
9.	Bibliografía	65
10.	Apéndice	73
A.	Purificación de DNA a partir de gel de agarosa "Zymoclean Gel DNA Recovery"	73
B.	Células electrocompetentes <i>E. coli</i> DH5a	74
C.	Transformación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> DH5a, por medio de Micropulser™ Electroporation Apparatus de BIORAD®	76
D.	Purificación de DNA plasmídico <i>Zymoclean™ miniprep kit</i>	77
E.	Células electrocompetentes <i>A. tumefaciens</i> PGV2260	78
F.	Transformación de células electrocompetentes <i>A. tumefaciens</i> PGV2260, por medio de Micropulser™ Electroporation Apparatus de BIORAD®	79
G.	Extracción de DNA plasmídico por el sistema GeneAll® Hybrid-Q™ Plasmid Rapidprep para bajo número de copias.	80
G.	PCR de DNA genómico directo de hoja por el sistema Phire Plant Direct PCR Kit® Thermo Scientific.	81

RESUMEN

La proteína NaSiPP es de reciente descubrimiento, se expresa en el polen de plantas auto incompatibles y se acumula en etapas maduras de la antera. A nivel de aminoácidos y comparando su secuencia de aminoácidos con las de transportadores de fosfatos mitocondriales, se encontró que la proteína NaSiPP tiene alta homología con estos.

Experimentos de doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae* indican que NaSiPP interactúa físicamente con NaStEP. A su vez, NaStEP es un gen esencial para la incompatibilidad en *Nicotiana*, ya que por medio de experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* se demostró que cuando la expresión de *NaStEP* se encuentra silenciada por medio de un RNA interferente, la planta pierde la capacidad de reconocer y rechazar su propio polen. Por esta razón, resulta relevante determinar la localización subcelular de NaSiPP en diferentes etapas de la maduración e hidratación del polen así como en los tubos polínicos, esto permitiría ir definiendo con mayor precisión su función celular y en la respuesta del rechazo del polen.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 **Procesos de polinización y crecimiento del tubo polínico en *Nicotiana***

Los procesos generales de fecundación en las plantas dependen de interacciones muy específicas entre los gametofitos masculino y femenino, durante este proceso se han identificado 5 etapas principales que conllevan a la fecundación (Hiscock *et al.*, 2008).

- 1. Captura del polen**
- 2. Hidratación de polen**
- 3. Formación del tubo polínico**
- 4. Penetración y crecimiento del tubo polínico a través del estigma y estilo**
- 5. Entrada del tubo polínico hasta el ovulo y la posterior descarga de las células espermáticas provocando la generación del cigoto y endospermo.**

Durante la polinización, los granos de polen son liberados de las anteras. La mayoría de los granos de polen están deshidratados, es decir su contenido de agua es de 15 a 35%. Después de que los granos de polen son liberados de las anteras, son transportados a través de vectores y depositados en la superficie del estigma. Una vez ahí, se adhieren a las papilas del estigma (Lord *et al.*, 2002; Edlund *et al.*, 2004). Posteriormente, se lleva a cabo la hidratación del polen (Lord *et al.*,

2002). La hidratación de los granos de polen es acompañada por la activación de diversos procesos metabólicos (Hiscock *et al.*, 2008).

En especies con estigmas húmedos, como *Nicotiana*, la hidratación de los granos de polen es pasiva y desregulada, debido a que el agua está disponible en las secreciones superficiales del estigma (Hiscock *et al.*, 2008). No obstante, en algunas especies solo algunos granos de polen son hidratados y germinan formando un tubo polínico (TP), cuyo crecimiento es controlado por una compleja vía de señalización que incluye una regulación por un gradiente de Ca^{2+} y la polimerización de F-actina (Lord *et al.*, 2002; McClure *et al.*, 2006).

Después de la germinación, el siguiente paso es la penetración del TP en la superficie estigmática, el TP continúa su crecimiento a través de la matriz extracelular (ME) del tejido de transmisión del estilo (TT), siendo guiado por señales estilares y del saco embrionario hasta llegar al ovario para fecundar el óvulo (Gauze y McCormick, 1999).

En *Nicotiana*, la ME está compuesta por glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, que proveen señales direccionales para el crecimiento del TP hacia el ovario. Dentro de estas glicoproteínas, se encuentran glicoproteínas tejido específico (TTS), glicoproteínas de 120 kDa (120K) y proteínas clase III específicas del TT del pistilo semejantes a extensinas (PELP III). Asimismo, la ME contiene proteínas involucradas en el reconocimiento y rechazo del polen, además de inhibidores de proteasas, que pueden proteger el pistilo de patógenos invasores (McClure *et al.*, 2006).

Una vez en el ovario, el TP libera dos células espermáticas en el saco embrionario para la doble fecundación, en la cual una célula espermática fecunda a la célula huevo para generar el embrión, mientras que la otra célula espermática se fusiona con la célula central para formar el endospermo, el cual provee los nutrimentos necesarios para el desarrollo del embrión (Hunter, 2009; Palanivelu *et al.*, 2010; Sprunck, 2010).

Uno de los primeros eventos durante el reconocimiento del polen se encuentra determinado por la capacidad que tiene la planta receptora a nivel del pistilo. El pistilo juega un papel importante, ya que además de recibir al polen en la superficie de su estigma, permite su germinación, hidratación, nutrición y conducción de los tubos polínicos al ovario.

El pistilo 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 Frankling-Tong, 2006).

Varias especies con flores 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). Estos mecanismos promueven la polinización cruzada y evitan el flujo génico a través del polen entre los padres con algunos individuos de la progenie.

1.2 **Sistemas de autoincompatibilidad (AI) en plantas**

Las angiospermas presentan diferentes estrategias reproductivas que tienen su efecto en el mantenimiento de la diversidad genética.

La reproducción sexual genera combinaciones nuevas de genes y alelos utilizando mecanismos como la cruza entre plantas, la meiosis y la fusión de gametos.

Muchas especies de angiospermas producen flores hermafroditas, las cuales pueden ser polinizadas con su propio polen (autopolinización), o por el de diferentes individuos (polinización cruzada).

Con frecuencia ambos órganos sexuales se encuentran en la misma flor, lo cual incrementa la probabilidad de la autopolinización (Hernández *et al.*, 2009) lo que redundaría en la disminución de la variabilidad genética. Para evitar los efectos negativos de la misma algunas especies desarrollaron adaptaciones morfológicas, fisiológicas y genéticas para abortar la progenie de individuos cercanamente relacionados o incompatibles y mantener la diversidad genética en las generaciones subsecuentes (Goring *et al.*, 2001; Takayama *et al.*, 2005).

Algunas de las barreras para prevenir la autopolinización son la dicogamia y la hercogamia.

La dicogamia es la separación temporal de los órganos reproductivos para evitar la autofecundación y favorecer la fecundación cruzada. Por

ejemplo, una especie con flores hermafroditas, en la cual maduran primero los órganos masculinos (androceo) y luego los órganos femeninos (gineceo), es decir, funcionará como flor masculina primero y más tarde como flor femenina (de Nettancourt, 2001).

La hercogamia es la separación espacial de los pistilos y estambres. Un ejemplo de esto ocurre en poblaciones de plantas distílicas, donde algunos individuos presentan flores con estilos más cortos que las anteras y plantas con flores con estilos largos y anteras cortas. El flujo génico a través del polen en estas especies ocurre solamente entre las flores con pistilos largos con polen producido en flores con anteras largas y lo mismo para el caso de anteras y estilos cortos (de Nettancourt, 2001).

Sin embargo, estos sistemas no son del todo eficientes, porque la restricción del flujo de polen entre individuos de la misma progenie o con los padres (introgresión), es limitada. Por tanto, muchas especies de plantas han desarrollado mecanismos únicos que permiten incrementar la polinización cruzada denominados sistemas de autoincompatibilidad (AI). Los sistemas de AI controlan genéticamente aquellos mecanismos que evitan la fecundación por el polen propio o polen de plantas estrechamente relacionadas (de Nettancourt, 2001).

La AI se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 2001). Es el principal mecanismo que promueve la cruce entre individuos no emparentados y previene la endogamia, por lo que se ha sugerido que la AI es uno de los mayores progresos evolutivos para las angiospermas (Franklin-Tong, 2008; Hunter, 2009).

Más de la mitad de las aproximadamente 250,000 especies de angiospermas presentan alguna forma de AI, lo cual muestra una presión considerable para prevenir la autopolinización e incrementar la diversidad genética (Franklin-Tong, 2008; Roldan *et al.*, 2010).

Los sistemas de AI se encuentran ampliamente distribuidos en las angiospermas y se han descrito en 91 de 271 familias. Una característica exclusiva de los sistemas de AI en plantas es que se basan en el reconocimiento de lo propio, a diferencia de lo que sucede en el resto de los sistemas conocidos, donde lo reconocido es lo no propio (Nasrallah, 2002).

La combinación de las barreras físicas, fisiológicas y genéticas, evitan en gran medida la autopolinización, ya que además, junto con las mutaciones y la recombinación en la meiosis, promueven la diversidad genética en las poblaciones, asegurando el mantenimiento de la variación genética en las especies y la capacidad de adaptarse a nuevos ambientes.

Los sistemas de AI se clasifican en dos tipos: homomórficos y heteromórficos. El primer tipo está controlado genéticamente por un solo locus multialélico, llamado locus **S**, que incluye un par de genes fuertemente ligados que son requeridos para mediar el rechazo del polen de manera alelo **S** específico (Takayama *et al.*, 2005).

A pesar de que la especificidad de la respuesta de AI está dictada por el locus **S**, el rechazo del polen se realiza por diversos mecanismos, que han evolucionado de manera independiente (Charlesworth *et al.*, 2005).

En algunas familias como *Brassicaceae* y *Papaveraceae*, el reconocimiento de las determinantes está dado por un mecanismo de ligando-receptor (Takayama *et al.*, 2005). En Solanáceas, la determinante femenina tiene un papel citotóxico que degrada el RNA del TP, abatiendo su crecimiento (Chen *et al.*, 2010).

A su vez, los sistemas AI homomórficos se dividen en dos clases principales: la AI gametofítica (AIG) y la esporofítica (AIE) [Hernández *et al.*, 2009].

El tipo homomórfico ha sido clasificado en gametofítico y esporofítico, dependiendo del genotipo que determine el comportamiento del polen en la AI. Es gametofítico está determinado por el genotipo del polen y el esporofítico por el genotipo de la planta de la cual proviene el polen.

Hasta la fecha solamente han sido estudiadas a nivel molecular cinco familias con AIG (*Papaveraceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*, *Plantaginaceae* y *Solanaceae*) y una sola familia con AIE (*Brassicaceae*) [Franklin-Tong *et al.*, 1995]. No obstante, ya han sido iniciados estudios en los sistemas de AIE en las familias *Convolvulaceae*, *Asteraceae* y *Betulaceae* (Hiscock y Mc Innis, 2003).

1.3 Sistema AI Esporofítico (AIE)

En la AIE el fenotipo **S** del polen está determinado por el genotipo diploide de la antera donde se desarrolló. Los alelos **S** son expresados en las células tapetales de la antera, por lo que la cubierta del polen tendrá dos proteínas **S**, el polen será rechazado si alguna de las dos proteínas **S** en la cubierta coinciden con alguna proteína **S** expresadas en el pistilo. El rechazo ocurre a nivel del estigma (Franklin-Tong, 2008).

En la AI esporofítica los tubos polínicos no se desarrollan correctamente en el estigma que expresa el mismo haplotipo **S**. El rechazo del polen resulta en la anulación de la hidratación del grano de polen o en una rápida detención del crecimiento del TP en la superficie estigmática (Busot *et al.*, 2009).

La determinante femenina es conocida como SRK (receptor de cinasa del locus **S**), es expresada en las células papilares del estigma. Esta determinante es una proteína con un dominio extracelular denominado dominio **S** o dominio receptor, un dominio transmembranal y uno intracelular de cinasa. Se sugiere que el dominio receptor es el responsable de la **S** especificidad, debido a que contiene regiones hipervariables (Hiscock *et al.*, 2003). Experimentos de ganancia de función muestran que SRK determina la **S** especificidad en el estigma; sin embargo, la capacidad del estigma para rechazar el polen incompatible es potenciada por la presencia de un segundo gen **S** estigmático (glicoproteína del locus **S**, **SLG**) [Hiscock *et al.*, 2003].

La determinante masculina es una proteína del polen rica en cisteínas, denominada SCR, también es conocida como SP11 (proteína 11 del locus **S**). Su expresión se detecta específicamente en las células de la antera. La proteína SP11 se secreta desde las células tapetales hacia la superficie del polen, localizándose en la exina de éstos (Busot *et al.*, 2009).

1.4 Sistema AI gametofítico (AIG)

En este caso el fenotipo **S** del polen está determinado por su genotipo haploide, por lo que el polen es rechazado cuando el haplotipo **S** del polen coincide con alguno de los dos haplotipos **S** de un pistilo diploide heterocigo (Franklin-Tong, 2008; Hernández *et al.*, 2009).

En muchas familias con sistemas de AIG (Solanaceae, Plantaginaceae, Rosaceae y Papaveraceae), los granos de polen germinan independientemente de su haplotipo **S** y producen un TP. Si la cruz es compatible porque no existe coincidencia entre el haplotipo **S** del polen con alguno del pistilo, el TP crecerá a lo largo del estilo hasta llegar al ovario; sin embargo, en cruzas incompatibles, el TP será inhibido a nivel del estilo y no logrará alcanzar el ovario (Chen *et al.*, 2010).

Al parecer la AI se ha desarrollado de manera independiente en los diferentes linajes de angiospermas. Se han estudiado a nivel molecular tres mecanismos diferentes:

1. Brassicaceae
2. Papaveraceae
3. Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae

1.5 AIE en *Brassicaceae*

En *Brassicaceae* el sistema de AI es esporofítico y el locus *S* tiene un tamaño de aproximadamente 80 a 100 kb y contiene hasta 17 genes (Watanabe *et al.*, 2000), de los cuales, solo existen dos genes fuertemente ligados, altamente polimórficos y requeridos para el reconocimiento alelo *S* específico del polen (Nasrallah, 2002). Hasta la fecha han sido identificados más de 30 haplotipos *S* en *B. rapa* y 50 en *B. oleracea* (Nou *et al.*, 1993; Ockendon, 2000). En esta familia el rechazo del polen propio tiene como finalidad la anulación de la hidratación del grano de polen o la detención rápida del crecimiento del tubo polínico en la superficie estigmática.

1.6 AIG en *Papaveraceae*

Papaver rhoeas es la especie más estudiada de este género y el control genético bajo el que se encuentra es gametofítico. La reacción de rechazo del polen ocurre en la superficie estigmática del pistilo y no en el estilo (Franklin-Tong *et al.*, 1992). A diferencia de los sistemas de AIG que dependen de S-RNasas, en esta familia no se requiere ningún componente en el pistilo adicional no ligado al locus *S* (McClure y Franklin-Tong, 2006). Los productos del alelo *S* del pistilo (determinante femenina) en *Papaver rhoeas* son secretados por el estigma. Debido a que estas proteínas son pequeñas (≈ 15 kDa) y no tienen ninguna homología con proteínas de función conocida (Foote *et al.*, 1994), se denominaron proteínas prsS (*Papaver rhoeas* stigma *S* determinant).

Algunas de estas proteínas se encuentran modificadas por N-glicosilación (Franklin-Tong y Franklin, 2003; McCubbin y Kao, 2000).

Las proteínas *prpS* son altamente polimórficas y comparten entre un 51.3% y un 63.7% de identidad a nivel de aminoácidos. Se ha reportado que en condiciones *in vitro*, proteínas *S* recombinantes producidas en *E. coli* inhiben la germinación del polen de una manera *S* alelo específica, de esta manera se concluyó que las proteínas *prpS* son las únicas determinantes femeninas (Franklin-Tong, 2008; Poulter *et al.*, 2011).

Con respecto a la determinante masculina (*prpS*) se sabe que se trata de un receptor que interacciona con la determinante femenina (*prpS*) de una manera *S* alelo específica. El análisis de la secuencia de la determinante masculina predice que se trata de una proteína de naturaleza sumamente hidrofóbica que contiene algunos cruces transmembranales. Además existe evidencia experimental que corrobora que *prpS* es una proteína transmembranal que se localiza en la membrana plasmática del tubo polínico (Wheeler *et al.*, 2010).

En este sistema, el reconocimiento *S* alelo específico entre *prpS* y *prpS* causa un rápido incremento en el calcio intracelular $[Ca^{2+}]$, y un influjo de Ca^{2+} extracelular en el tubo polínico que provoca en una primera instancia la disipación del gradiente apical de $[Ca^{2+}]$ y posteriormente se desencadena la inhibición del crecimiento del tubo polínico en pocos minutos (McClure y Franklin-Tong, 2006). Los cambios en la $[Ca^{2+}]$ generan varios eventos relacionados con la reacción de AI, entre ellos se encuentran la despolimerización del citoesqueleto de actina, la cual se ha asociado a la muerte celular programada (PCD) que en el contexto de la

Al corresponde a una de las estrategias mediante las cuales se puede destruir el polen no deseado o incompatible (Takayama *et al.*, 2005).

1.7 AIG en *Solanaceae*

La respuesta de Al en esta familia es el principal sistema de rechazo del polen propio en las angiospermas. En Solanáceas la respuesta de Al se caracteriza por que tanto los granos de polen compatibles como los incompatibles son hidratados y tienen una germinación normal.

Sin embargo, aquellos tubos polínicos incompatibles serán inhibidos a nivel del tercer segmento superior del estilo. El locus **S** codifica y expresa tanto la determinante femenina (S-RNasa) como a la masculina (SLF).

La interacción **S** específica determina si una crusa es compatible o incompatible (McClure *et al.*, 2006). Los productos del locus **S** en el estilo son proteínas con actividad de ribonucleasa, conocidas como S-RNasas (McClure *et al.*, 1989; McCubbin y Kao, 1996; Kao y Tsukamoto, 2004; Nettancourt, 2001; McClure, 2004; McClure y Franklin-Tong, 2006).

Las S-RNasas se encuentran en el estilo y tienen un carácter básico, son glicoproteínas de aproximadamente 30 kDa con un punto isoeléctrico en el rango de pH de 7.6 a 9.5, que se secretan hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo. En este sitio, las S-RNasas acceden al citoplasma del tubo polínico donde causan degradación del RNA de los tubos polínicos incompatibles (McClure *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1991).

Se cree que la actividad citotóxica afecta el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles interfiriendo con los patrones de expresión genética del polen (McClure y Franklin-Tong, 2006).

Cuando las S-RNasas pierden su actividad, no se observa degradación del RNA y por lo tanto las plantas no presentan el fenotipo de rechazo del polen (Huang *et al.*, 1994). Los resultados anteriores evidencian que las S-RNasas son las determinantes genéticas de rechazo del polen **S** alelo específico.

Más de 30 S-RNasas de 7 especies de solanáceas han sido reportadas; las secuencias de cDNA correspondientes a estas proteínas predicen la presencia de un péptido señal, el cual se pierde en la proteína madura. Esto corresponde con la localización de las S-RNasas en el espacio extracelular del tejido de transmisión del estilo (Cornish *et al.*, 1987).

Las secuencias de las diferentes S-RNasas son divergentes, ya que al compararlas entre ellas a nivel de aminoácidos se presenta una variación de entre un 38% y un 98%. Este nivel de variación es el esperado para los productos del alelo **S** (Clark y Kao, 1991).

Las S-RNasas poseen dos regiones, designadas como HVa y HVb, que exhiben un alto grado de diversidad de secuencias, estos dominios se **encuentran formados por "loops" con una carga positiva, seguidos de una α -helice** y una pequeña región con carga negativa. Estas dos regiones hipervariables son las más hidrofílicas de estas proteínas, incrementando la posibilidad de que éstas puedan estar involucradas en interacciones con los productos del alelo **S** del polen. A pesar de toda la diversidad de secuencias de las S-RNasas, cinco regiones se encuentran altamente

conservadas y se designan C1-C5 (Iorger *et al.*, 1991). Las regiones conservadas C1, C4 y C5 contienen la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos lo que hace pensar que están involucradas en la estructura principal de las S-RNasas.

Las regiones conservadas C2 y C3 comparten un alto grado de similitud a nivel de secuencia con las correspondientes regiones de la RNasa T2 y de otras RNasas (McClure *et al.*, 1989; Green, 1994). Entre los aminoácidos conservados entre las S-RNasas y otras RNasas se encuentran dos histidinas, una en la región C3 y otra en la región C2.

Respecto a la RNasa T2, estas dos histidinas son fundamentales para la actividad de ribonucleasa (Woodward *et al.*, 1989). SLF es la determinante masculina de locus **S** en los sistemas de autoincompatibilidad que se basan en S-RNasa.

SLF es un gen de aproximadamente 1.4 kb, el cual se expresa en la antera y en los granos de polen. Codifica para una proteína que contiene un dominio con una caja F en su extremo amino terminal (Sijacicetal., 2004 ;Takayama *et al.*, 2005; Zhangetal., 2009).

La mayoría de las proteínas con caja F, se encuentran involucradas en la degradación mediada por ubiquitina y el proteosoma 25S. Usualmente estas proteínas sirven como adaptador que une a proteínas sustrato específico al complejo SCF E3 ligasa de ubiquitina, por tal motivo se asume que SLF puede estar participando en un complejo SCF y ubiquitinar a la S-RNasa para su degradación (Zhang *et al.*, 2009).

Con base en experimentos *in vitro* y doble híbrido en levaduras se encontró que las interacciones físicas entre la SLF y la determinante femenina con un S haplotipo diferente son más fuertes que las interacciones entre la S-RNasa y SLF con el mismo haplotipo.

También se identificaron 3 regiones específicas de SLF (FD 1-3) [Hua *et al.*, 2006]. Los resultados de estos ensayos sugieren que el dominio FD2 es suficiente para que exista una unión de alta afinidad con la S-RNasa, FD1 y FD3 podrían conferir la especificidad ya que contienen una de las dos regiones variables de SLF (Hua *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009).

Mediante el análisis de una biblioteca de cDNA de polen se encontró la interacción de SLF con un homólogo de SKP1 denominado SSK1 (SLF-interacting SKPI like 1), esta interacción sugiere que SSK1 funciona como un adaptador entre SLF y una proteína tipo CUL-1, por lo cual el complejo hipotético SCF formado pudiese ser el responsable de la ubiquitinación de las S-RNasas (Zhangetal., 2009).

SLF pudiese estar mediando la degradación de las S-RNasas vía ubiquitinación y proteosoma 25S de manera dependiente del grado de afinidad de la interacción SLF-S-RNasa (Hua *et al.*, 2006 Zhangetal., 2009).

Se ha reportado en *Petunia inflata* la existencia de varios genes tipo SLF que se encuentran ligados al locus **S** y cada una de estas variantes interactúa con una S-RNasa de un diferente haplotipo **S** (Kuboet *et al.*, 2010).

Estos datos llevaron a la propuesta del modelo de colaboración de SLF, el cual plantea que todas las isoformas de SLF podrían funcionar como la determinante masculina dependiendo de la interacción con un haplotipo **S** de S-RNasa.

1.8 Genes Modificadores

Sin embargo, se han encontrado otros genes fuera del locus **S** que son tan esenciales como las S-RNasa y SLF para mediar el rechazo del polen. Estos factores se conocen como genes modificadores (GM) y se pueden clasificar en tres grupos (McClure *et al.*, 2006):

El grupo 1 que está compuesto por factores que afectan directamente la expresión de los genes que limitan la reacción.,

El grupo 2 que contienen grupos que interactúan de manera genética o bioquímica con las determinantes femenina y masculina pero sin alterar su expresión.,

Y el grupo 3 donde se incluyen genes que participan tanto en los sistemas A1, como en procesos generales de la polinización.

Hasta ahora se conocen tres GM provenientes del grupo 2 que se han estudiado a fondo **HT-B, 120K y NaStEP** (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005, Goldraij *et al.*, 2006; Busot *et al.*, 2008; Jimenez-Durán *et al.*, 2013).

El transcrito de **HT-B** es detectado en las últimas etapas del desarrollo del pistilo coincidiendo con la antesis, que es cuando la flor expone su

estigma para recibir el polen. Asimismo, se expresa en especies AI pero no en autocompatibles (AC). En experimentos de pérdida de función en *Nicotiana*, *Solanum* y *Petunia*, donde la expresión de *HT-B* fue suprimida, se pierde la capacidad de rechazar su propio polen convirtiendo a este GM en un factor esencial del estilo para el rechazo alelo *S* específico del polen (McClure *et al.*, 2006). Esta proteína es capaz de ingresar a los tubos polínicos (TPs) con la diferencia de que en especies compatibles se degrada en TPs (Goldraij *et al.*, 2006).

Otro GM particular es el llamado *120K* que codifica una proteína abundante en la matriz extracelular (ME), la cual además se ha observado por ensayos de inmunolocalización que migra desde la ME del estilo hasta las vacuolas de los TPs. Por medio de experimentos de pérdida de función de la expresión de *120K* indican que híbridos transgénicos de *N. pumblaginifolia* x *N. alata*, fueron incapaces de rechazar el polen con el mismo haplotipo del pistilo receptor (Hancock *et al.*, 2005).

NaStEP es una proteína codificada por otro GM y que pertenece a la familia de inhibidores de proteasa tipo Kunitz. Recientemente, se encontró que NaStEP posee la actividad de inhibidor de proteasas (Jiménez *et al.*, 2013; Bernal-Gracida y Cruz-García., no publicado). Esta proteína incluye en su secuencia una señal de destino vacuolar que la conduce a las vacuolas celulares papilares del estigma y que es relocalizada al exudado estigmático cuando estos son polinizados (Busot *et al.*, 2008). Nuevamente, se comprobó que por medio de experimentos de pérdida de función que *NaStEP* es un GM estigmático que es esencial en el rechazo del polen en *Nicotiana* (Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

1.9 NaSiPP

Actualmente, se ha encontrado una nueva proteína que podría estar íntimamente relacionada con los sistemas de AI y que es llamada Na**SiPP** (*N. alata* Self-Incompatibility Polen Protein). El RNAm de Na**SiPP** se acumula exclusivamente en el polen, además este transcrito se acumula mayoritariamente en etapas maduras de la antera, una etapa que coincide con la antesis (apertura de la flor). Notablemente, el transcrito de NaSiPP es solo detectado en el polen maduro de especies AI de *Nicotiana*. NaSiPP cuenta con homología alta a nivel de aminoácidos con transportadores de fosfatos mitocondriales. Asimismo, experimentos de doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae* indican que NaSiPP interactúa físicamente con NaStEP. Sin embargo, a la fecha no sabemos si esta interacción ocurre in planta durante la respuesta de rechazo del polen. Asimismo, desconocemos si NaStEP y NaSiPP comparten una localización subcelular en el tubo polínico. Aún más, desconocemos la localización de NaSiPP en diferentes etapas de la maduración e hidratación del polen así como en los tubos polínicos.

Dado que NaStEP es un inhibidor de proteasas tipo Kunitz y estos pueden actuar como bloqueadores de canales resulta notable que interactúe físicamente con *NaSiPP* que además presenta identidad con una proteína de membrana, por lo que resulta relevante determinar la localización subcelular de dicha proteína.

2. HIPOTESIS

Debido a que NaSiPP tiene homología con transportadores de fosfato mitocondriales se propone que en el tubo polínico esta proteína también localiza en mitocondrias.

3. OBJETIVOS

3.1 **Objetivo general**

Determinar la localización subcelular *in vivo* de la proteína NaSiPP en tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana*.

3.2 **Objetivo particular**

- Hacer una construcción genética que incluya la región codificante de *NaSiPP* en el vector de clonación *pGEM* y transformar células electrocompetentes de *E. coli*.
- Realizar la construcción de la región codificante de NaSiPP fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP).
- Transformar con la construcción anterior explantes de hoja de *A. thaliana*.

- Obtener una expresión estable de NaSiPP::GFP y pEarly103::NaSiPP en *A. thaliana*.
- Analizar la localización subcelular in *vivo* por microscopía confocal de la proteína NaSiPP en polen y tubos polínicos de *A. thaliana*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Construcción de NaSiPP en el vector de clonación pGEM®-T Easy Vector:

La secuencia codificante *NaSiPP* se recuperó de una biblioteca de cDNA previamente construida (referida en la introducción), para lo que se diseñaron cebadores (primers) específicos.

Estos primers se diseñaron tomando en cuenta la secuencia del gen NaSiPP por medio del programa PRIME3 (Tabla 1), esto con el fin de añadirle por medio de técnicas de PCR en el extremo 5´ la secuencia de corte que reconoce la enzima de restricción *NcoI* y en el extremo 3´ la secuencia que reconoce la enzima BamHI.

Tabla 1. Secuencia de los primers diseñados para *NaSiPP*

Diseño de primers	
FNcoI21	5´ CATGCCATGGATGGCCTACACACAACACTCTTCCCGG 3´
RSIPPnocodon	5´ GGATCCCGCTTGGCAGGGGCAGGTGGAGCTGCAC 3´

La reacción de PCR se realizó utilizando la enzima polimerasa **Jump Star Mix®** de **Clontech®** bajo las siguientes condiciones;

Tabla 2. Reacción de PCR para *NaSiPP*

Reactivo	Volumen (µL)
cDNA N. alata	1
Jump Star Mix® 2X	5
Oligo FNcoI21 10µM	1
Oligo RSIPPnocodon 10µM	1
Agua estéril	2
Total	10

Y con el programa de amplificación siguiente;

Tabla 3. Condiciones del programa de amplificación BioRad T100™ Thermal Cycler

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	5 min
Desnaturalización	95	30 segundos
Alineamiento	58	1 min
Extensión	72	2 min
Extensión final	72	5 min
Incubación	4	25 min

La amplificación del producto se realizó por 35 ciclos en el equipo **BioRad T100™ Thermal Cycler**.

Después, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) para comprobar el producto de PCR de NaSiPP (~1000 bp), y purificar la banda directamente del gel por medio del kit *Zymoclean Gel DNA Recovery*[®] (Apéndice A).

El vector *pGEM*[®]-*T Easy Vector* de **Promega**[®] ya viene abierto por lo que no se realizó ninguna digestión previa para la reacción de ligado con NaSiPP, el inserto entrara en el sitio de clonación múltiple entre los sitios NcoI y BamHI (Fig. 1).

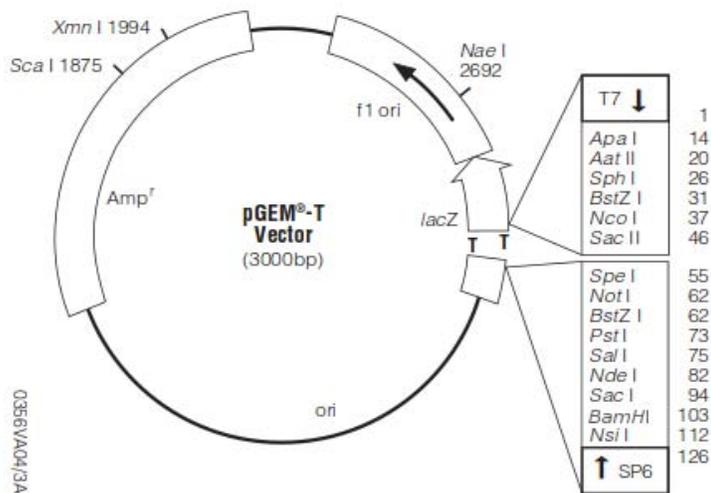


Figura 1. Mapa del vector *pGEM*[®]-*T Easy Vector* de Promega[®]

Las condiciones de la reacción de ligado fueron;

Tabla 4. Reacción de ligado entre NaSiPP y *pGEM*[®]-*T Easy Vector*

Reactivo	Volumen (μL)
NaSiPP NcoI/BamHI	3
pGEM NcoI/BamHI	1

T4 DNA ligasa 3u/μL	1
Buffer Promega 2x	5
Total	10

La reacción referida en la tabla 3, se incubó a 4°C durante toda la noche. Con 10μL de la reacción de ligado se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5α mediante electroporación en el **Micropulser™ Electroporation Apparatus de BIORAD®** (Apendice B). De las colonias que se desarrollaron se eligieron dos de color blanco y se crecieron en medio LB líquido con ampicilina (100 μg/mL) a 37°C/12 h. Una vez que las bacterias crecieron, se purificó el DNA por medio del sistema **Zymoclean™ miniprep kit** (Apendice C). El DNA plasmídico que se obtuvo se cuantificó vía **NANO DROP 2000c Thermo Scientific®**, dando una concentración de 166.7 ng/μL.

Para asegurarse que las células transformantes elegidas contengan la construcción *pGEM:NaSiPP* se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *NcoI/BamHI* y las condiciones de la reacción fueron;

Tabla 5. Ensayo de restricción para *pGEM:NaSiPP*

Reactivo	Volumen (μL)
DNA plasmídico <i>pGEM:NaSiPP</i>	3
Enzima <i>NcoI</i>	0.5
Enzima <i>BamHI</i>	0.5
NEBuffer 3 10X	1
BSA 10X	1
Agua estéril	4
Total	10

Esta reacción se incubó a 37°C por 2.5 h. Nuevamente, se separó la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

Además de la electroforesis, se realizó un ensayo de PCR bajo las condiciones previamente descritas (Tabla 2 y 3) para corroborar que el inserto se haya ligado al vector.

4.2 Construcción de NaSiPP en el vector pNGC y pEarleyGate 103:

Estos vectores previamente transformados en el laboratorio, se encontraban dentro de células competentes *E. coli* DH5a por lo que, se cultivaron las bacterias en medio líquido LB adicionado con los respectivos antibióticos (Fig. 2) a 37°C por 24 h. Posteriormente, se extrajo el DNA plasmídico (Apéndice C) con el fin de someterlo a un ensayo de restricción para comprobar que sean los vectores referidos.

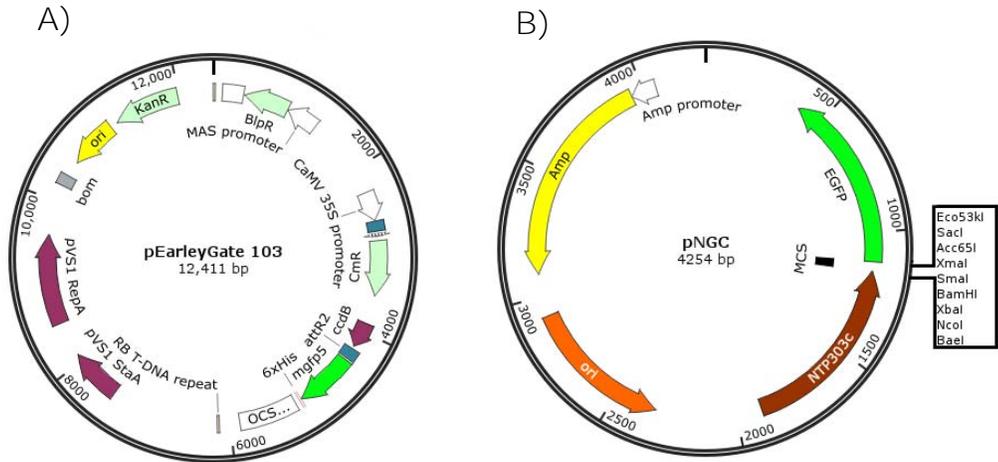


Figura 2. Mapa de los vectores de localización subcelular. A) Vector pEarleyGate103 con resistencia a kanamicina y promotor CaMV 35S. B) Vector pNGC con resistencia a ampicilina y promotor específico de polen NTP303.

Por medio del programa **Serial Cloner** se predijeron el número y tamaño de bandas (Fig. 3);

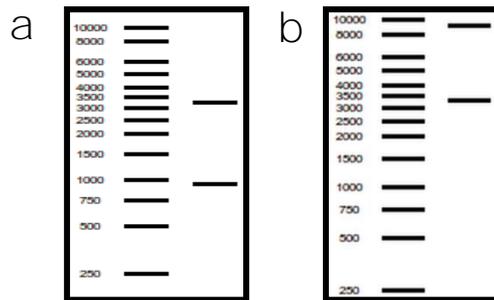


Figura 3. Simulación en gel de agarosa 1% (p/v) del ensayo de restricción. a) Corte del vector pNGC *AatII/BsaI*. b) Corte del vector pEarleyGate103 *SacI/NcoI*.

Las condiciones de la reacción con enzimas de restricción fueron las siguientes;

Tabla 6. Ensayo de restricción para *pNGC* y *pEarleyGate103*

pNGC		pEarleyGate103	
Reactivo	Volumen (μL)	Reactivo	Volumen (μL)
Vector <i>pNGC</i>	5	Vector <i>pEarleyGate103</i>	5
Buffer Cut Smart 10X	1.5	Buffer Cut Smart 10X	1.5
<i>AatII</i>	0.5	<i>SacI</i>	0.5
<i>BsaI</i>	1	<i>NcoI</i>	1
Agua estéril	7	Agua estéril	7
Total	15	Total	15

La incubación fue a 37°C por 1.5 h. Pasado ese tiempo, se fraccionaron en un gel de agarosa 0.75% (p/v) por 40 minutos a 95 V.

Teniendo confirmada la construcción *pGEM:NaSiPP*, el siguiente paso consistió en ligar a *NaSiPP* en los vectores de localización subcelular (unión a GFP) *pNGC* y *pEarleyGate103*. Con la extracción del DNA plasmídico *pGEM:NaSiPP*, se realizó un ensayo de PCR para amplificar la banda de interés (~1000 bp) y recuperarla directamente del gel con el sistema *Zymoclean Gel DNA recovery* (Apendice A).

El vector *pNGC* se trató con el par de enzimas *NcoI/BamHI* según las condiciones de la tabla 5 a 37°C por 2.5 h. Después se efectuó la reacción de ligado para unir *NaSiPP* con *pNGC* bajo las condiciones que se detallan en la tabla 4 dejando reposar a 4°C por 24 h.



Figura 4. Ejemplo gráfico de las construcciones en vectores de localización subcelular

En el caso de la construcción *pEarleyGate103:NaSiPP*, esta se hizo mediante recombinación por medio del sistema **Gateway** ocupando un vector destino (*pEarleyGate 103*), el inserto de DNA y la enzima **Clonasa II** dejando la reacción una hora a 24°C.

4.3 Transformación de células electrocompetentes *E. coli* DH5α con las construcciones *pNGC:NaSiPP* y *pEarleyGate103:NaSiPP*:

Con el fin de preservar y clonar las construcciones, se insertaron por medio de electroporación en células electrocompetentes *E. coli* DH5α (Apéndice B).

Las células transformantes se sembraron en placas de medio LB suplementado con los antibióticos requeridos para cada vector.

Se seleccionaron tres colonias por construcción para crecerlas en medio líquido LB/antibióticos a 37°C por 24 h. Después se purificó el DNA plasmídico (Apendice C) para someterlo, nuevamente, al ensayo de restricción y PCR. Se cuantificaron estos extractos vía **NANO DROP 2000c Thermo Scientific®** obteniéndose las siguientes concentraciones;

Tabla 7. Cuantificación vía NANO DROP de las muestras extraídas del cultivo de *E. coli* DH5a en medio líquido.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)
<i>pNGC:NaSiPP</i>	161.5
<i>pEarleyGate103:NaSiPP</i>	104.3

En el caso de la construcción *pEarleyGate103:NaSiPP* no se realizó el corte con enzimas de restricción porque el método de ligación fue por recombinación, solo se confirmó la presencia del inserto por PCR.

Las condiciones de los ensayos de PCR y restricción están referidas en la tabla 8. Para el caso de la construcción *pNGC:NaSiPP*, se digirió 1 μ g de DNA con 20 unidades de enzima de restricción cuidando que la suma de las dos enzimas no sea mayor al 10% del volumen total de la reacción, se incubó por 1.5 h a 37°C.

Tabla 8. Condiciones de los ensayos de PCR y restricción

PCR				Restricción	
<i>pNGC:NaSiPP</i>		<i>pEarleyGate103:NaSiPP</i>		<i>pNGC:NaSiPP</i>	
Reactivo	Volumen (μ L)	Reactivo	Volumen (μ L)	Reactivo	Volumen (μ L)
DNA plasmídico	0.5	DNA plasmídico	1	DNA plasmídico	6.2
Jump Star Mix[®] 2X	5	Jump Star Mix [®] 2X	5	Buffer Cut Smart 10X	3
Oligo FNcoI21 10μM	0.5	Oligo FNcoI21 10 μ M	1	<i>NcoI</i>	2

Oligo		Oligo			
RSIPPnocodon	0.5	RSIPPnocodon	1	<i>BamHI</i>	1
10µM		10µM			
Agua estéril	3.5	Agua estéril	2	Agua estéril	17.8
Total	10	Total	10	Total	30

Una vez que se comprobó que las construcciones fueran correctas, se procedió a la transformación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* PGV2260.

4.4 Transformación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* con las construcciones *pNGC:NaSiPP* y *pEarleyGate103:NaSiPP*:

El siguiente paso es la transformación por medio de electroporación de *A. tumefaciens* ya que, esta bacteria por medio de su mecanismo de infección, es capaz de insertar DNA exógeno en tejidos vegetales (Valderrama *et al.*, 2005).

Se transformaron células electrocompetentes *A. tumefaciens* PGV2260 (Apendice D) con las construcciones mencionadas. Posteriormente, se sembraron por duplicado en placas LB/Rifampicina/antibióticos (para cada uno de los vectores), cabe mencionar que de manera natural las cepas de *A. tumefaciens* cuentan con resistencia a rifampicina por lo que, aunado al gen de resistencia de cada vector, se ocupa como marcador gen ético para la selección de transformantes. La concentración final de estos antibióticos fue de 100 µg/mL y las placas se incubaron a 28°C durante 48 h. Pasado ese tiempo, se tomó de cada una de las placas dos

colonias aisladas para crecerlas en medio líquido LB/Rifampicina/Antibióticos bajo las mismas condiciones de incubación previamente descritas.

Dado que *A. tumefaciens*, presenta una numero bajo de copias, el DNA plasmídico se extrajo por medio del sistema **GeneAll® Hybrid-Q™ Plasmid Rapidprep (Apendice E)**, que es recomendado para este tipo de problemas. El DNA plasmídico se cuantifico vía **NANO DROP 2000c Thermo Scientific®**, obteniéndose los siguientes resultados;

Tabla 9. Cuantificación vía NANO DROP de las muestras extraídas del cultivo de *A. tumefaciens* en medio líquido.

Muestra	Concentración (ng/μL)
<i>pNGC:NaSiPP</i>	97.2
<i>pEarleyGate103:NaSiPP</i>	75.8

El tratamiento de las muestras fue el mismo que se realizó para *E. coli*, donde solo cambian las concentraciones de los reactivos en los ensayos de PCR y restricción quedando de la siguiente manera (tabla 10); recordar que el programa de amplificación es el que se indica en la tabla 3, nuevamente el ensayo de restricción solo se aplicó a la construcción *pNGC:NaSiPP* incubando a 37°C por 2 horas. Acabado el proceso, las muestras se corrieron en una electroforesis al 1% agarosa (p/v).

Tabla 10. Condiciones de los ensayos de PCR y restricción

PCR				Restricción	
<i>pNGC:NaSiPP</i>		<i>pEarleyGate103:NaSiPP</i>		<i>pNGC:NaSiPP</i>	
Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)
DNA plasmídico	0.5	DNA plasmídico	1	DNA plasmídico	6.2
Jump Star Mix® 2X	5	Jump Star Mix® 2X	5	Buffer Cut Smart 10X	3
Oligo FNcoI21 10µM	0.5	Oligo FNcoI21 10µM	1	<i>NcoI</i>	2
Oligo RSIPPnocodon 10µM	0.5	Oligo RSIPPnocodon 10µM	1	<i>BamHI</i>	1
Agua estéril	3.5	Agua estéril	2	Agua estéril	17.8
Total	10	Total	10	Total	30

Como paso adicional, el plásmido extraído de *A. tumefaciens* (*pNGC:NaSiPP* y *pEarleyGate103:NaSiPP*) se mandó a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM, con el primer *forward* para la secuencia codificante de *NaSiPP* en los dos casos, y así corroborar que la secuencia se encontraba en marco de lectura y la traducción se diera de manera correcta.

4.5 Infección y transformación de plantas tipo silvestre de *A.thaliana* vía *A. tumefaciens*.

El método de transformación elegido fue ***Floral-Dip*** (Davis, 2009), salvo algunas variantes para ajustarlas a las condiciones que se requerían en el experimento.

Cultivo de las células transformantes de *A. tumefaciens*:

Se cultivaron las células transformantes (*pNGC:NaSiPP* y *pEarleyGate103:NaSiPP*), de *A. tumefaciens* en medio líquido LB/Rifampicina/Antibióticos, en un volumen de 5 mL a modo de precultivo, se incubó a 28°C durante 48 h. Posteriormente, se tomaron 50 µL del precultivo y se adicionaron a 40 mL de medio líquido LB/Rifampicina/Antibióticos y se incubaron a 28°C hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 1-1.5$, normalmente de 2 a 3 días de incubación.

Preparación de las plantas de *A. thaliana*:

Las plantas *A. thaliana* se mantuvieron en el invernadero con una temperatura de 22°C-25°C y fotoperiodo de 16 h luz por 8 de oscuridad. Se cortaron las inflorescencias para favorecer el crecimiento del tejido durante 3 semanas y que se multiplicaran los botones florales.

Método de transformación *Floral-Dip*:

El cultivo se centrifugo y resuspendió en una solución de sacarosa al 5% con 0.05% del detergente silwet L-77. En esta solución se sumergieron las plantas *A. thaliana* hasta la roseta por 2 minutos. Después, se regresaron a las condiciones de invernadero previamente descritas y se regaron durante 5 semanas hasta la formación de silicuas.

Recolección y esterilización de semillas transformantes:

Una vez que se formaron las silicuas, se detuvo el ciclo de riego hasta la sequedad y se recolectaron las semillas.

Se desinfectaron bajo el siguiente proceso; lavado de 5 minutos con una solución de cloro al 2% y Tween-80 (0.01%), seguido de tres lavados cada uno con agua estéril por 1 minuto.

Germinación de semillas transformantes de *A. thaliana*:

Se realizó en placas con medio MS adicionado con el herbicida BASTA (5mg/mL) como marcador genético (Harrison, *et al*; 2006).

2 días de estratificación en oscuridad a 4°C	6 h en luz continua a 22°C	2 días en oscuridad a 22°C	1 día en luz continua a 22°C	Selección de transformantes
--	----------------------------	----------------------------	------------------------------	-----------------------------

Figura 5. Esquema del proceso general para la germinación de semillas de *A. thaliana*

Crecimiento y mantenimiento de las plantas transformantes de *A. thaliana*:

Después de la selección de las transformantes, se pasaron a suelo y se mantuvieron a 22-25°C con luz continua para favorecer el crecimiento con ciclos de riego 4 veces por semana. Una vez que alcanzaron cierta altura, el fotoperiodo se fijó en 16 h luz por 8 h de oscuridad hasta la formación de flores. Una vez por semana, las plantas se regaron con solución de micronutrientes Hoagland 1X (Apéndice).

Análisis de plantas transformantes por PCR directo de hoja:

Las plantas transformantes se confirmaron por PCR y por medio del sistema **Phire Plant Direct PCR Kit®Thermo Scientific™** (Apendice F) el cual consiste en tomar un pequeño disco (0.5 mm) de hoja con el aplicador y agregarlo al medio de reacción. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

Tabla 11. Condiciones de la reacción de PCR directo de hoja de *A. thaliana* transformantes.

Reactivo	Volumen (µL)
Phire Hot Start II DNA polimerasa	0.4
Primer FNcoI21	1.5
Primer RSIPPnocodon	1.5
Tejido	0.5 mm
Phire Plant Buffer 2X	10
Agua	6.6
Total	20

Con el siguiente programa de amplificación;

Tabla 12. Condiciones del programa de amplificación BioRad T100™ Thermal Cycler para el PCR directo de hoja de *A. thaliana* transformante

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	98	5 min
Desnaturalización	98	5 seg
Alineamiento	58	5 seg
Extensión	72	20 seg
Extensión final	72	1 min
Incubación	4	25 min

Las muestras se cargaron en un gel de agarosa 1.5% (p/v) para electroforesis a 100 V por un periodo de una hora.

4.6 Análisis por microscopia confocal de tubos polinicos de *A. thaliana*:

Con el fin de analizar y localizar la proteína fusionada NaSiPP-GFP que se genera a partir de las dos construcciones (*pNGC:NaSiPP* y *pEarleyGate103:NaSiPP*) se recolectó y germinó (*in-vitro*) polen de las flores de plantas transgénicas para después observarlas en el microscopio confocal.

Recolección y germinación *in vitro* de granos de polen de plantas transgénicas *A. thaliana*.

Teniendo la primer generación de plantas transgénicas, se recolectaron las flores para germinar el polen *in vitro*.

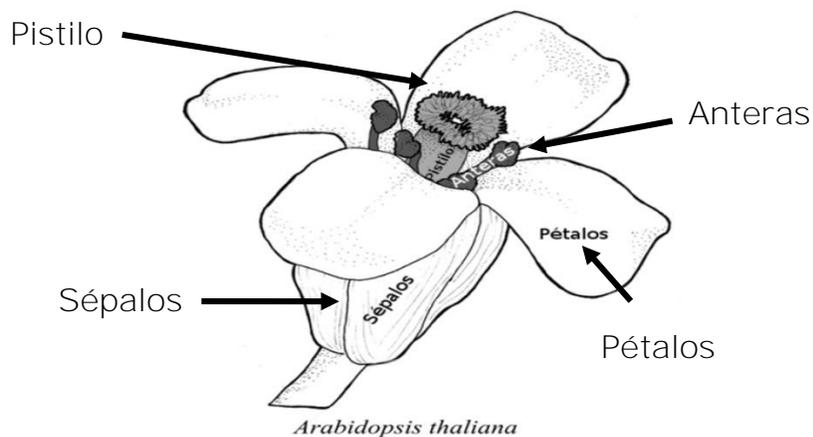


Figura 6. Esquema de la flor de *A. thaliana*.

Para esto se tomó la flor completa y con unas pinzas se retiraron los pétalos dejando solo el pistilo con las anteras (Fig. 6).

Simultáneamente, se prepararon portaobjetos con el siguiente medio semisólido de germinación;

Tabla 13. Composición del medio de germinación para polen de *A. thaliana*.

Solución Madre	Concentración final
H₃BO₃	1.62 mM
CaCl₂	5 mM
KCl	5 mM
MgSO₄	8 mM
Sacarosa	10%

Se adiciono agarosa para una concentración final de 0.7% (p/v). La solución se calentó a 95°C en baño maría hasta disolver por completo la **agarosa y se tomaron 400 µL** de la solución para formar una capa delgada sobre el portaobjeto.

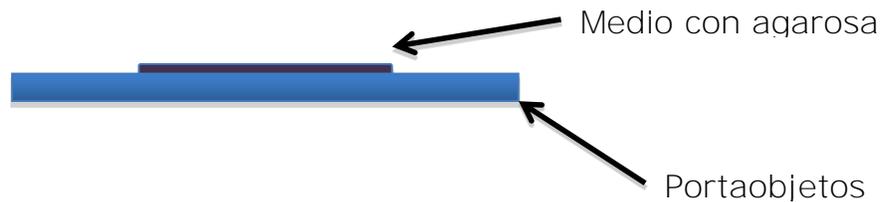


Fig 7. Imagen representativa del medio semisólido de germinación *in-vitro*

Con las anteras previamente recolectadas, se tocó la superficie del medio semisólido para colocar granos de polen en diversas zonas de la placa y se depositaron en la cámara húmeda por una hora para sincronizarlos.

Dado que la expresión del promotor *NTP303* es fuerte entre 3-5 horas de germinación (Weterings *et al.*, 1992), se eligieron dos tiempos para comparar, uno de dos horas y el segundo de cuatro horas.

La incubación se realizó en cámara húmeda y en oscuridad a 22°C. Una vez cumplido el tiempo se retiró el portaobjetos de la cámara y se observó el crecimiento de los tubos polínicos en el microscopio.

La placa con cubreobjetos se observó en el microscopio confocal con el filtro para GFP a un aumento de 40X.

5. RESULTADOS

5.1 Construcción de *NaSiPP* en el vector de clonación *pGEM[®]-T Easy Vector*:

La clonación de la secuencia codificante *NaSiPP* se realizó en un vector multicopia comercial de segunda generación llamado *pGEM[®]-T Easy Vector*, que tiene como peculiaridad la inserción de la secuencia **codificante para β -galactosidasa** en el sitio de clonación múltiple (Robles, 1994), esto provoca que las colonias transformantes sean de color blanco mientras que, las no transformantes se tornen a un color azul. El medio es suplementado con X-Gal que justamente es el reactivo que provoca **los cambios de color porque, si la secuencia de β -galactosidasa se encuentra interferida por el inserto de interés, esta no se sintetiza y no degradaría a X-Gal provocando la ausencia de color, al contrario; si el inserto de interés no interrumpe la síntesis de β -galactosidasa esta degrada a X-Gal y las colonias se vuelven azules.**

Con los oligonucleótidos diseñados (tabla 1), se amplificó la secuencia codificante de *NaSiPP* proveniente del DNA genómico de *N. alata* (especie auto-incompatible) agregando sitios de corte para las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI* **en la dirección 5'-3' respectivamente**. En la figura 7 se muestra el resultado del ensayo de PCR.

En este ensayo se utilizó como control negativo el agua para corroborar que no se amplifique algo inespecífico.

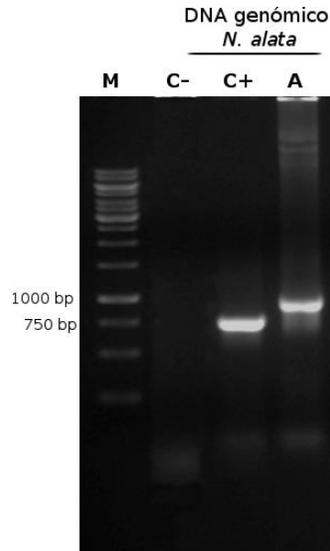


Figura 8. Ensayo de PCR para amplificar a *NaSiPP* de DNA genómico de *N. alata*. M: Marcador 1 Kb New England Biolabs,
C-: Agua, C+: eGFP, A: *NaSiPP*

Como control positivo, se amplificó la secuencia codificante de la proteína reportera GFP que está contenida en el vector *pEarleyGate103:NaSiPP* y dio como resultado una banda de tamaño aproximado a 750 bp. La banda correspondiente a *NaSiPP* se presenta alrededor de 1000 bp, la cual se cortó para ligarla al vector de clonación múltiple y transformar células competentes *E. coli* DH5 α . Dado que el vector *pGEM[®]-T Easy* por su cualidades permite seleccionar a las colonias transformantes por color (blancas transformantes, azules solo con resistencia a antibióticos), se tomaron para crecerlas en medio líquido aquellas que presentaran una tonalidad blanca por su incapacidad para producir β -galactosidasa.

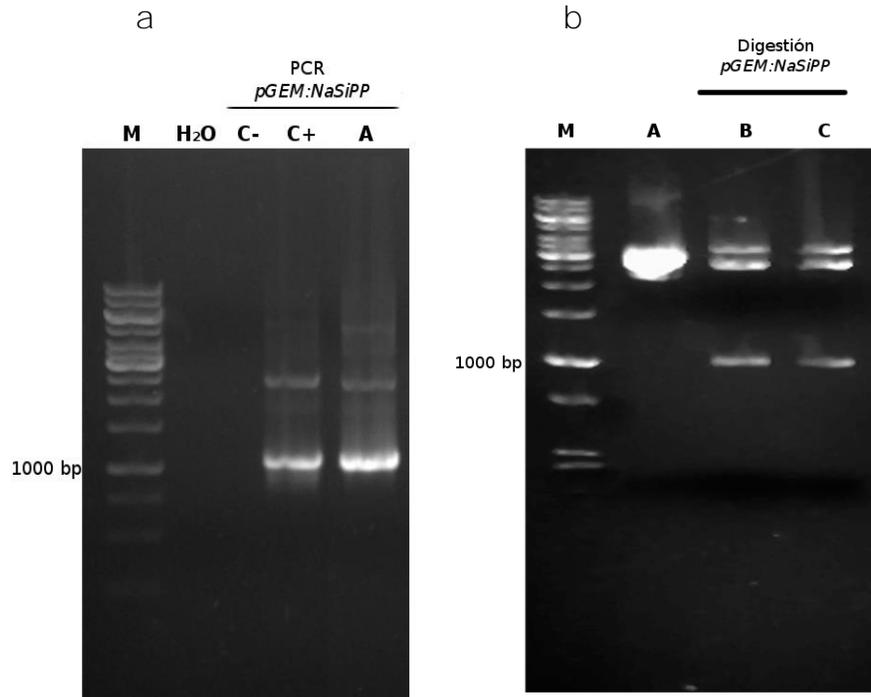


Figura. 9. Resultados de ensayos de PCR y restricción de la construcción *pGEM:NaSiPP* del plásmido extraído de células transformantes *E. coli DH5a*. 1) Reacción de PCR, (M) Marcador 1 kb NEB, (HO) Agua, (C-) plásmido *pGEM* vacío, (C+) DNA genómico de *N. alata*, (A) Construcción *pGEM:NaSiPP*. 2) (M) Marcador 1 kb NEB, (A) Construcción *pGEM:NaSiPP* sin digerir, (B) y (C) Construcción *pGEM:NaSiPP* tratado con *NcoI/BamHI*.

Del cultivo líquido se extrajo el plásmido para someterlo a un ensayo de PCR y restricción para asegurarse que *NaSiPP* se encontraba ligado al vector. Como se muestra en la figura 8, la banda correspondiente a 1000 bp es *NaSiPP* en ambos geles.

En el panel de la izquierda (Fig 8a) se observa el ensayo de PCR de la construcción *pGEM:NaSiPP*, mientras que, en el panel derecho (Fig 8b) se aprecia el corte con enzimas de restricción de la construcción citada.

En dicha imagen se observa la banda correspondiente a *pGEM:NaSiPP* sin digerir (Fig 8b carril A) que se utiliza a modo de control, seguido de los

cortes con *NcoI/BamHI* (Fig 8b carril B-C) liberando la banda de 1000 bp que corresponde a *NaSiPP*.

Al comprobarse por dos métodos que la construcción se había realizado de manera correcta, el siguiente paso consistió en la clonación de *NaSiPP* en los vectores de localización subcelular.

5.2 Construcción de *NaSiPP* en el vector *pNGC* y *pEarleyGate103*:

El plásmido *pNGC* es un vector basado en *pUC19*, que presenta en el amino terminal la fusión a GFP bajo el control del promotor específico de polen *NTP303* (Fig. 2b).

El promotor *NTP303* es parte de una familia de 5 miembros (*NTP101, 201, 302, 303 y 805*). Dichos genes están regulados tanto a nivel transcripcional como traduccional y son detectables de manera abundante en etapas maduras del polen (Weterings *et al.*, 1992), cabe destacar que el promotor *NTP303* está fuertemente regulado entre las tres y cinco horas de germinación *in vitro* (Weterings *et al.*, 1995). Además, se conoce que la detección solo se da hasta la germinación y crecimiento del tubo polínico (Groot *et al.*, 2004) y que su silenciamiento provoca un crecimiento deficiente de los tubos polínicos y la fertilización no se efectúa. Por estas razones se eligió al vector *pNGC* para llevar a cabo la localización por que tanto *NTP303* como *NaSiPP* son genes que se expresan exclusivamente en el polen.

El vector *pEarleyGate103*, contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S). La característica más importante del promotor

es su capacidad de expresarse en varios órganos y etapas del desarrollo de una planta. El clonar el gen *NaSiPP* en este vector, tuvo como finalidad obtener un control positivo de la expresión porque se espera que la proteína fusionada (NaSiPP-GFP) se observe en varios tejidos de la planta.

Como se mencionó, estos vectores ya se encontraban en células *E. coli DH5a* por lo que se crecieron en medio líquido para después obtener el plásmido y trabajar con él.

Para tener la certeza de que se tenían los vectores, estos se trataron con enzimas de restricción. Por medio del programa **Serial Cloner** se buscaron en la secuencia de cada uno de los vectores dos sitios de corte únicos para obtener dos fragmentos, este programa también da un aproximado del tamaño de cada uno de los fragmentos que se generan por el corte.

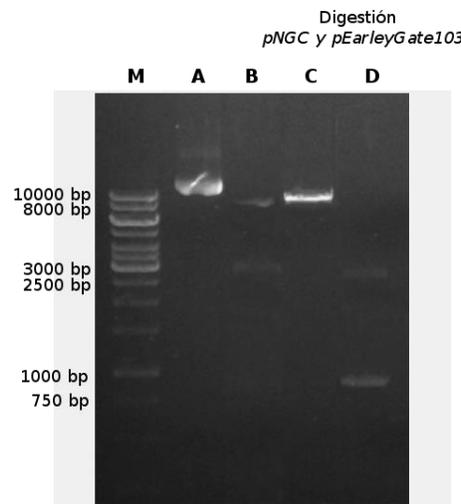


Figura 10. Digestión de los vectores de localización subcelular.

(M) Marcador 1kb NEB, (A) *pEarleyGate103* sin digerir, (B) *pEarleyGate 103 SacI/NcoI*,
(C) pNGC sin digerir, (D) pNGC AatII/BsaI

Para el caso del vector *pNGC*, el software predijo dos sitios de corte únicos dados por *AatII/BsaI* con un tamaño aproximado de 966 bp y 3288 bp, respectivamente. En cuanto al vector *pEarleyGate103*, el sitio de corte único está delimitado por *SacI/NcoI* produciendo dos fragmentos con tamaño de 9104 bp y 3307 bp aproximadamente. Como se aprecia en la figura 9, las bandas en el gel de agarosa están a la altura predicha para cada corte (Fig.3).

Teniendo confirmada la presencia de los vectores, se ligó a ellos la secuencia codificante de *NaSiPP*, para después transformar células electrocompetentes *E. coli DH5a*.

Nuevamente la confirmación de las construcciones se dio por ensayos de PCR y con enzimas de restricción. Este último no aplica para la construcción *pEarleyGate103:NaSiPP* dado que el inserto entró por recombinación y no existe la presencia de sitios de corte.

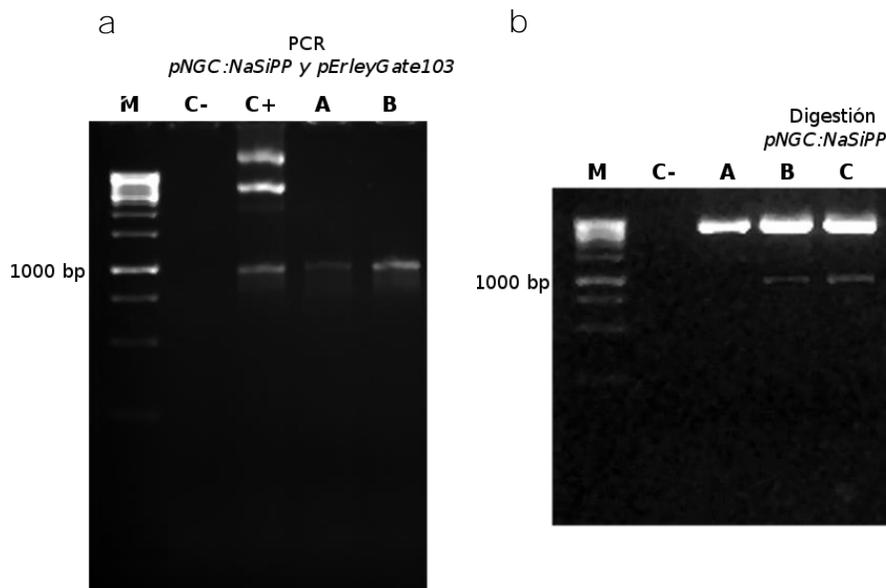


Figura 11. Ensayos de PCR y restricción del plásmido extraído de *E. coli DH5a*.
 Reacción de PCR, (M) Marcador 1kb NEB, (C-) *pNGC* vacío,
 (C+) pGEM: NaSiPP, (A) pNGC: NaSiPP, (B) pEarleyGate103: NaSiPP
 2) Ensayo de restricción, (M) Marcador 1kb NEB, (C-) *pNGC* vacío *NcoI/BamHI*,

(A) pNGC: NaSiPP sin digerir , (B) pNGC: NaSiPP NcoI/BamHI cultivo 1,
(C)pNGC: NaSiPP NcoI/BamHI cultivo 2

Nuevamente se extrajo el plásmido de cultivos de bacterias transformantes y se realizó un ensayo de electroforesis en un gel de agarosa 1% (p/v). En la figura 10a correspondiente al ensayo de PCR, se aprecia la banda de 1000 bp para ambas construcciones, como control negativo se utilizó el vector *pNGC* vacío para corroborar que con los primers diseñados no se amplifiquen zonas del vector diferentes al inserto. La figura 10b muestra el corte con NcoI/BamHI para la construcción *pNGC:NaSiPP* contenida en dos cultivos diferentes de células *E. coli DH5a* transformantes, la banda correspondiente a *NaSiPP* (~1000 bp) vuelve a aparecer confirmándose que la construcción está bien realizado, en este caso el control negativo fue nuevamente el vector *pNGC* que se digirió con las mismas enzimas (*NcoI/BamHI*) y comprobar que no se cortó en sitios diferentes a los que flanquean el inserto. Con estos plásmidos confirmados se transformó finalmente a las cepas de *A. tumefaciens*.

5.3 Transformación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* con las construcciones *pNGC:NaSiPP* y *pEarleyGate103:NaSiPP*:

La capacidad de estas bacterias para poder insertar una parte de su material genético en el genoma vegetal esta mediado por el *ADN-T* localizado en el plásmido *Ti* (plásmido inductor de tumor), que además contiene los genes *vir* que son necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN en el genoma de la planta (Valderrama *et al.*, 2005). Para que *A. tumefaciens* pueda infectar a las

plantas estas deben tener la presencia de exudados causadas por heridas y que además promueven la activación transcripcional de los genes *vir* (Winans *et al.*, 1994). Los sensores proteicos identificados *vir A* y *vir G* reaccionan con estos exudados, el primero de manera directa o indirecta con compuesto fenólicos como la lignina (Stachel *et al.*, 1985) y la segunda es fosforilada por *vir A* y permite la transducción de señales que activan los genes *vir* (Jin *et al.*, 1990) al final este tipo de interacción es quimiotáctica. La infección de las plantas es un proceso largo y laborioso debido a las condiciones de esterilidad en las que se tiene que manejar todo el material además factores como la edad de la planta, el tipo de tejido a transformar, el tiempo y las condiciones de luz así como el periodo de precultivo de la bacteria son factores cruciales para el éxito de la transformación (Grevelding *et al.*, 1993; Salas *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2003).

Una vez que se transformaron las células de *A. tumefaciens*, se les extrajo DNA plasmídico para someterlo a los mismos ensayos previamente descritos.

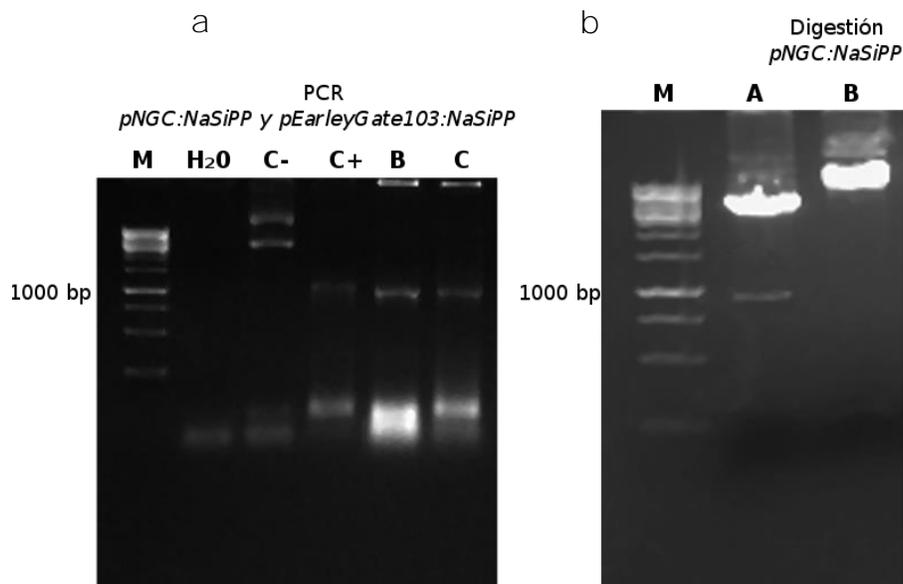


Figura 12. Ensayos de PCR y restricción del plásmido extraído de *A. tumefaciens*.
Reacción de PCR, (M) Marcador 1kb NEB, Agua,
(C-) pNGC vacío, (C+) pNGC: NaSiPP de *E. coli* DH5 α , (B) *pNGC:NaSiPP*,
(C) *pEarleyGate103:NaSiPP.2*) Ensayo de restricción, (M) Marcador 1kb NEB, (A) *pNGC:NaSiPP* *NcoI/BamHI*, (B)
pNGC:NaSiPP sin digerir.

En la figura 11a, se vuelve a presentar la banda de 1000 bp correspondiente a *NaSiPP* para ambas construcciones (carril B y C). Los controles utilizados fueron agua, vector *pNGC* vacío como negativo y por último DNA plasmídico *pNGC:NaSiPP* de cultivos *E. coli* DH5 α como positivo. A su vez, se muestra el ensayo de restricción (Fig. 11b) para la construcción *pNGC:NaSiPP* extraído de cultivos *A. tumefaciens* transformantes, donde se puede observar que la digestión liberó el inserto de 1000 bp correspondiente a la secuencia codificante de *NaSiPP*.

El plásmido extraído se secuenció con el fin de corroborar que la secuencia *NaSiPP* estuviera en marco de lectura y no se tuvieran problemas en la traducción de la proteína en el modelo biológico.

```

10      20      30      40      50      60
1      MATTHSSRKPLIPTFLYDTASSSPFSYRNTSSSAMAKKPFVVPAPKESSGKIEMFSPG NaSIPP_sec
1      maythnsarkpliptflfydtassspfsyvrntsssaMAKKPFVVPAPKESSGKIEMFSPG p21_secuen
consensus

70      80      90      100     110     120
25     YTAAGTFGGVMSGGLTHMAYPLDLVKGMQIDPAKTKSISSGFGVLLKEQGVGGFFRGV NaSIPP_sec
61     YTAAGTFGGVMSGGLTHMAYPLDLVKGMQIDPAKTKSISSGFGVLLKEQGVGGFFRGV p21_secuen
consensus
YTAAGTFGGVMSGGLTHMAYtPLDLVKGMQIDPAKTKSiSSGFGVLLKEQGVGGFFRGV

130     140     150     160     170     180
85     VP TLIGYSAQQACKYGFYETFKKYYSDLAGPENAVKTKLITLAGSASAEVIADVALGPF NaSIPP_sec
121    VP TLIGYSAQQACKYGFYETFKKYYSDLAGPENAVKTKLITLAGSASAEVIADVALGPF p21_secuen
consensus

190     200     210     220     230     240
145    EAVKYRVQIQPFARGLSDGLPKFYKAEGAAGLYKGLAPLWGRQIPYTMKFFASFETIVE NaSIPP_sec
181    EAVKYRVQIQPFARGLSDGLPKFYKAEGAAGLYKGLAPLWGRQIPYTMKFFASFETIVE p21_secuen
consensus
EAVKYRVQIQPFARGLSDGLPKFYKAEGAAGLYKGLAPLWGRQIPYTMKFFASFETIVE

250     260     270     280     290     300
205    QLYKHVITPKKQCSKSTQLQVSFAGGTLAAILCAIVSEPADELVSFLFNKAGATVQDAV NaSIPP_sec
241    QLYKHVITPKKQCSKSTQLQVSFAGGTLAAILCAIVSEPADELVSFLFNKAGATVQDAV p21_secuen
consensus
QLYKHVITPKKQCSKSTQLQVSFAGGTLAAILCAIVSEPADELVSFLFNKAGATVQDAV

310     320     330     340     350
265    NYLQVMGLGTRGLPLRIYVMIGTLTGAQWGIYDSFKVYVGLPTTGGAAH.GCRG NaSIPP_sec
301    NYLQVMGLGTRGLPLRIYVMIGTLTGAQWGIYDSFKVYVGLPTTGGAAPAAAK p21_secuen
consensus
NYLQVMGLGTRGLPLRIYVMIGTLTGAQWGIYDSFKVYVGLPTTGGAA-paPakg

```

```

x non conserved
x similar
x conserved
x all match

```

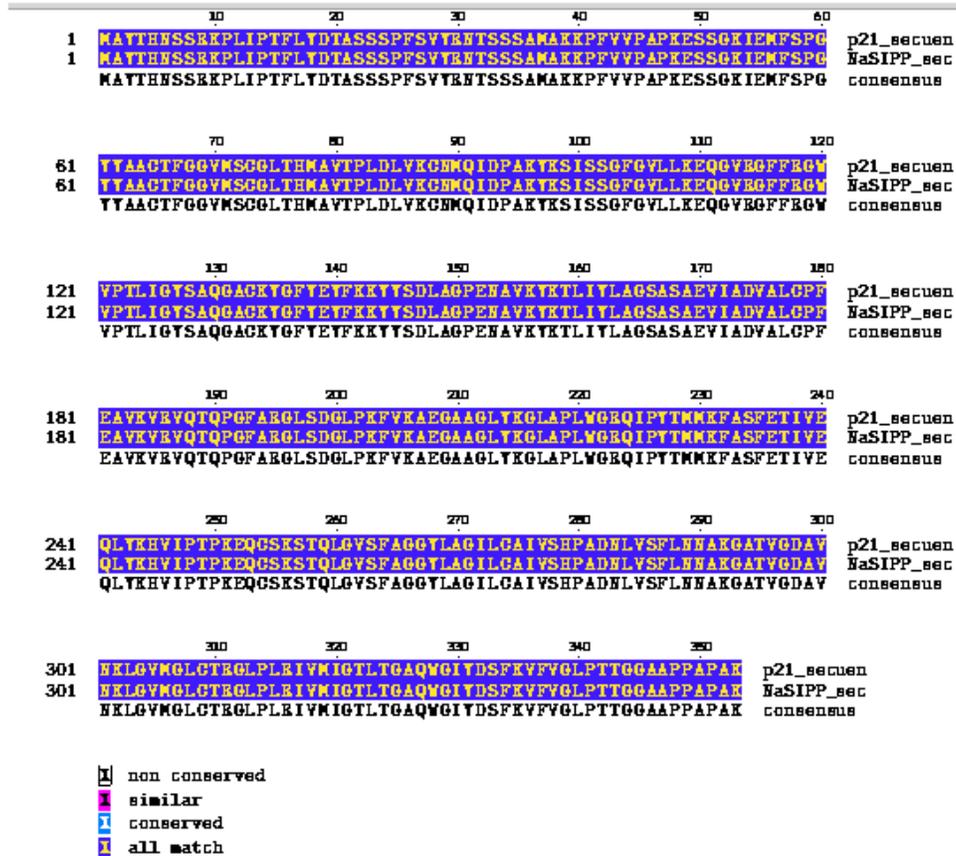


Figura 12. Alineamiento a nivel de aminoácidos de la secuencia original de NaSiPP con las resultantes de la secuenciación. Arriba: NaSiPP con *pEarleyGate103:NaSiPP*. Abajo: NaSiPP con *pNGC:NaSiPP*.

Los alineamientos mostrados en la figura 12, muestran que en los dos casos, la secuencia original de NaSiPP es conservada a nivel de aminoácidos contra los resultados de la secuenciación de NaSiPP en el vector *pEarleygate103:NaSiPP* (Fig. 12 arriba) y *pNGC* (Fig. 12 abajo). Esta es considerada como la prueba final previo a la infección de las plantas con *A. tumefaciens*.

5.4 Infección y transformación de plantas tipo silvestre de *A.thaliana* mediante *A. tumefaciens*.

Con las cepas de *A. tumefaciens* que contienen a las construcciones previamente descritas se transformaron las plantas por el método **floral dip** que consiste en la inmersión de los botones florales de *A. thaliana* hasta la roseta en una solución con las bacterias transformantes. Las plantas se sometieron a un foto periodo 16 h luz con 8 h de oscuridad durante una semana y ciclos de riego cada tercer día. Las plantas se observaron hasta la formación de silicuas, justo en ese momento se detuvo el riego y se esperó a que se secaran naturalmente las plantas para la recolección de las semillas provenientes de las silicuas.

Cumplido el proceso, se germinaron las semillas transgénicas en placas MS adicionadas con BASTA, un herbicida que sirvió como marcador genético para seleccionar a las transformantes que mantuvieron el color verde, mientras que los falsos positivos empezaron a tornarse de un color verde claro indicando que el herbicida estaba ejerciendo su efecto y que dichas plántulas no poseían el gen de resistencia a BASTA por tanto no estaban transformadas.

Las plántulas que presentaban hojas verdaderas se pasaron a suelo para su crecimiento individual hasta la formación de las flores en antésis.

El porcentaje de transformación se determinó por esta fórmula:

$$\%Transformación = \frac{\text{Plántulas que sobrevivieron}}{\text{Número de Semillas que germinaron}} * 100$$

Fórmula 1. Cálculo del porcentaje de transformación de la germinación de semillas de *A. thaliana* cultivadas en placas con medio MS

En la fórmula 1 se detallan los parámetros para el cálculo del porcentaje de transformación de las semillas que germinaron y sobrevivieron al tratamiento con BASTA por un periodo de 7 días (Fig. 5), cabe destacar que esta fórmula solo indica la cantidad de plantas que adquirieron el gen de resistencia y no necesariamente las que contienen en su genoma la secuencia de *NaSiPP*.

En la placa que contenía las plantas transformadas con la construcción *pEarleyGate103:NaSiPP* se contabilizaron 98 plántulas al término de la germinación y al final solo sobrevivieron 27 por lo que aplicando la fórmula 1 da un 27.6% de transformación. Aplicando el mismo procedimiento para la transformación con *pNGC:NaSiPP* al principio se tenían 114 plántulas, de las cuales solo 36 se mantuvieron vivas por lo que se alcanza un 31.5% de transformación.

Siguiendo los ciclos de temperatura, luz y riego descritos en la metodología, se esperó a que las plantas generaran más tejido para someterlas al monitoreo mediante PCR y buscar amplificar la secuencia de *NaSiPP* en el DNA genómico de las plantas y así discernir entre las plantas con el inserto y las que son falsos positivos. Mediante el sistema **Phire Plant Direct PCR Kit®Thermo Scientific™** se llevaron a cabo reacciones de PCR (Fig. 13) para contabilizar el número de plantas que contenían el inserto y continuar su crecimiento.

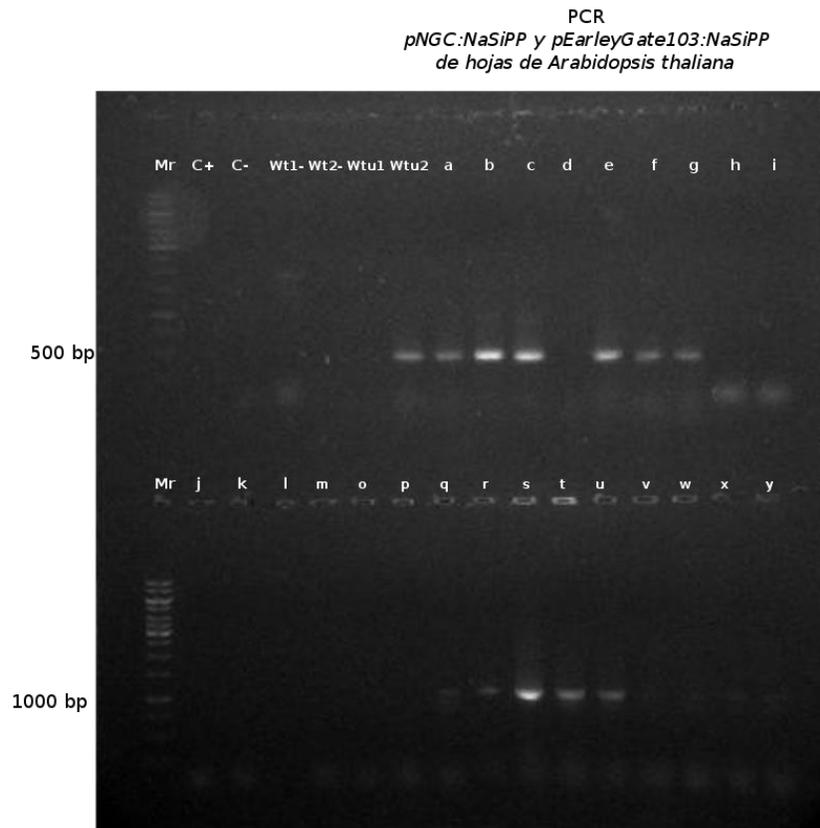


Figura 13. Ensayo de PCR directo de hoja de plantas *A. thaliana*. (Mr) Marcador 1kb NEB, (C+) *pEarleyGate103:NaSiPP*, (C-) *pEarleyGate103* vacío, (Wt1-) hoja de planta tipo silvestre con primers para *NaSiPP*, (Wt2-) hoja de planta tipo silvestre con primers para *GFP* (Wtu1) hoja de planta tipo silvestre con primers para ubiquitina, (Wtu2) hoja de planta tipo silvestre con primers para ubiquitina, (a-f) hojas de plantas transformantes *pNGC:NaSiPP* con primers para ubiquitina, (k-l) hojas de plantas transformantes *pEarleyGate103:NaSiPP* con primers para ubiquitina, (m-s) hojas de plantas transformantes *pNGC:NaSiPP* con primers para *NaSiPP*, (t-y) hojas de plantas transformantes *pEarleyGate103:NaSiPP* con primers para *NaSiPP*.

La figura 13 es un ejemplo de los ensayos de PCR que se hicieron para la selección de las plantas. Los controles que se tomaron en cuenta para este experimento fueron los habituales (amplificar directamente del DNA plasmídico a *NaSiPP*) y además, la incorporación de plantas tipo silvestre (Wt) que no estuvieron sometidas al proceso **floral dip** para descartar que dentro del genoma propio de *A. thaliana* no existieran secuencias parecidas al inserto de interés, tal es el caso de los controles Wt1- y wt2- (primers para *NaSiPP* y *GFP*, respectivamente). Otro control utilizado fue amplificar la banda correspondiente a la ubiquitina (secuencia altamente conservada en las plantas) de aproximadamente 300 bp, esto con el fin de constatar que el DNA genómico del disco de hoja se encontraba en buen estado.

Nuevamente se calculó el porcentaje de transformación ahora llamado de incorporación (tomando en cuenta la cantidad de plantas que dieron positivo en el ensayo de PCR directo de hoja y que contienen la secuencia de *NaSiPP*) por la siguiente fórmula;

$$\%Incorporación = \frac{\text{Número de plántulas positivas PCR}}{\text{Número de plántulas transformantes}} * 100$$

Fórmula 2. Cálculo del porcentaje de incorporación de la secuencia de *NaSiPP* en plantas de *A. thaliana* con resistencia a BASTA

Con la formula dos se obtiene el número en porcentaje de las plantas que contienen a *NaSiPP* en su genoma, para la construcción *pEarleyGate103:NaSiPP* de las 27 plantas que presentaron resistencia a BASTA, solo fueron positivas en el ensayo de PCR 8, por lo que, el porcentaje de incorporación es del 22%. De 36 plantas infectadas con la

construcción *pNGC:NaSiPP* y que presentaron resistencia a BASTA, 15 resultaron positivas para la amplificación de *NaSiPP* dando como resultado el 42% de incorporación del inserto en el genoma de *A. thaliana*.

5.5 Análisis por microscopia confocal de tubos polínicos de *A. thaliana*

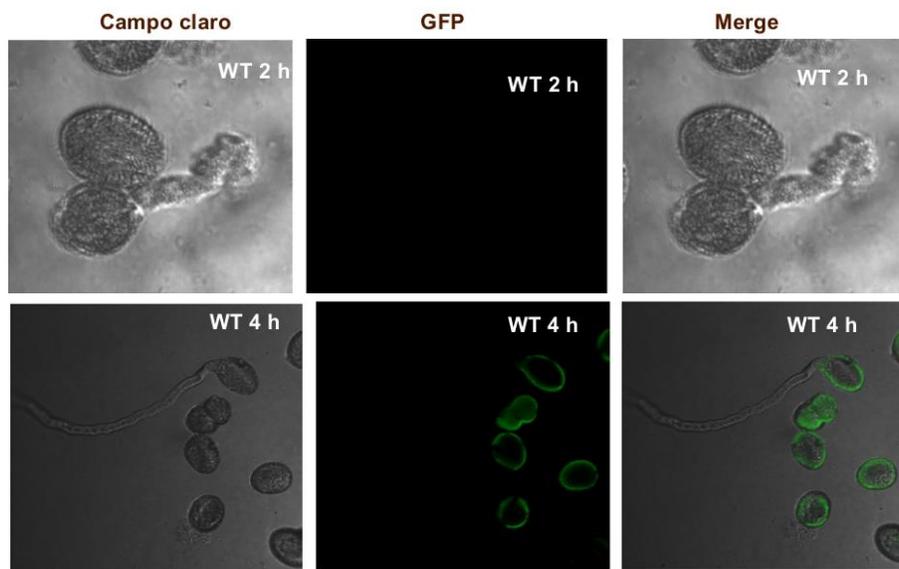


Figura 14. Tubos polínicos de *A. thaliana* silvestre. Arriba: tubos polínicos silvestres de 2 horas de germinación a 22°C. Abajo: tubos polínicos silvestres de 4 horas de germinación a 22°C, el brillo de color verde se debe a la emisión natural de la hexina.

Todo el polen colectado se germinó en el medio referido en la tabla 13 y de acuerdo a la figura 7. Como ya se mencionó en la metodología, el promotor NTP303 presenta una expresión fuerte entre 3 y 5 horas de germinación, por tanto se eligieron solo dos tiempos (2 y 4 horas de germinación) a modo de comparación.

En la figura 14 se aprecia el crecimiento de los tubos polínicos de *A. thaliana* silvestre a los tiempos elegidos, en el panel izquierdo se muestra el campo claro de la preparación en el portaobjeto, el panel central muestra el filtro para ver la expresión de GFP (tiene una emisión máxima alrededor de los 509 nm) y por último el panel derecho, muestra la superposición (merge) de las dos imágenes. Como se puede ver, no existe autofluorescencia de los tubos polínicos por lo que este experimento resulta un apropiado control negativo. El grano de polen autofluoresce de manera natural debido a la capa más externa del mismo, la exina.

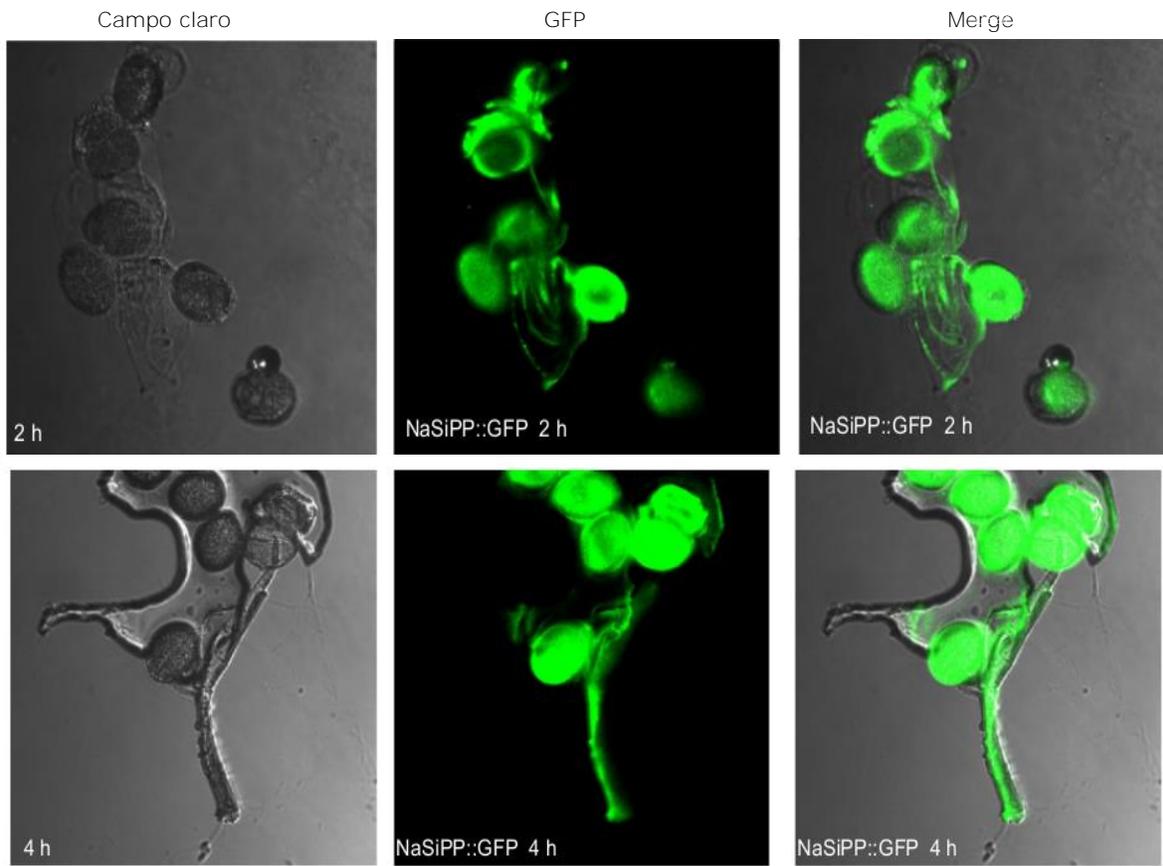


Figura 15. Tubos polínicos de *A. thaliana* silvestre transformados con la construcción *pEarleyGate103::NaSiPP*. Arriba: tubos polínicos *pEarleyGate103::NaSiPP* de 2 horas de germinación a 22°C. Abajo: tubos polínicos *pEarleyGate103::NaSiPP* de 4 horas de germinación a 22°C.

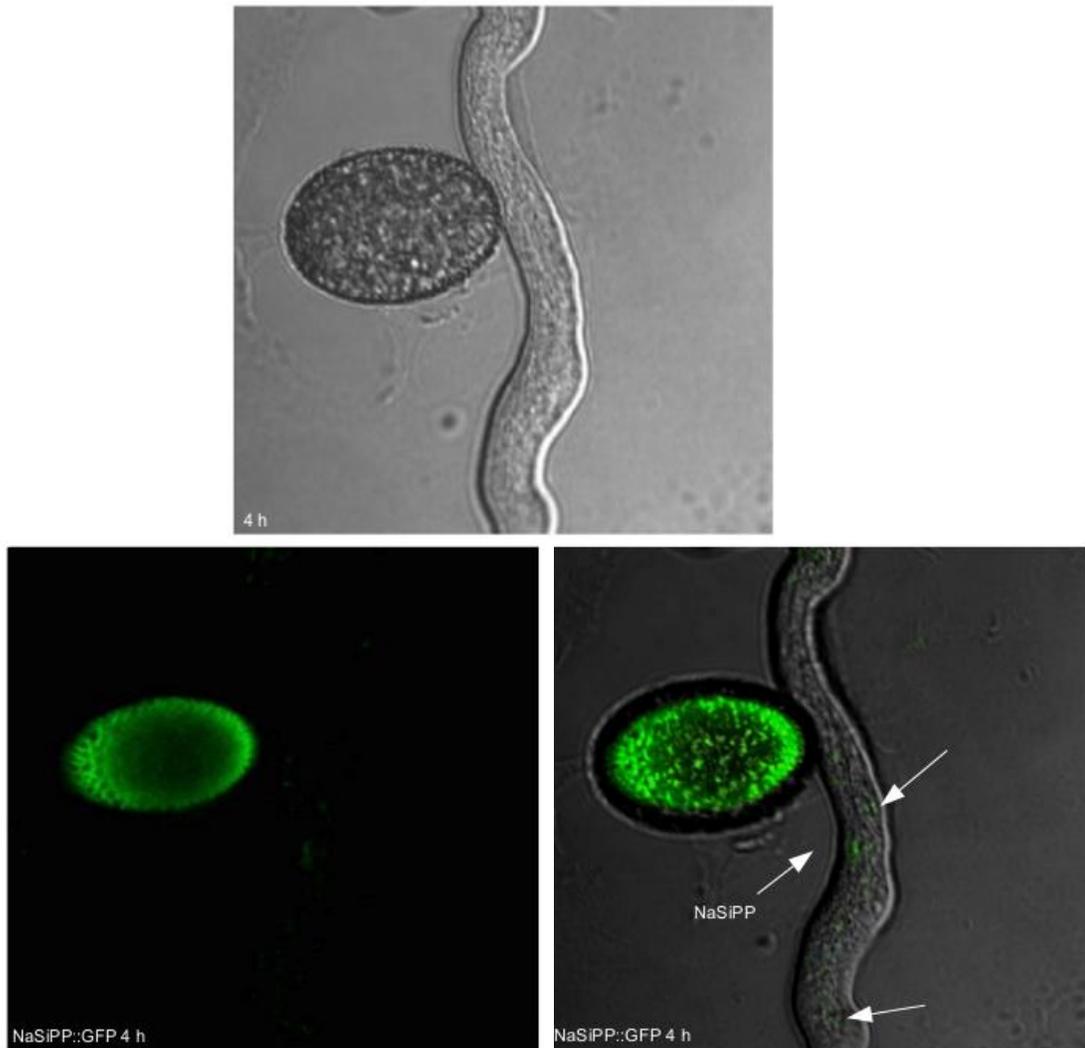


Figura 16. Tubos polínicos de *A. thaliana* silvestre transformados con la construcción *pNGC::NaSiPP* de 4 horas de germinación a 22°C. Por medio de las flechas blancas se indica la posible localización de la proteína NaSiPP.

Posterior al análisis por microscopía confocal de los tubos polínicos silvestres, se observaron los que provenían del polen de la plantas transformadas con la construcción *pEarleyGate103:NaSiPP* (Figura 15), en este caso se esperaba que la fluorescencia fuera extendida en todo el tubo polínico ya que, el promotor 35S contenido en el vector *pEarleyGate*

103 es fuerte y constitutivo. Al igual que en la imagen 14, se presentan tres campos, el claro, filtro para GFP y el solapamiento. Existe fluorescencia en todo el cuerpo del tubo y aumenta en el grano de polen lo que indica que existe una sobreexpresión de la proteína de fusión NaSiPP::GFP en los dos tiempos. A su vez, se presenta diferencia de la intensidad de fluorescencia entre los dos tiempos de germinación.

Por último se analizó la construcción *pNGC:NaSiPP*. La figura 16 muestra dichos resultados donde se omitió presentar la imagen correspondiente a las dos horas de germinación ya que no presento fluorescencia detectable. A las 4 horas de germinación, sin embargo, se pudo observar la señal correspondiente a NaSiPP::GFP en puntos localizados dentro del cuerpo del tubo polínico, como las flechas blancas lo indican (Fig. 16).

6. Discusión

En Solanaceae es claro que el mecanismo de autoincompatibilidad es desencadenado por la interacción alelo específica entre la determinante femenina llamada S-RNasa y la masculina SLF. Sin embargo, en experimentos previos se demostró que dicha interacción no es suficiente para que se ocurra el rechazo del polen, por lo que existen otras determinantes llamados genes modificadores (GM) que se encuentran fuera del locus **S** y resultan ser esenciales para el reconocimiento y rechazo del polen propio. Hasta el momento se conocen tres GM en *Nicotiana glauca*; HT-B, 120K y NaStEP (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et*

al., 2005, Goldraij *et al.*, 2006; Busot *et al.*, 2008; Jimenez-Durán *et al.*, 2013).

A pesar de todo el conocimiento que se ha acumulado sobre el mecanismo AI, este no ha sido elucidado por completo por lo que se han realizado experimentos de interacción entre los GM conocidos o con proteínas del polen y el tubo polínico.

De esta manera se descubrió a NaSiPP, una proteína que se expresa de manera exclusiva en el polen de especies auto incompatibles y en etapas maduras de la antera durante la pre-antesis (apertura de la flor), este patrón de expresión podría indicar que NaSiPP participa durante la polinización (García-Valencia, F.C.G., no publicado).

Otro dato relevante para el estudio de la localización de NaSiPP es la interacción específica con la proteína estigmática NaStEP. Por medio de un ensayo de doble híbrido se descubrió que la interacción es física y específica para el producto de *NaSiPP* (García-Valencia, F.C.G., no publicado).

NaSiPP presenta similitud a nivel de DNA y aminoácidos en el extremo carboxilo con un transportador de fosfatos mitocondrial. Dicho extremo carboxilo es característico de las porinas y también se observa que algunos aminoácidos se encuentran conservados y compartidos con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el cual es el componente más abundante en la membrana externa mitocondrial que está involucrado en el transporte metabólico entre la mitocondria y el citoplasma (Kusano *et al.*, 2009).

Los canales aniónicos dependientes de voltaje forman parte del poro de transición y están involucrados en procesos de muerte celular programada en células de mamíferos. Al dispararse la señal de apoptosis, el poro de transición se abre provocando la pérdida del potencial en la membrana interna mitocondrial dando como resultado la desorganización de la membrana externa, liberando el citocromo c que es una característica de la muerte celular programada por medio de la activación de caspasas dando como resultado la muerte celular (Kusano *et al.*, 2009 y Takeda *et al.*, 2009).

NaStEP pertenece a la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz, los cuales además de tener la actividad de inhibidor de proteasas (se ha demostrado que NaStEP tiene al menos actividad de inhibición con proteasas tipo subtilisina) [Bernal-Gracida, F.C.G., no publicado], también pueden actuar como bloqueadores de canales lo cual resulta relevante, ya que NaSiPP presenta homología con una proteína de membrana que posiblemente funcione en el transporte; sin embargo, esta proteína podría ser un GM debido a su expresión exclusiva en el polen y en etapas maduras de la antera así como su interacción física con NaStEP que se ha visto es esencial para el rechazo del polen en especies auto incompatibles (Jiménez-Duran *et al.*, 2013), además hasta ahora no se había descubierto una proteína que se expresara únicamente en la parte masculina (polen) y que interactuara con alguna proteína de la parte femenina (estigma) por lo que, NaSiPP podría estar involucrada en el mecanismo de rechazo del polen.

Para evaluar la localización subcelular de NaSiPP, el transcrito obtenido por medio de una biblioteca de cDNA de polen en *N. alata* se amplificó

con *primers* con los sitios NcoI/BamHI para clonarlo en los vectores de localización pEarleyGate103 y pNGC, en los cuales se encuentra la proteína reportera GFP hacia el carboxilo terminal.

El vector pNGC tiene hacia el extremo amino, el promotor ***NTP303*** específico de polen. NTP303 pertenece a una familia compuesta por NTP101, NTP201, NTP302, NTP303 y NTP805 (Groot, 2004). Estas proteínas son muy abundantes y específicas del polen; sin embargo, no son detectables hasta que el grano de polen es rehidratado y comienza a germinar donde se presentan de manera abundante, principalmente en la pared celular del tubo polínico (Groot *et al.*, 2004).

En *N. tabacum* se han realizado experimentos de pérdida de función, donde la expresión de la proteína NTP303 es silenciada en plantas transgénicas, los tubos polínicos no alcanzan el óvulo porque el crecimiento se inhibe a la altura del estigma demostrando que los miembros la familia NTP303 están relacionados con el crecimiento del tubo polínico (Groot *et al.*, 2004).

Teniendo las construcciones *pEarleyGate103:NaSiPP* y *pNGC:NaSiPP* se transformaron plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* por medio del método floral Dip.

Arabidopsis thaliana es una planta que pertenece a la familia de las crucíferas la cual ofrece numerosas ventajas que la colocan como un modelo biológico idóneo para investigación básica. Entre las ventajas destaca el ciclo de vida corto (6 a 8 semanas), es autocompatible y produce numerosas semillas que permanecen viables por muchos años,

además de que se cuenta con el genoma totalmente secuenciado (Pérez *et al.*, 2006).

Los transportadores mitocondriales (TM) constituyen una gran familia de transportadores localizados en la membrana interna de la mitocondria. En *A. thaliana* se conocen 45 genes que podrían codificar para 6 diferentes TM (Picault *et al.*, 2004). La mitocondria es el componente más importante para la integración del carbono y nitrógeno en el metabolismo en plantas (Pellny *et al.*, 2008), además de ser un organelo importante para la biosíntesis de moléculas tan importantes como las pirimidinas, vitaminas, entre otras. Además la mitocondria está involucrada en procesos de muerte celular programada (PCD) que es un proceso natural que no solo es normal para el correcto desarrollo de las plantas si no está presente en los sistemas de defensa contra el estrés biótico y abiótico (Picault *et al.*, 2004).

Los TM se localizan regularmente en la membrana interna o externa de la mitocondria (Aquila *et al.*, 1987). Sin embargo, se han detectado proteínas tipo TM que no están localizadas estrictamente en las membranas mitocondriales (Haferkamp, 2007), ya que se han localizado también en peroxisomas, plastidios y en el retículo endoplasmático en *Arabidopsis* (Leroch *et al.*, 2008).

Se analizó la T1 de las plantas transformantes de *A. thaliana* en el microscopio confocal con el filtro para GFP. En la figura 14, se muestran las imágenes del crecimiento de los tubos polínicos silvestres *in vitro* de *A. thaliana* que como se esperaba no emitió alguna señal (color verde) salvo la exina, que es una proteína que forma parte de la cubierta externa del grano de polen (Zinki, 1999) y presenta auto fluorescencia de manera

natural, incluso como se ha descrito en trabajos previos, en la cubierta del grano de polen existen patrones específicos entre interespecie e intraespecie que determinaran la adhesión de estos en los estigmas femeninos de manera independiente a los diversos factores que también regulan dicha adhesión (Zinki, 1999).

En la figura 16, se aprecia la expresión de NaSiPP::GFP bajo el promotor específico de polen NTP303. No se puede concluir de manera acertada la localización subcelular de NaSiPP en el tubo polínico debido al poco acercamiento de la imagen y por tanto no se puede determinar que organelos se asocian los puntos localizados de color verde.

Actualmente, se están mejorando las observaciones de dicha expresión utilizando colorantes específicos de mitocondria (mito-tracker) para delimitarla y poder determinar si existe asociación entre las dos señales (NaSiPP y mitocondria) y poder determinar la localización subcelular de dicha proteína (García-Valencia y F.C.G, no publicado). Además la interacción física que existe (demostrado en ensayos de doble híbrido) entre NaSiPP y NaStEP representa un dato relevante para los mecanismos de autoincompatibilidad, por tanto, también se están llevando a cabo experimentos de bicomplementaridad molecular (BiFC) para determinar dicha interacción, restableciendo la fluorescencia de YFP que esta fusionada solo por su extremo amino terminal a NaSiPP y el extremo carboxilo a NaStEP.

7. Conclusiones

Se logró clonar la secuencia codificante de *NaSiPP* en el vector *pGEM*.

Se fusiono *NaSiPP* a los vectores *pEarleyGate103* y *pNGC*, además de transformar células electrocompetentes de *E. coli* DH5a y *A. tumefaciens* PGV2260 con dichas construcciones.

Por medio del método **floral dip** se transformaron plantas *A. thaliana* con las construcciones previamente descritas y se logró obtener una expresión estable de las dos construcciones hasta la T1.

Bajo las condiciones de este trabajo, no se pudo determinar la localización subcelular de *NaSiPP* en tubos polínicos germinados *in-vitro* de *Arabidopsis thaliana*.

8. Perspectivas

Determinar la localización subcelular de *NaSiPP* en tubos polínicos de *A. thaliana* por medio de acercamientos y la tinción diferencial de organelos en las células del tubo polínico. Es importante mencionar que es necesario determinar la localización de *NaSiPP* en las plantas *N. tabacum* y *N. rastroensis* porque, estas especies representan los modelos biológicos donde se presenta el mecanismo de autoincompatibilidad.

Para corroborar dicha localización se puede utilizar como método alternativo la inmunolocalización de NaSiPP.

Determinar la interacción física entre NaSiPP y NaStEP por un método diferente al de doble híbrido en levaduras como, por ejemplo, la bicomplementaridad molecular.

Silenciar la expresión de NaSiPP en plantas transgénicas de *N. tabacum* y *N. glauca* y confirmar si es vital en el mecanismo de rechazo del polen.

9. Bibliografía

Aquila H, Link T, Klingenberg M (1987). **Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. *FEBS letters* 212 (1): 1-9.**

Busot G, McClure B, Ibarra C, Jimenez D, Santana S. y Cruz-Garcia F (2008). **Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *JExpBot* 59 (11): 3187-3201.**

Busot G (2009). **Genes modificadores requeridos en el rechazo del polen en *Nicotiana*. Tesis de Doctorado. P: 41-96.**

Charlesworth D y Willis J (2009). **The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews* 10: 783- 796.**

Chen G, Zhang B, Zhao Z, Sui Z, Hang H. y Xue Y (2010). **A life or death decision for pollen tubes in S-RNase-based self-incompatibility. *JExpBot* 61(7): 2027-2037.**

Clark A, G, y Kao T (1991). **Excess nonsynonymous substitution at shared polymorphic sites among self-incompatibility alleles of Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9823-9827.**

Cornish E.C, Pettitt J.M, Böning I, and Clarke A.E. (1987). **Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, 326, 99 102.**

de Nettancourt D (2001). **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants, 2^a ed. Springer, Berlin Heidelberg New York**

Edlund A, Swanson R, Preuss D (2004). **Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *Plant cell.*, 16: 84-97.**

Franklin F.C.H, Lawrence M.J. and Franklin-Tong V.E (1995) **Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int. Rev. Cytol*, 158, 1-64.**

Franklin-Tong V.E, Thorlby G.J, Lawrence M.J. and Franklin F.C (1992) **Recognition signals and pollen responses in the incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. In: Angiosperm Pollen and Ovules: Basic and applied aspects, pp. 84-93, Mulcahy D.L., Bergamini-Mulcahy G, Ottaviano E. (eds), Springer, New York.**

Franklin-Tong (2008). **Self-incompatibility in flowering plants:**

evolution, diversity and mechanism. Springer, Berlin Heidelberg.

Foot H, Ride J, Franklin-Tong V, Walker E, Lawrence M and Franklin, F.C.H (1994). **Cloning and expression of a novel self incompatibility (S-) gene from *Papaver rhoeas* L.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 2265–2269.

Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock N, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillip T, Cruz-García F y McClure B (2006). **Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self compatible *Nicotiana*.** *Nature* **439**: 805-810.

Goring R y Silva N (2001). **Mechanism of self-incompatibility in flowering plants.** *Cell Mol Life Sci.* **58(14)**: 1988-2007.

Gray , McClure B, Bönig I, Anderson M, Clarke A (1991). **Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca* (S-RNase) on in vitro-grown pollen tubes.** *Plant Cell* **3**: 271–283.

Green, P (1994). **The ribonucleases of higher plants.** *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **45**:421–445.

Greveling C, Fantes V, Kemper E, Schell J, Masterson R (1993). **Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs.** *Plant Mol Biol.* **23(4)**: 847-860.

Groot P, Wetering K, Been M, Wittink F, Hulzink R, Custers J, van Herpen M, Wullems G (2004). **Silencing of the pollen-specific gene *NTP303* and its family members in tobacco affects in vivo pollen tube growth and results in male sterile plants.** *Plant Mol Biol.* **55(5)**: 715-726.

Haferkamp I (2007). **The diverse members of the mitochondrial carrier family in plants.** *FEBS Lett* **581**: 2375-2379.

Hancock C, Kent L, McClure B (2005). **The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* 43:716-723.**

Harrison S, Mott E, Parsley K, Aspinall S, Gray and Cottage A (2006). **A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2 (19): 1-7.**

Hernández A, Cruz Y, Ibarra C, Cruz-García F (2009). **Molecular mechanisms on plant self-incompatibility. *Functional Diversity of Plant Reproduction.* p: 1-4, 15-20.**

Hiscock S, McInnis S (2003). **Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: Brassica and beyond. *Trends Plant Sci.* 8(12): 606-613.**

Hiscock S, Allen A (2008). **Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol* 179: 286- 317.**

Hua Z, Kao T (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.**

Huang S, Lee H, Karunanandaa B, Kao T (1994). **Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell* 6: 1021-1028.**

Hunter P (2009). **Me, myself and I. *EMBO reports* 10 (12): 1297-1300.**

Longer T, Gohlke J, Xu B, Kao, T (1991). **Primary structural features of the self-incompatibility proteins in the Solanaceae. *Sex Plant Reprod* 4, 81-87.**

Jiménez-Durán K y Cruz-García F (2011). **Incompatibilidad sexual, un mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal.** *Rev Fitotec Mex* **34: 1-9.**

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 glauca* pollen tubes.** *Plant Physiol* **161: 97-107.**

Jin S, Roitsch T, Ankenbauer G, Gordon M, Nester E (1990). **The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for *vir* gene regulation.** *J Bacteriol* **172(2): 525-530.**

Kao T and Tsukamoto T (2004). **The molecular and genetic bases of SRNase-based selfincompatibility.** *Plant Cell* **16:72-83.**

Ko J, Han K, Park S, Yang J (2004). **Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling.** *Plant Physiol* **135:1069-1083.**

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

Kusano T, Tateda C, Berberich T, Takahashi Y (2009). **Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death.** *Plant Cell Rep* **28: 1301-1308.**

Leroch M, Neuhaus E, Kirchberger S, Zimmermann S, Melzer M, Gerhold J and Tjadena J (2009). **Identification of a Novel Adenine Nucleotide Transporter in the Endoplasmic Reticulum of *Arabidopsis*.** *Plant Cell* **20(2): 438-451.**

Lord W y Russell S (2002). **The mechanism of pollination and fertilization in plants.** *Annu Rev Cell Dev Biol* **18:81-105.**

McClure B, Haring V, Ebert P, Anderson M, Simpson R, Sakiyama F and Clarke A (1989). **Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonuclease. *Nature* 342:955–957.**

McClure B, Gray J, Anderson M and Clarke A (1990). **Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* 347: 757–760.**

McClure B, Mou B, Canevascini S, and Bernatzky R (1999). **A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 13548–13553.**

McClure B (2004). **S-RNase and SLF determine S-haplotype-specific pollen recognition and rejection. *Plant Cell* 16: 2840–2847.**

McClure B and Frankling-Tong V (2006). **Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanism involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta* 224: 233-245.**

McCubbin A and Kao T (2000). **Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 16: 333–364.**

McCormick and Gaude T (1999). **Signaling in pollen- pistil interactions. *Cell Dev Biol* 10: 139-147.**

Nasrallah J (2002). **Recognition and rejection of self in plant reproduction. *Science* 296: 305-308.**

Nou I, Watanabe M, Isogai A and Hinata K (1993). **Comparison of S-alleles and S glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex Plant Reprod* 6: 79–86.**

Ockendon D (2000). **The S-allele collection of *Brassica oleracea*. *Acta Hort* 539: 25–30.**

Palanivelu R and Johnson M (2010). **Functional genomics of pollen tube–pistil interactions in Arabidopsis. *Biochem Soc Trans* 38: 593–597.**

Pellny Till, Van Aken O, Foyer C (2008). **Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen-dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Journal* 54: 976-992.**

Pérez J, Frigerio M, Alabadí D (2006). **Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142: 553–56.**

Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F (2004). **The growing family of mitochondrial carriers in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 9(3): 138-146.**

Poulter N, Bosch M, Franklin-Tong V (2011). **Proteins implicated in mediating self-incompatibility- induced alterations to the actin cytoskeleton of *Papaver* pollen. *Annals of Bot* 108(4): 659-675.**

Roldan J, Quiroga R, Goldraij A (2010). **Molecular and genetic characterization of novel S-RNases from a natural population of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Rep* 29: 735- 746.**

Salas M, *et al* (2001). **Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Reports* 20: 701-705.**

Sijacic P, Wang X, Skirpan A, Wang Y, Dowd P, McCubbin A, Huang S and Kao T (2004). **Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self incompatibility. *Nature* 429: 302- 305.**

Sprunck S (2010). **Let´s get physical: gamete interaction in flowering plants. *Biochem Soc Trans* 38 (2):635- 640.**

Stachel S, Messens E, Van Montagu M and Zambryski P (1985). **Identification of the signal molecules produced by wounded plant**

cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624 – 629.

Takayama S and Isogai A (2005). **Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol* 15: 467-487.**

Takeda S, Ishii Y, Iwanaga M, Yamada H (2009). **Interaction of Cytochrome P450 3A4 and UDP-Glucuronosyltransferase 2B7: Evidence for Protein-Protein Association and Possible Involvement of CYP3A4 J-Helix in the Interaction. *Mol Pharm* 75(4): 956-964.**

Valderrama A, Arango R and Kafuri L (2005). **Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "INGENIERÍA GENÉTICA NATURAL APLICADA". *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*. 59(2):2569-2585.**

Watanabe M, Suzuki G, Takayama S, Isogai A and Hinata K (2000) **Genomic organization of the SLG/SRK region of the S locus in Brassica species. *Ann. Bot* 85: 155–160.**

Weterings K, Reijnen W, van Aarssen A, Kortstee, Spijkers J, van Herpen M, Schrauwen J, Wullems G (1992). **Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Nicotiana tabacum* expressed during microgametogenesis and germination. *Plant Mol Biol* 18: 1101-1111.**

Wheeler M, Vatovec S, Franklin-Tong V (2010). **The pollen S-determinant in *Papaver*: comparisons with know plant receptor and protein ligand partners. *J Exp Bot* 61: 2015- 2025.**

Winans S and Fuqua C (1994). **A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol* 176(10): 2796-2806**

Woodward J, Basic A, Jahnen W and Clarke A (1989). **N-linked glycan**

chains on S-allele associated glycoproteins from *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* 1: 511–514.

Zhang Y, Zhao Z, Xue Y (2009). **Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. *Annu Rev Plant Biol* 60: 21- 42.**

Zink G, Zwiebel B, Grier D and Preuss D (1999). **Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Dev. Biologists* 126: 5431-5440.**

10. Apéndice

A. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa “Zymoclean Gel DNA Recovery”

- Separar el fragmento de DNA deseado del gel de agarosa y transferir a un tubo eppendorf de 1.5mL.
- Pesar el fragmento de gel y adicionar 3 volúmenes de amortiguador ADB por cada volumen de gel escindido (ej. Por 100µL (mg) de gel de agarosa, adicionar 300µL de buffer ADB).
- Incubar a 50°C por 10 min o hasta lograr que el gel se disuelva completamente.
- Transferir la solución de agarosa fundida a una columna (Zymo-Spin) dentro de un tubo colector.

- Centrifugar 30-60 segundos y descartar el sobrenadante.
- Adicionar 200µL de amortiguador de lavado a la columna y centrifugar durante 30 segundos, descartar el sobrenadante.
- Repetir el paso de lavado.
- Adicionar 15µL de H₂O desionizada estéril directamente a la matriz de la columna e incubar 1min. Posteriormente transferir la columna a un tubo limpio de 1.5mL y centrifugar por 30-60 segundos para eluir el DNA.

B. Células electrocompetentes *E. coli* DH5a

- Inocular 500 mL de medio LB con 500µL de cultivo de *E. coli* incubado por toda la noche.
- Crecer la células a 37°C con una agitación constante de 300 rpm hasta DO₆₀₀ de aproximadamente 0.5 a 0.7.
- Transferir el cultivo a botellas para centrifugación e incubar en hielo por 20 minutos. Centrifugar a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante. Cuidadosamente, resuspender el pellet en 500 ml de Glicerol 10% frío. Centrifugar a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C.

- Descartar el sobrenadante. Cuidadosamente, resuspender el pellet en 250 ml de Glicerol 10% frío. Centrifugar a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante. Cuidadosamente, resuspender el pellet en aproximadamente 20 ml de Glicerol 10% frío. Centrifugar a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2 ml de Glicerol 10% frío. Tomar alícuotas **de 200µL y** transferirlas a tubos eppendorf de 1.5 mL e inmediatamente congelar con nitrógeno líquido.
- Guardar a -70°C hasta su uso.

C. Transformación de células electrocompetentes *E. coli* DH5 α , por medio de Micropulser™ Electroporation Apparatus de BIORAD®

- Descongelar las células electrocompetentes e incubarlas junto con las cubetas de electroporación (0.1 o 0.2 cm) en hielo, durante 20 minutos.
- En hielo, mezclar 40 μ L de células con 1 a 2 μ L de DNA purificado, mezclar bien e incubar al menos un minuto en hielo.
- Fijar el programa "EC1" en el Micropulser™ Electroporation Apparatus.
- Transferir la mezcla de células con DNA a la cubeta de electroporación. Posicionar la cubeta en el aparato y pulsar una sola vez.
- Retirar la cubeta del aparato e inmediatamente adicionar 1mL de medio SOC, transferir la suspensión a un tubo de 1.5 ml e incubar a 37°C durante una hora con una agitación de 250 rpm.
- Pasado el tiempo de incubación, plaquear la suspensión celular en medio selectivo.

D. Purificación de DNA plasmídico *Zymoclean™ miniprep kit*

- En un tubo eppendorff de 1.5mL agregar 600µL del cultivo de bacterias, centrifugar durante 3 min a 13,000 rpm. Descartar sobrenadante (repetir este paso una vez más hasta agotar el cultivo celular).
- Adicionar 100µL de “Amortiguador de lisis 7X”10 y mezclar por inversión de 4 a 6 veces e incubar a temperatura ambiente 2 min.
- Adicionar 350µL de buffer de neutralización y mezclar vigorosamente.
- Cuando la neutralización es completa se forma un precipitado de color amarillo.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 2-4 min.
- Transferir el sobrenadante (~900µL) en una columna “ZYMO-Spin IIN” teniendo cuidado de no tomar parte del pellet.
- Colocar en un tubo recolector y centrifugar durante 15 s a 13,000 rpm.

- Agregar 200µL de “ENDO wash buffer” a la columna y centrifugar por 1 min/13,000 rpm.
- Agregar 400µL de “Wash Buffer” a la columna y centrifugar durante 1 min.
- Transferir la columna dentro de un tubo eppendorf de 1.5mL y agregar 30µL de H₂O desionizada estéril directamente a la matriz de la columna e incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
- Centrifugar durante 30 s a 13,000 rpm para eluir el DNA plasmídico purificado.

E. Células electrocompetentes A. tumefaciens PGV2260

- Inocular 750 mL de medio LB con 2 mL de cultivo de *A. tumefaciens* incubado por toda la noche.
- Crecer las células a 37 ° C toda la noche con una agitación constante de 300 rpm hasta DO₆₀₀ de aproximadamente 0.8 a 1.0.
- Transferir el cultivo a botellas para centrifugación de 500 mL. Centrifugar a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C.
- Resuspender el cultivo en aproximadamente 50 mL de Glicerol 10% frío, una vez disuelto llevar a un volumen final de 500 mL con glicerol 10% frío. Centrifugar a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C.

- Descartar el sobrenadante y repetir el paso anterior.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 ml de Glicerol 10% frío. Centrifugar a 3000 x g durante 5 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender en 1 mL de Sorbitol 1 M frío. Tomar alícuotas de **100µL** y transferirlas a tubos eppendorf de 1.5 mL e inmediatamente congelar con nitrógeno líquido.
- Guardar a -70°C hasta su uso.

F. Transformación de células electrocompetentes *A. tumefaciens* PGV2260, por medio de Micropulser™ Electroporation Apparatus de BIORAD®

- Descongelar las células electrocompetentes e incubarlas junto con las cubetas de electroporación (0.1 o 0.2 cm) en hielo, durante 20 minutos.
- **En hielo, mezclar 20µL de células con 5µL de DNA purificado, mezclar bien e incubar al menos un minuto en hielo.**
- **Fijar el programa "Agr" en el Micropulser™ Electroporation Apparatus.**
- Transferir la mezcla de células con DNA a la cubeta de electroporación. Posicionar la cubeta en el aparato y pulsar una sola vez.

- Retirar la cubeta del aparato e inmediatamente adicionar 1 mL de medio SOC, transferir la suspensión a un tubo de 1.5 ml e incubar a 30°C durante tres horas con una agitación de 250 rpm.
- Pasado el tiempo de incubación, plaquear la suspensión celular en medio selectivo.

G. Extracción de DNA plasmídico por el sistema GeneAll® Hybrid-Q™ Plasmid Rapidprep para bajo número de copias.

- En un tubo eppendorff de 1.5mL agregar 600µL del cultivo de bacterias, centrifugar durante 3 min a 13,000 rpm. Descartar sobrenadante (repetir este paso una vez más hasta agotar el cultivo celular, el sistema admite hasta 3 ml de cultivo.).
- **Resuspender el pellet en 170µL de Buffer SI**
- **Adicionar 170µL de buffer S2** y mezclar por inversión 3 a 4 veces (incubar hasta 5 minutos).
- Adicionar **250µL de buffer G3** y de manera inmediata mezclar por inversión de 3 a 5 veces.
- Transferir el lisado a la columna EZClear™ y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.

- Remover la columna y desechar el sobrenadante del tubo colector, re insertar la columna en el tubo colector y adicionar 700µL de buffer PW. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.
- Descartar el sobrenadante y adicionar a la columna 50µL de buffer EB. Centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad para eluir el DNA purificado.

G. PCR de DNA genómico directo de hoja por el sistema Phire Plant Direct PCR Kit® Thermo Scientific.

- Elegir una hoja joven (tres semanas máximo de crecimiento).
- Obtener un disco de hoja (0.5 mm aproximadamente) con el Harris Uni-Core™ y depositarlo en el tubo de reacción previamente preparado de acuerdo a las especificaciones de la tabla 11.
- Cerciorarse de que el disco de hoja quede en la solución y no, en las paredes o tapa del tubo.

Soluciones y medios

Tabla 14. Composición del buffer CutSmart NEB (pH 7.9 a 25 °C)

Reactivo	Concentración 1 X
Acetato de potasio	50 mM
Tris-acetato	20 mM
Acetato de magnesio	10 mM
BSA	100 µg/ml

Tabla 15. Componentes de la solución amortiguadora de *Promega* 2X

Reactivo	Concentración 1 X
Tris- HCl (pH 7.8)	30 mM
DTT	10 mM
MgCl ₂	10 mM
ATP	1 mM
PEG	5 %

Tabla 16. Composición de la solución de micronutrientes Hoagland 1X

Reactivo	Concentración 1 X
KNO ₃	3 mM
Ca(NO ₃) ₂	2 mM
MgSO ₄	1 mM
MnCl ₂	0.004 mM
H ₃ BO ₃	0.023 mM
ZnSO ₄	0.004 mM
CuSO ₄	0.00015 mM

H₂MoO₄	0.00005 mM
Fe(III) EDTA	1g /200mL
(NH₄)H₂PO₄	500 μM

- Medio LB

10g de Peptona

5g de Extracto de levadura

10g NaCl

15g de agar

Aforar a 1 L con H₂O destilada

- Medio SOC

Medio LB

Glucosa 0.02 M (Concentración final)

- TAE 50X

242g Tris-HCl

57.1ml Ácido acético glacial

100ml EDTA 0.5 M pH8

Aforar a 1L con agua destilada

- Gel de agarosa 1X

300mg de agarosa

30ml de amortiguador TAE 1X

Calentar hasta disolver y agregar 10μl de bromuro de etidio (0.5 mg/ml)