



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Análisis funcional del promotor de *NaStEP* en plantas
transgénicas de *Arabidopsis thaliana***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

Luis Alberto Ramos Mora



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:** Dr. Felipe Cruz García
VOCAL: **Profesora:** Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez
SECRETARIO: **Profesor:** Dr. Euclides Avila Chávez
1er. SUPLENTE: **Profesora:** Dra. Martha Patricia Coello Coutiño
2° SUPLENTE: **Profesora:** Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 104. Conjunto E, Departamento de Bioquímica. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Felipe Cruz García

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Yuridia Cruz González

SUSTENTANTE:

Luis Alberto Ramos Mora

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó con el apoyo del Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo de tesis se llevó a cabo con el financiamiento de los Proyectos DGAPA-IN210312 y CONACYT 81968.

Agradecemos las sugerencias y comentarios del Dr. Euclides Avila Chávez y de la Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
a. Sistemas genéticos que controlan el rechazo del polen.....	3
b. Sistemas de AIG dependientes de S-RNasa.....	5
1. Determinante femenina (S-RNasa).....	5
2. Determinante masculina (SLF/SFB).....	6
c. Rechazo del polen.....	7
1. Modelo de compartimentalización.....	7
d. Factores no asociados al locus S que resultan determinantes en el rechazo del polen.....	8
1. Genes modificadores.....	9
i. HT-B.....	10
ii. 120K.....	11
iii. NaStEP (<i>N. alata</i> Stigma-Expressed Protein).....	11
e. Región promotora de un gen.....	12
III. ANTECEDENTES	14
a. Posible región promotora del gen <i>NaStEP</i>	14
b. Homología de promotor putativo de <i>NaStEP</i> con el promotor <i>SLG</i> ₁₃ de <i>Brassica</i>	14
IV. JUSTIFICACIÓN	17
V. HIPÓTESIS	18
VI. OBJETIVO GENERAL	18
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	18
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	19
a. Vectores de clonación.....	19
b. Medios de Cultivo.....	21
c. Antibióticos.....	21
d. Cepas bacterianas.....	21
e. Cultivo de <i>A. thaliana</i>	22
f. Clonación del promotor de <i>NaStEP</i> en el vector de entrada <i>pENTR</i>	23

g.	Evaluación de la construcción <i>pENTR:ppNaStEP</i>	26
h.	Recombinación dirigida en el vector binario <i>pBGWFS7</i>	27
i.	Evaluación de la construcción <i>pBGWFS7:ppNaStEP</i> en <i>E. coli</i>	28
j.	Evaluación de la construcción <i>pBGWFS7:ppNaStEP</i> en <i>A. tumefaciens</i>	29
k.	Transformación estable de plantas adultas de <i>A. thaliana</i>	30
l.	Selección de transformantes de <i>A. thaliana</i>	31
m.	Análisis de estigmas maduros de <i>A. thaliana</i> por microscopia confocal.	33
n.	Tinción histoquímica de la actividad de GUS	33
IX.	RESULTADOS	35
a.	Clonación del promotor de <i>NaStEP</i> en <i>pENTR</i>	35
b.	Recombinación dirigida en el vector binario <i>pBGWFS7</i>	37
c.	Selección de transformantes de <i>A. thaliana</i>	40
d.	Confirmación de la presencia de <i>ppNaStEP:GFP:GUS</i> en <i>A. thaliana</i>	42
e.	Expresión del promotor de <i>NaStEP</i> en estigmas maduros de <i>A. thaliana</i> ...	43
1.	Expresión de GFP	43
2.	Actividad de GUS	44
X.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
XI.	CONCLUSIONES	52
XII.	PERSPECTIVAS	52
XIII.	APÉNDICES	54
XIV.	BIBLIOGRAFÍA	61

I. RESUMEN

NaStEP es una proteína perteneciente a la familia de inhibidores de proteasa tipo Kunitz que se expresa abundantemente en estigmas maduros de diferentes especies incompatibles de *Nicotiana*. *NaStEP* es un gen esencial para la autoincompatibilidad en *Nicotiana*, ya que experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* muestran que cuando *NaStEP* se encuentra silenciado por un RNAi, se pierde la capacidad del reconocimiento y rechazo del polen con el mismo haplotipo S que el pistilo.

Previamente, en el grupo del Dr. Cruz se clonó un fragmento de DNA genómico río arriba del extremo 5' de la región codificante de *NaStEP*, el cual fue denominado *putative promoter of NaStEP (ppNaStEP)*. Se llevó a cabo un análisis bioinformático de *ppNaStEP* utilizando el software *Softberry TSSP* y se encontraron varios elementos de regulación en *cis*, así como una caja TATA ubicada a 34 pares de bases (pb) en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción.

En este trabajo se clonó la secuencia *ppNaStEP*, fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) y a la β -glucuronidasa (GUS) como reporteras de la expresión en el vector binario *pBGWFS7*, para posteriormente transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante el método de "Floral Dip". Las plántulas T₁ que portan el transgen lograron desarrollar hojas verdaderas al ser expuestas al herbicida BASTA cuando se germinaron en medio mínimo. Posteriormente la presencia en el DNA genómico del promotor de *NaStEP* fue verificada mediante ensayos de PCR.

Una vez que las plantas transformantes desarrollaron inflorescencias, se detectaron en estigmas maduros la expresión tanto de GFP como de GUS, mediante microscopía confocal y ensayos histoquímicos respectivamente, de manera que, *ppNaStEP* es una región reguladora con actividad promotora que dirige la expresión *in vivo* de GFP y GUS de manera específica en los estigmas.

II. INTRODUCCIÓN

Las angiospermas son el grupo más exitoso de las plantas, ya que abarcan más del 90% de las especies y dominan casi todos los ecosistemas terrestres. Este éxito evolutivo se debe, en parte, a su sofisticada reproducción. Para que la reproducción sexual en las plantas se lleve a cabo, es necesaria una serie de procesos que en su conjunto se denominan polinización (Franklin et al., 1995). La polinización puede darse entre individuos diferentes de una misma especie (polinización cruzada) o dentro de un solo individuo cuando un pistilo es polinizado por el polen de la misma flor, denominado autopolinización.

Un gran número de especies de angiospermas tienen tanto a los órganos sexuales femeninos (pistilo: compuesto por el estigma, el estilo y el ovario) como a los masculinos (estambres) en la misma flor (hermafroditas), los cuales se encuentran muy cerca entre sí, de manera que se incrementa la probabilidad de que ocurra la autopolinización. En respuesta a esto, varias especies han generado adaptaciones morfológicas y fisiológicas que disminuyen la probabilidad de la autopolinización y que promueven la polinización cruzada.

La dicogamia es la maduración diferencial de los órganos reproductivos y la hercogamia es la separación espacial del pistilo y los estambres (de Nettancourt, 2001; McClure & Franklin-Tong, 2006). No obstante, estas barreras no son del todo efectivas, porque aún existe la posibilidad de flujo génico a través del polen entre individuos relacionados genéticamente. Es por ello que algunas especies han desarrollado un mecanismo de reconocimiento del polen, conocido como sistema de autoincompatibilidad (AI); el cual se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 2001).

El control que ejercen los sistemas de AI restringe el flujo génico entre los padres y su progenie, favoreciendo la polinización cruzada y contribuyendo a la generación

de diversidad genética en las plantas, aumentado así la capacidad de supervivencia y adaptación (Hunter, 2009).

a. Sistemas genéticos que controlan el rechazo del polen

En varias familias de angiospermas la AI está controlada genéticamente por un solo locus multialélico (altamente polimórfico) conocido como locus *S*, el cual incluye dos genes estrechamente ligados. Uno de ellos es expresado en el polen (determinante masculina) y otro es expresado en el pistilo (determinante femenina). El locus *S* se encuentra cerca del centrómero y la proximidad de las dos determinantes provoca que no haya recombinación entre ambos genes, de tal manera que se promueve su herencia como una sola unidad mendeliana llamada haplotipo *S* (F. Cruz-García & McClure, 2001). El polen es rechazado cuando el haplotipo *S* masculino y femenino coinciden (de Nettancourt, 1977, 2001; Franklin et al., 1995).

Hay dos tipos de control genético en los sistemas de AI homomórficos (las flores de la misma especie presentan una misma morfología): en función del tiempo de expresión de la determinante masculina en el polen, gametofítico (AIG) y esporofítico (AIE) (Newbiggin et al., 1993).

En el sistema AIG los componentes que determinan la AI son expresados por el genotipo haploide del grano de polen (gametofito masculino). En este caso el mecanismo del rechazo del polen ocurre cuando el haplotipo *S* del polen coincide con alguno de los dos haplotipos *S* del pistilo en una planta heterocigota; esto inhibe el crecimiento del tubo polínico (TP) a nivel del estilo. En caso contrario el polen es aceptado y el TP alcanza los óvulos (Figura 1). En el sistema AIG, la progenie puede retrocruzarse parcialmente con los padres y con individuos de la misma progenie (F. Cruz-García & McClure, 2001).

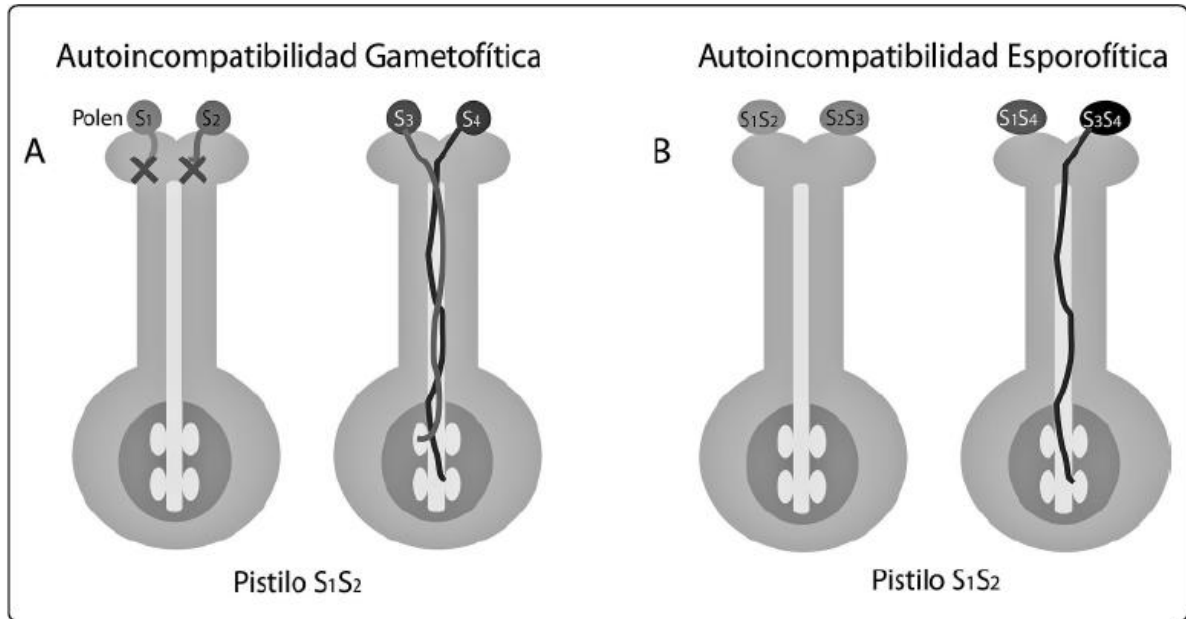


Figura 1. Control genético de rechazo del polen. A) Rechazo del polen en sistemas de AI gametofítica (AIG). La AIG es determinada por el haplotipo S del genoma haploide del polen, el polen que presente los haplotipos S_1 o S_2 serán rechazados (izquierda), mientras que el polen S_3 podrá ser aceptado para fertilizar la planta S_1S_2 (derecha). **B)** Rechazo del polen en el sistema de AI esporofítica (AIE). La AIE es determinada por el haplotipo S del genotipo diploide, en este caso S_1S_2 , S_2S_3 , S_3S_4 y S_1S_4 . El polen será rechazado si algunas de las dos proteínas S coinciden con una de las proteínas S expresadas en el pistilo (S_1S_2) como se observa a la izquierda. Si no existe coincidencia alélica de ninguna proteína S de la cubierta del polen (derecha), este podrá fecundar a los óvulos. Modificado de García-Valencia et al., 2013.

En el sistema AIE, la respuesta de AI está determinada por los productos de los alelos S que son expresados y sintetizados por los tejidos diploides de la planta madre, los cuales son incorporados a la cubierta del grano de polen durante su maduración en la antera (Nasrallah & Nasrallah, 1993). En una planta madre heterocigota las dos proteínas S estarán presentes en la cubierta del polen. El polen será rechazado si algunas de las dos proteínas S coinciden con una de las proteínas S expresadas en el pistilo. La respuesta de AI se manifiesta como la inhibición de la germinación del polen a nivel de la superficie del estigma (Figura 1).

b. Sistemas de AIG dependientes de S-RNasa

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

1. Determinante femenina (S-RNasa)

El producto génico de la determinante femenina en las familias Rosaceae, Plantaginaceae y Solanaceae, es una proteína con actividad de ribonucleasa conocida como S-RNasa (Kao & McCubbin, 1996; B. A. McClure et al., 1989). Las S-RNasas son glicoproteínas de aproximadamente 30 kDa que se expresan en estigma, estilo y ovario. Las S-RNasas son secretadas hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, sitio por el cual el TP crece hacia al ovario (Cornish et al., 1987; B. A. McClure et al., 1989; Xue et al., 1996). Experimentos de ganancia o pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* y *Petunia* demostraron que las S-RNasas determinan la respuesta de AI en el pistilo, ya que causan cambios en el fenotipo de polinización pasando de autocompatible a incompatible o viceversa (Huang et al., 1994; H. S. Lee et al., 1994; Murfett et al., 1994).

Las S-RNasas tienen un rango de similitud a nivel de secuencia de 38-98%. La comparación de secuencias de S-RNasas en Solanaceae revela cinco regiones altamente conservadas (C1-C5) y dos dominios hipervariables (HVa y HVb) (Parry et al., 1997). Las regiones conservadas C1, C4, C5 parecen estar implicadas en la estabilización de la estructura tridimensional de la S-RNasa (Ioerger et al., 1991; Qin et al., 2005), mientras que en las regiones conservadas C2 y C3 se encuentran dos histidinas conservadas (His32 e His90) esenciales para la actividad de RNasa en la respuesta de AI (Huang et al., 1994). Las dos regiones HV se cree que

desempeñan un papel clave en la especificidad haplotipo S (Kao & McCubbin, 1996; Murfett et al., 1996; O'Brien et al., 2002).

Se propone que las S-RNasas actúan como agentes citotóxicos S-específicos (B. A. McClure et al., 1989). Estas ribonucleasas se incorporan a los TP durante su crecimiento por la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, independientemente de si la cruce es compatible o incompatible y son almacenadas en algunas de sus vacuolas. En cruces incompatibles, se observa la ruptura de la vacuola liberando a las S-RNasas al citoplasma del TP, donde degradan su RNA e inhiben su crecimiento. Por otro lado, en una cruce compatible la vacuola con las S-RNasas se mantiene estable permitiéndole al TP alcanzar el ovario (Goldraij et al., 2006).

2. Determinante masculina (SLF/SFB)

La determinante masculina del locus S en sistemas de AI basados en S-RNasa es SLF (S-locus F-box gene) en Solanaceae y Plantaginacea y SFB (S-haplotype-specific F-box protein) en Rosaceae (Ushijima et al., 2004). Esta determinante es miembro de una familia de proteínas que contiene una caja F hacia su extremo amino. Esta proteína presenta dos dominios variables (Va y Vb) y dos dominios hipervariables (HVa y HVb) hacia el extremo carboxilo (Ushijima et al., 2004; Yamane & Tao, 2009). Las proteínas con caja F pertenecen a la familia de las enzimas tipo ligasas E3 y están asociadas con la vía de degradación de proteínas mediante el proteosoma 26S (Sullivan et al., 2003). *SLF* es un gen de aproximadamente 1,4 kb que se expresa únicamente en la antera y en los granos de polen; su expresión es haplotipo S específica (Sijacic et al., 2004).

Se ha observado *in vitro* que las interacciones entre la S-RNasa y SLF con un haplotipo S diferente resultan ser más fuertes que las interacciones entre la S-RNasa y SLF con un haplotipo S idéntico. Lo anterior permite suponer que en una cruce compatible SLF podría interaccionar con alta afinidad con las S-RNasas no

específicas y mediar la degradación de las mismas mediante ubiquitinación y el proteosoma 26S; por otro lado, en una cruce incompatible la interacción específica entre SLF y la S-RNasa resultaría más débil y no ocurriría la degradación de la S-RNasa (Chang et al., 2008).

En especies AI de Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae se ha observado que en el locus *S*, existe una única copia del gen de la *S-RNasa* y múltiples genes tipo *SLF*. Se ha encontrado en *Petunia inflata* que hay varios genes tipo *SLF* ligados al locus *S* y que cada una de estas variantes, podría interactuar con un subconjunto específico de S-RNasas con diferente haplotipo *S*. Estas isoformas de SLF podrían actuar de una manera colaborativa para contender contra diferentes S-RNasas (Kubo et al., 2010).

c. Rechazo del polen

1. Modelo de compartimentalización

El modelo de la compartimentalización propone que cuando los granos de polen llegan al estigma estos germinan sin importar su haplotipo *S*, sus tubos polínicos se dirigen al ovario a través del tejido de transmisión del estilo. Durante el trayecto los tubos polínicos incorporan a su citoplasma (posiblemente mediante endocitosis) diversas proteínas como es el caso de la S-RNasa, 120K, HT-B (HighTop-Band), y NaStEP (*Nicotiana alata* Stigma-Expressed Protein) (Goldraij et al., 2006; Jiménez-Durán et al., 2013).

Las S-RNasas y 120K son compartimentalizadas en una de las vacuolas de los tubos polínicos (Goldraij et al., 2006). Como anteriormente se mencionó, la interacción haplotipo *S* específica entre la S-RNasa y SLF desencadena la cascada bioquímica que conduce al rechazo o aceptación del polen. Esta interacción en una cruce incompatible estabiliza a la proteína HT-B, esto provoca la liberación de las S-RNasas al citoplasma del TP, debido a la ruptura de la vacuola que las contiene.

Una vez en el citoplasma del TP, las S-RNasas actúan como agentes citotóxicos degradando el RNA del TP y ocasionando eventualmente su muerte (Figura 2) (Roldán et al., 2012).

De manera contraria, en una cruce compatible, HT-B es degradada en el TP y la vacuola que contiene a las S-RNasas permanece intacta, lo anterior permite que el TP logre alcanzar el ovario (Goldraij et al., 2006).

En este contexto, la proteína NaStEP desempeña un papel muy importante evitando la degradación prematura de HT-B en el TP, ya que esta proteína se incorpora al TP una vez que los granos de polen han germinado en el estigma (Figura 2). Se ha visto que en plantas transgénicas de *Nicotiana* que no acumulan a NaStEP, HT-B es degradada en el TP tanto en cruces compatibles como en cruces incompatibles, provocando que los tubos polínicos alcancen el ovario (Jiménez-Durán et al., 2013).

d. Factores no asociados al locus S que resultan determinantes en el rechazo del polen.

Aunque las S-RNasas y SLF determinan la especificidad de la AI, se han encontrado otros genes no ligados al locus S que son determinantes en el mecanismo del rechazo del polen haplotipo S específico (Ai et al., 1991; Bruce McClure & Franklin-Tong, 2006; Murfett et al., 1996; Tsukamoto et al., 1999) que son conocidos como genes modificadores (GM) y se clasifican en tres grupos (Bruce McClure & Franklin-Tong, 2006).

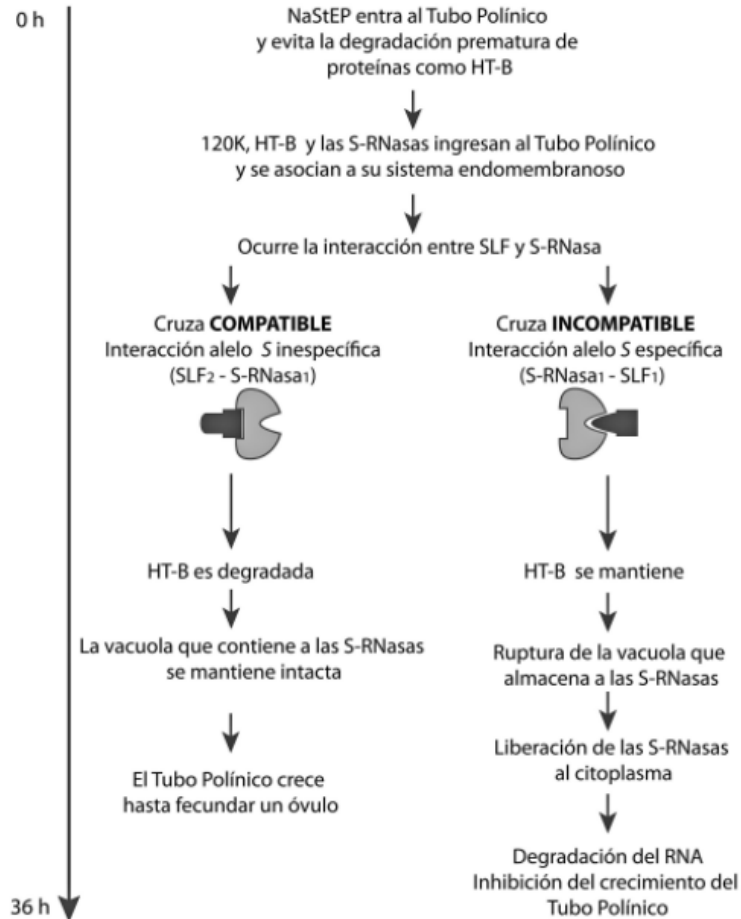


Figura 2. Modelo de la compartimentalización de las S-RNasas. En una cruz incompatible (derecha), la S₁-RNasa presente en el citoplasma se une a SLF₁, esto evita que HT-B no se degrade y que las vesículas que contienen a las S-RNasa se rompan, liberándolas en el citoplasma de manera que se inhibe el crecimiento del TP. En una cruz compatible (izquierda) la interacción de las determinantes provoca que HT-B se degrade, evitando así la ruptura de la vacuola. El fenómeno descrito ocurre en un lapso que va de 0 a 36 horas posteriores a la polinización. Tomado de García-Valencia et al., 2013.

1. Genes modificadores

El grupo I incluye genes cuyos productos regulan la expresión de las determinantes de la especificidad (SLF y S-RNasa).

El grupo II está comprendido por factores que interaccionan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad (SLF y S-RNasa) sin

afectar su expresión. Por lo tanto, son factores que se requieren específicamente para el rechazo del polen. Entre ellos encontramos a *HT-B*, *120K* y *NaStEP* (Busot et al., 2008; Hancock et al., 2005; Jiménez-Durán et al., 2013; B McClure et al., 1999).

En el grupo III se encuentran los genes que participan tanto en la respuesta del rechazo del polen como en procesos generales durante la polinización y en la interacción polen-pistilo. En este grupo podrían encontrarse TTS (proteína específica del tejido de transmisión [TT] del estilo de *N. alata*), PELP III (proteína similar a extensina), Nap11 (proteína de 11 kDa, similar a una quimiocianina), NaTrxh (tiorredoxina h que se secreta a la matriz extracelular del TT de estilos de *N. alata* y que reduce a las S-RNasas *in vitro*), y SPB (Busot et al., 2008; O'Brien et al., 2002). Sin embargo, mediante experimentos de pérdida de función en plantas sólo se ha evaluado la participación en la AI de los genes *HT-B*, *120K* y *NaStEP*.

i. HT-B

El gen *HT-B* está presente en tres géneros de la familia Solanaceae: *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum* (B McClure et al., 1999; O'Brien et al., 2002) *HT-B* es una proteína de 8.6 kDa con un dominio constituido por 20 residuos de asparagina y ácido aspártico hacia el carboxilo terminal (Kondo & McClure, 2008). *HT-B* se expresa sólo en estilos maduros de plantas AI (B McClure et al., 1999). En experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Solanum*, *Nicotiana* y *Petunia*, las plantas perdieron la capacidad de rechazar su propio polen cuando *HT-B* fue silenciado (B McClure et al., 1999; O'Brien et al., 2002; Puerta et al., 2009) También se ha observado que esta proteína es capaz de ingresar a los TP tanto en cruza compatibles como de cruza incompatibles; sin embargo, en las cruza compatibles esta proteína es degradada en el interior del mismo (Goldraij et al., 2006).

ii. 120K

120K es una arabinogalacto-proteína con un motivo de extensina de 120 kDa; esta proteína se localiza en las células del tejido de transmisión del estilo y es secretada a la matriz extracelular de este tejido, tanto en especies autocompatibles (AC) como en incompatibles de *Nicotiana* (Hancock et al., 2005). El silenciamiento del gen *120K* por RNA interferente (RNAi) en plantas transgénicas provocó la incapacidad de rechazar el polen con el mismo haplotipo *S* que el pistilo receptor (Hancock et al., 2005). En *Nicotiana*, 120K forma complejos *in vitro* con las S-RNasas (Felipe Cruz-García et al., 2005) e ingresa a los TPs independientemente de su haplotipo *S* (Goldraij et al., 2006).

iii. NaStEP (N. alata Stigma-Expressed Protein)

NaStEP es una proteína perteneciente a la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz y recientemente se encontró que NaStEP posee la capacidad de inhibir la actividad de la proteasa subtilisina (Jiménez-Durán *et al.*, 2013; Bernal-Gracida & Cruz-García, no publicado); no obstante, se desconoce si es la actividad de inhibidor de proteasas en la que participa en el mecanismo del rechazo del polen. *NaStEP* se expresa abundantemente en estigmas maduros de diferentes especies AI de *Nicotiana* (Figura 3), y su transcrito se detecta desde etapas tempranas del desarrollo del estigma alcanzando sus máximos niveles hacia la madurez del pistilo (Busot et al., 2008).

Estudios inmunocitoquímicos indican que NaStEP se almacena en las vacuolas de las células del estigma, de donde es liberada cuando los estigmas son polinizados (Busot et al., 2008). Una vez que NaStEP se encuentra en el exudado estigmático entra a los TPs sin importar su haplotipo *S* (Jiménez-Durán et al., 2013). Experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* dan evidencia de que cuando *NaStEP* se encuentra silenciado por un RNAi, se pierde la capacidad del reconocimiento y rechazo del polen con el mismo haplotipo *S* que el

pistilo; lo que indica de manera contundente que *NaStEP* es un gen modificador estigmático clave en el mecanismo del rechazo del polen en *Nicotiana* (Jiménez-Durán et al., 2013).

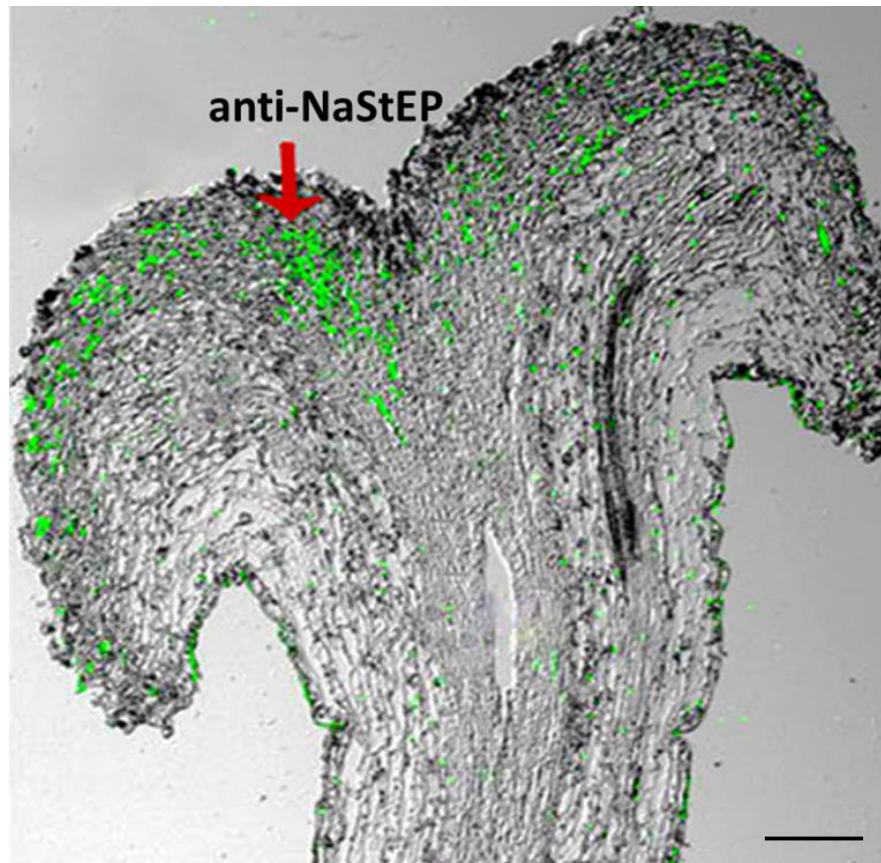


Figura 3. Localización inmunohistoquímica de NaStEP en los tejidos del estigma de *N. alata* BT. Estigma y estilo tratados con anticuerpo anti-NaStEP (verde). Barra=500 μ m Adaptado de Busot et al., 2008.

e. Región promotora de un gen

El promotor mínimo o “core promoter”, es una región localizada aproximadamente a 40 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS); allí se encuentra la caja TATA (Molina & Grotewold, 2005). La caja TATA es el sitio de unión de la subunidad del factor del inicio de la transcripción TFIID TPB (“TATA-box-Binding Protein”). El promotor mínimo también posee elementos reguladores en *cis* donde

se une la maquinaria transcripcional basal, incluyendo a la RNA polimerasa II y sus subunidades correspondientes (Burley & Roeder, 1996).

En dirección del extremo 5' del promotor mínimo se encuentran las llamadas regiones proximales y regiones distales del promotor. Estas regiones contienen diversas secuencias regulatorias, tales como: intensificadores (“enhancers”), silenciadores, aislantes (“insulators”) y elementos de regulación en *cis* que contribuyen a la regulación “fina” de la expresión génica a nivel transcripcional (T. I. Lee & Young, 2000).

Durante la transcripción, co-activadores y factores de transcripción se unen a regiones específicas en el DNA interaccionando simultáneamente con la maquinaria transcripcional unida al promotor mínimo (T. I. Lee & Young, 2000). Esta interacción proteína-DNA lleva a la activación, intensificación o supresión de la transcripción, de manera que la regulación de la transcripción depende de la disponibilidad y actividad de los factores transcripcionales, así como del tipo, número, posición y combinación de los elementos regulatorios presentes alrededor del promotor (Zou et al., 2011).

La regulación de la expresión génica a nivel del promotor, es controlada mayoritariamente por los elementos de regulación en *cis* localizados hacia el extremo 5' del TSS. La interacción física entre las proteínas implicadas en la regulación y la maquinaria transcripcional basal es directa durante el inicio de la transcripción (Hernandez-Garcia & Finer, 2014).

III. ANTECEDENTES

a. Posible región promotora del gen *NaStEP*

En el grupo de trabajo del Dr. Cruz García se clonó un fragmento de DNA genómico río arriba del extremo 5' de la cadena codificante del gen *NaStEP*, a la cual llamamos *ppNaStEP*, por *putative promoter of NaStEP*. El posterior análisis bioinformático de *ppNaStEP*, utilizando el software *Softberry TSSP*, sugirió que esta secuencia contenía una caja TATA ubicada a 34 pb en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción (Soto, 2011). Es importante mencionar que esta secuencia muestra una alta identidad con la caja TATA reportada de un promotor de *N. tabacum* (Soto, 2011).

Los elementos de regulación en *cis* localizados en *ppNaStEP* corresponden a elementos de respuesta a luz (L-Box, A y P-Box, Box 4, Box I, G-Box, GAG-motif, TCT-motif, 4cl-CMA2b, G-Box 6 y GATA 2T), elementos de respuesta al ácido abscísico y al ácido salicílico, elementos de respuesta al estrés por sequía y también a la regulación negativa de la expresión en el polen (Soto, 2011).

b. Homología de promotor putativo de *NaStEP* con el promotor *SLG₁₃* de *Brassica*

En *Brassica*, el gen de la Glicoproteína del Locus S (*SLG*) se expresa únicamente en órganos reproductivos específicos. En un estudio previo (Dzelzkalns et al., 1993) se establecieron los elementos mínimos de expresión del promotor del gen *SLG₁₃* mediante la transformación en *N. tabacum* con versiones truncadas del promotor y fusionados al gen reportero GUS. Se determinó que ciertas regiones denominadas “cajas” confieren especificidad en la expresión del gen marcador (Figura 4). Existe un dominio (caja V) que permite la expresión específica en el polen, mientras que la región o caja I-II-III modula la expresión específica en el estigma. Además, existe

un elemento silenciador en *cis* que actúa sobre el dominio específico del polen, regulando negativamente su expresión (caja IV).

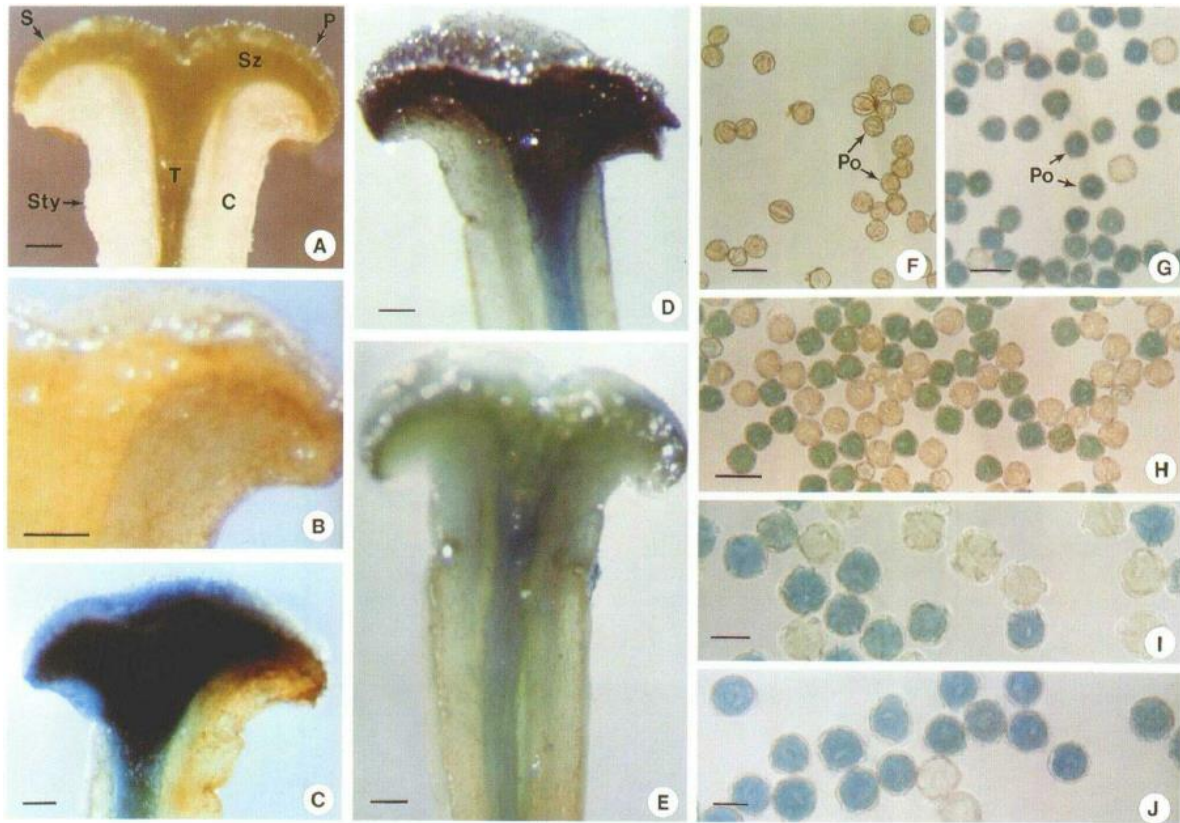


Figura 4. Análisis histoquímico de la actividad de la beta-glucuronidasa (GUS) conferida por los diferentes fragmentos del promotor de *SLG₁₃* en estigmas y polen de *N. tabacum*. A) Corte longitudinal de pistilo de tabaco que muestra el estigma (S), el estilo (Sty), cortex o tejido parenquimático (C), células papilares (P), la zona secretora (Sz) y tejido de transmisión (T). B) Pistilos de un control sin transformar que no muestra actividad de GUS. C) Pistilos de plantas transformadas con la secuencia completa del promotor de *SLG₁₃*. D) Pistilos de plantas transformados con las cajas I-II-III-IV-V del promotor de *SLG₁₃*. E) Pistilos obtenidos a partir de plantas transformadas con las cajas I-II-III que muestra actividad de GUS en la zona secretora del estigma y en el tejido de transmisión del estilo. F) Polen de plantas sin transformar que no presentan coloración azul en los granos de polen (Po). G) Polen proveniente de plantas transformadas con el promotor de *SLG₁₃* completo. H) Granos de polen provenientes de plantas transformadas únicamente con la caja V del promotor. I) y J) Polen de dos líneas transgénicas que portan la construcción del elemento distal del polen, en cada una de ellas se observa un porcentaje distinto de polen en donde se detecta actividad de GUS. (A) hasta (E) barra = 600 μ m (F), en (G) y (H) 50 μ m. 25 μ m en (I) y (J) (Tomado de Dzelzkalns et al., 1993).

Posteriormente se llevó a cabo un alineamiento de tres secuencias promotoras adicionales a *SLG*₁₃, dos correspondientes a distintos alelos de *SLG* (*SLG*₂ de *B. oleracea* y *SLG*₈ de *B. Campestres*) y la tercera correspondiente a la región promotora del gen *SLR*₁ (proteína involucrada en la adhesión de polen). En la Figura 5 se observa que las secuencias de estas cajas se encuentran altamente conservadas.

Gen	Dominio de expresión en estigma/estilo			Elemento silenciador de expresión en el polen	Dominio de expresión en polen
	Caja I	Caja II	Caja III	Caja IV	Caja V
<i>SLG</i> ₁₃	GACNAATGATA	GTTTGT	TGANTTAATCG	TGAAAAAGTCATNGA	ATTTNCTTGTCTGCT
<i>SLR</i> ₁	GACCAATGACA	GTTTGT	TGAGTTAAT(-)G	TGG(-)AAAGTCATAGA	AATTTTCTTGTCTGCT
<i>SRK</i> ₂	GAAAGAATGATA	GTTCTGT	TGAATTAACAAG	TGAAAAAGTCATGGA	ATTTTGCTTGCTGCT
<i>SRK</i> ₆	GACAAATGATA	GTTTGT	TAGGTC AATCG	TGAAAAAGTCATGGA	ATTTTGCTTGTCTGCT
<i>NaStEP</i>	GGCAAATGATG	GTTTGC	TGAACCTGTGG	CAGAAGAGTCATC(T)GA	GTTTTATTTTATGTT

Figura 5. Secuencias conservadas (cajas) en las regiones promotoras de los genes que presentan expresión órgano-específica: *SLG*₁₃, *SLR*₁, *SRK*₂, *SRK*₆ y *NaStEP*. La caja I II y III en su conjunto confieren la expresión en el estigma/estilo, la caja IV parece ser un elemento silenciador de la expresión en polen y la caja V dirige la expresión al polen. En rojo de muestran las bases que difieren a las de la secuencia consenso del gen *SLG*₁₃.

Cabe señalar que todas las cajas se encuentran presentes en la presunta región promotora de *NaStEP* y la mayoría de las bases se conservan respecto a la secuencia consenso del gen *SLG*₁₃.

IV. JUSTIFICACIÓN

Los genes no ligados al *locus S* involucrados en la respuesta de autoincompatibilidad en Solanaceae se expresan específicamente en los órganos implicados (i. e. pistilo y polen). NaStEP, proteína esencial para la respuesta del rechazo del polen alelo *S* específico, se localiza en los estigmas de *N. alata*. De forma interesante, su probable secuencia promotora incluye cajas homólogas a las presentes en el de *SLG₁₃*, gen que se expresa órgano-específicamente en *Brassica olearaceae*, por lo que es necesario demostrar que esto mismo ocurre para el gen *NaStEP*. Esto además, contribuirá al conocimiento sobre los elementos de regulación en *cis* de la transcripción y abrirá la posibilidad de realizar un análisis más detallado sobre los mismos aportando información interesante en el ámbito de la regulación de la expresión génica en plantas, en este caso, específicamente sobre genes involucrados en la autoincompatibilidad.

V. HIPÓTESIS

Dado que el promotor de *NaStEP* posee elementos reguladores en *cis* implicados en la expresión tejido específica, se observará la presencia de las proteínas reporteras GFP y GUS exclusivamente en estigmas maduros de plantas transgénicas de *A. thaliana*.

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la secuencia nucleotídica río arriba del gen *NaStEP* es capaz de dirigir la expresión órgano-específica de GFP y de GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana*.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Obtener plantas transgénicas de *A. thaliana* que porten la construcción de *ppNaStEP* fusionada a GFP y a GUS en la generación T₁.
- ✓ Determinar la localización *in planta* de la proteína reportera GFP en estigmas maduros de *A. thaliana*.
- ✓ Determinar el patrón de expresión de la proteína reportera GUS en órganos florales de *A. thaliana*.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Vectores de clonación

Se eligió como vector de clonación al vector de entrada **pENTR/D-TOPO** de Invitrogen el cual permite clonar a los productos de PCR con extremos romos de manera direccional con una alta eficiencia; lo anterior se logra añadiendo cuatro bases (CACC) en el extremo 5' de la secuencia del cebador sentido como se observa en la Figura 6.

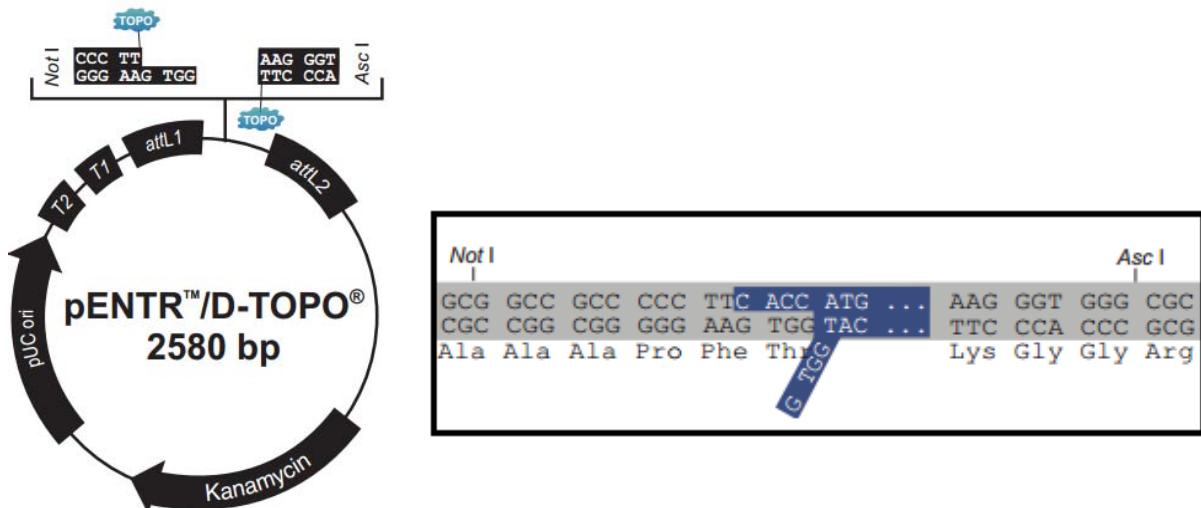


Figura 6. Mapa del vector **pENTR/D-TOPO** (Invitrogen). Se resalta en azul la zona donde se inserta de forma direccional el producto de PCR deseado.

Se utilizó el vector binario **pBGWFS7** (Figura 7) como vector de destino, tal que el promotor de *NaStEP* controle la expresión del gen reportero GFP (proteína verde fluorescente) y de la enzima β -glucuronidasa (GUS) en las plantas transformadas.

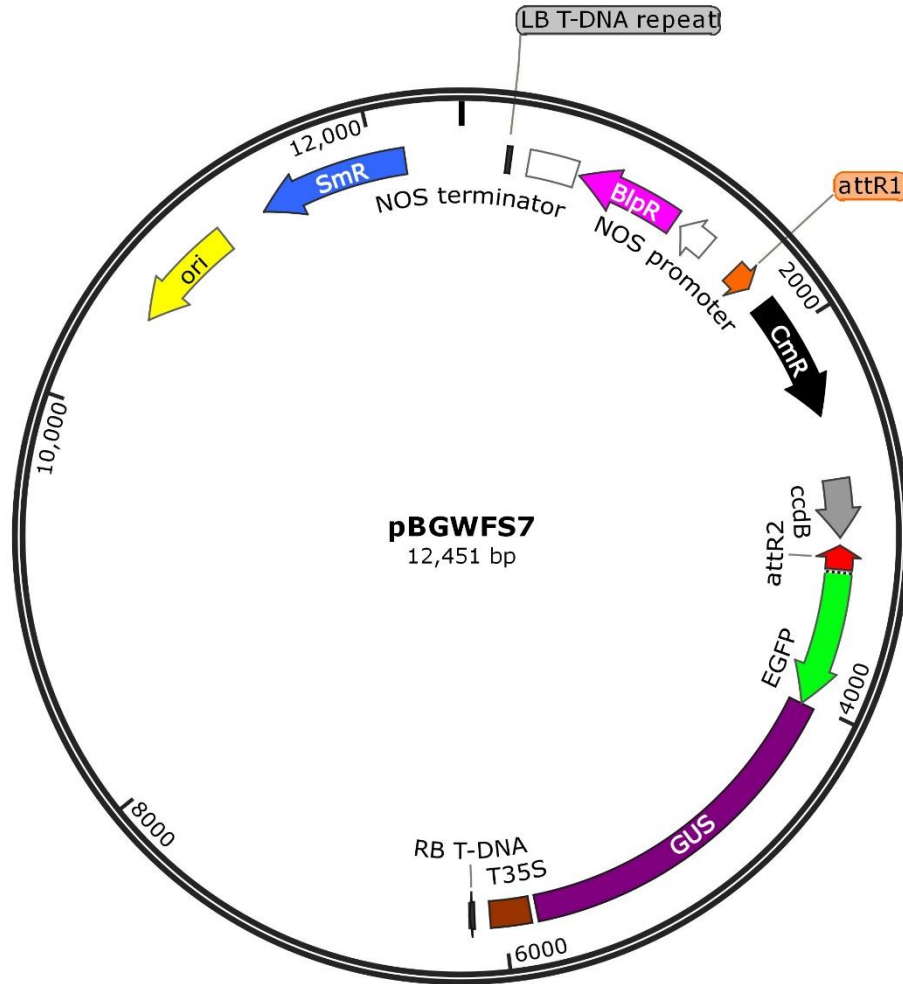


Figura 7. Mapa del vector binario *pBGWFS7*. En amarillo el origen de replicación del plásmido. En azul la secuencia que confiere resistencia a espectinomicina. En rosa la secuencia que confiere resistencia al herbicida BASTA (*fosfotricina*) y flanqueado por el promotor y el terminador NOS (*nopalina sintasa*) en blanco. En naranja los sitios de recombinación attR1 y attR2. En negro la secuencia que confiere resistencia a cloranfenicol. Se muestran los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del T-DNA y resalta en verde la secuencia de la proteína reportera verde fluorescente (GFP) y la β -glucuronidasa (GUS) en morado, seguida de la secuencia del terminador del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) en café. En gris se denota la secuencia que da origen a la toxina ccdB (“cassette de la muerte”), la cual afecta directamente a la DNA girasa.

b. Medios de Cultivo

El medio LB (bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L y agar 15 g/L para medio sólido) tanto en su forma sólida como líquida, fue utilizado para el crecimiento de las distintas bacterias. El medio SOC (bactotripton 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L, glucosa 0.2 M y MgCl₂ 0.1 M) fue utilizado durante la transformación de células electro-competentes de *Escherichia coli* DH5α y *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. El medio MS (medio basal Murashige y Skoog de Sigma-Aldrich M5519) se utilizó en una concentración de 2.2 g/L, junto con agar a 8 g/L para la selección de semillas transformantes de *A. thaliana* en cajas Petri de 150 mm de diámetro.

c. Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon en agua desionizada bidestilada y se esterilizaron por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore). Los antibióticos se prepararon en las siguientes concentraciones: kanamicina (Kan, 100 μg/mL) y espectinomicina (Spec, 100 μg/mL). La rifampicina (Rif), se preparó en una concentración de 100 μg/mL utilizando como disolvente DMSO (dimetil sulfóxido).

d. Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5α para la multiplicación del vector de entrada **pENTR** y la cepa DB3.1 para propagar el vector **pBGWFS7**. La cepa GV3101 de *A. tumefaciens* fue utilizada para la transformación de plantas de *A. thaliana*.

1. Crecimiento y mantenimiento de las cepas

E. coli se creció a 37°C con agitación constante a 250 rpm durante 24 h en medio LB líquido suplementado con el antibiótico apropiado a una concentración de 100 mg/μL. A partir de estos cultivos se tomaron inóculos con los que se prepararon “stocks” en LB y glicerol al 20 % (v/v) los cuales se almacenaron a -70°C. Las células electro-competentes de *E. coli* DH5α se prepararon según lo detallado en el Apéndice A.1.

La cepa GV3101 de *A. tumefaciens* se creció a 28°C en medio líquido con agitación constante a 200 rpm y en placas con LB suplementado con Rif (100 μg/mL) y Kan (100 μg/mL -vector de entrada- o Spec, 100 μg/mL -vector binario-) durante 48 h. El método de almacenamiento a -70°C fue similar al de *E.coli*. Las células electro-competentes de *A. tumefaciens* se prepararon según lo detallado en el Apéndice A.2.

e. Cultivo de *A. thaliana*

Se utilizaron plantas silvestres (WT) de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0).

1. Composición y preparación del sustrato

En una charola se mezclaron dos partes de sustrato comercial (peat moss y vermiculita) y una parte de agrolita. La mezcla se humedeció con agua de la llave minutos antes de ser utilizada.

2. Germinación

Las semillas de *A. thaliana* almacenadas a 4°C y en oscuridad se tomaron con la punta de una espátula y se esparcieron sobre la superficie de sustrato humedecido de una maceta pequeña de aproximadamente 100 mL de capacidad. Se taparon

con un domo transparente (esto permite mantener la humedad de la superficie del sustrato) y se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 22°C con un fotoperiodo de 18 h de luz/ 6 h de oscuridad. Se mantuvo siempre húmedo el sustrato. Después de la germinación y una vez formadas las hojas verdaderas se retiró el domo manteniendo las condiciones de crecimiento antes descritas.

3. Crecimiento

Las macetas y las charolas se lavaron con hipoclorito (NaClO) comercial y se enjuagaron con agua antes de utilizarlas. Las plántulas se trasplantaron en macetas individuales colocando de una a tres plántulas por cada maceta. La transferencia se llevó a cabo con ayuda de pinzas y una espátula. Se removió con sumo cuidado la tierra de la maceta que contiene a las plántulas, esto facilitó la manipulación de las plántulas. Las charolas con macetas se cubrieron con domos transparentes y se les suministró agua con una regadera de chorro lento y fino aproximadamente dos veces por semana.

Las plantas crecieron en invernadero a una temperatura de 22°C con un fotoperiodo de 18 h de luz/8 h de oscuridad. Al cabo de una semana aproximadamente se removieron los domos. Se continuó el procedimiento de riego entre dos y tres veces a la semana. Las plantas se regaron con solución de Hoagland (Apéndice A.3) cada semana para mejorar su crecimiento. Se cortaron las inflorescencias precoces; lo anterior permitió un mejor crecimiento vegetativo y el desarrollo posterior de inflorescencias secundarias.

f. Clonación del promotor de *NaStEP* en el vector de entrada *pENTR*

Partiendo de que la secuencia de la región promotora ya se encontraba previamente clonada y secuenciada en el vector *pGEM* (Promega) se procedió a la amplificación de la misma para su clonación ahora en el vector de entrada.

1. Cebadores

Los cebadores que se utilizaron (Tabla I) fueron diseñados tomando en cuenta la secuencia del promotor de *NaStEP*.

Tabla I. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región promotora del gen *NaStEP*. El cebador sentido contiene los cuatro nucleótidos (CACC) que permiten direccionar la construcción en la clonación efectuada en el vector de entrada **pENTR**

Nombre	Secuencia
Sentido : FPET32	5'- CACCTGGTCCTGACACTTACCAACACATG -3'
Antisentido : PR321REV	5'-GTTTACGCAAGGAGTGTGTTGCG-3'

2. Amplificación por PCR

Utilizando el par de cebadores de la Tabla I se amplificó la región del promotor utilizando las condiciones sugeridas por el fabricante de la DNA polimerasa de alta fidelidad (KAPA Bio) y por el protocolo de clonación en **pENTR** (Tablas II y III).

Tabla II. Mezcla de PCR para amplificar la región promotora de *NaStEP*

Reactivo	Volumen (μ L)
Amortiguador KAPA HiFi 5X	5.00
Mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's, 10 mM c/u)	0.75
Oligo FPET32 (10 μ M)	0.75
Oligo PR321REV (10 μ M)	0.75
DNA (20 ng/ μ L)	1.0
Polimerasa KAPA HiFi	0.5
Agua grado PCR	16.25
Volumen final	25.00

Tabla III. Condiciones de amplificación utilizadas en el termociclador T100 BioRad

Etapa	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	98°C	20 segundos	
Alineamiento	68°C	30 segundos	25
Extensión	72°C	60 segundos	
Extensión final	72°C	15 inutos	1

3. Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa a una concentración de 0.8% (m/v) utilizando amortiguador TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 1 mM pH 8) con bromuro de etidio (0.5 mg/mL). Las muestras se prepararon usando amortiguador de carga (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6, azul de bromofenol 0.03%, xileno cianol 0.03%, glicerol 60% y EDTA 60 mM). El gel se corrió por 45 minutos a un voltaje constante de 90 V. El gel fue observado y fotografiado mediante el uso del equipo foto-documentador ChemiDoc (BioRad).

Posteriormente se purificó la banda directamente del gel de agarosa siguiendo las indicaciones del kit de purificación de DNA Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) (Apéndice A.4).

4. Clonación y purificación del plásmido

La reacción de clonación **TOPO**, se efectuó mediante la mezcla del producto de PCR ya purificado y el vector **pENTR/D-TOPO** en una relación molar 1:1, a la cual se añadió solución salina provista por el kit y agua estéril para completar un volumen de reacción final de 6 µL. Posteriormente la reacción se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se procedió a transformar células electro-competentes de *E. coli* DH5α (Apéndice A.5) utilizando 2 µL de la reacción anterior.

La selección de las colonias transformantes se realizó mediante su crecimiento en medio sólido LB con Kan (100 µg/mL). Se purificó el DNA plasmídico con ayuda del kit de purificación de DNA Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) (Apéndice A.6). El plásmido obtenido fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000c y la concentración se ajustó a 100 ng/µL y a 20 ng/µL.

g. Evaluación de la construcción *pENTR:ppNaStEP*

1. Amplificación por PCR

Se realizó un PCR confirmativo con la DNA polimerasa de alta fidelidad KAPA HiFi utilizando las condiciones previamente descritas en las Tablas II y III.

2. Ensayo de restricción

El plásmido se sometió a una reacción de restricción (Tabla IV) empleando las enzimas NotI-HF y Ascl (New England Biolabs).

Tabla IV. Ensayo de doble restricción utilizando las enzimas NotI-HF y Ascl

Reactivo	Volumen (µL)
Amortiguador CutSmart 10X	2.50
NotI-HF (10 U/µL)	0.50
Ascl (20 U/µL)	0.25
<i>pENTR:ppNaStEP</i> (100 ng/µL)	3.00
Agua destilada	18.75
Volumen final	25.00

La digestión se llevó a cabo a una temperatura de 37°C durante 2 horas.

3. Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa a una concentración 0.8% (m/v) utilizando amortiguador TAE con bromuro de etidio (0.5 mg/mL). Las muestras se prepararon usando amortiguador de carga. El gel se corrió por 40 minutos a un voltaje constante de 92 V. Se observó y fotografió el gel con el equipo foto-documentador ChemiDoc.

h. Recombinación dirigida en el vector binario *pBGWFS7*

1. Reacción Gateway®

La reacción de recombinación Gateway® (Figura 8) entre el vector de entrada con la secuencia del promotor (*pENTR:ppNaStEP*) y el vector destino (*pBGWFS7*, este plásmido fue propagado y purificado de células *E. coli* DB3.1) se efectuó mezclando 1 µL del vector de entrada (150 ng), 1 µL vector destino (125 ng), 2 µL **LR Clonase II** (Invitrogen) y 6 µL de amortiguador TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) . Se incubó durante 60 min a 22°C y finalmente se agregó 1 µL de proteinasa K para detener la reacción, incubándose durante 15 min a 37°C.

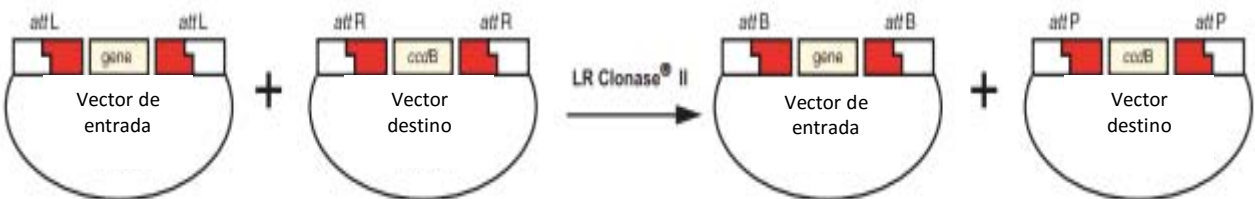


Figura 8. Reacción de recombinación LR mediada por la LR Clonase II. Los sitios de recombinación se muestran en rojo (attL, attR, attB y attP). ccdB es el denominado “cassette de la muerte”. La cepa de *E. coli* DB3.1 es resistente a la toxina ccdB y no así la cepa DH5α.

2. Transformación de *E. coli*

Se utilizó 1 μL de la reacción anterior para transformar células electro-competentes de *E. coli* DH5 α (Apéndice A.5). En esta ocasión la selección se realizó en placas con LB-agar con Spec 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se purificó el DNA plasmídico con ayuda del kit de purificación de DNA Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Apéndice A.6). El plásmido obtenido fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000c y la concentración fue ajustada nuevamente a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y a 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

i. Evaluación de la construcción *pBGWFS7:ppNaStEP* en *E. coli*

1. Amplificación por PCR

Se realizó un PCR confirmativo empleando la DNA polimerasa de alta fidelidad KAPA HiFi utilizando las condiciones anteriormente descritas en las Tablas II y III.

2. Ensayo de restricción

El plásmido se sometió a una reacción de restricción (Tabla V) empleando a las endonucleasas HindIII y NcoI (New England Biolabs).

Tabla V. Ensayo de doble restricción para confirmar la construcción *pBGWFS7:ppNaStEP* utilizando las enzimas HindIII y NcoI

Reactivo	Volumen (μL)
Amortiguador 3 10X	2.50
HindIII (10 U/ μL)	0.50
NcoI (20 U/ μL)	0.25
<i>pBGWFS7:ppNaStEP</i> (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$)	3.00
Agua destilada	18.75
Volumen final	25.00

La digestión se llevó a cabo a una temperatura de 37°C durante 2.5 horas.

3. Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa a una concentración 0.8% (m/v) utilizando amortiguador TAE con bromuro de etidio (0.5 mg/mL). Las muestras se prepararon usando amortiguador de carga. El gel se corrió por 35 minutos a un voltaje constante de 95 V. Se observó y fotografió el gel con el equipo foto-documentador ChemiDoc.

4. Transformación de *A. tumefaciens*

Se procedió a transformar células electro-competentes de *A. tumefaciens*.GV3103 (Apéndice A.7). La selección se llevó a cabo en placas que contenían LB-agar y los antibióticos para la selección, Rif 100 µg/mL, (resistencia aportada por la cepa de *A. tumefaciens*), y Spec 50 µg/mL, resistencia aportada por el vector binario utilizado para la transformación.

j. Evaluación de la construcción *pBGWFS7:ppNaStEP* en *A. tumefaciens*

Las colonias que resultaron resistentes a los dos antibióticos se crecieron en medio líquido LB con ambos antibióticos para extraer DNA plasmídico con ayuda del kit de purificación de DNA Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Apéndice A.6).

1. Amplificación por PCR

Se realizó un PCR confirmativo con la DNA polimerasa de alta fidelidad KAPA HiFi utilizando nuevamente las condiciones anteriormente descritas en las Tablas II y III.

2. Ensayo de restricción

Nuevamente se llevó a cabo la restricción del plásmido para corroborar que el tamaño del inserto se mantuviera. La secuencia promotora de *NaStEP* contiene un sitio de corte para la endonucleasa HindIII hacia el 3', por lo que se empleó a las endonucleasas HindIII y NcoI (New England Biolabs) en las condiciones descritas previamente en la Tabla V.

3. Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa a una concentración 0.8% (m/v) utilizando amortiguador TAE con bromuro de etidio (0.5 mg/mL). Las muestras se prepararon usando amortiguador de carga. El gel se corrió por 35 minutos a un voltaje constante de 95 V. Se observó y fotografió el gel con el equipo foto-documentador ChemiDoc.

k. Transformación estable de plantas adultas de *A. thaliana*

1. Preparación del cultivo de *A. tumefaciens*

Se utilizaron células de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción ***pBGWFS7:ppNaStEP***. Se tomó una colonia aislada y se inoculó en 10 mL de medio líquido LB que contenía Rif (100 µg/mL) y Spec (100 µg/mL) y se creció a 28°C por 24 horas con una agitación constante de 200 rpm. Posteriormente, se tomaron 5 mL del cultivo anterior y se vertió en un matraz de 2L que contenía 500 mL de medio líquido LB con Rif (100 µg/mL) y Spec (100 µg/mL). Nuevamente se creció el cultivo líquido a 28°C y 200 rpm durante toda la noche. Se centrifugaron las células a 5500 g por 20 minutos a una temperatura de 4°C y se decantó el sobrenadante en un frasco que contenía cloro. Luego las células se resuspendieron en una solución estéril de sacarosa 5% y se ajustaron a una DO₆₀₀ (Densidad óptica a 600 nm) de 0.8. Finalmente se añadió Silwet L-77 a una concentración de 0.05%. Este

surfactante disminuye la tensión superficial y permite que la solución con *A. tumefaciens* cubra en su totalidad la superficie de las flores.

2. Inmersión de las plantas de *A. thaliana* (Floral Dip)

La transformación se realizó sumergiendo las inflorescencias de las planta en el cultivo de *A. tumefaciens* durante 30 segundos. Posteriormente las plantas se cubrieron con plástico transparente (para mantener una humedad relativa alta) y se colocaron en la oscuridad por 24 horas. A continuación se removió el plástico y las plantas continuaron en las condiciones normales de crecimiento (22°C y fotoperiodo 18 h de luz/ 6 h de oscuridad) hasta que la mayoría de las silicuas se desarrollaron por completo y se secaron totalmente. Finalmente, se recolectaron las semillas y se almacenaron a una temperatura de 4°C.

I. Selección de transformantes de *A. thaliana*

Las semillas de las plantas sometidas al método de transformación descrito previamente (Floral Dip) se evaluaron para establecer el porcentaje de eficiencia de transformación obtenido. Se determinó el número de semillas aproximado utilizando la relación de 50 mg corresponde aproximadamente a 2500 semillas de *A. thaliana*.

1. Esterilización y estratificación

Se añadió 1 mL de isopropanol a las semillas contenidas en un tubo de micro centrifuga (1.5 mL de capacidad), transcurridos 60 segundos se decantó. Inmediatamente las semillas se lavaron con 1 mL de una solución que contiene NaClO al 20% (v/v) y Tween-20 0.05% (v/v). Se agitó el tubo con las semillas durante 5 min en un agitador eléctrico fijo. Luego se centrifugó durante 10 segundos en una minifuga y se retiró el sobrenadante. Finalmente se realizaron cinco lavados consecutivos con 1 mL de agua estéril, agitando y centrifugando cada vez. Se resuspendieron las semillas en 2.5 mL de una solución de agarosa al 0.1% y se

esparcieron en placas de MS-agar adicionado con BASTA (potente inhibidor de la glutamina sintetasa en plantas) a una concentración de 10 mg/L. Las placas se secaron en la campana de flujo laminar durante 20 minutos y se cubrieron con papel aluminio para permanecer en oscuridad a 4°C durante 48 h.

2. Germinación y crecimiento

La germinación se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Harrison et al., 2006 ilustrado en el siguiente esquema:



Aquellas plántulas que lograron desarrollar hojas verdaderas en presencia del herbicida BASTA se trasplantaron en macetas individuales con sustrato y se crecieron en el invernadero a 22°C con fotoperiodo de 18 h de luz/ 6 h de oscuridad por 7 días.

3. Extracción de DNA genómico y confirmación de la presencia de la construcción *pBGWFS7:ppNaStEP*

Para corroborar el carácter transgénico de las plantas resistentes al agente de selección, se realizó una extracción de DNA genómico de cada una de las líneas utilizando el kit de purificación Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) siguiendo las indicaciones del fabricante.

i. Amplificación por PCR

Se realizó un PCR confirmativo utilizando como templado al DNA genómico purificado. Se utilizó nuevamente a la DNA polimerasa de alta fidelidad KAPA HiFi.

La reacción se llevó a cabo en las condiciones anteriormente descritas en las Tablas II y III.

ii. Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa a una concentración 0.8% (m/v) utilizando amortiguador TAE con bromuro de etidio (0.5 mg/mL). Las muestras se prepararon usando amortiguador de carga. El gel se corrió por 45 minutos a un voltaje constante de 90 V. Se observó y fotografió el gel con el equipo foto-documentador ChemiDoc.

m. Análisis de estigmas maduros de *A. thaliana* por microscopia confocal.

Tanto las plantas control (WT) como las que portan la construcción ***ppNaStEP:GFP:GUS*** se crecieron con un fotoperiodo de 18 h de luz/ 6 h de oscuridad hasta que lograron desarrollar numerosas inflorescencias (aproximadamente 3 semanas).

Luego se llevó a cabo la emasculación; los estigmas posteriormente fueron removidos y colocados en posición vertical en agar al 0.5%, permaneciendo toda la noche a 22°C en oscuridad. Se seleccionaron aquellos estigmas que presentaban un mayor desarrollo de las papilas (se verificó con ayuda del microscopio estereoscópico) y se procedió a la preparación de las muestras (sin necesidad de fijar el tejido vegetal) para su posterior observación en el microscopio confocal de fluorescencia (Olympus FV1000).

n. Tinción histoquímica de la actividad de GUS

Se colectaron flores (posterior a la antesis) tanto de las plantas control (WT) como de las que portan la construcción ***ppNaStEP:GFP:GUS*** (crecidas a 22°C con un fotoperiodo de 18 h de luz/ 6 h de oscuridad) y se colocaron en tubos tipo eppendorf de 1.5 mL que contenían acetona fría al 90%. Se aplicó vacío durante 10 minutos a

temperatura ambiente, luego se dejaron reposar durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se removió la acetona de las muestras y se añadió el amortiguador de tinción (amortiguador de fosfatos 50 mM pH=7.0, Triton X-100 0.2 %, ferrocianuro de potasio 0.5 mM, ferricianuro de potasio 0.5 mM y X-Gluc 1 mM (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-ácido glucurónico) manteniendo siempre en hielo. Posteriormente, se aplicó nuevamente vacío (las muestras se mantuvieron en hielo) por 20 minutos. Se liberó lentamente el vacío verificando que las flores se hundieran en el amortiguador.

Los tubos con las muestras se incubaron a 37°C durante 36 horas en oscuridad. Luego se removió el amortiguador de tinción de todas las muestras y se sustituyó por una solución de etanol al 20% donde permanecieron por 30 minutos; posteriormente, se removió esta solución y se utilizó la solución de 35% por otros 30 minutos. Los pasos anteriores se repitieron con las soluciones de etanol al 50%, 70% 80% y 90%. Finalmente las flores fueron llevadas a una solución de PBS 1X y glicerol 50% donde se mantuvieron hasta ser vistas en el microscopio óptico.

IX. RESULTADOS

a. Clonación del promotor de *NaStEP* en *pENTR*

La clonación de la secuencia río arriba de la región codificante de *NaStEP* se realizó utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla I. Mediante el uso del software *Serial Cloner* se utilizó la secuencia nucleotídica para obtener un esquema gráfico de la construcción en el vector *pENTR/D-TOPO* como se muestra en la Figura 9.

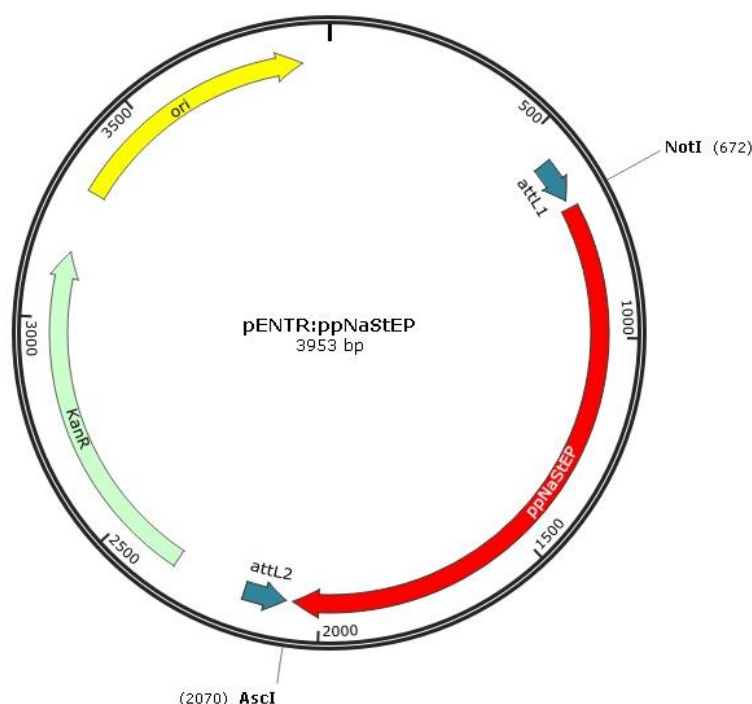


Figura 9. Mapa de la construcción *pENTR:ppNaStEP*. En amarillo se indica el origen de replicación del plásmido. En verde la secuencia que confiere resistencia a kanamicina. En azul los sitios de recombinación Gateway® (*attL1* y *attL2*). Se resalta en rojo el promotor de *NaStEP* (*ppNaStEP*) de 1373 pb. Se muestran los sitios de corte de las enzimas *NotI* y *AscI*.

Con la finalidad de verificar la correcta clonación se realizaron diferentes ensayos que comprobaron la presencia de la construcción en dicho vector.

Después de transformar bacterias de *E. coli* DH5 α mediante electroporación, efectuar la selección de transformantes y la posterior purificación del plásmido, se realizó tanto un ensayo de PCR como de restricción simple y doble.

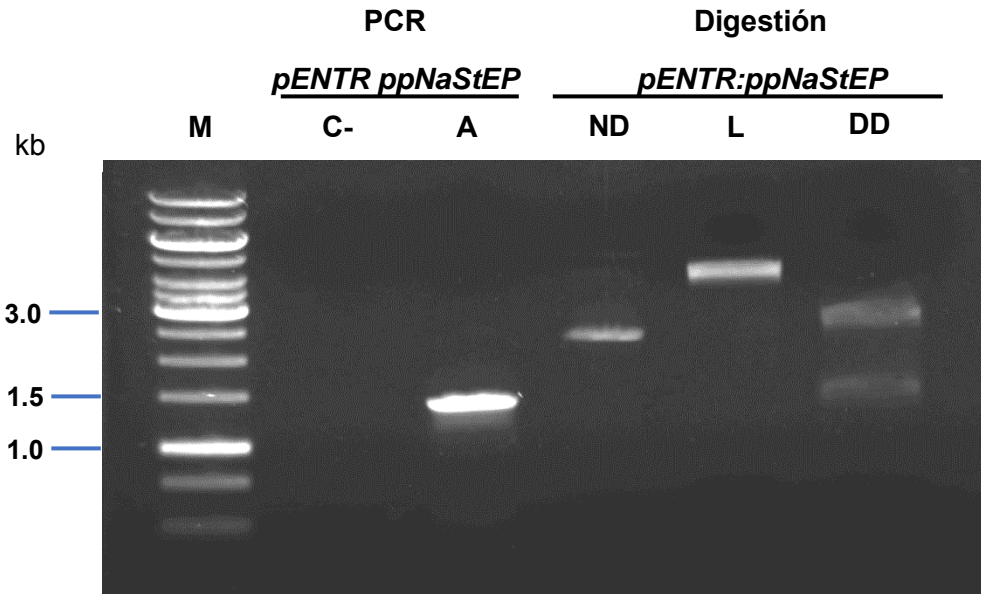


Figura 10. Ensayo de PCR y restricción de la construcción *pENTR:ppNaStEP*. Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) donde se muestra la amplificación de *ppNaStEP* (A), la banda presenta una longitud aproximada de 1400 pb; se utilizó agua como control negativo de la reacción (C-). También se observa el vector no digerido (ND), la linearización (L) del vector con la enzima de restricción *Ascl* (4000 pb aprox.) y la doble digestión (DD) efectuada con las enzimas *Ascl* y *NotI-HF* (1500 y 2500 pb aprox.). (M) Marcador de peso molecular de 1 kb. (Thermo Scientific).

El resultado del PCR se muestra en la Figura 10, la banda resultado de la amplificación se encuentra por debajo de las 1500 pb, lo cual concuerda con el tamaño esperado del inserto de 1373 pb.

Se seleccionaron dos endonucleasas de restricción para obtener fragmentos de DNA de tamaño específico. Las enzimas que se emplearon fueron *NotI-HF* y *Ascl*. La construcción *pENTR:ppNaStEP* (3953 pb) contiene únicamente un sitio de reconocimiento para las enzimas antes mencionadas (Figura 9). Después de llevar a cabo la linearización del vector con la enzima *Ascl*, se realizó una electroforesis para separar las bandas de DNA e identificar los fragmentos, de acuerdo con el patrón de restricción establecido con el mapa del plásmido *pENTR:ppNaStEP*. Las

dos bandas generadas presentaron pesos moleculares de 2500 pb y 1500 pb aproximadamente.

b. Recombinación dirigida en el vector binario *pBGWFS7*

Una vez confirmada la presencia de la construcción en el vector de entrada, se procedió a realizar la recombinación dirigida en el vector binario *pBGWFS7* (Figura 11).

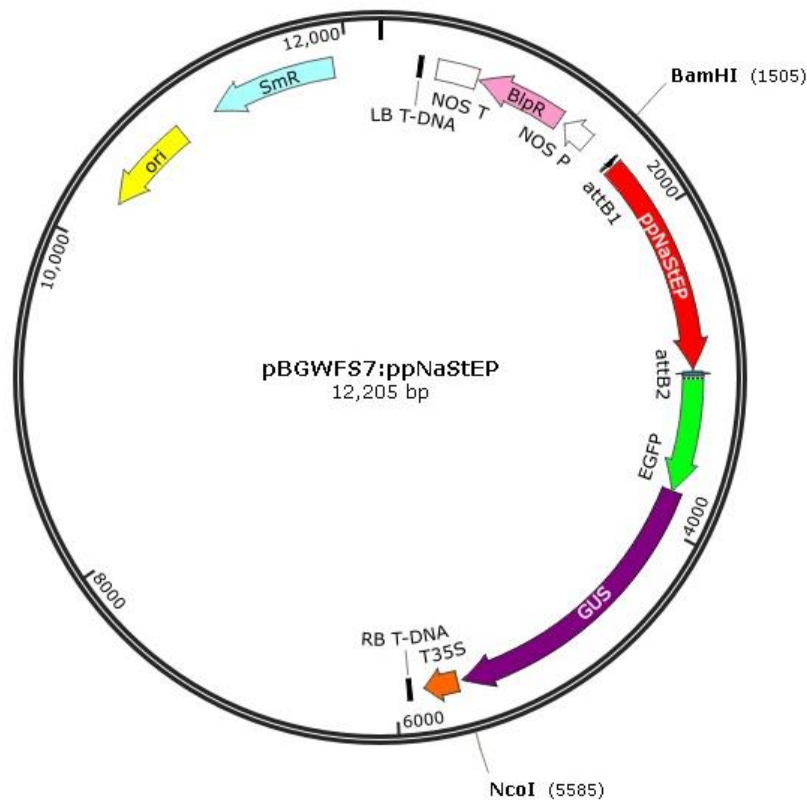


Figura 11. Mapa de la construcción *pBGWFS7:ppNaStEP*. En amarillo el origen de replicación del plásmido. En azul la secuencia que confiere resistencia a espectinomicina. En rosa la secuencia que confiere resistencia al herbicida BASTA (*fosfinotricina*) y flanqueado por el promotor y el terminador NOS (*nopalina sintasa*) en blanco. Se muestran los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del T-DNA y resalta en rojo el posible promotor de *NaStEP* (*ppNaStEP*), así como la secuencia de la proteína reportera verde fluorescente (GFP) y la β -glucuronidasa (GUS), seguida de la secuencia del terminador del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) en naranja. Se señalan los sitios de corte de las enzimas HindIII y NcoI.

Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α con la construcción ***pBGWFS7:ppNaStEP*** mediante electroporación. La finalidad de clonar en este vector binario fue para obtener la región promotora de *NaStEP* la fusionada a GFP. El paso siguiente consistió en realizar la selección de transformantes en medio LB adicionado con espectinomicina, para posteriormente recuperar colonias aisladas y crecerlas en medio LB líquido adicionado con el antibiótico ya señalado. La posterior purificación del plásmido fue seguida por un ensayo de PCR y por un análisis de restricción con endonucleasas.

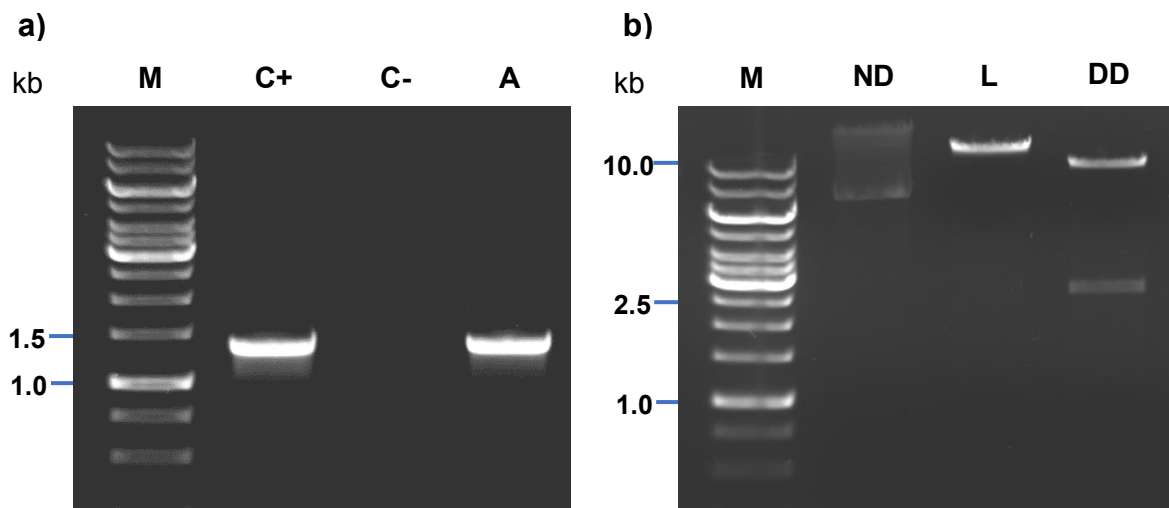


Figura 12. Ensayo de PCR y restricción de la construcción *pBGWFS7:ppNaStEP* a partir de plásmido purificado de *E. coli*. (a) Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) donde se muestra la amplificación de *ppNaStEP* (A), la banda presentó un peso de 1373 pb; se utilizó agua como control negativo de la reacción (C-) y el plásmido con la construcción *pENTR:ppNaStEP* como control positivo (C+). (b) Digestión del vector donde se observan los topoisómeros del vector sin digerir (ND), el vector linearizado (L) con la enzima de restricción BamHI (por encima de 10 kb.) y la doble restricción (DD) efectuada por las enzimas BamHI y NcoI (4 kb y 8 kb aprox.). (M) Marcador de peso molecular de 1 kb.

En la Figura 12a se puede observar la banda correspondiente a la amplificación del DNA de *ppNaStEP*, que tiene un peso molecular por debajo del marcador de 1500 pb. Por otro lado, en la Figura 12b se muestra la digestión del vector ***pBGWFS7:ppNaStEP***.

En esta ocasión se seleccionaron dos endonucleasas de restricción para obtener también fragmentos de DNA de tamaño específico. Las enzimas utilizadas fueron BamHI y NcoI. La construcción ***pBGWFS7:ppNaStEP*** (12,205 pb) contuvo únicamente un sitio de reconocimiento para cada una de las enzimas ya mencionadas (Figura 11).

En la electroforesis (Figura 12b) se separaron las bandas producto de la linearización de la construcción ***pBGWFS7:ppNaStEP*** con la enzima BamHI y la restricción doble empleando BamHI y NcoI. Las dos bandas generadas presentaron pesos moleculares de 8000 pb y 4000 pb aproximadamente.

A partir de este momento a la construcción ***pBGWFS7:ppNaStEP*** se le referirá como ***ppNaStEP:GFP:GUS*** para fines prácticos.

Una vez confirmada la fusión ***ppNaStEP:GFP:GUS*** se transformaron finalmente a las células de *A. tumefaciens* nuevamente mediante electroporación. De igual manera se hizo la selección de transformantes en medio LB adicionado esta vez con espectinomicina y rifampicina, para posteriormente seleccionar colonias aisladas y crecerlas en medio LB líquido adicionado con los antibióticos ya mencionados. De nuevo el plásmido purificado se analizó mediante ensayos de restricción y PCR.

En la Figura 13a se denota la banda correspondiente a la amplificación del DNA de *ppNaStEP* con un peso molecular por debajo del marcador de 1500 pb. Por otro lado, en la Figura 13b se puede observar la digestión simple y doble de ***ppNaStEP:GFP:GUS*** obteniendo dos bandas de alrededor de 9000 pb y 3000 pb .

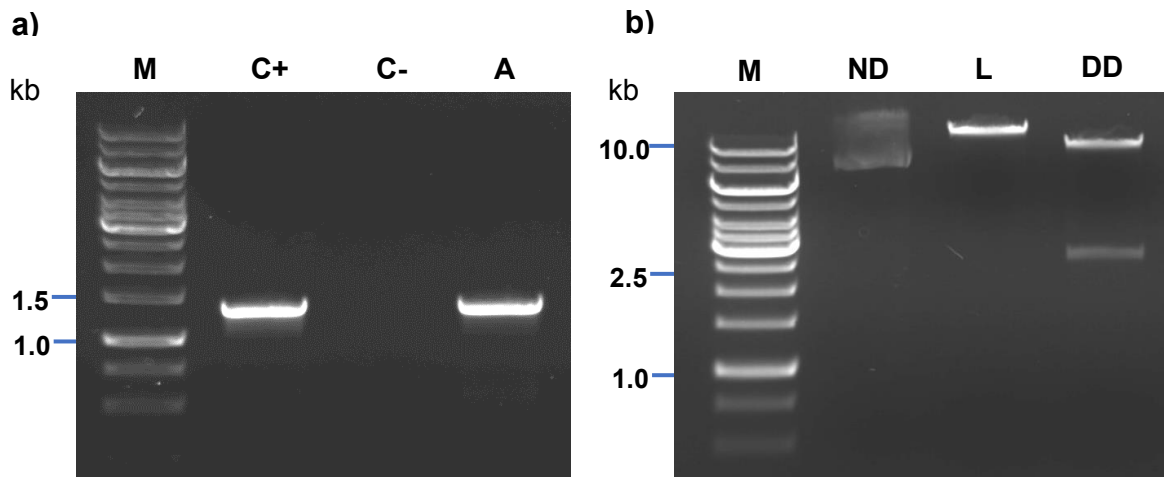
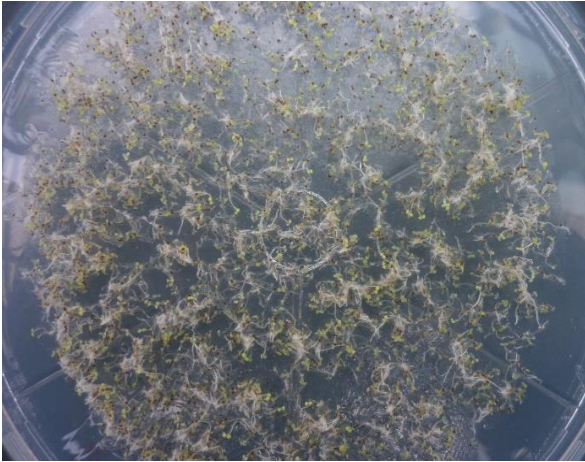


Figura 13. Ensayo de PCR y restricción de la construcción *ppNaStEP:GFP:GUS* a partir de plásmido purificado de *A. tumefaciens*. (a) Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) donde se muestra la amplificación de *ppNaStEP* (A), la banda presenta un peso de 1373 pb; se utilizó agua como control negativo de la reacción (C-) y el plásmido con la construcción *ppNaStEP:GFP:GUS* (purificado de *E. coli*) como control positivo (C+). (b) Digestión del vector donde se observan los topoisómeros del vector sin digerir (ND), el vector linearizado (L) con la enzima de restricción BamHI (por encima de 10 kb) y la doble restricción (DD) efectuada por las enzimas BamHI y NcoI (4 kb y 8 kb aproximadamente). (M) Marcador de peso molecular de 1 kb.

c. Selección de transformantes de *A. thaliana*

Una vez confirmada la construcción *ppNaStEP:GFP:GUS* en *A. tumefaciens* se realizó la transformación de plantas de *A. thaliana* mediante el método del “*Floral Dip*”. Con esta metodología se buscó aprovechar la capacidad de esta bacteria para poder insertar una parte de su material genético en el genoma de la planta y de la capacidad de esta planta de permitir que *A. tumefaciens* colonice el interior de los ovarios. Tanto las semillas de las plantas transformadas como las semillas WT fueron crecidas en medio MS con BASTA (10 mg/L) como agente de selección.

a)



b)

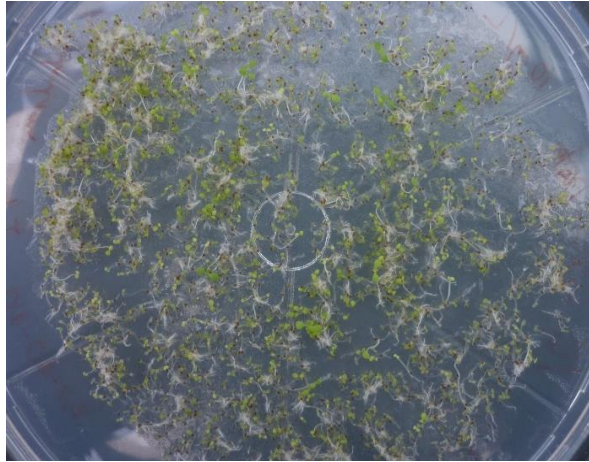


Figura 14. Selección de plántulas transformantes de *A. thaliana* en medio MS sólido con BASTA. a) Plántulas WT que no presentaron resistencia al herbicida. b) Plántulas T₁ producto de la transformación con *A. tumefaciens*, algunas de ellas lograron desarrollar hojas verdaderas y mantener su coloración verde.

En la Figura 14a se observa que las plantas control (WT) no lograron desarrollar hojas verdaderas y los cotiledones presentaron una coloración amarillo pálido. Por el contrario, en la Figura 14b se lograron distinguir algunas plántulas resistentes al herbicida que desarrollaron hojas verdaderas y que presentaron una tonalidad verde oscuro.



Figura 15. Plántulas transformantes de *A. thaliana* en medio MS sólido con herbicida (BASTA). Acercamiento a la placa donde se señalan en rojo aquellas que presentan resistencia al herbicida.

Un acercamiento (Figura 15) nos permite distinguir mejor aquellas plántulas con resistencia y que muy posiblemente portan la construcción ***ppNaStEP:GFP:GUS*** completa.

Posteriormente, se trasplantaron todas aquellas plántulas que presentaban hojas verdaderas en macetas individuales para continuar con su crecimiento a 22°C con un fotoperiodo de 18 h de luz/ 6 h de oscuridad.

d. Confirmación de la presencia de la construcción ***ppNaStEP:GFP:GUS*** en plantas de *A. thaliana* transgénicas

Para asegurar la selección de aquellas transformantes que portan la construcción, se procedió a la extracción de DNA total para posteriormente amplificar mediante PCR la secuencia del promotor de *NaStEP*.

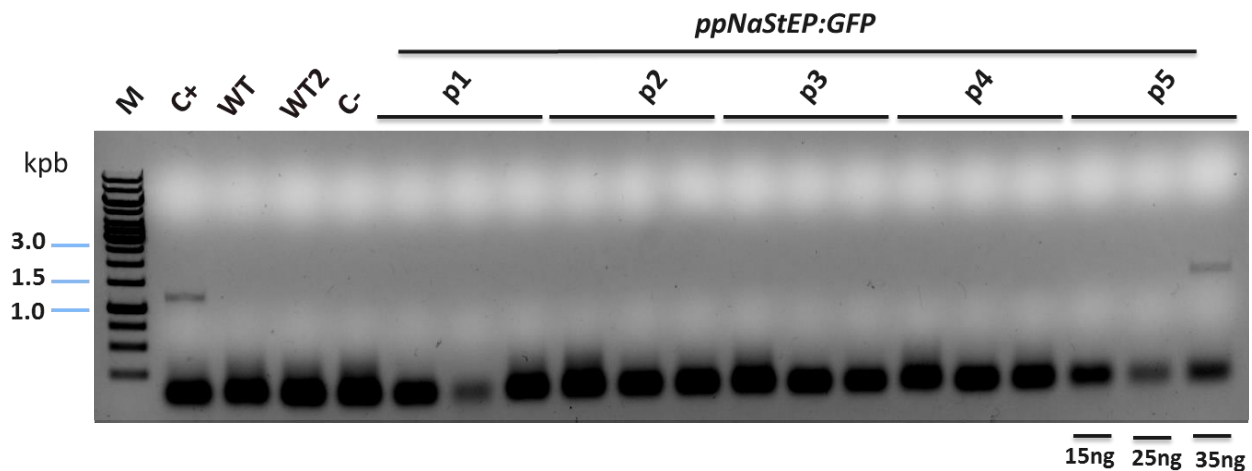


Figura 16. Reacción de PCR para amplificar la secuencia del promotor de *NaStEP* utilizando como molde DNA total de las plantas que presentaron resistencia a BASTA. La construcción *ppNaStEP:GFP:GUS* fue utilizada como control positivo (C+) de la reacción. Como control negativo se empleó DNA de dos diferentes plantas WT (WT y WT2) así como agua (C-). Se observa el amplicón únicamente cuando se utilizaron 35 ng de DNA como molde. (M) Marcador de peso molecular de 1 kb.

En la Figura 16 se muestra el resultado de una electroforesis en gel de agarosa de la reacción de PCR en 5 líneas candidatas a portar el transgen. Se utilizaron diferentes cantidades de DNA y se utilizaron como control positivo el plásmido **pBGWFS7:ppNaStEP** purificado de la colonia de *A. tumefaciens* empleado en el “Floral Dip” (C+) y como controles negativos agua (C-) y dos líneas de *A. thaliana* WT (WT,WT2). Únicamente se observó el amplicón de la planta 5 (p5) cuando se utilizaron como molde 35 ng de DNA.

Repitiendo este experimento con todas las posibles transformantes, identificamos al menos 3 líneas que portan la construcción **ppNaStEP:GFP:GUS**.

e. Expresión del promotor de *NaStEP* en estigmas maduros de *A. thaliana*

1. Expresión de GFP

Para verificar si las plantas transgénicas que portan la construcción del promotor de *NaStEP* eran capaces de dirigir la expresión de la proteína reportera GFP, se realizaron observaciones al microscopio de fluorescencia de estigmas de *A. thaliana* WT así como de las plantas transgénicas. Las plantas fueron emasculadas (remoción de anteras cuando éstas no han abierto) previamente, para evitar señales de la calosa del grano de polen. Como se puede ver en la Figura 17, los estigmas de las líneas transformadas registran fluorescencia de GFP, la cual se restringió a la zona del estigma de las líneas que portan y expresan la construcción **ppNaStEP:GFP:GUS**, lo cual indica que la secuencia río arriba de la región codificante de *NaStEP* contiene los elementos suficientes para dirigir la expresión específica de este gen en las células estigmáticas.

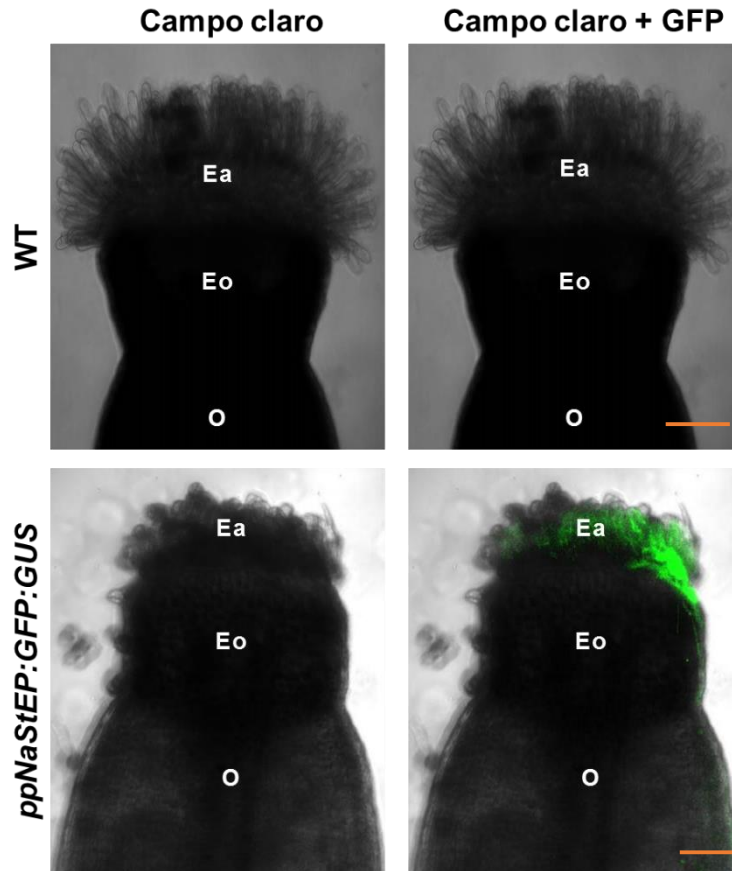


Figura 17. Expresión de GFP en las células papilares del estigma dirigida por el promotor de *NaStEP* en estigmas de *A. thaliana*. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia en la que se observan (parte superior) estigmas maduros de *A. thaliana* del tipo silvestre (WT) y estigmas de plantas transgénicas que portan la construcción *ppNaStEP:GFP:GUS*. En verde se observa la fluorescencia de GFP. Ea: Estigma; Eo: Estilo y O: Ovario. Barra = 100 μ m.

2. Actividad de GUS

En aras de corroborar que el promotor de *NaStEP* dirige de manera tejida específica la expresión de la proteína reportera de la beta-glucuronidasa (GUS) únicamente en el estigma de líneas transgénicas (T_1) se procedió a realizar el ensayo histoquímico basado en un protocolo reportado para plantas de *A. thaliana* transformadas con el vector binario *pBGWFS7* (Sessions et al., 1999). Se realizaron observaciones al microscopio óptico de flores de *A. thaliana* blanqueadas (tratamiento para remover

la clorofila) WT así como de las plantas que portan la construcción ***ppNaStEP:GFP:GUS***.

En la Figura 18 se observa claramente la presencia abundante de un precipitado azul índigo como resultado de la actividad de GUS sólo en el estigma.

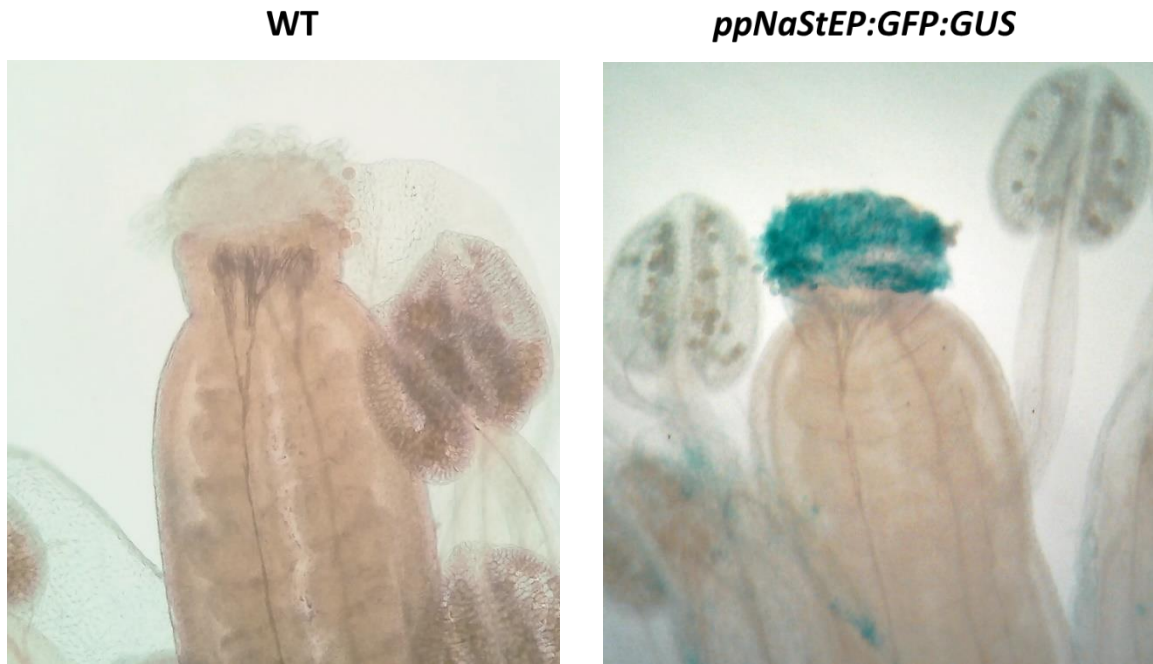


Figura 18. Ensayo histoquímico de la actividad de GUS dirigida por el promotor de *NaStEP* en *A. thaliana*. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (10X) donde se observan estigmas maduros y anteras de *A. thaliana* del tipo silvestre (WT) y de plantas transgénicas que portan la construcción ***ppNaStEP:GFP:GUS***. La actividad de GUS se observa únicamente en el estigma.

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

a. Secuencia promotora de *NaStEP*

Previamente nuestro grupo de trabajo se dio a la tarea de clonar la secuencia (de aproximadamente 1400 pb) río arriba del extremo 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *NaStEP* mediante la metodología de “*Genome Walker*”. Lo anterior se derivó de un análisis bio-informático con ayuda de la base de datos PLANT CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) y el software Softberry TSSP (<http://linux1.softberry.com>) en el cual se determinó la presencia de una caja TATA en la región -34 del supuesto sitio de inicio de la transcripción, mostrando en su secuencia una alta identidad con la caja TATA de un promotor de *N. tabacum*.

También fue posible identificar elementos reguladores en *cis* que corresponden a elementos de respuesta a la luz, elementos de respuesta al ácido salicílico y al ácido abscísico, elementos de respuesta al estrés por sequía, y notablemente un elemento de regulación negativa de la expresión en el polen (Soto, 2011).

Se sabe que el gen de la glicoproteína del Locus *S* (*SLG₁₃*), el cual está implicado en la respuesta de AI en *Brassica*, se expresa únicamente en los órganos reproductivos de la flor (las anteras y el pistilo). En el trabajo desarrollado por Dzelzkalns et al., 1993, se lograron obtener los elementos mínimos de expresión en el promotor de este gen mediante la transformación de *N. tabacum* con versiones truncadas del promotor fusionadas al gen reportero *GUS*, de manera que se demostró que existen regiones o cajas que de manera independiente dirigen la expresión específica tanto en el pistilo como en el polen. La región mínima necesaria que otorga especificidad en la expresión en estigma (ubicada entre -339 y -143) presenta una longitud de 196 pb, mientras que dos sectores distintos, pero que presentan la misma función, acotan la expresión en el polen (-415 a -291 y -117 a

+8). Por otro lado, cabe resaltar al posible elemento silenciador en *cis* (ubicado en -117) que actúa regulando negativamente la expresión en el polen.

Para profundizar en esa investigación se alinearon tres secuencias promotoras más a *SLG₁₃*, dos correspondientes a distintos alelos de *SLG₁₃* (*SLG₂* y *SLG₈*) y la tercera correspondiente a la región promotora del gen *SLR₁* y se elucidaron cinco regiones de secuencias altamente conservadas (Figura 5). Las cajas I, II y III, se encuentran situadas dentro de la secuencia de 196 pb del dominio que confiere especificidad de expresión en estigma y estilo. La caja V se encuentra dispuesta dentro del dominio -117, por lo cual sugieren que este elemento podría desempeñar un papel en la dirección de la expresión polen-específica. De manera notable, la caja IV se ubica en la región -117, es decir, en el supuesto elemento regulador negativo en *cis*.

Tanto *NaStEP* como los genes *SLG₁₃*, *SLR₁*, *SRK₂*, y *SRK₆* comparten un patrón similar de expresión órgano-específica y presentan secuencias nucleotídicas conservadas en sus regiones reguladoras que coinciden con las cinco cajas identificados previamente en los promotores de *SLG* y *SLR₁* (Soto, 2011) de tal suerte que estas secuencias corresponden posiblemente a elementos reguladores en *cis* involucrados en la expresión órgano-específica.

b. NaStEP está involucrado en el sistema de autoincompatibilidad

NaStEP es una proteína que pertenece a la familia de inhibidores de proteasa tipo Kunitz. El gen se expresa de manera abundante y específicamente en estigmas (la cantidad de mRNA aumenta hacia la madurez) de *N. alata*. Su transcrito no es detectado en especies AC como *N. plumbaginifolia*, *N. longiflora* y *N. tabacum* (Busot et al., 2008). Ensayos de Western-blot y análisis inmuno-histoquímicos y de microscopía confocal, confirmaron que la expresión se restringe al estigma de las especies AI estudiadas (Busot et al., 2008).

También se demostró que la supresión de la expresión de *NaStEP* en plantas transgénicas de *Nicotiana spp* (RNAi) anula la capacidad de la planta de rechazar su propio polen, volviéndose AC (Jiménez-Durán et al., 2013).

c. El promotor de *NaStEP* conduce la expresión estigma-específica *in vivo* de GFP en *A. thaliana*

Con el fin de determinar si los elementos reguladores en *cis* (presentes en la región de 1400 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción) previsualizados *in silico* dirigen la expresión órgano-específica de *NaStEP*, se decidió probar su funcionalidad en un sistema heterólogo como *A. thaliana*, planta modelo utilizada en biología molecular por su ciclo de vida corto (6 a 8 semanas) y su alta eficiencia de transformación mediada por *A. tumefaciens*.

Las plantas que portan el transgen que contiene la secuencia del promotor de *NaStEP* fusionado a GFP (***ppNaStEP:GFP:GUS***) mostraron resistencia al herbicida BASTA y lograron desarrollar cotiledones sanos y verdes, a diferencia del control negativo (plantas silvestres) donde se observaron los cotiledones pequeños y cloróticos.

En la Figura 17 es posible observar que la fluorescencia únicamente se restringe a la región estigmática de pistilos maduros. Cabe señalar que aunque las muestras contenían granos de polen con autofluorescencia en la cubierta externa (exina) dada por el efecto de compuestos fenólicos y carotenoides (Roshchina, 2003), estos no presentaron la coloración verde tanto en el control negativo (planta silvestre) como en la transformante. La expresión tejido específica de GUS en estigmas de *A. thaliana* (y no en polen) se observa claramente en la Figura 18.

Sin embargo, la presencia de GFP restringida a las papilas estigmáticas, sólo fue posible observarla en dos de las tres transformantes obtenidas previamente.

Resulta relevante mencionar que las líneas analizadas son las correspondientes a la generación T₁, por lo que en todos los casos se presenta hemicigosis (la construcción ***ppNaStEP:GFP:GUS*** está presente generalmente en el cromosoma materno del huésped) y posiblemente la cantidad de proteína reportera sintetizada no logró alcanzar concentraciones que permitieran su visualización en el estigma. Por otro lado, se sabe que la transformación de plantas no siempre resulta en la expresión eficiente del transgen, ya que el T-DNA también podría integrarse en regiones transcripcionalmente activas o en su defecto en regiones transcripcionalmente inactivas (cromatina cerrada) del genoma de la planta (Koncz et al., 1989).

Cabe mencionar que el silenciamiento de los transgenes es también a menudo "postranscripcional"; es decir, el transgen se transcribe, pero el RNA resultante es inestable (Meins, 2000). Tal silenciamiento génico postranscripcional se asocia frecuentemente con múltiples copias del transgen dentro de una célula, aunque la transformación mediada por *A. tumefaciens* por lo general resulta en un menor número de copias de los transgenes integrados (en comparación con otras técnicas de transformación como la biobalística). Es común encontrar copias en tándem de pocos T-DNA's integrados en un único *locus* (Jorgensen et al., 1987).

Por estas razones es importante determinar el número de inserciones de la construcción ***ppNaStEP:GFP:GUS*** en el genoma de las transformantes en cuestión.

El aislamiento de plantas transgénicas homocigóticas que tienen una sola copia del gen transformado (en eventos de transformación independientes) es crucial para llevar a cabo análisis y experimentos posteriores.

El genotipo de las plantas transgénicas se estima generalmente por un ensayo de segregación usando a las transformantes T₁, las semillas (T₂) obtenidas se someten a selección en medio con herbicida BASTA y se conservan únicamente aquellas

líneas que presenten una segregación 3:1 (donde el 75% son resistentes a BASTA y 25% no logra desarrollar hojas verdaderas). Después de la autofecundación y obtención de la progenie (T₃) nuevamente se verifica la segregación; en este caso aquellas líneas que presenten el 100% de resistencia al agente de selección se considerarían homocigas para ***ppNaStEP:GFP:GUS***.

d. La secuencia nucleotídica de *NaStEP* no se encuentra exclusivamente en *N. alata*

Es importante señalar que las especies AC como *N. plumbaginifolia*, *N. longiflora* y *N. tabacum* muy probablemente poseen un gen ortólogo a *NaStEP*, debido a que muestran una hibridación clara con la sonda de DNA de *NaStEP* en ensayos de Southern blot (Busot et al., 2008).

Como ya se mencionó anteriormente, el transcrito de *NaStEP* tampoco es detectado en especies de *Nicotiana* AC, lo que podría explicarse en parte porque el gen pudo haber acumulado mutaciones en el extremo 3' UTR (involucrado en la regulación la expresión génica en el nivel post-transcripcional) afectando así la estabilidad del mRNA; se sabe que alteraciones en el plegamiento de la estructura secundaria del RNA mensajero en esta región ocasionada por mutaciones, podría afectar su estabilidad (Barrett et al., 2012).

Otra posible explicación de la ausencia del transcrito de *NaStEP* en especies AC, podría ser la presencia de mutaciones en el promotor que eviten la unión de factores de transcripción que faciliten el acceso de la RNA polimerasa II. Finalmente, no se puede descartar que la regulación esté ocurriendo a nivel epigenético. Una de las modificaciones epigenéticas mas estudiada es la metilación del DNA (adición de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina). Se ha reportado que la hipermetilación de la secuencia promotora conduce al silenciamiento del gen (Fojtova et al., 2003). También es necesario considerar las modificaciones post-traduccionales en las histonas que pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la transcripción.

Las histonas pueden ser modificadas en sus regiones N-terminal a través de la adición de grupos funcionales que incluyen metilo, acetilo, y fosforilo (entre otros). La adición de estas marcas epigenéticas a las histonas conducen a la activación o silenciamiento de la transcripción como resultado ya sea del relajamiento o del aumento en el grado de compactación de la cromatina.

El análisis de las secuencias promotoras de estos genes ortólogos podría brindarnos un panorama más amplio acerca de la regulación de este gen clave en el sistema de autoincompatibilidad en *Nicotiana*, ya que la expresión órgano-específica es el resultado de un efecto sinérgico entre la combinatoria de regiones reguladoras positivas y negativas con factores de transcripción específicos de tejido (Omidvar et al., 2010), así como del grado de compactación de la cromatina y del estado de metilación de la secuencia nucleotídica.

Resultaría de esta manera interesante también explorar las regiones promotoras de otros genes posiblemente implicados en la respuesta del rechazo del polen, como es el caso de *NaSiPP* (*N. alata* Self-incompatibility Pollen Protein), el cual codifica para una proteína que se expresa de manera exclusiva en etapas maduras del polen en especies AI de *Nicotiana*.

XI. CONCLUSIONES

- ✓ Se clonó el promotor de *NaStEP* en el vector ***pENTR*** y posteriormente se realizó la recombinación dirigida para obtener la construcción en el vector binario ***pBGWFS7 (ppNaStEP:GFP:GUS)***.
- ✓ La secuencia río arriba de la región codificante de *NaStEP* dirige la expresión tanto de GFP como de GUS en estigmas maduros de plantas transgénicas, por lo tanto esta región contiene elementos de un promotor.

XII. PERSPECTIVAS

Cabe mencionar que se necesitan obtener al menos 5 líneas independientes homocigas con únicamente una inserción del transgen, a manera de validar la expresión órgano-específica en *A. thaliana*. También resulta necesario transformar plantas de *N. tabacum* (AC) para confirmar si la expresión de GFP y GUS se mantiene únicamente en los estigmas.

Para corroborar dicha localización se puede utilizar como método alternativo la inmunolocalización (anti-*NaStEP*) en plantas transformadas que porten la construcción de la región promotora fusionada a la secuencia codificante de *NaStEP*.

Es necesario evaluar el papel que juegan las diferentes cajas en la modulación de la expresión órgano-específica presentes en la región promotora tanto de *SLG₁₃* de *Brassica* como en *ppNaStEP*, considerando también la regulación negativa que ejerce la caja IV del promotor *SLG₁₃* de *Brassica*. Lo anterior es posible mediante la obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana* que porten diferentes construcciones de *ppNaStEP* que contengan deleciones en las diferentes cajas, incluido el supuesto elemento silenciador en *cis* (caja IV).

No hay que olvidar que la regulación de la expresión también puede verse afectada por factores epigenéticos. Lo anterior se puede evaluar determinando el patrón de metilación del DNA del promotor de *NaStEP* tanto en *N. alata* como en las plantas transgénicas de *A. thaliana* con la construcción ***ppNaStEP:GFP:GUS***, además; pueden realizarse experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina que permitan determinar el patrón de marcas epigenéticas que indiquen la presencia de complejos remodeladores de la cromatina, desempeñando un papel importante en la regulación de la expresión de este gen.

XIII. APÉNDICES

A.1

Preparación de células electro-competentes *E. coli* DH5 α

- Se inoculan 500 mL de medio LB con 500 μ L de pre-cultivo de *E. coli* incubado a 37°C y 250 rpm durante la noche anterior.
- Se crecen las células a 37°C con una agitación constante de 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5 a 0.7.
- Se transfiere el cultivo a contenedores de plástico para centrifugación y se incuban en hielo por 20 minutos. Posteriormente se centrifuga el cultivo líquido a 4000 g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.
- Se descarta el sobrenadante. Cuidadosamente se resuspende el “pellet” en 500 mL de glicerol 10% frío y se centrifuga a 4000 g durante 15 minutos a 4°C.
- Nuevamente se descarta el sobrenadante. Ahora se resuspende el pellet en 250 mL de glicerol 10% frío. Se centrifuga a 4000 g durante 15 minutos a 4°C.
- Finalmente se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 2 mL de glicerol 10% frío. Se toman alícuotas de 50 μ L y se transfieren a tubos eppendorf de 1.5 mL. Inmediatamente se congelan con nitrógeno líquido.
- Las células se mantienen a -70°C hasta su uso.

A.2

Preparación de células electro-competentes *A. tumefaciens* GV3103

- Se inoculan 500 mL de medio LB con 500 μ L de pre-cultivo de *A. tumefaciens* incubado a 28°C y 200 rpm durante la noche anterior.
- Se crecen las células a 28°C con una agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5 a 0.7.
- Se transfiere el cultivo contenedores de plástico para centrifugación y se incuban en hielo por 20 minutos. Posteriormente se centrifuga el cultivo líquido a 3000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C.
- Se descarta el sobrenadante. Cuidadosamente se resuspende el “pellet” en 500 mL de glicerol 10% frío y se centrifuga a 3000 g durante 10 minutos a 4°C.
- Nuevamente se descarta el sobrenadante. Ahora se resuspende el pellet en 250 mL de glicerol 10% frío. Se centrifuga a 3000 g durante 10 minutos a 4°C.
- Finalmente se descarta el sobrenadante y se resuspende en 1 mL de sorbitol 1 M frío. Se toman alícuotas de 50 μ L y se transfieren a tubos eppendorf de 1.5 mL. Inmediatamente se congelan con nitrógeno líquido.
- Las células se mantienen a -70°C hasta su uso.

A.3

Composición del medio Hoagland-Arnon

Macronutrientes	
Reactivo	Concentración final
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4 mM
KNO_3	6 mM

Micronutrientes	
Reactivo	Concentración final
H_3BO_3	46 μM
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.1 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.3 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.8 μM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9 μM

Se ajusta el pH a 5.2-5.5

A.4

Purificación de DNA a partir de gel de agarosa

Zymoclean Gel DNA Recovery Kit

- Se corta el fragmento de DNA deseado del gel de agarosa (0.8%) y se transfiere a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- Se pesa el fragmento de gel y se adicionan 3 volúmenes de amortiguador ADB por cada volumen de gel (ej. Por 100 μL (mg) de gel de agarosa, adicionar 300 μL de amortiguador ADB).
- Se incuba a 50°C por 10 min hasta lograr que el gel se disuelva totalmente.

- Se transfiere la solución de agarosa fundida a una columna Zymo-Spin dentro de un tubo colector.
- Se centrifuga durante 30-60 segundos y se descarta el sobrenadante.
- Se adicionan 200 μ L de amortiguador de lavado a la columna y se centrifuga durante 30 segundos. Se descarta el sobrenadante.
- Se repite el paso de lavado anterior.
- Se adicionan 15 μ L de H₂O desionizada estéril directamente a la matriz de la columna y se incuba por 60 segundos. Posteriormente se transfiere la columna a un tubo limpio de 1.5 mL y se centrifuga durante 30-60 segundos para eluir el DNA.

A.5

Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α

Micropulser Electroporation Apparatus BioRad

- Se descongelan las células electrocompetentes y se incuban junto con las cubetas de electroporación (0.1 cm) en hielo, durante 10 minutos.
- En hielo, se mezclan 50 μ L de células con 1 μ L de DNA, se incuban al menos un minuto.
- Se fija el programa "EC1" en el Micropulser Electroporation Apparatus.

- Se transfiere la mezcla de células con DNA a la cubeta de electroporación. Luego se posiciona la cubeta en el aparato y se da un pulso (solamente una sola vez).
- Se retira la cubeta del aparato e inmediatamente se adiciona 1 mL de medio SOC.
- Se transfiere la mezcla a un tubo de 1.5 mL y se incuba a 37°C durante una hora con una agitación de 250 rpm.
- Pasado el tiempo de incubación, plaquear la suspensión celular en medio selectivo.

A.6

Purificación de DNA plasmídico

Zyppy Plasmid Miniprep Kit

- En un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregan 600 µL del cultivo de bacterias, se centrifugan durante 3 min a 14,000 rpm. Se descarta el sobrenadante (repetir este paso hasta agotar el cultivo celular).
- Se adicionan 100 µL de “amortiguador de lisis 7X” y se mezcla por inversión de 4 a 6 veces. Posteriormente se incuba a temperatura ambiente por 2 minutos.
- Se agregan 350 µL de amortiguador de neutralización y se mezcla por inversión de 4 a 6 veces cuidadosamente. Cuando la neutralización es completa se forma un precipitado de color amarillo.

- Se centrifuga a 14,000 rpm por 4 minutos
- Se transfiere el sobrenadante (~900 μ L) a una columna Zymo-Spin II cuidando no tomar ninguna parte del pellet.
- Se coloca en un tubo recolector y se centrifuga durante 15 segundos a 14,000 rpm.
- Se agregan 200 μ L del amortiguador de lavado I a la columna y se centrifuga por 1 minuto a 14,000 rpm.
- Se agregan 400 μ L del amortiguador de lavado II a la columna y se centrifuga durante 60 segundos.
- Se transfiere a la columna dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregan 30 μ L de H₂O desionizada estéril directamente a la matriz de la columna. Se incuba a temperatura ambiente durante 60 segundos.
- Finalmente se centrifuga durante 30 segundos a 14,000 rpm para eluir el DNA plasmídico purificado.

A.7

Transformación de células electrocompetentes *A. tumefaciens* GV3103

Micropulser Electroporation Apparatus 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 20 μ L de células con 5 μ L 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.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Ai, Y. J., Kron, E., & Kao, T. H. (1991). S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Molecular & General Genetics*, 230(3), 353–8.
- Barrett, L. W., Fletcher, S., & Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(21), 3613–34.
- Burley, S. K., & Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annual Review of Biochemistry*, 65, 769–99.
- Busot, G. Y., McClure, B., Ibarra-Sánchez, C. P., Jiménez-Durán, K., Vázquez-Santana, S., & Cruz-García, F. (2008). Pollination in *Nicotiana alata* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3187–201.
- Chang, W.-C., Lee, T.-Y., Huang, H.-D., Huang, H.-Y., & Pan, R.-L. (2008). PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics*, 9, 561.
- Cornish, E. C., Pettitt, J. M., Bonig, I., & Clarke, A. E. (1987). Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature*, 326(6108), 99–102.
- Cruz-García, F., & McClure, B. A. (2001). Current Trends in the Embryology of Angiosperms. In S. S. Bhojwani & W.-Y. Soh (Eds.), (pp. 167–196). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Cruz-García, F., Nathan Hancock, C., Kim, D., & McClure, B. (2005). Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 42(3), 295–304.
- De Nettancourt, D. (1977). *Incompatibility in Angiosperms* (Vol. 3). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- De Nettancourt, D. (2001). *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants* (2nd ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Dzelzkalns, V. A., Thorsness, M. K., Dwyer, K. G., Baxter, J. S., Balent, M. A., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1993). Distinct cis-acting elements direct pistil-specific and pollen-specific activity of the Brassica S locus glycoprotein gene promoter. *The Plant Cell*, 5(8), 855–63.

- Fojtova, M., Van Houdt, H., Depicker, A., & Kovarik, A. (2003). Epigenetic switch from posttranscriptional to transcriptional silencing is correlated with promoter hypermethylation. *Plant Physiology*, *133*(3), 1240–50.
- Franklin, F. C. H., Lawrence, M. J., & Franklin-Tong, V. E. (1995). Cell and Molecular Biology of Self-Incompatibility in Flowering Plants. *International Review of Cytology*, *158*, 1–64.
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T. E., Cruz-Garcia, F., & McClure, B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, *439*(7078), 805–10.
- Hancock, C. N., Kent, L., & McClure, B. A. (2005). The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *43*(5), 716–23.
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, *2*, 19.
- Hernandez-Garcia, C. M., & Finer, J. J. (2014). Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology*, *217-218*, 109–19.
- Huang, S., Lee, H. S., Karunanandaa, B., & Kao, T. H. (1994). Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell*, *6*(7), 1021–8.
- Hunter, P. (2009). Me, myself and I. The genetics and molecular biology behind self-incompatibility and the avoidance of inbreeding in plants. *EMBO Reports*, *10*(12), 1297–300.
- Ioerger, T. R., Gohlke, J. R., Xu, B., & Kao, T. H. (1991). Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae. *Sexual Plant Reproduction*, *4*(2), 81–7.
- Jiménez-Durán, K., McClure, B., García-Campusano, F., Rodríguez-Sotres, R., Cisneros, J., Busot, G., & Cruz-García, F. (2013). NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiology*, *161*(1), 97–107.
- Jorgensen, R., Snyder, C., & Jones, J. (1987). T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Molecular and General Genetics*, *207*(2-3), 471-77.

- Kao, T. H., & McCubbin, A. G. (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12059–65.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Körber, H., Redei, G. P., & Schell, J. (1989). High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(21), 8467–71.
- Kondo, K., & McClure, B. (2008). New microsome-associated HT-family proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family. *Molecular Plant*, 1(4), 634–44.
- Kubo, K., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., 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 (New York, N.Y.)*, 330(6005), 796–9.
- Lee, H. S., Huang, S., & Kao, T. (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, 367(6463), 560–3.
- Lee, T. I., & Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual Review of Genetics*, 34, 77–137.
- Li, Y., Wu, Z., Ma, N., & Gao, J. (2009). Regulation of the rose Rh-PIP2;1 promoter by hormones and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 28(2), 185–96.
- Liliana E. García-Valencia, Carlos E. Bravo-Alberto & Felipe Cruz-García. (2013). Evitando el incesto en las plantas: Control genético y bioquímico. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(1), 57–65.
- McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., & Clarke, A. E. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature*, 342(6252), 955–7.
- McClure, B., & Franklin-Tong, V. (2006). Gametophytic self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta*, 224(2), 233–45.
- McClure, B., Mou, B., Canevascini, S., & Bernatzky, R. (1999). A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), 13548–53.

- Meins, F. (2000). RNA degradation and models for post-transcriptional gene-silencing. *Plant Molecular Biology*, 43(2-3), 261–73.
- Molina, C., & Grotewold, E. (2005). Genome wide analysis of Arabidopsis core promoters. *BMC Genomics*, 6, 25.
- Murfett, J., Atherton, T. L., Mou, B., Gasser, C. S., & McClure, B. A. (1994). S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*, 367(6463), 563–6.
- Murfett, J., Strabala, T., Zurek, D., Mou, B., Beecher, B., & McClure, B. (1996). S RNase and Interspecific Pollen Rejection in the Genus *Nicotiana*: Multiple Pollen-Rejection Pathways Contribute to Unilateral Incompatibility between Self-Incompatible and Self-Compatible Species. *The Plant Cell*, 8(6), 943–58.
- Nasrallah, J., & Nasrallah, M. (1993). Pollen Stigma Signaling in the Sporophytic Self-Incompatibility Response. *The Plant Cell*, 5(10), 1325–35.
- Newbigin, E., Anderson, M. A., & Clarke, A. E. (1993). Gametophytic Self-Incompatibility Systems. *The Plant Cell*, 5(10), 1315–24.
- O'Brien, M., Kapfer, C., Major, G., Laurin, M., Bertrand, C., Kondo, K., Koyama, Y., & Matton, D. P. (2002). Molecular analysis of the stilar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 32(6), 985–96.
- Omidvar, V., Abdullah, S. N. A., Izadfar, A., Ho, C. L., & Mahmood, M. (2010). The oil palm metallothionein promoter contains a novel AGTTAGG motif conferring its fruit-specific expression and is inducible by abiotic factors. *Planta*, 232(4), 925–36.
- Parry, S., Liu, Y., Clarke, A., & Newbigin, E. (1997). S-RNases and other plant extracellular ribonucleases. In *Ribonucleases: Structures and Functions*. Academic Press, New York (pp. 191–211).
- Puerta, A. R., Ushijima, K., Koba, T., & Sassa, H. (2009). Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1309–18.
- Qin, X., Soulard, J., Laublin, G., Morse, D., & Cappadocia, M. (2005). Molecular analysis of the conserved C4 region of the S11-RNase of *Solanum chacoense*. *Planta*, 221(4), 531–7.

- Roldán, J. A., Rojas, H. J., & Goldraij, A. (2012). Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the in vivo self-incompatibility response in *Nicotiana glauca*. *Annals of Botany*, *110*(4), 787–95.
- Roshchina, V. V. (2003). Autofluorescence of Plant Secreting Cells as a Biosensor and Bioindicator Reaction. *Journal of Fluorescence*, *13*(5), 403–18.
- Sessions, A., Weigel, D., & Yanofsky, M. F. (1999). The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant Journal*, *20*(2), 259–63.
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S., & Kao, T.-H. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, *429*(6989), 302–5.
- Soto, C. (2011). Análisis molecular de la región promotora del gen *NaStEP* de *Nicotiana glauca*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sullivan, J. A., Shirasu, K., & Deng, X. W. (2003). The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Reviews. Genetics*, *4*(12), 948–58.
- Tsukamoto, T., Ando, T., Kokubun, H., Watanabe, H., Masada, M., Zhu, X., Marchesi, E., & Kao, T. (1999). Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. *Sexual Plant Reproduction*, *12*(1), 6–13.
- Ushijima, K., Yamane, H., Watari, A., Kakehi, E., Ikeda, K., Hauck, N. R., Iezzoni, A. F., & Tao, R. (2004). The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *39*(4), 573–86.
- Xue, Y., Carpenter, R., Dickinson, H. G., & Coen, E. S. (1996). Origin of allelic diversity in antirrhinum S locus RNases. *The Plant Cell*, *8*(5), 805–14.
- Yamane, H., & Tao, R. (2009). Molecular Basis of Self-(in)compatibility and Current Status of S-genotyping in Rosaceous Fruit Trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *78*(2), 137–57.
- Zou, C., Sun, K., Mackaluso, J. D., Seddon, A. E., Jin, R., Thomashow, M. F., & Shiu, S.-H. (2011). Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(36), 14992–7.