



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

NaSIPP, una nueva proteína mitocondrial requerida para el mecanismo de  
autoincompatibilidad en *Nicotiana*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Liliana Elizabeth García Valencia

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Felipe Cruz García

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Alejandra A Covarrubias Robles

Instituto de Biotecnología

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Facultad de Química

Ciudad de México. Febrero, 2018



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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Doctorado se realizó bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García en el Laboratorio 104, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y en la Universidad de Massachusetts, Amherst en el laboratorio de la Dra. Alice Y. Cheung.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado por IN217816 y RN217816 (PAPIIT-UNAM); 236602 por CONACYT y 0955910 (RCN on Integrative Pollen Biology). Durante los estudios de Doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT (329718/234690) para la realización de la presente tesis.

Al Programa de Becas Mixtas de CONACYT por el apoyo económico para realizar una estancia de investigación en la Universidad de Massachusetts (2013-2014).

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) de la UNAM, por el apoyo económico para asistir a congresos nacionales e internacionales.

El Jurado del Examen Doctoral estuvo contituido por:

Dra. Dimitrova Dinkova Tzvetanka	PRESIDENTE
Dra. Coello Coutiño Martha Patricia	VOCAL
Dra. Sánchez Jiménez María de la Paz	VOCAL
Dr. Cárdenas Torres Luis	VOCAL
Dra. León Mejía Patricia	SECRETARIO

A mi amado esposo sin cuyo apoyo, comprensión y cariño no hubiera sido posible finalizar este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas a un mundo de conocimiento.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química por el apoyo brindado durante la realización de la tesis.

A mi asesor, Dr. Felipe Cruz García por su contribución a mi formación académica.

A los integrantes del Comité Tutoral de Maestría y Doctorado por todas las aportaciones, discusiones y sugerencias brindadas: Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles y Dr. Rogelio Rodríguez Sotres.

A los miembros del Comité evaluador de esta tesis por sus comentarios y revisiones que contribuyeron al mejoramiento de la misma: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez, Dra. Patricia León Mejía y Dr. Luis Cárdenas Torres.

A la Dra. Alice Y. Cheung, Dr. Hen-Ming Wu, Dra. Yanjiao Zou, Dr. Ming-Che Liu, Dra. Fang-Ling Yeh, Dra. Qiaohong Duan, por hacerme parte de su equipo de trabajo y por todo el apoyo brindado durante mi estancia en University of Massachusetts, Amherst.

A Lilia de la Rocha, Leticia García y Adelina Gonzáles por la ayuda y orientación en todos los trámites realizados durante mi estancia en el posgrado.

A la M. C Yuridia Cruz González Zamora por su asistencia técnica en la realización de esta tesis.

Al Dr. Jorge Herrera Díaz por su asistencia técnica en los experimentos de complementación en levaduras.

Al Dr. Javier A. Juárez Díaz por su asistencia técnica en los experimentos de complementación bimolecular de la fluorescencia.

A Dra. Karina Jiménez Durán por su asistencia técnica en el uso del microscopio confocal.

A la M. C. María T. Olivera Flores por el soporte técnico en los experimentos de cultivo de tejidos y el apoyo con el material vegetal.

A la Dra. Florencia García Campusano de CENID-COMEF, INIFAP y a su grupo de trabajo por el tiempo invertido en las discusiones académicas y su apoyo en los últimos experimentos requeridos para la finalización de esta tesis.

A mis queridos amigos Cesar L. Cuevas, Enrique Muñoz, Zeus Bravo, Ernesto Guerrero, Andrea Hernández, Sara M. Garza, Victor Sánchez, Aurora Lara, Elpidio García, Ariadna González, Gregorio Orozco, Lilia Bernal, Claudia Ibarra y Alejandra Ávila, por su apoyo en las diferentes etapas de este viaje.

A Carlos E. Bravo Alberto por estar presente durante todo este trayecto, por su apoyo en la planeación, realización y análisis de los diferentes experimentos. Gracias por contagiarme con tu entusiasmo y pasión por la ciencia, sin ti no hubiera sido posible concluir esta tesis.

A mi familia, que siempre ha estado a mi lado llenándome de amor; en especial a mis padres, gracias por todos los consejos y apoyo.

Agradezco a todas las personas que me han ayudado a llegar al lugar en el que me encuentro profesionalmente.

## ABREVIATURAS

120K: Glicoproteína de 120 kDa

AC: Autocompatibilidad

AI: Autoincompatibilidad

ANOVA: Análisis de varianza

ARC1: Proteína 1 que contiene motivos repetidos de armadillo

ATP: Trifosfato de adenosina

BiFC: Complementación Bimolecular de la Fluorescencia

Cul 1: Culina 1

DO: Densidad óptica

H: Horas

HT-B: Gen modificador HT-B

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno

MdABCD: Transportador ABCD de *Malus domestica*

MDF: Modifier

Medio LB: Medio Luria-Bertani

Min: minutos

MLPK: Proteína cinasa del M-locus

MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog

NaPCCP: Proteína de polen con dominio C2 de *Nicotiana alata*

NaPEPII: Proteína II expresada en el pistilo de *N. alata*

NaSIPP: Proteína específica de polen incompatible de *N. alata*

NaStEP: Proteína específica del estigma de *N. alata*

NaTrxh: Tiorredoxina tipo h de *N. alata*

PCD: Muerte celular programada

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PELP III: Proteína tipo extensina del pistilo

PrABP80: Proteína 80 de unión a actina de *Papaver rhoeas*

PrsP: Proteína S del polen de *P. rhoeas*

PrsS: Proteína S del estigma de *P. rhoeas*

PTP: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial

RACE: Amplificación rápida de los extremos de cDNA

RNAi: RNA de interferencia

Rpm: Revoluciones por minuto  
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa  
SBP1: Proteína 1 de unión a S-RNasa  
SCR: Proteína rica en cisteínas del locus *S*  
SD-Ura: Medio sintético con glucosa sin uracilo  
Sec: Segundos  
SEM: Error estándar de la media  
SGal-Ura: Medio sintético con galactosa sin uracilo  
SGli-Ura: Medio sintético con glicerol sin uracilo  
SLF: Proteína con caja F del locus *S*  
SLG: Glicoproteína del locus *S*  
SMC: Sitio múltiple de clonación  
SRK: Receptor cinasa del locus *S*  
TFM: Transportador de fosfatos mitocondrial  
THL1: Tiorredoxina 1  
TTS: Glicoproteína específica del tejido de transmisión  
U: Unidades de enzima  
WT: Cepa silvestre  
YPD: Medio de crecimiento completo para levadura, fuente de carbono glucosa  
YPGal: Medio de crecimiento completo para levadura, fuente de carbono galactosa  
YPGli: Medio de crecimiento completo para levadura, fuente de carbono glicerol



## ÍNDICE

Resumen .....	1
Abstract .....	2
I. Antecedentes .....	3
A. Interacción polen- pistilo .....	3
1. Adhesión e hidratación de los granos de polen a la superficie estigmática .....	3
2. Germinación del polen y formación del tubo polínico .....	3
3. Penetración del tubo polínico en la superficie estigmática .....	4
4. Crecimiento del tubo polínico a través del estilo .....	4
5. Entrada del tubo polínico en el óvulo .....	4
B. Sistemas de autoincompatibilidad en plantas .....	5
1. Sistema de autoincompatibilidad esporofítico .....	7
2. Sistema de autoincompatibilidad gametofítico .....	9
a) Sistema de autoincompatibilidad en Papaveraceae .....	9
b) Sistema de autoincompatibilidad en Solanaceae .....	11
(1) S-RNasa o determinante <i>S</i> femenina .....	12
(2) SLF o determinante <i>S</i> masculina .....	13
(3) Genes modificadores .....	14
(a) HT-B .....	15
(b) 120K .....	15
(c) MdABCF .....	16
(d) NaStEP .....	16

	(4) Modelos de rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasas.....	17
	(a) Modelo colaborativo de degradación.....	17
	(b) Modelo del secuestro de las S-RNasas.....	18
	(c) ¿Qué se conoce hasta ahora en el mecanismo de AI en sistemas basados en S-RNasas?.....	19
II.	Antecedentes inmediatos.....	22
III.	Hipótesis.....	23
IV.	Objetivos.....	24
V.	Materiales y métodos.....	25
	A. Material biológico.....	25
	1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	25
	2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
	B. Clonación de <i>NaSIPP</i> , <i>NaStEP</i> , <i>Pic2</i> y <i>Mir1</i> en el vector <i>pENTR<sup>TM</sup>-D-TOPO</i> .....	25
	C. Clonación de <i>NaSIPP</i> y <i>NaStEP</i> en el vector <i>pKSII</i> .....	27
	D. Transformación de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
	E. Bombardeo de granos de pólen de <i>Nicotiana</i> .....	28
	F. Localización subcelular de <i>NaSIPP</i> .....	28
	1. Expresión en tubos polínicos de <i>N. tabacum</i> .....	28
	2. Expresión en plántulas de <i>A. thaliana</i> .....	29
	G. Complementación bimolecular de la fluorescencia.....	29
	1. Expresión en tubos polínicos de <i>N. tabacum</i> .....	29
	2. Expresión en plántulas de <i>A. thaliana</i> .....	30

H.	Coexpresión de NaSIPP y NaStEP en tubos polínicos de <i>N. tabacum</i> .....	31
I.	Ensayos de complementación de la mutante $\Delta mir1$ de <i>S. cerevisiae</i> .....	31
	1. Plásmidos usados en los ensayos de complementación.....	31
	2. Condiciones de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .....	32
J.	Análisis de la expresión de <i>NaSIPP</i> .....	32
K.	Supresión de NaSIPP en granos de polen de <i>N. alata</i> .....	33
	1. Construcción <i>RNAi-NaSIPP</i> y bombardeo de granos de polen de <i>N. alata</i> .....	33
	2. Polinizaciones manuales .....	34
	3. Evaluación del crecimiento de tubos polínicos en estilos polinizados de <i>N. alata</i> .....	34
VI.	Resultados.....	36
	A. NaSIPP pertenece a la familia de transportadores mitocondriales.....	36
	B. Localización subcelular de NaSIPP .....	40
	C. La expresión de NaSIPP compensa el defecto mitocondrial de la mutante $\Delta mir1$ de <i>S. cerevisiae</i> .....	41
	D. Interacción de NaSIPP y NaStEP en células vegetales.....	43
	E. La interacción de NaSIPP y NaStEP esta asociada a las mitocondrias .....	45
	F. Expresión espacio-temporal de <i>NaSIPP</i> .....	46
	G. Supresión de NaSIPP en tubos polínicos de <i>N. alata</i> .....	49
VII.	Discusión .....	52
VIII.	Conclusiones .....	56
IX.	Bibliografía .....	57
X.	Apéndices.....	74

A. Apéndice 1. Medios .....	74
B. Apéndice 2. Procedimientos adicionales para la transformación por bombardeo .....	77
C. Apéndice 3. Alineamiento de secuencias de <i>SIPP</i> de diferentes especies de <i>Nicotiana</i> .....	78
D. Apéndice 4. Evaluación de la longitud de los tubos polínicos después de las polinizaciones manuales .....	80
E. Apéndice 5. ANOVA de los diferentes tratamientos en las polinizaciones manuales .....	83
F. Apéndice 6. Artículos científicos publicados durante los estudios de doctorado.....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rechazo del polen en sistemas de AI esporofítico .....	7
Figura 2. Rechazo del polen en sistemas de AI gametofítico .....	9
Figura 3. Modelo de rechazo del polen en <i>Papaver</i> .....	11
Figura 4. Modelo colaborativo de degradación .....	18
Figura 5. Modelo de compartimentalización de S-RNasas .....	19
Figura 6. Esquema de los hechos conocidos en la AI dependiente de S-RNasas .....	21
Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de NaSIPP, TFM funcionales y putativos ..	38
Figura 8. Relaciones filogenéticas de NaSIPP con TFM funcionales y putativos .....	39
Figura 9. Localización subcelular de NaSIPP .....	41
Figura 10. NaSIPP complementa parcialmente la ausencia de <i>Mir1</i> en <i>S. cerevisiae</i> .....	42
Figura 11. NaSIPP interacciona con NaStEP en tubos polínicos de <i>Nicotiana</i> .....	44
Figura 12. NaSIPP interacciona con NaStEP en plántulas de <i>A. thaliana</i> .....	44
Figura 13. La interacción física entre NaStEP y NaSIPP está asociada a las mitocondrias ..	45
Figura 14. Localización de NaSIPP y NaStEP en tubos polínicos de <i>Nicotiana</i> .....	46
Figura 15. El transcrito de <i>SIPP</i> es acumulado específicamente en polen maduro de <i>Nicotiana</i> .....	47
Figura 16. Alineamiento múltiple de la secuencia de <i>SIPP</i> de diferentes especies de <i>Nicotiana</i> .....	48
Figura 17. La supresión de NaSIPP en tubos polínicos afecta la AI en <i>N. alata</i> .....	51

## RESUMEN

El éxito reproductivo en las angiospermas está relacionado con diversos mecanismos que previenen la autofecundación, como la autoincompatibilidad (AI), la cual es una barrera genética que involucra el reconocimiento y rechazo del polen propio mediante interacciones polen-pistilo; con el fin de evitar los efectos de la endogamia y promover la diversidad genética en la población. La AI está controlada por un locus polimórfico, conocido como locus *S*. En el caso de las Solanáceas, este locus codifica para una S-RNasa (determinante femenina, expresada en el pistilo) y para las proteínas SLFs o determinante masculina (expresadas en el polen). La interacción *S* específica entre las determinantes establece si una cruce es compatible (aceptación del polen) o incompatible (rechazo del polen). Sin embargo, existen otros genes esenciales para el mecanismo de AI (*HT-B*, *120K*, *NaStEP* y *MdABCF*).

Previamente se demostró que la proteína estigmática NaStEP es requerida en el mecanismo de AI de *Nicotiana*. Durante la polinización, NaStEP ingresa a los tubos polínicos, donde probablemente lleva a cabo su función. Mediante ensayos de doble híbrido en levadura, se encontró interacción con NaSIPP, una proteína homóloga a transportadores de fosfato mitocondrial.

En este trabajo se evaluó la interacción física entre las proteínas NaStEP- NaSIPP en células vegetales (plántulas de *Arabidopsis thaliana* y tubos polínicos de *Nicotiana tabacum*). Asimismo, se confirmó la localización mitocondrial de NaSIPP y su capacidad para transportar fosfato. Interesantemente, la coexpresión de NaStEP y NaSIPP en tubos polínicos indica que la interacción está asociada a las mitocondrias, ya que cuando NaStEP fue expresado solo, se observó una señal citoplasmática, sugiriendo la translocación de NaStEP a este organelo. El transcrito de *SIPP* fue detectado específicamente en polen maduro de diferentes especies de *Nicotiana*; sin embargo, en especies autocompatibles este gen ha acumulado mutaciones, lo cual provoca corrimientos en el marco de lectura, haciendo poco probable la producción de una proteína funcional. Mediante ensayos de supresión por RNAi de NaSIPP en granos de polen de *Nicotiana*, se evaluó su participación en el mecanismo de rechazo del polen. Los resultados señalan que NaSIPP es un gen requerido en la AI en *Nicotiana*. En conjunto, estos resultados son consistentes con un modelo donde la interacción de NaStEP con NaSIPP en tubos polínicos incompatibles, podría desestabilizar las mitocondrias y contribuir a la inhibición del crecimiento de los tubos polínicos.

## ABSTRACT

Mate choice is an essential process during sexual plant reproduction, in which self-incompatibility (SI) is widely adopted as a reproductive barrier in angiosperms. SI prevents mating between closely related plants, to avoid the deleterious effects of inbreeding and enhances genetic diversity in a population.

In plants, mate selection operates at the level of biochemical pollen-pistil interactions; which are controlled by a polymorphic locus, known as *S*-locus. In Solanaceae, the *S*-locus includes two linked genes: the female determinant or S-RNase (expressed in the pistil) and the male determinant or SLF (expressed in the pollen). Although this interaction defines the specificity of the pollen rejection response, the identification of other essential modifier genes unlinked to the *S*-locus (*HT-B*, *120K*, *NaStEP* and *MdABCF*), unveils a higher degree of complexity in the pollen rejection pathway.

We showed previously that the stigmatic protein NaStEP is essential to SI in *Nicotiana*. During pollination NaStEP is taken up by pollen tubes where potential interactions with pollen tube proteins might underlie its function. We identified NaSIPP, a mitochondrial protein with phosphate transporter activity, as a novel NaStEP- interacting protein. Coexpression of NaStEP and NaSIPP in pollen tubes showed interaction in the mitochondria, although when expressed alone NaStEP remains mostly cytosolic, implicating NaSIPP-mediated translocation of NaStEP into the organelle. The NaSIPP transcript is detected specifically in mature pollen of *Nicotiana* spp; however, in self-compatible plants this gene has accumulated mutations, so its coding region is unlikely to produce a functional protein. RNAi suppression of NaSIPP in *Nicotiana* pollen grains disrupts the SI by preventing pollen tube inhibition. Taken together, our results are consistent with a model whereby the NaStEP and NaSIPP interaction, in incompatible pollen tubes, might destabilize the mitochondria, and contribute to arrest pollen tube growth.

## **I. ANTECEDENTES**

### **A. Interacción polen- pistilo**

La fecundación en plantas requiere una compleja red de interacciones entre el gametofito femenino (saco embrionario) y el gametofito masculino (grano de polen); pero en general se requieren cinco etapas principales:

#### **1. Adhesión e hidratación de los granos de polen a la superficie estigmática**

La mayoría de los granos de polen son metabólicamente quiescentes y altamente desecados (contenido de agua del 15-30 %) cuando son liberados de las anteras (Edlund *et al.*, 2004). Los granos de polen son transportados por factores bióticos o abióticos a la superficie estigmática, donde se lleva a cabo el proceso de hidratación (Lord y Russell, 2002; Edlund *et al.*, 2004). La hidratación es acompañada por la activación del metabolismo y la síntesis de proteínas. En especies con estigmas húmedos, como *Nicotiana*, la hidratación de los granos de polen es pasiva y desregulada, debido a que el agua está disponible en las secreciones superficiales del estigma (Hiscock y Allen, 2008). No obstante, en algunas especies con estigmas secos como *Brassica*, el proceso de hidratación es altamente regulado por el sistema de autoincompatibilidad, ya que solo algunos granos de polen son hidratados y germinan formando un tubo polínico (Chapman y Goring, 2010).

#### **2. Germinación del polen y formación del tubo polínico**

Después de la hidratación del grano de polen, se produce un crecimiento a través de una apertura o un área delgada en la pared de donde emerge el tubo polínico. Una vez que ocurre la germinación se requiere mantener un crecimiento polar, el cual es controlado principalmente por GTPasas (Fu *et al.*, 2002).

En los tubos polínicos en crecimiento se observa un gradiente de calcio ( $Ca^{+2}$ ), que se ha visto que está involucrado en la biosíntesis y organización de componentes celulares de la pared del mismo, entre ellos pectina, celulosa, hemicelulosa y calosa (Hepler *et al.*, 2001). Al igual, se forman tapones de calosa, con los cuales se aíslan las partes viejas del tubo polínico, manteniendo solamente el citoplasma cerca del ápice en crecimiento (Franklin-Tong, 1999).



La deposición de tapones de calosa ha sido correlacionada con la tasa de crecimiento, es decir, el número de tapones de calosa es empleado como un indicador del crecimiento del tubo polínico (Snow y Spira, 1991).

### **3. Penetración del tubo polínico en la superficie estigmática**

Después de la germinación del polen, el tubo polínico penetra la superficie estigmática (Gaude y McCormick, 1999; Chapman y Goring, 2010). En especies con estilos cerrados, los tubos polínicos deben penetrar una cubierta lipídica externa que se encuentra en las papilas estigmáticas, llamada cutícula; mientras que en especies con estigmas abiertos, el estigma es cubierto con una epidermis que es continua con la matriz extracelular del estilo (Edlund *et al.*, 2004).

### **4. Crecimiento del tubo polínico a través del estilo**

En *Nicotiana*, la matriz extracelular del tejido de transmisión es rica en glicoproteínas (Sommer-Knudsen *et al.*, 1996; Lind *et al.*, 1994), que proveen señales direccionales para el crecimiento del tubo polínico hacia el ovario. Dentro de estas glicoproteínas, se encuentran proteínas tejido-específico como TTS (Transmitting Tissue Specific; Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995; 2000), 120K (Lind *et al.*, 1996) y proteínas semejantes a extensinas como PELP III (class III Pistil-specific Extensin-like Protein; Bosch *et al.*, 2003; de Graaf *et al.*, 2003). Asimismo, la matriz extracelular contiene proteínas involucradas en el reconocimiento y rechazo del polen, además de inhibidores de proteasas, que pueden proteger el pistilo de patógenos invasores (McClure y Franklin-Tong, 2006).

### **5. Entrada del tubo polínico en el óvulo**

El tubo polínico crece a través de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo y es guiado por el gametofito femenino, el cual está constituido por dos células sinérgidas, una célula huevo y una célula central (Hamamura *et al.*, 2012). El tubo polínico contiene dos células espermáticas, que son liberadas dentro del gametofito femenino para llevar a cabo la doble fecundación; es decir, un proceso en el que una célula espermática fecunda a la célula huevo para generar el cigoto y la otra célula espermática se fusiona con la célula central para formar el endospermo, el cual es un tejido que provee los nutrimentos necesarios para el

desarrollo del embrión y el crecimiento temprano de la plántula (Hunter, 2009; Chae y Lord, 2010; Sprunck, 2010).

## **B. Sistemas de autoincompatibilidad en plantas**

Aproximadamente el 75 % de las especies de angiospermas producen flores hermafroditas, es decir tienen órganos sexuales masculinos y femeninos en la misma flor (Gaude *et al.*, 2006). La cercanía entre los órganos reproductivos incrementa la probabilidad de autopolinización, la autofecundación y con ello la endogamia (de Nettancourt, 2001).

La endogamia está asociada con la pérdida de variabilidad genética y tiene un efecto negativo en la progenie producida, como la disminución de vigor y de la fertilidad (Darwin, 1876; Charlesworth y Willis, 2009; Barret, 2010; Fobis-Loisy y Gaude, 2010). Debido a esto, algunas especies desarrollaron adaptaciones morfológicas, fisiológicas y genéticas para evitar la progenie con individuos cercanamente relacionados o incompatibles y mantener la diversidad genética en las generaciones subsecuentes (de Nettancourt, 2001; Goring y Silva, 2001). Algunas de las barreras para prevenir la autopolinización que han desarrollado las angiospermas son la dicogamia y la hercogamia:

- La dicogamia es la separación temporal de los órganos reproductivos, es decir una especie con flores hermafroditas, en la cual maduran primero los órganos masculinos (androceo) y luego los órganos femeninos (gineceo); en otras palabras, funcionará primero como flor masculina y más tarde como flor femenina (de Nettancourt, 2001).
- La hercogamia es la separación espacial de los pistilos y estambres. Un ejemplo de esto ocurre en poblaciones de plantas distílicas, donde algunos individuos presentan flores con pistilos más cortos que los estambres y otras flores con pistilos largos y estambres cortos. El flujo génico a través del polen en estas especies, ocurre solamente entre las flores con pistilos largos con polen producido en flores con estambres largos y lo mismo para el caso de estambres y pistilos cortos (de Nettancourt, 2001).

Sin embargo, estos sistemas no son del todo eficientes, porque la restricción del flujo de polen entre individuos genéticamente relacionados es limitada. Para sobreponerse a este problema, algunas especies desarrollaron un mecanismo genético de reconocimiento del polen, llamado autoincompatibilidad (AI), en donde el pistilo reconoce y rechaza el polen propio o el polen

genéticamente relacionado (Takayama e Isogai, 2005; Wright y Barret, 2010). La AI se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización y puede presentarse a nivel del estigma, estilo o en el ovario (de Nettancourt, 2001).

Más del 50 % de las especies de angiospermas presentan alguna forma de AI, lo cual representa una presión considerable para prevenir la autopolinización y favorecer la polinización cruzada e incrementar la diversidad genética (Franklin-Tong, 2008; Roldan *et al.*, 2010).

La AI tiene un costo aparentemente más elevado que la autocompatibilidad (AC), por lo que algunas plantas han perdido la capacidad de rechazar su propio polen a lo largo de la historia evolutiva, un ejemplo es *Arabidopsis thaliana* (Bechsgaard *et al.*, 2006; Willi y Määtänen, 2010). Sin embargo, se ha observado una ventaja macroevolutiva de la AI en el mantenimiento de la selección de especies (Wright y Barret, 2010). Goldberg *et al.* (2010) demostraron que los linajes AI tienen una mayor tasa de diversificación que los linajes AC, lo que explica porque la AI se ha mantenido durante 90 millones de años.

La combinación de las barreras físicas, fisiológicas y genéticas, evitan en gran medida la autopolinización. Dichas barreras junto con las mutaciones y la recombinación meiótica, promueven la diversidad genética en las poblaciones, asegurando el mantenimiento de la especie y la capacidad de adaptarse a nuevos ambientes.

El sistema de AI está controlado genéticamente por un locus multialélico conocido como locus *S*, el cual determina la especificidad del reconocimiento y rechazo del polen. En el locus *S* se encuentran al menos dos genes estrechamente ligados, uno de ellos es expresado en el polen (determinante *S* masculina) y otro es expresado en el pistilo (determinante *S* femenina), los productos de estos genes interactúan para determinar si el polen es rechazado o aceptado (de Nettancourt, 2001). La ubicación del locus *S* es cercana al centrómero y la proximidad de las determinantes *S*, promueve su herencia como una unidad mendeliana; conocida como haplotipo *S*, la cual denota variantes del locus (Cruz-García y McClure, 2001). La AI puede clasificarse de acuerdo al fenotipo del polen en dos tipos: gametofítica y esporofítica.

## 1. Sistema de autoincompatibilidad esporofítico

La AI esporofítica está determinada por los productos de los alelos  $S$  que son expresados y sintetizados en el tapete de la antera (tejido diploide de la planta madre) y son incorporados a la cubierta del grano de polen durante su maduración en la antera (de Nettancourt, 2001).

En la Figura 1 se muestra que los granos de polen expresan dos proteínas  $S$ . El polen será rechazado si alguna de las dos proteínas  $S$  en la cubierta coinciden con una de las proteínas  $S$  expresadas en el pistilo (Nasrallah y Nasrallah, 1993). Una característica común de las plantas con AI esporofítica es que la inhibición del polen con el mismo haplotipo  $S$  es muy rápida y ocurre en la interfase del polen-estigma; el rechazo del polen resulta en la anulación de la hidratación del mismo (Nasrallah y Nasrallah, 1993).

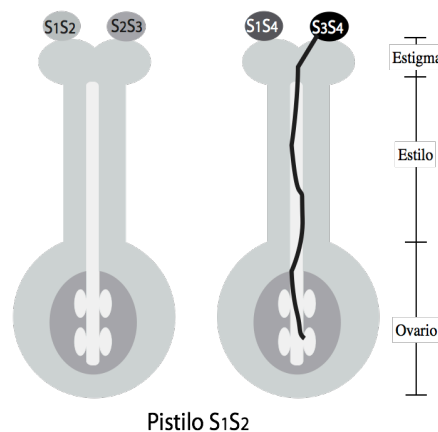


Figura 1. Rechazo del polen en sistemas de AI esporofítico. En la AI esporofítica el fenotipo del polen es determinado por el genoma diploide de la planta parental. En este caso, los granos de polen expresan dos proteínas  $S$  en su cubierta:  $S_1S_2$ ,  $S_2S_3$ ,  $S_1S_4$  y  $S_3S_4$ . El polen será rechazado en la superficie estigmática si algunas de las dos proteínas  $S$  en la cubierta del polen ( $S_1S_2$ ,  $S_2S_3$ ,  $S_1S_4$ ) coinciden con una de las proteínas  $S$  expresadas en el pistilo ( $S_1S_2$ ). Si no existe coincidencia alélica de ninguna proteína  $S$  de la cubierta del polen ( $S_3S_4$ ), el grano de polen podrá germinar y fecundar un óvulo.

La mayoría de los estudios a nivel molecular de este tipo de AI han sido realizados en especies con importancia agrícola de la familia Brassicaceae, como la col y la canola. En *Brassica*, el locus  $S$  es extremadamente complejo, abarca aproximadamente 80-100 Kb y contiene aproximadamente 17 genes, de los cuales dos unidades transcripcionales se encuentran fuertemente ligadas y son altamente polimórficas (determinante femenina y determinante masculina), dichos genes son requeridos para el reconocimiento del polen haplotipo  $S$  específico (Hiscock y McInnis, 2003).

La determinante femenina es un receptor de cinasa, conocida como SRK (S-locus Receptor Kinase) que se localiza en la membrana plasmática de las células papilares del estigma. Experimentos de ganancia de función muestran que SRK determina la *S* especificidad en el estigma; sin embargo, la capacidad del estigma para rechazar el polen incompatible es potenciada por la presencia de un segundo gen *S* estigmático (S-locus Glycoprotein o SLG; Takasaki *et al.*, 2000). Existe evidencia que sugiere que SLG contribuye con la estabilización de SRK y con su acumulación en el estigma (Dixit *et al.*, 2000). La determinante masculina es una proteína del polen rica en cisteínas, denominada SCR (*S*-locus Cysteine Rich protein), la cual es sintetizada y secretada por las células tapetales de la antera para ser incorporada a la cubierta del polen maduro (Iwano *et al.*, 2003). Experimentos de pérdida y ganancia de función demostraron que SCR determina la *S* especificidad en el polen (Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000).

La expresión de SRK, SCR y SLG es casi indetectable en botones florales y alcanzan su máxima expresión antes de la antesis (apertura de la flor), cuando las flores son AI (Hiscock y McInnis, 2003). SRK y SCR forman un complejo ligando-receptor, lo que provoca la autofosforilación de SRK de manera alelo *S* específica y desencadena una cascada de señalización que involucra a otras proteínas como:

- **THL1** o tiorredoxina 1, se encuentra asociada a SRK para prevenir su autofosforilación, pero después de la interacción SRK-SCR, THL1 se disocia y SRK se autofosforila (Cabrillac *et al.*, 2001).
- **ARC1** (Armadillo-Repeat-Containing 1), interacciona de manera fosforilación-dependiente con SRK y se sugiere que funciona como E3-ubiquitin ligasa; sin embargo, se desconoce si SRK es sustrato de ARC1 (Gu *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 1999; Ivanov *et al.*, 2010).
- **MLPK** (M-locus Protein Kinase), interacciona con SRK y debido a la existencia de plantas que no expresan a esta cinasa, se pudo concluir que es esencial en el rechazo del polen en *Brassica* (Murase *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2012).

Esta cascada de señalización tiene como fin inhibir la germinación del grano de polen en una cruz incompatible; sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular exacto (Doucet *et al.*, 2016).

## 2. Sistema de autoincompatibilidad gametofítico

El sistema de AI gametofítico es el mecanismo de AI más abundante en las angiospermas. El fenotipo  $S$  del polen está determinado por su genotipo haploide, por lo que el polen es rechazado cuando el haplotipo  $S$  del polen coincide con alguno de los dos haplotipos  $S$  del pistilo diploide, en caso contrario el polen es aceptado (Figura 2) (Franklin-Tong, 2008).

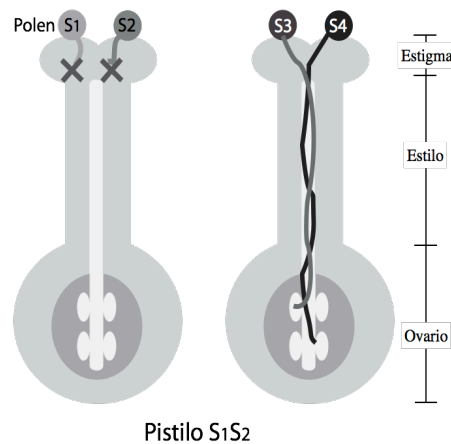


Figura 2. Rechazo del polen en sistemas de AI gametofítico. La AI gametofítica es determinada por el haplotipo  $S$  del genoma haploide del polen. Los granos de polen son hidratados y germinan; sin embargo, si existe coincidencia alélica entre el polen y el pistilo, como en el caso de los haplotipos  $S_1$  o  $S_2$  serán rechazados, mientras que los granos de polen  $S_3$  y  $S_4$  podrán germinar y ser aceptados para fertilizar la planta  $S_1S_2$ .

Existen dos principales sistemas de AI gametofítica: uno de ellos es dependiente de S-RNasas (presente en las familias Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae) y el otro no, este último está presente en la familia Papaveraceae (Takayama e Isogai, 2005). En las familias con sistemas de AI gametofítica dependiente de S-RNasas, los granos de polen germinan independientemente de su haplotipo  $S$ , generando tubos polínicos. En una cruce compatible (no existe coincidencia entre el haplotipo  $S$  del polen y el haplotipo  $S$  del pistilo), el tubo polínico crecerá a lo largo del estilo hasta llegar al ovario. Sin embargo, en cruces autoincompatibles, el tubo polínico es inhibido en el tercer segmento superior del estilo y no logra alcanzar el ovario. Mientras que en la familia Papaveraceae la inhibición se produce en el estigma (de Nettancourt, 2001).

### a) Sistema de autoincompatibilidad en Papaveraceae

La especie más estudiada de este género es *Papaver rhoeas*. La reacción de rechazo del polen ocurre en la superficie estigmática del pistilo. A diferencia de los sistemas de AI gametofítica

dependientes de S-RNAsas, en esta familia no se requiere ningún componente adicional no ligado al locus *S* (McClure y Franklin-Tong, 2006). La determinante femenina es una proteína de 15 kDa y debido a que no tiene ninguna homología con proteínas de función conocida, es denominada PrsS (*Papaver rhoeas stigma S* determinant). Las proteínas PrsS son altamente polimórficas y comparten un 51-63% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos (Poulter *et al.*, 2011). Bajo condiciones *in vitro*, las proteínas PrsS recombinantes producidas en *Escherichia coli* inhiben la germinación del polen de una manera alelo *S* específica, de esta forma se concluyó que PrsS es la determinante femenina (Foote *et al.*, 1994; Franklin-Tong, 2008). En cuanto a la determinante masculina PrpS (*P. rhoeas pollen S* determinant) se predice que es un receptor que interacciona con PrsS de manera *S* específica; sin embargo, no se ha identificado su función con precisión. El análisis de la secuencia predice que PrpS es una proteína muy hidrofóbica con cruces transmembranales y existe evidencia experimental que respalda esta predicción (Wheeler *et al.*, 2010). PrpS tiene un pequeño dominio extracelular que interacciona con PrsS y que está involucrado en el mecanismo de AI (Poulter *et al.*, 2011).

Como se muestra en la Figura 3, el reconocimiento alelo *S* específico entre las determinantes (PrpS y PrsS) causa un rápido incremento en el  $Ca^{+2}$  intracelular en el tubo polínico, el cual funciona como segundo mensajero. Dentro de los primeros 90 segundos, dos pirofosfatasas inorgánicas solubles o sPPasas (Pr-p26.1a y Pr-p26.1b) son fosforiladas de manera dependiente de  $Ca^{+2}$  intracelular (Rudd *et al.*, 1996), la fosforilación de estas proteínas reduce la actividad de pirofosfatasa (catálisis de pirofosfato a fosfato, esencial en el anabolismo celular) (de Graaf *et al.*, 2006). Otro blanco en la reacción de AI involucra el citoesqueleto de actina, el cual tiene un papel crítico en la regulación del crecimiento del tubo polínico (Gibbon *et al.*, 1999). La AI induce alteraciones rápidas (aproximadamente 1 min después de la respuesta de AI) en la organización de los filamentos de actina (Snowman *et al.*, 2002); la proteína PrABP80 (*P. rhoeas Actin-Binding Protein* 80) con propiedades de gelsolina dependiente de  $Ca^{+2}$ , se ha propuesto como candidata para estas alteraciones (Huang *et al.*, 2004). La AI además produce la despolimerización de microtúbulos (Poulter *et al.*, 2008). Una MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) llamada p56, es activada por la respuesta de AI. La cascada de MAPK actúa como una red universal de transducción de señales que conecta diversas cascadas de señalización. La activación de p56 se da después de 10 minutos de la respuesta de AI (Poulter *et al.*, 2011). Estos eventos contribuyen a la muerte celular programada (por sus siglas en inglés, PCD) del tubo polínico (Franklin-Tong, 2008). En la

AI, la PCD es una estrategia para destruir específicamente el polen no deseado (Takayama e Isogai, 2005). La respuesta de AI se encuentra acompañada por la despolarización de la membrana mitocondrial, conduciendo a la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol, la activación de proteínas tipo caspasas (DEVDasa/ tipo caspasa-3), que son proteasas que median la ruptura de numerosos sustratos, dentro de los que se encuentran inhibidores de nucleasas (Thomas y Franklin-Tong, 2004; Bosch y Franklin-Tong, 2008), provocando la fragmentación del DNA nuclear (Jordan *et al.*, 2000). Finalmente, todos estos eventos conducen a la muerte del tubo polínico incompatible.

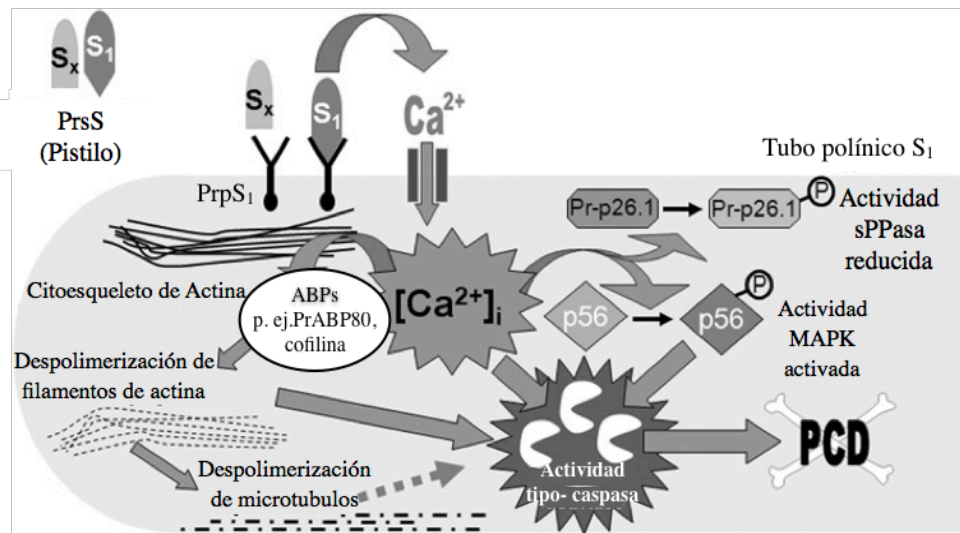


Figura 3. Modelo de rechazo del polen en *Papaver* (modificada Poulter *et al.*, 2011). Cuando las proteínas PrsS secretadas por el estigma interaccionan de forma *S* específica con la determinante masculina PrpS, se desencadena la cascada de AI, la cual es mediada por el Ca<sup>2+</sup> intracelular, primero las pirofosfatasa Pr-p26.1a/b son fosforiladas, inhibiendo su actividad y disminuyendo la capacidad biosintética del polen, posteriormente se despolimerizan los filamentos de actina y microtubulos, este proceso es mediado por proteínas de unión a actina (profilina y PrABP80). Posteriormente una MAPK, p56, es activada, así como la actividad de proteínas tipo caspasa, provocado PCD en el tubo polínico, asegurando que la fecundación no ocurra en cruza AI.

### b) Sistema de autoincompatibilidad en Solanaceae

En Solanaceae la respuesta de AI se caracteriza porque tanto los granos de polen compatibles como los incompatibles son hidratados y tienen una germinación normal. Sin embargo, el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles es inhibido en el tercer segmento superior del estilo. La inhibición es caracterizada por la deposición anormal de calosa en la pared del tubo polínico, el engrosamiento de la pared celular, hinchazón y la consecuente ruptura de la punta del tubo polínico (Goring y Silva, 2001; Hancock *et al.*, 2005; Franklin-Tong, 2008). El sistema de AI gametofítico en la familia Solanaceae, está controlado por el locus multialélico



*S*, el cual contiene el gen de la determinante femenina o *S-RNasa* (Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994) y uno o varios genes ortólogos de proteínas de caja F o *S-locus F box (SLFs)* que son expresados en el polen y fungen como la determinante masculina (Kubo *et al.*, 2010). La interacción entre las determinantes establece si una cruce es compatible o incompatible (de Nettancourt, 2001).

### **(1) S-RNasa o determinante S femenina**

En 1981 Bredimeijer y Blaas identificaron en *N. alata* glicoproteínas específicas del pistilo, las cuales cosegregaban con un haplotipo *S*. Estas proteínas mostraron actividad de ribonucleasa, por lo que fueron nombradas S-RNasas (McClure *et al.*, 1989). Estas ribonucleasas se expresan exclusivamente en el pistilo y se localizan abundantemente en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo; tejido por el que los tubos polínicos crecen para llegar al ovario (Newbiggin *et al.*, 1993). Las S-RNasas tienen su máxima expresión en la anthesis, que es el momento en el que la flor abre y expone su estigma para recibir el polen (Bernatzky, 1993; Murfett *et al.*, 1994). Experimentos de pérdida y ganancia de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* y *Petunia* demuestran que las S-RNasas determinan la respuesta de AI en el pistilo (Huang *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994). Por ejemplo, la transformación de los híbridos de *N. langsdorffii* x *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  que expresan los transgenes que codifican a la  $S_2$ -RNasa o a la  $S_{C10}$ -RNasa, rechazan el polen  $S_{A2}$  o  $S_{C10}$ , un fenotipo que las plantas sin transformar no presentan (Murfett *et al.*, 1994; 1996).

Las S-RNasas son proteínas altamente divergentes, tienen un rango de similitud de secuencia de 38-98%. A pesar de esta amplia diversidad en su secuencia, estas proteínas contienen cinco regiones conservadas (C1-C5) y dos dominios hipervariables (HVa y HVb) (Ioerger *et al.*, 1991). Las regiones C1, C4 y C5 estabilizan el centro catalítico de la proteína, debido a que comparten de 7 a 10 residuos de cisteínas que están relacionados con la formación de cuatro puentes disulfuro (Ida *et al.*, 2001). Las regiones C2 y C3 comparten un alto grado de similitud con las correspondientes regiones de la RNasa T2 y de otras RNasas. En estas regiones se encuentran dos histidinas conservadas (His32 e His90) (Ioerger *et al.*, 1991) que están involucradas en la catálisis, dado que cuando son reemplazadas mediante mutagénesis dirigida las plantas transgénicas con la S-RNasa mutada son incapaces de rechazar su propio polen, debido a la imposibilidad de la S-RNasa para degradar el RNA del tubo polínico. Esta fue una evidencia sólida de que la actividad de ribonucleasa es necesaria en la respuesta de AI

(Huang *et al.*, 1994). Los dominios hipervariables (HVa y HVb), están formados por “loops” cargados positivamente seguidos de una  $\alpha$  hélice y una pequeña región cargada negativamente. Se sugiere que las regiones HV juegan un papel importante en la interacción haplotipo *S* específico con SLF (Ida *et al.*, 2001).

Hasta el momento, se conoce que las S-RNAsas entran a los tubos polínicos tanto en cruza compatibles como incompatibles y son almacenadas en las vacuolas de los tubos polínicos. En cruza incompatibles, se observa la ruptura de las vacuolas (por un mecanismo desconocido) liberando su contenido en el citoplasma de los tubos polínicos, donde las S-RNAsas degradan el RNA e inhiben su crecimiento. Mientras que en una cruce compatible estos compartimentos vacuolares se mantienen estables, permitiéndole a los tubos polínicos alcanzar el ovario (Goldraj *et al.*, 2006).

## (2) SLF o determinante *S* masculina

La determinante masculina codifica para proteínas citosólicas específicas de polen y tubos polínicos conocidas como SLFs (Sijacic *et al.*, 2004); las cuales tienen una caja F en su extremo amino terminal (Lai *et al.*, 2002; Entani *et al.*, 2003; Ushijima *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Sijacic *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2004). La mayoría de las proteínas con caja F son componentes del complejo SCF (Skp1, Culina-1, proteína con caja-F) E3 ligasa, el cual está involucrado en la ubiquitinación de proteínas para su degradación por el proteosoma 26S (Qiao *et al.*, 2004; Hua y Kao, 2008; Williams *et al.*, 2015). Dentro del complejo SCF, Culina-1 (Cul-1) es una proteína de andamiaje, Skp1 funciona como un adaptador que conecta a Cul-1 con la proteína de caja F, que reconoce y recluta a la proteína blanco (Vierstra, 2003; Xu *et al.*, 2009). Evidencia experimental soporta los datos de la formación de un complejo tipo-SCF, ya que SLF en *Antirrhinum hispanicum* (Huang *et al.*, 2006) y *Petunia inflata* (Zhao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014) interacciona con SSK1 (proteína tipo-Skp1) y a su vez SSK1 interacciona con una proteína tipo-Cul-1 (Huang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014).

Muchos genes *SLF* han sido identificados en el locus *S* de Solanaceae y Rosaceae (subfamilia Maloideae) (Wang *et al.*, 2004; Wheeler y Newbigin, 2007; Ashkani y Rees, 2016). En particular en los haplotipos  $S_2$  y  $S_3$  de *P. inflata*, se han identificado 17 genes *SLF* que colaboran en el reconocimiento y detoxificación de S-RNAsas con un haplotipo *S* diferente (Sijacic *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2015). Basados en esta evidencia, se

ha propuesto que múltiples proteínas SLF colaborativamente reconocen S-RNasas no específicas, las cuales serán ubiquitinadas y degradadas mediante el proteosoma 26S; permitiendo que solo las S-RNasas con un haplotipo *S* específico ejerzan su efecto citotóxico en el tubo polínico (Kubo *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2015).

### (3) Genes modificadores

A pesar de que la especificidad del rechazo del polen depende de la interacción haplotipo *S* específica entre SLFs y S-RNasa, otros genes fuera del locus *S* también son requeridos para el rechazo del polen en la mayoría de las especies con sistemas de incompatibilidad basados en S-RNasa. Estos factores son conocidos como genes modificadores y se clasifican en tres grupos (McClure *et al.*, 2000):

- El grupo I está integrado por factores que afectan directamente la expresión de las determinantes de especificidad (*S-RNasa* y *SLFs*). Un ejemplo de este grupo de genes lo describieron Tsukamoto *et al.* (1999; 2003) en una población silvestre de *P. axillaris*, que segrega plantas AI y AC; estos autores encontraron que la expresión de la *S*<sub>13</sub>-RNasa está suprimida en las plantas AC debido a un gen modificador denominado *MDF* (*Modifier*).
- El grupo II está compuesto por factores que interactúan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad sin afectar su expresión; por lo tanto, son factores que se requieren particularmente para el rechazo del polen. Algunos ejemplos de genes modificadores pertenecientes a este grupo son: HT-B (*H-Top Band*; McClure *et al.*, 1999), 120K (*120 kDa glycoprotein*; Hancock *et al.*, 2005), NaStEP (*N. alata Stigma Expressed Protein*; Jiménez-Durán *et al.*, 2013) y MdABCF (*Malus domestica ABCF transporter*; Meng *et al.*, 2014).
- El grupo III incluye genes que participan tanto en la respuesta de AI como en procesos generales de la polinización y la interacción polen-pistilo. En este grupo podrían clasificarse a las proteínas TTS (*Transmitting Tissue Specific*; Cheung *et al.*, 1995), PELPIII (*class III Pistil-specific Extensin-like Protein*; de Graaf *et al.*, 2003), NaTrxh (*N. alata Thioredoxin type h*; Juárez-Díaz *et al.*, 2006), SBP1 (*S-RNase Binding Protein 1*; O'Brien *et al.*, 2004; Hua y Kao, 2006) y NaPEPII (*N. alata Pistil Expressed Protein II*; Bravo-Alberto *et al.*, no publicado).

De los tres grupos de genes modificadores descritos a la fecha solo se ha evaluado la participación en el mecanismo de AI mediante experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de: *HT-B*, *120K*, *NaStEP* y *MdABCF*; de los cuales se realiza la siguiente descripción:

#### **(a) HT-B**

La proteína HT-B es una proteína de 8,6 kDa, con un dominio constituido de 20 residuos de asparagina y ácido aspártico hacia el extremo carboxilo (Kondo y McClure, 2008). HT-B fue identificada por su expresión diferencial en estilos maduros de *N. alata* (especie AI) pero no en aquellos de *N. plumbaginifolia* (especie AC) (McClure *et al.*, 1999) y se ha descrito en tres géneros de la familia Solanaceae: *Solanum* (O'Brien *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2002a), *Nicotiana* (McClure *et al.*, 1999) y *Petunia* (Sassa e Hirano, 2006). Kondo *et al.*, (2002b) determinaron que, aunque *HT-B* también está presente en especies AC de *Lycopersicon*, su secuencia contiene codones de paro prematuros, por lo que es poco probable sintetizar una proteína funcional. Experimentos para suprimir la expresión de HT-B mediante un RNA interferente (RNAi) mostraron que las plantas transgénicas de *Solanum* (O'Brien *et al.* 2002), *Nicotiana* (McClure *et al.*, 1999) y *Petunia* (Puerta *et al.*, 2009), fueron incapaces de rechazar su propio polen.

Experimentos de inmunolocalización en *Nicotiana* demuestran que HT-B ingresa tanto a los tubos polínicos compatibles como incompatibles. En cruza incompatibles la cantidad de HT-B en los tubos polínicos disminuye aproximadamente un 50%; mientras que en cruza compatibles, la cantidad de HT-B dentro de los tubos polínicos disminuye entre 75- 97% (Goldraj *et al.*, 2006; Jiménez Durán *et al.*, 2013).

#### **(b) 120K**

Es una arabinogalactoproteína de 120 kDa, que se localiza en la matriz extracelular del estilo de *Nicotiana* (Hancock *et al.*, 2005) y es tomada por los tubos polínicos en crecimiento (Lind *et al.*, 1994, 1996), donde es localizada en compartimentos vacuolares (Goldraj *et al.*, 2006). La función de 120K fue probada mediante su supresión por RNAi. El fenotipo observado en las plantas transgénicas fue la incapacidad de rechazar el polen con el mismo haplotipo S que

el pistilo receptor, poniendo de manifiesto la participación de 120K en la AI (Hancock *et al.*, 2005).

Experimentos de interacción proteína- proteína *in vitro*, dan evidencia de la formación de complejos de 120K con proteínas estilares, como S-RNasas, NaPELP III y Nap11 (Cruz-García *et al.*, 2005) y con la proteína de polen NaPCCP (*N. alata* pollen C2 domain-containing protein), la cual se asocia al sistema endomembranoso vía fosfatidilinositol 3-fosfato (Lee *et al.*, 2008; 2009).

### (c) MdABCF

Es una proteína que pertenece a la familia de transportadores ABC subfamilia F y se localiza en la membrana de los tubos polínicos de manzana (*Malus domestica*, Rosaceae). Experimentos de interacción proteína-proteína demostraron su interacción con S-RNasas, para asistir en la entrada de la determinante femenina a los tubos polínicos de manera *S* inespecífica (Meng *et al.*, 2014). Debido a las dificultades para obtener plantas transgénicas de manzana (largos periodos de desarrollo y floración tardía), se decidió utilizar como modelo a *P. inflata* para evaluar la función de ABCF en la AI. Experimentos para suprimir la expresión de *PiMABCF* mediante RNAi, mostraron que las plantas transgénicas de *P. inflata* no son capaces de rechazar su propio polen, confirmando el papel de ABCF en el mecanismo de AI; debido a la imposibilidad de las S-RNasas para ingresar a los tubos polínicos.

### (d) NaStEP

Es una proteína abundante y específica de estigmas maduros de especies AI de *Nicotiana* (Busot *et al.*, 2008). En células estigmáticas maduras, NaStEP es almacenada en las vacuolas, pero después de la polinización, esta proteína es liberada y relocalizada en el exudado estigmático (Busot *et al.*, 2008). Una vez en el exudado estigmático, NaStEP entra a los tubos polínicos sin importar su haplotipo *S*; mediante ensayos de inmunohistoquímica de pistilos polinizados se detectó la señal de NaStEP se asocia al sistema endomembranoso del tubo polínico, así como en al citoplasma y al lumen vacuolar (Jiménez-Durán, 2013).

NaStEP es homólogo a los inhibidores de proteasa tipo Kunitz (Busot *et al.*, 2008) e inhibe de manera específica a las proteasas de serina (Jiménez-Durán *et al.*, 2013, Cruz-González, no

publicado); hasta el momento se desconoce si la actividad de inhibidor de proteasa es requerida en el mecanismo de rechazo del polen. Experimentos de pérdida de función mediante RNAi en plantas transgénicas de *Nicotiana* demostraron que cuando *NaStEP* se encuentra silenciado, se pierde la capacidad de rechazar el polen con el mismo haplotipo *S* que el pistilo, lo que indica que *NaStEP* es esencial en el rechazo del polen en *Nicotiana* (Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

Además *NaStEP* es una proteína requerida para la estabilidad de HT-B en los tubos polínicos por un mecanismo aun no identificado, ya que en un entorno genético con *NaStEP* silenciado, la proteína HT-B se degrada tanto en los tubos polínicos de cruza incompatibles como de compatibles (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Esta evidencia sugiere una interacción entre estos dos genes modificadores en algún punto de la vía de rechazo del polen en *Nicotiana*.

A pesar de las evidencias descritas arriba, se desconoce cual es el papel de *NaStEP* en el mecanismo de AI, por lo que se propuso que la función de *NaStEP* depende de la interacción física con proteínas del polen; para lo cual se realizaron ensayos de doble híbrido en levadura, llevando a cabo un tamizaje de una biblioteca de cDNA de polen-tubos polínicos de *N. glauca* y usando como carnada a *NaStEP*; se encontró que *NaStEP* interacciona con el carboxilo terminal de una proteína específica de polen tipo-transportador de fosfatos (C1-21) (García-Valencia, 2013).

#### **(4) Modelos de rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasas**

La interacción *S* específica entre la S-RNasa y SLFs desencadena la cascada bioquímica que conduce al rechazo del polen. Las S-RNasas actúan como citotoxinas para degradar el RNA del tubo polínico con el mismo haplotipo *S* y de esta manera inhiben su crecimiento. Sin embargo, el mecanismo exacto de cómo se lleva a cabo el rechazo del polen aún no es del todo claro. Para explicar lo anterior se han propuesto diferentes modelos, los principales son:

##### **(a) Modelo colaborativo de degradación**

Este modelo se basa fundamentalmente en la potencialidad que tiene SLF de participar en la vía de degradación de proteínas mediante el proteosoma 26S. Debido a que la mayoría de las

proteínas con caja F son componentes del complejo SCF, el cual está involucrado en la ubiquitinación específica y degradación de proteínas blanco (Hua *et al.*, 2006). Kubo *et al.*, (2010) propusieron un modelo colaborativo de degradación de las S-RNasas; en donde SLF interactúa con un sub-conjunto de S-RNasas con un haplotipo *S* diferente para mediar su ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S (Figura 4). Este modelo es radicalmente diferente a los sistemas de AI que poseen las familias Brassicaceae y Papaveraceae, donde las determinantes son codificadas por un solo gen y la interacción *S* específica entre las determinantes desencadena la respuesta de rechazo del polen.

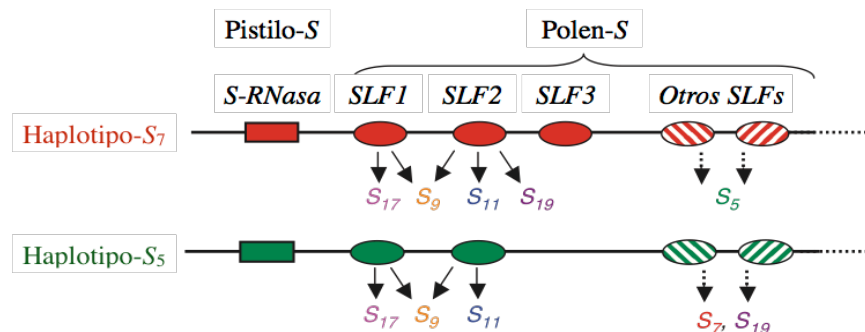


Figura 4. Modelo colaborativo de degradación (modificado Kubo *et al.*, 2010). En el locus *S* de Solanaceas se ha encontrado un solo gen de *S-RNasa* o determinante femenina (representado con un rectángulo) y múltiples genes *SLFs* o determinante masculina (representados con óvalos). Para cada haplotipo *S*, los productos de *SLFs* son responsables de detoxificar una o más de las variantes alélicas de *S-RNasa* (indicadas con flechas sólidas). Con flechas punteadas se muestran los posibles blancos de los productos de *SLFs*. La localización de estos *SLFs* aun no ha sido determinada, pero por conveniencia son colocados en grupos.

### (b) Modelo del secuestro de las S-RNasas

Este modelo propuesto por Goldraij *et al.* (2006), se basa en el hecho de que las S-RNasas se introducen desde la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo al tubo polínico posiblemente por endocitosis sin importar su haplotipo *S*. Como se muestra en la Figura 5, las S-RNasas junto con 120K son transportadas a compartimentos vacuolares del tubo polínico. HT-B también es incorporada al tubo polínico, aunque se desconoce su localización. Bajo este modelo, HT-B juega un papel importante en el rechazo del polen, ya que se propone que como consecuencia de la interacción *S* inespecífica entre S-RNasa-SLF, HT-B es degradada por una proteasa hipotética del polen durante una cruce compatible; sin embargo, si la cruce es incompatible la interacción S-RNasa-SLF es *S* específica, promoviendo directa o indirectamente la estabilización de HT-B, posiblemente por la degradación de la proteasa hipotética del polen, lo que suscitará que las membranas vacuolares (donde se encuentran

compartimentalizadas las S-RNasas) sean degradadas, liberando a las S-RNasas al citoplasma del tubo polínico, en donde ejecutarán su acción citotóxica, inhibiendo el crecimiento del tubo polínico.

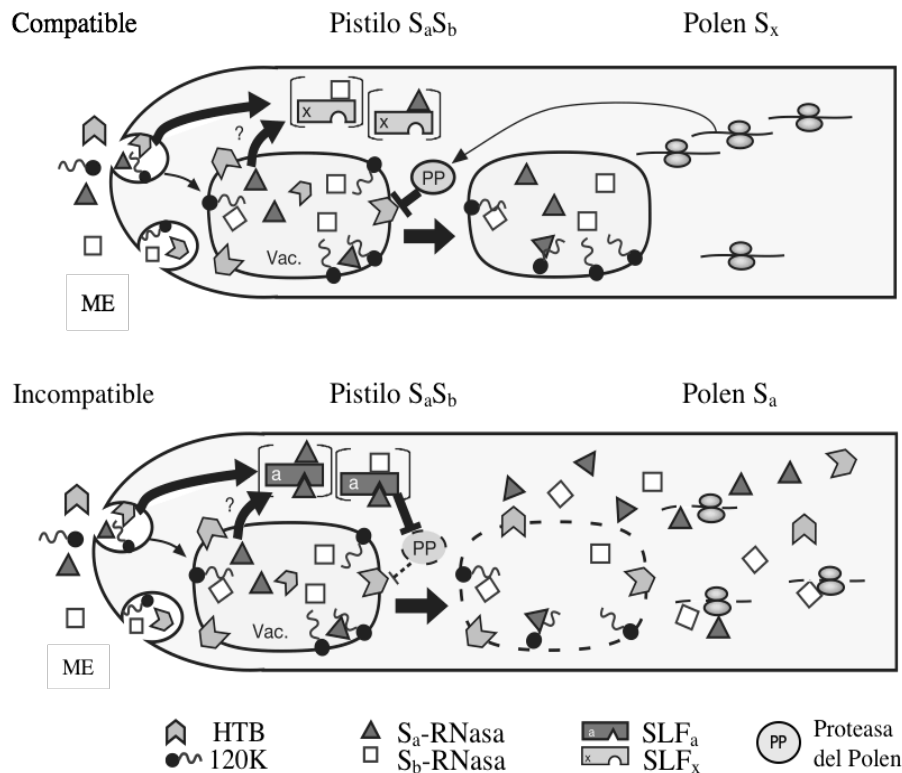


Figura 5. Modelo de compartimentalización de S-RNasas (Modificado de Goldraij *et al.*, 2006). Arriba se observa una cruz compatible, las S-RNasas entran al tubo polínico por endocitosis y se almacenan en compartimentos vacuolares, junto con HT-B y 120K. Posteriormente, ocurre la degradación de HT-B por una proteasa hipotética del polen (PP) y se mantienen los compartimentos vacuolares, donde se encuentran confinadas las S-RNasas. Abajo se representa una cruz incompatible, donde se observa el ingreso de las S-RNasas por endocitosis y su almacenamiento en las vacuolas; sin embargo, a diferencia de una cruz compatible, HT-B se mantiene estable, posiblemente por la degradación de la proteasa hipotética PP del polen y se liberan las S-RNasas de las vacuolas al citoplasma del tubo polínico y por ende, ocurre la degradación de RNA del tubo polínico, inhibiendo su crecimiento.

**(c) ¿Qué se conoce hasta ahora en el mecanismo de AI en sistemas basados en S-RNasas?**

Sin duda los modelos propuestos dejan a la vista diversas preguntas por contestar, por ejemplo, en el modelo de Goldraij *et al.* (2006) no es claro como se podría dar la interacción entre S-RNasa y SLFs, ni como esta interacción controla la ruptura vacuolar y como afecta la estabilidad de HT-B. Además se propone que una proteasa hipotética del polen es la encargada de regular la estabilidad de HT-B, dicha proteasa no ha sido identificada. Por otro lado, el modelo colaborativo de la degradación no menciona la participación de los genes



modificadores, ni la compartimentalización de las S-RNAsas. Debido a las interrogantes que existen en estos modelos, la Figura 6 incorpora los sucesos que hasta el momento se conocen en el mecanismo de rechazo del polen en la familia Solanaceae. En este esquema, los granos de polen llegan al estigma, germinan sin importar su haplotipo *S* y los tubos polínicos se dirigen al ovario a través del tejido de transmisión del estilo. Durante esta jornada, los tubos polínicos van incorporando a su citoplasma, proteínas como las S-RNAsas, 120K, HT-B, y NaStEP (Goldraj *et al.*, 2006; Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Las S-RNAsas son incorporadas a los tubos polínicos a través del transportador *ABCF* (Meng *et al.*, 2014). Algunas proteínas como las S-RNAsas son compartimentalizadas en las vacuolas de los tubos polínicos; proteínas como 120K se mantienen asociadas con el sistema endomembranoso del tubo polínico (Goldraj *et al.*, 2006).

La interacción *S* específica entre S-RNasa y SLF en una cruce incompatible estabiliza a la proteína HT-B en los tubos polínicos a través de NaStEP por un mecanismo aún no identificado (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). La estabilidad de HT-B directa o indirectamente ocasiona la liberación masiva de las S-RNAsas al citoplasma de los tubos polínicos por la ruptura vacuolar que las contiene; lo cual es precedido por la desorganización de los filamentos de actina (Roldán *et al.*, 2012). Una vez en el citoplasma del tubo polínico las S-RNAsas actúan como citotoxinas degradando su RNA, inhibiendo su crecimiento y ocasionando eventualmente su muerte.

Por otro lado, en una cruce compatible, la interacción entre la S-RNasa y SLFs no es *S* específica, provocando la ubiquitinación de S-RNAsas que pueden encontrarse en el citoplasma e induciendo su degradación por el proteosoma 26S. NaStEP será degradada, inactivada o secuestrada como consecuencia de la interacción SLF y S-RNasa no *S* específica (Jiménez-Durán, 2013). En esta situación, las vacuolas que contienen a las S-RNAsas permanecen intactas, HT-B es degradada dentro del tubo polínico y los tubos polínicos pueden continuar su crecimiento por la matriz extracelular para fecundar al óvulo.

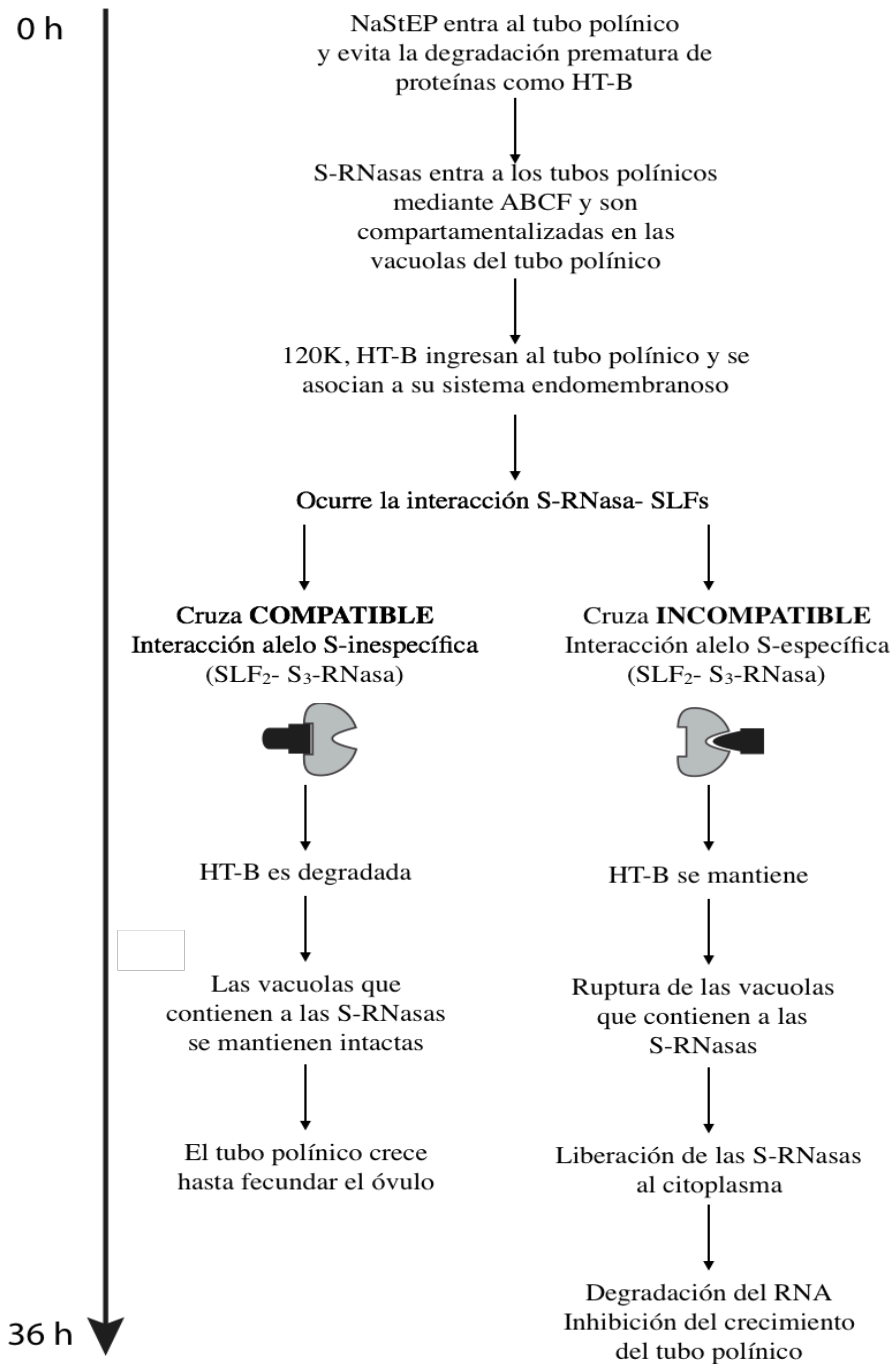


Figura 6. Esquema de los hechos conocidos en la AI dependiente de S-RNasas. Se indica una línea de tiempo de 0 a 36 horas posteriores a la polinización y los diferentes eventos que han sido demostrados tanto en polinizaciones compatibles como en incompatibles (modificado García-Valencia *et al.*, 2013).

## II. ANTECEDENTES INMEDIATOS

A pesar de las evidencias genéticas y de biología celular conocidas sobre el papel de NaStEP en el rechazo del polen, su función bioquímica aún es desconocida. Por consiguiente, realizamos ensayos de doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae* para identificar las proteínas del polen con potencial de interacción con NaStEP. El ensayo reveló que NaStEP interacciona de manera específica con una proteína denominada C1-21 (Caja 1- Clona 21), la cual incluye una región homóloga al extremo carboxilo de un transportador de fosfatos de plantas (García-Valencia, 2013). Mediante ensayos de northern blot se determinó que el transcrito de *C1-21* se acumula específica y abundantemente en polen maduro de *Nicotiana glauca* y *N. glauca* (García-Valencia, 2013).

Mediante ensayos de RACE 5' (Rapid amplification of cDNA ends 5'), identificamos la secuencia desconocida de cDNA hacia el extremo 5' de *C1-21*. Al obtener la secuencia completa de cDNA, decidimos nombrarla *NaSIPP* (*N. glauca* Self-Incompatible Pollen Protein). *NaSIPP* codifica un péptido predicho de 353 aminoácidos, que presenta homología con los transportadores de fosfato mitocondrial (TFM), los cuales catalizan el transporte de fosfato citosólico al interior de la mitocondria junto con un protón (Pratt *et al.*, 1991), o el transporte antiporte de fosfato/ion hidroxilo (Stappen *et al.*, 1994). El fosfato, junto con el ADP, son esenciales para la producción de ATP durante la fosforilación oxidativa. El fosfato también participa en otras funciones, por ejemplo, en reacciones que requieren fosfato (las catalizadas por succinil-CoA) o en el reciclaje de su propio transportador (Palmieri, 2004).

Asimismo, determinamos que *NaSIPP* interacciona específicamente con NaStEP mediante ensayos de doble híbrido en levadura (García-Valencia *et al.*, 2017). La caracterización de *NaSIPP* y la determinación de si es un gen involucrado en el rechazo del polen es importante para el entendimiento del mecanismo bioquímico del sistema de AI en *Nicotiana*.

### **III. HIPÓTESIS**

La expresión específica y abundante de *NaSIPP* en polen maduro de *Nicotiana alata* y su interacción con NaStEP (gen modificador estigmático), indican que NaSIPP participa en la vía del rechazo del polen en *Nicotiana*.

## **IV. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar si NaSIPP está involucrado en la vía de rechazo del polen en *Nicotiana alata*.

### **Objetivos Particulares**

- Determinar la localización subcelular de NaSIPP en tubos polínicos.
- Evaluar si *NaSIPP* tiene actividad de transportador de fosfatos.
- Corroborar la interacción entre NaSIPP y NaStEP en células vegetales.
- Estudiar la expresión espacio- temporal de *NaSIPP* mediante RT-PCR.
- Determinar la participación de NaSIPP en la respuesta de rechazo del polen en *N. alata*.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Material biológico

#### 1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las plantas AI de *N. alata* (genotipos  $S_{A_2}S_{A_2}$  y  $S_{C_{10}}S_{C_{10}}$ ), AC de *N. tabacum* “*Praecox*” y AC de *N. glauca* han sido descritas previamente (Murfett *et al.*, 1994, 1996; Beecher y McClure, 2001). Las plantas AC de *N. plumbaginifolia* (No. de inventario TW107) y AI de *N. forgetiana* (No. de inventario TW50) fueron un regalo del laboratorio del Dr. Bruce McClure. Las plantas AI de *N. rastruensis* y AC de *N. benthamiana* han sido descritas previamente (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Plantas de *N. tabacum* var Petit Havana SR1 fueron utilizadas para la transformación de granos de polen. Todas las plantas de *Nicotiana* fueron crecidas bajo condiciones de invernadero a 16 h luz/ 8 h oscuridad.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) se incubaron en etanol absoluto durante 2 min y 8 min en 2 % de hipoclorito de sodio con 0.01 % de Triton X-100. Las semillas fueron enjuagadas con agua estéril, posteriormente tres veces con 0.5X de medio Murashige y Skoog (MS) pH 7.2 (Apéndice 1) y se mantuvieron en este medio durante 5 días a 4 °C en la oscuridad. Posteriormente las semillas fueron germinadas en una cámara a 22 °C, en un ciclo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.

#### 2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* BY4741 *MAT $\alpha$* ; *his3*  $\Delta$ 1; *leu2*  $\Delta$ 0; *met15*  $\Delta$ 0; *ura3*  $\Delta$  (WT) y BY4741 *MAT $\alpha$* ; *his3*  $\Delta$ 1; *leu2*  $\Delta$ 0; *met15*  $\Delta$ 0; *ura3*  $\Delta$ 0; YJR077c: kanMX4 ( $\Delta$ *mir1*) fueron usadas para los ensayos de complementación. Las cepas de levadura fueron un regalo del Dr. Salvador Uribe-Carvajal.

### B. Clonación de *NaSIPP*, *NaStEP*, *Pic2* y *Mir1* en el vector *pENTR<sup>TM</sup>-D-Topo*

El RNA total de granos de polen y de pistilos maduros de *N. alata* fue extraído con TRIzol<sup>TM</sup> (Invitrogen) mediante el protocolo establecido por el proveedor. 1  $\mu$ g de RNA total fue separado electroforéticamente en un gel de formaldehído (2 % de agarosa, 1.11 % de

formaldehído y 1X MOPS (0.02 M de MOPS, pH 7)), para verificar su integridad. Posteriormente 5 µg de RNA total fueron tratados con DNasa I (New England BioLabs) mediante el protocolo establecido por el proveedor. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 3 µg de RNA total tratado con DNasa I de acuerdo al protocolo de Transcriptasa Reversa M-MLV (Sigma). El cDNA de granos de polen de *N. alata* fue empleado como molde para la amplificación de *NaSIPP*, usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-CACCATGGCCTACACACACAACACT-3' y *reverse* 5'-CTTGGCAGGGGCAGGTG-3'. El cDNA de pistilos maduros de *N. alata* fue empleado como molde para la amplificación de *NaStEP*, usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-CACCATGTCATCTTTCACCTTCCA-3' y *reverse* 5'-TGCATCAGTCTTCTGGAATTTCTC -3'. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl (100 ng de cDNA, amortiguador de PCR, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, mezcla de oligonucleótidos 200 µM cada uno, 1 U Phusion DNA polimerasa y H<sub>2</sub>O) en un termociclador (T100<sup>TM</sup> Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 98 °C por 30 sec, 30 ciclos de temperatura de desnaturalización (98 °C) por 10 sec y una temperatura de extensión (72 °C) por 30 sec y un ciclo final de extensión (72 °C) por 5 min.

El RNA total de una suspensión de células de *S. cerevisiae* BY4741 WT (5 x 10<sup>6</sup> células) fue extraído con TRIzol<sup>TM</sup> (Invitrogen) mediante el protocolo establecido por el proveedor. 1 µg de RNA total fue separado electroforéticamente en un gel de formaldehído (2 % de agarosa, 1.11 % de formaldehído y 1X MOPS), para verificar su integridad. Posteriormente 5 µg de RNA total fueron tratados con DNasa I (New England BioLabs) mediante el protocolo establecido por el proveedor. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 3 µg de RNA total tratado con DNasa I de acuerdo al protocolo de Transcriptasa Reversa M-MLV (Sigma). El cDNA de *Pic2* fue amplificado usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-CACCATGGAGTCCAATAACAACC-3'; *reverse*, 5'-ATAAGAATGCGGCCGCCTAACCGGTGGTTGGTAA-3'. El cDNA de *Mir1* fue amplificado usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-CACCATGTCTGTGTCTGCT-3'; *reverse*, 5'-ATGACCACCACCACCAATTC-3'. Las condiciones de reacción y amplificación son las descritas arriba.

Los productos de PCR de *NaSIPP*, *NaStEP*, *Pic2* y *Mir1* fueron clonados en el vector *pENTR<sup>TM</sup>-D-TOPO* (Invitrogen) de acuerdo al protocolo establecido por el proveedor y se secuenciaron.

### C. Clonación de *NaSIPP* y *NaStEP* en el vector *pKSII*

El cDNA de granos de polen y pistilos maduros de *N. alata* fue obtenido como se describe arriba. El cDNA de granos de polen de *N. alata* fue empleado como molde para la amplificación de *NaSIPP*, usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-GGATCCATGGCCTACACACACAAC-3' y *reverse* 5'-GAATTCCTTGGCAGGGGCAGGTG-3'. La reacción de PCR se realizó bajo las condiciones descritas arriba. El cDNA de pistilos maduros de *N. alata* fue empleado como molde para la amplificación de *NaStEP*, usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-GGATCCATGTCATCTTCACTTCCA-3' y *reverse* 5'-GAATTCTGCATCAGTCTTCTGGAATTTCTC-3'. Las condiciones de reacción y amplificación son las descritas arriba. Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente y visualizados en un gel de agarosa al 1.5 %, posteriormente fueron escindidos del gel y purificados con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (ZymoResearch) de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor. Los fragmentos purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes como sigue: 500 ng de los cDNAs de *NaStEP* y *NaSIPP* con los sitios *BamHI/EcoRI* se digirieron con 10 U de *BamHI* (New England BioLabs) y 10 U de *EcoRI* (New England BioLabs) usando amortiguador NEB4 (New England BioLabs). Las digestiones se desarrollaron durante 3 h a 37 °C. De forma paralela, el plásmido *pKSII* fue digerido con las mismas enzimas de restricción usando condiciones idénticas. Los productos de las digestiones se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5 % y se purificaron siguiendo el mismo método empleado para la purificación de los productos de PCR. Una vez purificados, se realizaron dos reacciones de ligado usando la proporción de inserto/plásmido 2:1 aproximadamente. Los productos de PCR de digeridos con *BamHI* y *EcoRI* se ligaron al vector *pKSII* digerido con las mismas enzimas (50 ng de *pKSII*, 100 ng de inserto, amortiguador de la DNA ligasa T4 (Promega) y 1 U de DNA ligasa T4). Las reacciones de ligado se incubaron a 4 °C toda la noche. Una vez ligado cada inserto al vector (*NaSIPP:pKSII* y *NaStEP:pKSII*) se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con 5  $\mu$ l de la reacción de ligado de acuerdo al protocolo descrito por García-Valencia, 2013. Las células transformadas con la reacción de ligado fueron crecidas en placas con Luria-Bertani (LB) sólido (Apéndice 1) suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Se seleccionaron algunas colonias recombinantes, se purificó el plásmido con el kit Zyppy plasmid miniprep (ZymoResearch) de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor y se secuenció.



#### **D. Transformación de plántulas de *Arabidopsis thaliana***

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 llevando las construcciones de interés (especificadas posteriormente) fueron crecidas en un primer ciclo (20 h, 200 rpm, 28 °C) en 5 ml de medio LB con 50 µg ml<sup>-1</sup> de rifampicina y 100 µg ml<sup>-1</sup> de espectinomicina. Un segundo ciclo de crecimiento se inició con la inoculación del primer cultivo en una dilución 1:1000 en medio LB con 50 µg ml<sup>-1</sup> de rifampicina y 100 µg ml<sup>-1</sup> de espectinomicina; hasta una DO<sub>600</sub> 1.5- 2.0. Las bacterias fueron colectadas y resuspendidas en 10 mM de MgCl<sub>2</sub> con 100 µM de acetosiringona (3, 5-dimetoxi- acetofenona; Sigma-Aldrich) y se incubó en oscuridad y con agitación por 1 h. Después, las bacterias fueron colectadas y resuspendidas en 0.5X MS pH 7.2 con 0.003 % de Sylwett-77 para obtener una DO<sub>600</sub> 0.5 (Campanoni *et al.*, 2007). Finalmente las plántulas de 3 días de *A. thaliana* fueron cocultivadas con la suspensión de bacterias en condiciones de oscuridad a 22 °C durante 24- 72 h.

#### **E. Bombardeo de granos de polen de *Nicotiana***

Cinco miligramos de polen maduro de *Nicotiana* (8 x 10<sup>5</sup> células, contadas con TC20TM®, Bio-Rad) fueron resuspendidos en 500 µl de medio para germinación de tubos polínicos líquido (Apéndice 1), descrito por Cheung *et al.*, (2002). La suspensión de granos de polen fue dispersada en cajas Petri de 35 mm que contenían medio para germinación de tubos polínicos sólido (Apéndice 1). Después, los granos de polen fueron bombardeados dos veces con el equipo Bio-Rad Biolistic® PDS-1000/He, de acuerdo a Chen *et al.*, (2002) y con el protocolo sugerido del equipo Bio-Rad (Apéndice 2). Posteriormente los granos de polen fueron colocados en portaobjetos con medio para germinación de tubos polínicos sólido. Los portaobjetos se mantuvieron en una cámara húmeda a 26-28 °C en oscuridad. Los tubos polínicos fueron observados después de 8-12 h de germinación. Para cada muestra se contó un promedio de 25 tubos polínicos transformados, a menos que se indique lo contrario. El promedio de la eficiencia de transformación fue de 0.003 %. Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

#### **F. Localización subcelular de NaSIPP**

##### **1. Expresión en tubos polínicos de *N. tabacum***

Se realizó una digestión con las enzimas de restricción *BamHI/EcoRI* para: 1) liberar el fragmento de *NaSIPP* del vector *NaSIPP-pKSII*, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente y 2) linearizar el vector *Lat52::SMC:Tomato* (SMC, Sitio múltiple de clonación; Chen *et al.*, 2002), de forma tal para generar la construcción *Lat52::NaSIPP:Tomato*. Dicha construcción fue empleada para expresar a la proteína NaSIPP fusionada a la proteína roja fluorescente Tomato (Shaner *et al.*, 2004), bajo el control del promotor específico de polen *Lat52* (Twell *et al.*, 1989). Posteriormente 2 µg de esta construcción se mezclaron con 1 µg de la construcción *Lat52::Mit:GFP* (Secuencia de señalización mitocondrial fusionada al extremo amino de GFP; Logan y Leaver, 2000). Se prepararon partículas de tungsteno recubiertas con el DNA, mezclando 10 µl de espermidina (0.1 M), 25 µl CaCl<sub>2</sub> (2.5 M) y 25 µl de partículas de tungsteno (60 mg ml<sup>-1</sup>). Las partículas recubiertas de DNA fueron usadas para bombardear granos de polen de *N. tabacum*; los cuales se germinaron de acuerdo a las condiciones descritas arriba. Se evaluó la colocación de la fluorescencia de las proteínas de fusión NaSIPP-Tomato y Mit-GFP en los tubos polínicos, mediante la observación en el microscopio confocal Nikon E800. Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

## **2. Expresión en plántulas de *A. thaliana***

Se realizó una digestión con las enzimas de restricción *BamHI/EcoRI* para: 1) liberar el fragmento de *NaSIPP* del vector *NaSIPP-pKSII*, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente y 2) linearizar el vector *35S::SMC:GFP* (Cheung *et al.*, 2002), de forma tal para generar la construcción *35S::NaSIPP:GFP*. Dicha construcción fue usada para transformar células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101; las bacterias transformadas fueron empleadas para transformar plántulas de *A. thaliana* (protocolo descrito arriba). Las plántulas tratadas con las células de *A. tumefaciens* fueron incubadas con una disolución 20 nM MitoTracker Red FM (Invitrogen) en oscuridad durante 15 minutos y a temperatura ambiente. Las plántulas fueron observadas inmediatamente en el microscopio confocal Olympus FV1000. Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

## **G. Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC)**

### **1. Expresión en tubos polínicos *N. tabacum***

Se realizó una digestión con las enzimas de restricción *BamHI/EcoRI* para: 1) liberar el fragmento de *NaSIPP* del vector *NaSIPP-pKSII* y a *NaStEP* del vector *NaStEP-pKSII*, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente y 2) linearizar el vector *Lat52::SMC:CV* y *Lat52::SMC:NV* (Chen *et al.*, 2002), de forma tal para generar las construcciones *Lat52::NaSIPP:CV* y *Lat52::NaStEP:NV* y obtener las proteínas de fusión NaSIPP- Extremo carboxilo de Venus (CV) y NaStEP- Extremo amino de Venus (NV). También se realizaron las construcciones para generar las proteínas de fusión hacia el animo terminal (*Lat52::NV:NaStEP* y *Lat52::CV:NaSIPP*). Se prepararon partículas de tungsteno recubiertas con una mezcla de 3 µg de cada construcción, 10 µl de espermidina (0.1 M), 25 µl CaCl<sub>2</sub> (2.5 M) y 25 µl de partículas de tungsteno (60 mg ml<sup>-1</sup>). Las partículas recubiertas de DNA fueron usadas para bombardear granos de polen de *N. tabacum*; los cuales se germinaron de acuerdo a las condiciones descritas arriba. El restablecimiento de la fluorescencia de la proteína Venus en los tubos polínicos fue observada en el microscopio confocal Nikon E800. Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

Como controles para confirmar que la fluorescencia observada en el ensayo de BiFC era debido a la interacción específica de las proteínas NaSIPP y NaStEP; se cobombardearon granos de polen con las construcciones NaStEP-NV y vector vacío (CV); NaSIPP-CV y vector vacío (NV), tal como se describe arriba. Al igual se realizó el cobombardeo con las construcciones NV-NaStEP y vector vacío (CV); CV-NaSIPP y vector vacío (NV). Para evaluar la presencia/ ausencia de fluorescencia, se efectuó un tamizaje rápido (objetivo 10x) observando todos los portaobjetos donde se germinaron los granos de polen y posteriormente se realizó un tamizaje mas detallado (objetivo 40x) en la búsqueda de fluorescencia. Un total de 200 tubos polínicos fue analizado. Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

## **2. Expresión en plántulas de *A. thaliana***

Con las construcciones de *NaSIPP:pENTR* y *NaStEP:pENTR* (descritas arriba), se realizó una reacción de recombinación LR en los vectores *pUBC-nYFP* y *pUBN-cYFP* (Grefen *et al.*, 2010) para generar las proteínas de fusión NaStEP-nYFP y NaSIPP-cYFP. También se realizaron las construcciones para generar las proteínas de fusión hacia el animo terminal (nYFP-NaStEP y cYFP-NaSIPP). Los análisis de BiFC fueron evaluados en plántulas de *A. thaliana* en base al protocolo de transformación descrito anteriormente. Las plántulas tratadas

con las células de *A. tumefaciens* fueron incubadas con una disolución 20 nM MitoTracker Red FM (Invitrogen) durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Las plántulas fueron observadas inmediatamente en el microscopio confocal Olympus FV1000. Para confirmar que la fluorescencia observada en el ensayo de BiFC era debido a la interacción específica de las proteínas NaSIPP y NaStEP, como controles se emplearon plántulas de *A. thaliana* cocultivadas con la suspensión de bacterias transformadas con NaStEP-nYFP y vector vacío (cYFP); NaSIPP-cYFP y vector vacío (nYFP). Al igual se cocultivaron las plántula de *A. thaliana* con las construcciones nYFP-NaStEP y vector vacío (cYFP); cYFP-NaSIPP y vector vacío (nYFP). Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

## **H. Coexpresión de NaSIPP y NaStEP en tubos polínicos de *N. tabacum***

Para este experimento, se cobombardearon granos de polen con 5 µg de la construcción *Lat52::NaSIPP::Tomato* y 7 µg de la construcción *Lat52::NaStEP::GFP*. Se prepararon partículas de tungsteno recubiertas con la mezcla de DNA, 10 µl de espermidina (0.1 M), 25 µl CaCl<sub>2</sub> (2.5 M) y 25 µl de partículas de tungsteno (60 mg ml<sup>-1</sup>). Las partículas recubiertas de DNA fueron usadas para bombardear los granos de polen de *N. tabacum*; los cuales se germinaron de acuerdo a las condiciones descritas arriba. Se evaluó la presencia de tubos polínicos que coexpresaran las proteínas de fusión NaSIPP-Tomato y NaStEP-GFP; la fluorescencia fue observada en el microscopio confocal Nikon E800. Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

## **I. Ensayos de complementación de la mutante *Δmir1* de *S. cerevisiae***

### **1. Plásmidos usados en los ensayos de complementación**

Las construcciones de *Pic2::pENTR*, *Mir1::pENTR* y *NaSIPP::pENTR* (descritas arriba) fueron usadas en reacciones de recombinación LR con el vector *pYES-DEST52*<sup>®</sup> (Invitrogen), de acuerdo al protocolo establecido por el proveedor. Posteriormente se transformaron células de *S. cerevisiae* BY4741 *Δmir1* con las construcciones de *NaSIPP*, *Pic2*, *Mir1* y vector vacío (*pYES-DEST52*<sup>®</sup>), de acuerdo al protocolo Yeastmaker<sup>™</sup> Yeast Transformation, Clontech. Las levaduras fueron crecidas en medio selectivo sin uracilo (-Ura, Clontech).

## 2. Condiciones de crecimiento de *S. cerevisiae*

Un precultivo de 5 ml de las cepas WT y *Δmir1* BY4741 fue crecido en medio YPD (fuente de carbono: glucosa, Apéndice 1) durante 24 h, a 30 °C, agitación de 200 rpm. Subsecuentemente se tomó una alícuota de 0.5 ml y se inocularon en 10 ml de medio YPGal (fuente de carbono: galactosa, Apéndice 1) y se incubaron durante 24 h, a 30 °C, agitación de 200 rpm. Posteriormente se tomó una alícuota de 0.5 ml y se inocularon en 10 ml de YPGli (fuente de carbono: glicerol, Apéndice 1); finalmente, las levaduras se incubaron durante 5 días a 30 °C con agitación (200 rpm). La evaluación del crecimiento se realizó cada 24 h determinando la DO<sub>600</sub>. Las levaduras transformadas fueron incubadas en 5 ml de medio SD-Ura (fuente de carbono: glucosa, Apéndice 1) durante 24 h, a 30 °C, 200 rpm. Posteriormente se tomó una alícuota de 0.5 ml y se inocularon en 10 ml de medio SGal-Ura (fuente de carbono: galactosa, Apéndice 1) y se incubaron durante 24 h, a 30 °C, agitación de 200 rpm. Subsecuentemente se tomó una alícuota de 0.5 ml y se inocularon en 10 ml de SGli-Ura (fuente de carbono: glicerol, Apéndice 1); finalmente, las levaduras se incubaron durante 5 días a 30 °C, agitación 200 rpm. La evaluación del crecimiento se realizó cada 24 h evaluando la DO<sub>600</sub>. Para la evaluación del crecimiento en medio sólido, se tomó una alícuota de 100 µl del cultivo de YPGal y SGal-Ura y se colocó en cajas de Petri que contenían medio sólido con glicerol (YPGli y SGli-Ura). Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

### J. Análisis de la expresión de *NaSIPP*

Se purificó RNA total de diferentes órganos de *N. alata* (pistilo, sépalo, pétalo, hoja, raíz y polen) y diferentes etapas de desarrollo de anteras de *N. alata* (A1: 0.5-1.0 cm, A2: 1.1-2.0 cm, A3: 2.1-3.5 cm, A4: 3.5-6.0 cm y A5: 6.0 cm-flor madura) utilizando TRIzol<sup>TM</sup> (Invitrogen) siguiendo el protocolo del proveedor. Al igual, se purificó RNA total de polen maduro (A5) de las siguientes especies: *N. alata*, *N. rastroensis*, *N. forgetiana*, *N. glauca*, *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* y *N. benthamiana*, utilizando TRIzol<sup>TM</sup> (Invitrogen) siguiendo el protocolo del proveedor. 1 µg de RNA total de cada muestra fue separado electroforéticamente en un gel de formaldehído (descrito arriba) para verificar su integridad. Posteriormente 5 µg RNA total fueron tratado con DNasa I (New England BioLabs) mediante el protocolo establecido por el proveedor. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 3 µg de

RNA total tratado con DNasa de acuerdo al protocolo de Transcriptasa Reversa M-MLV (Sigma).

El cDNA de *NaSIPP* fue amplificado usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-GACACGGCTTCTTCTTCACCATTCTC-3'; *reverse*, 5'-TCTTCACTTGGCAGGGGCA-3'. Para el cDNA de la proteína tipo-TFM de *N. tabacum XM\_016632920.1* (LOC107808402) se emplearon los oligonucleótidos *forward*, 5'-ATGGAGTATATTGATCCTGCAAAGTACA-3'; *reverse*, 5'-TCGTGTATGGTATCTGTCTGCC-3'. El cDNA de la proteína tipo-TFM de *N. tabacum XM\_016617131.1* (LOC107823043) fue amplificado usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-ATGGCGTTTCCAGATAGCTCGACT-3'; *reverse*, 5'-GGTGTCCGAATGACATGTTTATAGAGTTG-3'. Finalmente para el cDNA de la proteína tipo-TFM de *N. tabacum XM\_016600064.1* (LOC107779610) fue amplificado usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-ATGGAGAACTCACGCCGTCA-3'; *reverse*, 5'-TTGGTAATCCATCTGACAATCCCCT-3'. Las condiciones de PCR para *SIPP* se encuentran descritas arriba. Las condiciones de PCR para los cDNAs tipo-TFM de *N. tabacum* se realizaron en un volumen final de 20 µl (100 ng de cDNA, amortiguador de PCR, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, mezcla de oligonucleótidos 200 µM cada uno, 1 U Phusion DNA polimerasa y H<sub>2</sub>O) en un termociclador (T100<sup>TM</sup> Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 98 °C por 30 sec, 30 ciclos de temperatura de desnaturalización (98 °C) por 10 sec, una temperatura de alineamiento de 58 °C por 30 sec y una temperatura de extensión de 72 °C por 30 sec y un ciclo final de extensión (72 °C) por 5 min. Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

## **K. Supresión de NaSIPP en granos de polen *N. alata***

### **1. Construcción *RNAi-NaSIPP* y bombardeo de granos de polen *N. alata***

El promotor de *NTP303* fue amplificado usando los oligonucleótidos *forward*, 5'-CCGGAGGTCCTGATACTCGCAAC-3'; y *reverse*, 5'-CCGCTCGAGCATGACGTTGTTTTT-3' a partir del vector *pNGC* (regalo del Dr. Javier A. Juárez-Díaz). El producto de PCR purificado contiene los sitios de restricción *XhoI/PpumMI* y fue insertado en el vector linearizado *pBADC* mediante una reacción de ligación (descrito arriba). Posteriormente se transformaron células competentes de *E. coli DB3.1* con 5 µl de la

reacción de ligado de acuerdo al protocolo descrito por García-Valencia, 2013. Las células transformadas con la reacción de ligado fueron crecidas en placas con LB sólido suplementado con cloranfenicol 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y espectinomicina 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Se seleccionaron algunas colonias transformantes y se analizaron por PCR. Posteriormente se purificó el plásmido con el kit Zyppy plasmid miniprep (ZymoResearch), al cual se denominó *pBADC RNAi*. Finalmente se realizó una reacción de recombinación LR con la construcción *NaSIPP:pENTR* (descrito arriba) y el vector *pBADC RNAi*, para generar una construcción con *NaSIPP* en sentido y antisentido (*RNAi-NaSIPP*). Se transformaron células competentes de *E. coli DH5 $\alpha$*  con 5  $\mu\text{l}$  de la reacción de recombinación de acuerdo al protocolo descrito por García-Valencia, 2013. Las células transformadas con la reacción de ligado fueron crecidas en placas con LB sólido suplementado con espectinomicina 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Se mezclaron 5  $\mu\text{g}$  de la construcción *RNAi-NaSIPP* con 10  $\mu\text{l}$  de espermidina (0.1 M), 25  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (2.5 M) y 25  $\mu\text{l}$  de partículas de tungsteno (60  $\text{mg ml}^{-1}$ ); estas partículas fueron usadas para bombardear los granos de polen  $S_{A2}$  de *N. alata* (protocolo descrito arriba).

Los granos de polen  $S_{A2}$  de *N. alata* recién colectados fueron transformados con la construcción *RNAi-NaSIPP* mediante bombardeo con el equipo Bio-Rad® Biolistic PDS-1000, de acuerdo con Chen *et al.*, (2002) y con el protocolo sugerido de Bio-Rad (Apéndice 2). Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.

## 2. Polinizaciones manuales

Para llevar a cabo las polinizaciones manuales, las flores en pre-antesis de las plantas de *N. alata* receptoras de polen fueron emasculadas. Las polinizaciones se realizaron cuando los estigmas se encontraban receptivos (estado en el que los estigmas están húmedos). El polen bombardeado fue colectado con una espátula y colocado sobre el estigma hasta cubrir la superficie por completo; para una cruce incompatible se emplearon pistilos  $S_{A2}S_{A2}$  y para cruces compatibles pistilos  $S_{C10}S_{C10}$ .

## 3. Evaluación del crecimiento de tubos polínicos en estilos polinizados de *N. alata*

Después de 72 h de haber realizado las polinizaciones, los pistilos fueron colectados y se fijaron en una solución de etanol:ácido acético (3:1) durante 24 h. Posteriormente se aclararon y suavizaron en una disolución al 10 % de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y se colocaron en una autoclave a una

temperatura de 90 °C por 5 minutos para ablandar el tejido (el tiempo comienza a contar cuando se llega a una presión de 10 psi; Jiménez Durán, 2013); después se desechó el sobrenadante y se agregó una disolución al 0.1 % de azul de anilina, en donde se mantuvieron los pistilos en oscuridad a 4 °C durante al menos 12 h. Los pistilos teñidos se colocaron en un portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos y con los dedos se aplastaron hasta que el tejido se disgregó para ser observado en el microscopio de fluorescencia AmScope FM320T. Finalmente, se evaluó la longitud de los tubos polínicos en el pistilo; así como la presencia de tubos polínicos en la base del estilo. Este ensayo se realizó al menos cuatro veces de manera independiente.



## VI. RESULTADOS

### A. NaSIPP pertenece a la familia de transportadores mitocondriales

*NaSIPP* codifica un polipéptido de 353 aminoácidos, con un punto isoeléctrico teórico de 9.3. Además, la secuencia de NaSIPP tiene tres dominios homólogos repetidos (Palmieri, 2004), conocidos como dominios de transportador mitocondrial (PROSITE PS50920, IPR00193 y PFAM PF00153). Estos dominios son de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud y contienen dos segmentos hidrofóbicos conectados a través de loops hidrofílicos, caracterizados por el motivo: PX[D/E]XX[K/R]X[K/R] (20-30 residuos) [D/E]GXXXX[W/Y/F][K/R]G (Palmieri, 1994; 2004). Este motivo, ha sido usado para identificar otros transportadores mitocondriales en secuencias genómicas de eucariontes (Palmieri, 1994; 2004). En la Figura 7, se observa un alineamiento de NaSIPP con diferentes transportadores de fosfato mitocondrial (TFM), en el cual se resaltan las regiones transmembranales y los loops hidrofílicos de cada secuencia.

Se realizó un análisis filogenético basado en las secuencias predichas de aminoácidos de: NaSIPP, TFM funcionales (azul) y putativos (púrpura) de levaduras, animales y plantas. Los resultados observados en la Figura 8 definen los clados de animales (amarillo) y de plantas (gris). El grupo conformado por las secuencias de plantas pueden dividirse en tres sub-grupos: 1) TFM de leguminosas (*Glycine max* y *Medicago truncatula*) que comparten un 95.3 % de similitud; 2) TFM de Solanaceae (las cinco secuencias comparten un 84 % de similitud) y 3) el resto de las secuencias de plantas que no forman un grupo muy conservado porque son de diferente familia de plantas. El subgrupo de Solanaceae esta compuesto por cinco TFM, la mayor similitud la comparten los transportadores de *Solanum* (99 % de similitud), seguido por los transportadores de *Nicotiana*, que comparten 98 % de similitud. NaSIPP forma parte de este subgrupo y presenta una alta similitud con su homólogo de *N. tomentosiformis*; seguido por los transportadores de *Solanum* (95 %) y el transportador de *Ipomoea* (88 %). En particular, la secuencia de NaSIPP pertenece al subgrupo Solanaceae de TFM de plantas.

Es interesante mencionar que diversos reportes han demostrado la existencia de múltiples TFM en levaduras, animales y plantas, algunos de estos transportadores presentan una expresión diferencial y se han asociado con la respuesta a estrés. Por ejemplo en *S. cerevisiae*, se han reportado dos TFM (Mir1 y Pic2), Mir1 es el TFM mayoritario y su expresión se

mantiene constante en diferentes condiciones de temperatura, mientras que la expresión de *Pic2* se incrementa bajo condiciones de estrés térmico (Hamel *et al.*, 2004). Por otro lado, en humanos, vacas y ratas sólo se ha detectado un gen de *TFM*, el cual mediante splicing alternativo genera dos isoformas (A y B; Fiermonte *et al.*, 1998), TFM-A únicamente es expresado en los músculos, mientras que TFM-B es ubicuo (Dolce *et al.*, 1996); este patrón de expresión sugiere que la isoforma B puede funcionar para el requerimiento básico de los tejidos, mientras que la isoforma A podría ser requerida en caso de estrés, por ejemplo durante la contracción del músculo estriado (Palmieri, 2004). Otro ejemplo se ha descrito en *A. thaliana*, donde se han identificado tres TFM (2, 3 y 5); la expresión del TFM-3 es inducida significativamente en condiciones de estrés salino (Zhu *et al.*, 2012).

```

A. thaliana 2 MTR -----SRSLTPSFLYSSD-HRLFOATIMSTH-LKSD-----PLTSPNT-SSVSSNGCTSF-ATATPNEKVEVMSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTVPLDLVKCRMOVDPAKY-K
A. thaliana 3 MESP-----KNSLIPSFLYSSD-SSPRSLFDLDVLSNMSMAAEFKSP-SPAPRSSPT-SMISRKNFLIASPTPEPKGIEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTVPLDLVKCRMOVDPAKY-K
C. griseus MHG-----VSCLEITTEYSEFGSMKYVALCGFGVGLSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
D. rerio MYPN-----ALTLARANPFSAPLFTLQ-KVEE-----PETO-TPVQKRLLAAAVADSDGSCAFSGSKYVALCGFGVGLSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
H. sapiens MALPDS5-S-RRNLSLIPSFYSSD-SKTLPLHMLNT-ASAA-----A-AAAPSPPPAM-DAGSRGLMTP-SPSESRKTELYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTVPLDLVKCRMOVDPAKY-K
G. max MESS-----VAH-LARANPFTNPLQLV-HDGL-----GDLRSSPCP-TCOPRRNPLAAAVAEVSEYSEFGSAKYVALCGFGVGLSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
I. tricolor MAFPENS-H-ATKPLTPGFLYSSP-SSFAASLI-TSLD-Q-----SRTSVPP-PAVERKGFVIPAPKEPKKIEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTVPLDLVKCRMOVDPAKY-K
L. japonicus MAFPDS5-SRRNLSLIPSFYSSD-SKTLPLNQTL-SS-----SSTAAAPSKLMI-----PAPNEKIEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTVPLDLVKCRMOVDPAKY-K
NaSIPP MAYTHN-S-SRKLPIPTFLYNTA-SSSPFVYRNWTDLEN-----HDMTSS-SAMAQKPFVVPAPKESGKIEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
N. tomentosiformis MAYTHN-S-SRKLPIPTFLYNTA-SSSPFVYRNWTDLEN-----HDMTSS-SAMAQKPFVVPAPKESGKIEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
M. domestica MALSDKQ-SQALIPSFYSSD-SSIALIE-KMLYARPN-----G-GETPNAIWE-GVSARKGLVIPSPEKIEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
M. musculus MFPSS-----VAH-LARANPFNAPHLQLV-HDGL-SG-PRSP-PAPRRSRHLAAAVAEVSEYSEFGSMKYVALCGFGVGLSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
M. truncatula MAOSSSESSSRNLSLIPSFYSSD-SKTLPVTHOIVS-SGPA-----PSAAATPSRLGTSGRFMTSPKPEFGKIEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTVPLDLVKCRMOVDPAKY-K
P. trichocarpa MDHR-----OQSLIPSFYSSD-SSAKTLTSLKLL-HSDQ-P-SLSPSLTPAMGRKSSGGVTPAPSEPKRTEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTVPLDLVKCRMOVDPAKY-K
R. communis MGFSDS-----SKQSLIPSFYSSD-SSSKTLTSLKLL-HS-----NQSPSPSLMRKSSGMFVTP-APSEPKRTEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTVPLDLVKCRMOVDPAKY-K
R. norvegicus MFSV-----VAH-LARANPFNAPHLQLV-HDGL-SG-PRSP-PAPRRSRHLAAAVAEVSEYSEFGSMKYVALCGFGVGLSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
S. cerevisiae Mir 1 MVS-----VAH-LARANPFNAPHLQLV-HDGL-SG-PRSP-PAPRRSRHLAAAVAEVSEYSEFGSMKYVALCGFGVGLSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
S. cerevisiae Pic 2 MES-----NKOPRKTOLYTKFEVYCTLGGTACGPTHSSTPDLVKCRLOVMPKLY-T
S. lycopersicum MAYTDNS-S-SRTPLIPNPLYNTA-SSSSFSSTL-TITN-N-----TLSDPCN-ESTVKKPVLVAAPKESRTEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
S. tuberosum MAYTDNS-S-SRTPLIPNPLYNTA-SLSSS-T-TISN-N-----TLSDPCN-ESTVKKPVLVAAPKESRTEIMYSYPAFYAAGTGGILSCGLTHMTAVPDLVKCRMOVDPAKY-K
* **
A. thaliana 2 S1TSGFSTLIREHGHSLWRGWSKLLGVGVGGCRFLGYEYFKTLYSDVLPNH-----NRTSYFLSSASAOIFADMALCFPEATKVRVOT-OPMFAGKLLDGFPRVRS-EGLAGFHRGLFLPNC
A. thaliana 3 S1TSAFKTITKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
A. thaliana 5 S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
C. griseus S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
D. rerio S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
G. max S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
H. sapiens S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
I. tricolor S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
L. japonicus S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
NaSIPP S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
N. tomentosiformis S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
M. domestica S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
M. musculus S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
M. truncatula S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
P. trichocarpa S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
R. communis S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
R. norvegicus S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
S. cerevisiae Mir 1 S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
S. cerevisiae Pic 2 S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
S. lycopersicum S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
S. tuberosum S1TSGFGLLKEOGLKGFTRGWSPTLLGYSAGAFKGLYEAQKYSYDVGPEYAAKYTLIYLASASAEIADVALCPFEAVKVRVOT-OPGFARGLSDGLPKFIKIS-EGFRGLKGLVPLMG
* * *
A. thaliana 2 RNL PFSVMFSTFEQSEVFIYOKITOKRQDCSKA00LGVTLGAGYTAGAVGTIISNPADVLSL YNNKAKN-----VL D-----AVRNTGFGVGLFRSLVPRITTVGVPVITLDFWFYDATK
A. thaliana 3 ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
A. thaliana 5 ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
C. griseus ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
D. rerio ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
H. sapiens ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
G. max ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
I. tricolor ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
L. japonicus ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
NaSIPP ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
N. tomentosiformis ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
M. domestica ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
M. musculus ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
M. truncatula ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
P. trichocarpa ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
R. communis ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
R. norvegicus ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
S. cerevisiae Mir 1 ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
S. cerevisiae Pic 2 ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
S. lycopersicum ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
S. tuberosum ROIPTYMMKFAFETIEMLYKHYVTPKNECKSCKLQDGVSFAGGYVAGVFCATVSHPADNLVSLFNNAKGAT-----VAD-----AVKRLGLWGLTRGFLPRTVMIGTLTGAOWGYDPAK
* * *
A. thaliana 2 VLSGFTSGLGKVPVDAKLL--S-V
A. thaliana 3 VLAGLPTTGGASPATALAPS--VS-A
A. thaliana 5 VFVGLPTTGGVAPAPATAAT--EAK-A
C. griseus VFVRLPRPPPMPESLKKK--LGLAE
D. rerio VFVRLPRPPPMPESLKKK--LGLTE
H. sapiens VFVRLPRPPPMPESLKKK--LGLTE
G. max VFVRLPRPPPMPESLKKK--LGLTE
I. tricolor VVVLPTTGGVAPAPAAAA--K
L. japonicus VFVGLPTTGGVAPAPAK--K
NaSIPP VFVGLPTTGGVAPAPAK--K
N. tomentosiformis VFVGLPTTGGVAPAPAK--K
M. domestica VFVGLPTTGGVAPAPAAAE--LSK-V
M. musculus VFVRLPRPPPMPESLKKK--LGLTE
M. truncatula VFVGLPTTGGVAPAPAAE--AK-F
P. trichocarpa VFVGLPTTGGVAPAPAAE--LAK-A
R. communis VFVGLPTTGGVAPAPAAE--LAK-A
R. norvegicus VFVRLPRPPPMPESLKKK--LGLTE
S. cerevisiae Mir 1 STLGCPTTEIGGGGH--
S. cerevisiae Pic 2 AVVGLPTTG--
S. lycopersicum VFVGLPTTGGVAPAPV--K
S. tuberosum VFVGLPTTGGVAPAPV--K

```

Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de NaSIPP, TFM funcionales y putativos. Los TFM funcionales de: *S. cerevisiae* Mir1 (NP\_012611) y Pic2 (NP\_010973.3), *Ipomoea tricolor* (BAF64711), *Lotus japonicus* (BAB83689), *Glycine max* (NP\_001237304), *Mus musculus* (NP\_598429), *Rattus norvegicus* (NP\_620800), *Homo sapiens* isoforma B (NP\_002626), *Arabidopsis thaliana* 3 (NP\_190454), *A. thaliana* 5 (NP\_196908). TFM putativos de: *Solanum tuberosum* (XP\_006347354), *S. lycopersicum* (XP\_004242142), *Ricinus communis* (XP\_002512859.1), *Populus trichocarpa* (XP\_002300143), *Medicago truncatula* (XP\_003624478), *Danio rerio* (AAH67565), *Cricetulus griseus* (ERE87819), *Nicotiana tomentosiformis* (XP\_009618018), *Malus domestica* (XP\_008341244), *A. thaliana* 2 (NP\_179319) y *N. alata* (NaSIPP). Estas secuencias fueron alineadas usando PSI/TM-Coffee (<http://tcoffee.org.cat/apps/tcoffee/do:tmcoffee>). Los aminoácidos resaltados en rosa corresponden a las regiones transmembranales predichas, en amarillo los residuos que se encuentran en la parte interna de la membrana y en morado los residuos que se encuentran en la parte externa de la membrana. Los residuos marcados con un asterisco en la parte de abajo, son aminoácidos que se ha demostrado son críticos o importantes para la actividad de transporte de fosfatos en Mir1 (Briggs *et al.*, 1999; Phelps *et al.*, 2001; Wohlrab *et al.*, 2002). La posición 1 corresponde al primer aminoácido de Mir1.

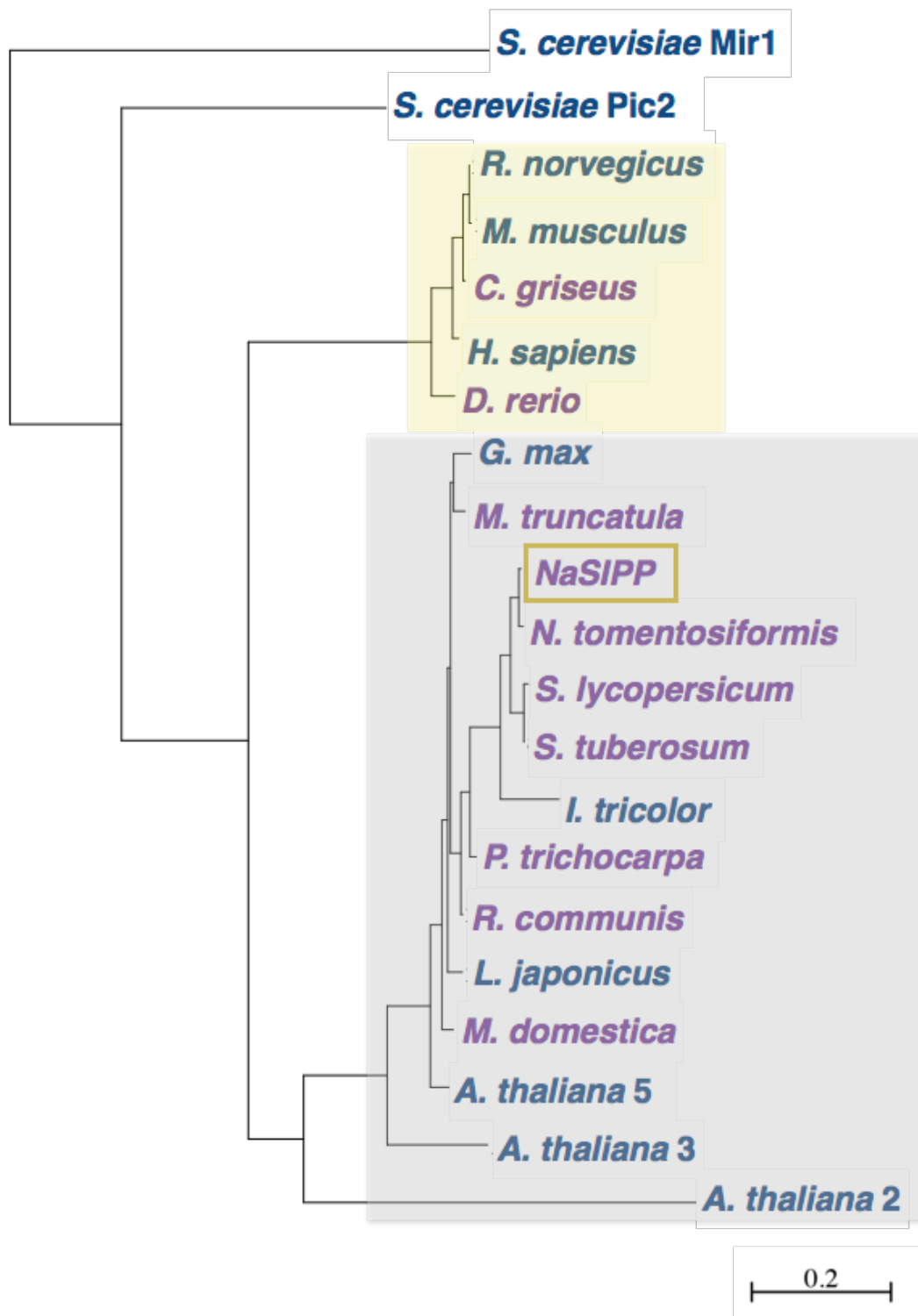


Figura 8. Relaciones filogenéticas de NaSIPP con TFM funcionales y putativos. Los TFM funcionales se encuentran en azul, mientras que los TFM putativos se observan en violeta, descritos en la Figura 7. El clado de animales se encuentra enmarcado en un recuadro amarillo, mientras que el clado de plantas en un recuadro gris. El análisis filogenético fue originado a partir de un alineamiento realizado con MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). El alineamiento fue delimitado y curado con Gblocks ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)). El servidor ProTest 2.4 determinó el mejor modelo para la sustitución de aminoácidos. El árbol fue construido con el método de máxima verosimilitud y fue estimado por PHYML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>).

## **B. Localización subcelular de NaSIPP**

Muchos miembros de la familia de transportadores mitocondriales se localizan en la mitocondria; sin embargo, también se han encontrado localizados en la membrana plasmática, específicamente en microdominios caveolares (Lisanti *et al.*, 1994; Bãthori *et al.*, 1999), pequeñas vesículas (Wandrey *et al.*, 2004), peroxisomas, glioxisomas o plástidos (Fukao *et al.*, 2001; Palmieri *et al.*, 2001; Bedhomme *et al.*, 2005; Leroch *et al.*, 2005).

Es por ello que para determinar la localización subcelular precisa de NaSIPP, se expresó NaSIPP fusionada a la proteína roja fluorescente Tomato (Shaner *et al.*, 2004), bajo el control del promotor específico de polen *Lat52* (Twell *et al.*, 1989) en tubos polínicos de *N. tabacum*. La señal fluorescente de la proteína NaSIPP-Tomato fue asociada a pequeñas estructuras que se encuentran en el citoplasma del tubo polínico (Figura 9A). La cotransformación con el marcador mitocondrial Mit-GFP (Figura 9B; Logan y Leaver, 2000), muestra una clara colocalización entre las señales de NaSIPP-Tomato y Mit-GFP (señal amarilla), proporcionando evidencia de que NaSIPP se localiza en las mitocondrias de los tubos polínicos de tabaco (Figura 9A-C).

Para confirmar la localización mitocondrial de NaSIPP, se expresó transitoriamente la construcción *35S::NaSIPP-GFP* en plántulas de *A. thaliana*. Los resultados indican que la señal de NaSIPP-GFP se observa principalmente en las raíces (Figura 9D) y en la zona baja del hipocótilo, en esta última zona se presenta un patrón punteado (Figura 9G), que colocaliza con el marcador mitocondrial MitoTracker Red FM (Figura 9E-I), confirmando la localización mitocondrial de NaSIPP.

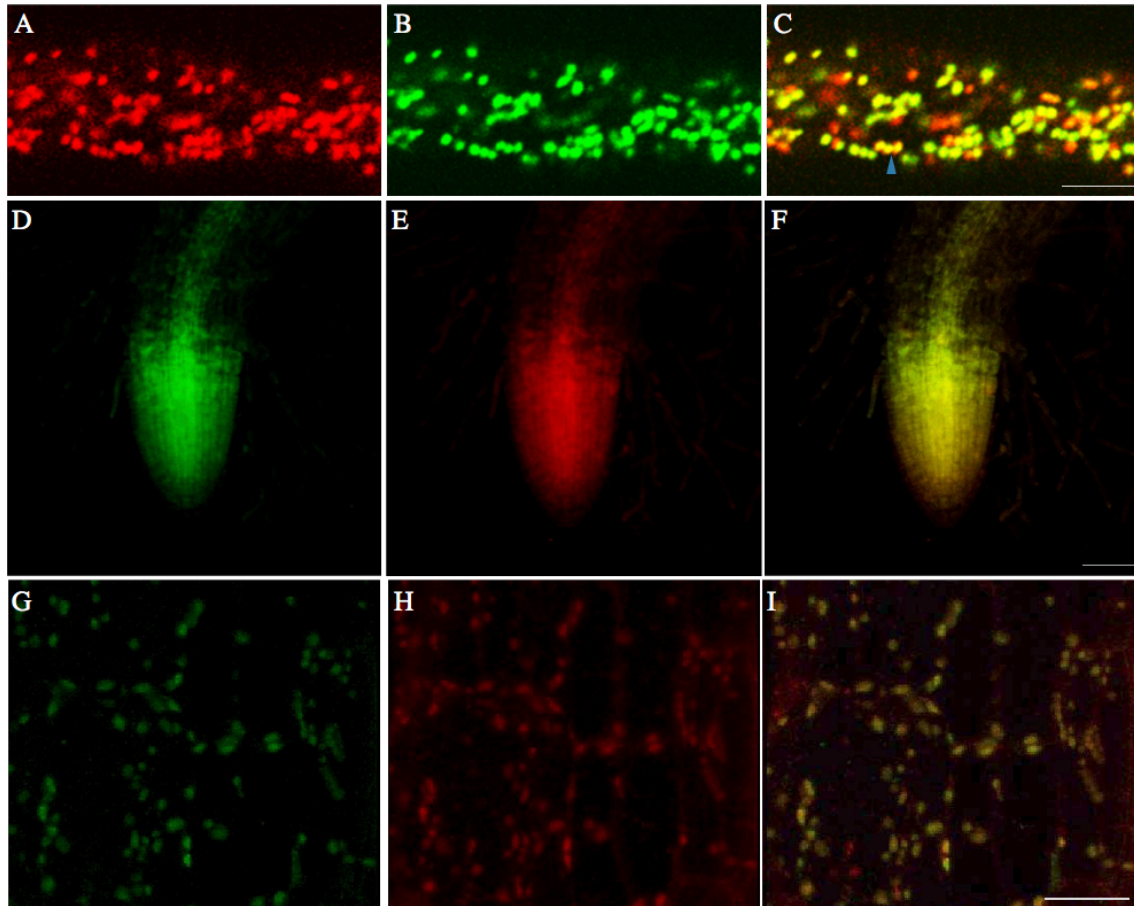


Figura 9. Localización subcelular de NaSIPP. Coexpresión de NaSIPP-Tomato con el marcador mitocondrial Mit-GFP. Compartimentos fluorescentes en los tubos polínicos de *N. tabacum* expresan: (A) NaSIPP-Tomato (rojo), (B) Mit-GFP (verde) y (C) Acoplamiento o merge (amarillo). La punta de flecha azul muestra un ejemplo de la colocalización de NaSIPP-Tomato y Mit-GFP. Los granos de polen fueron transformados mediante biobalística. Escala: 5  $\mu$ m. Expresión transitoria en plántulas de *A. thaliana*. (D) Expresión de la construcción *35S::NaSIPP:GFP* (verde) en raíces, (E) La señal del marcador mitocondrial MitoTracker Red FM es observada en rojo, (F) Acoplamiento o merge (amarillo). Escala: 50  $\mu$ m. (G) Expresión de la construcción *35S::NaSIPP:GFP* (verde) en células del hipocótilo, (H) La señal del marcador mitocondrial MitoTracker Red FM es observada en rojo, (I) Acoplamiento o merge (amarillo). Escala: 40  $\mu$ m.

### C. La expresión de NaSIPP compensa el defecto mitocondrial de la mutante $\Delta mir1$ de *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* existen dos TFM funcionales, Mir1 y Pic2. Mir1 es cuatro veces más abundante que Pic2 bajo condiciones normales de temperatura (28-30  $^{\circ}$ C; Murakami *et al.*, 1990; Hamel *et al.*, 2004), mientras que la expresión de Pic2 es inducida a altas temperaturas, es decir 37  $^{\circ}$ C (Hamel *et al.*, 2004). Las levaduras mutantes que carecen del gen *Mir1* ( $\Delta mir1$ ) son incapaces de crecer en medios con sustratos no fermentables en condiciones normales de temperatura (por ejemplo, glicerol), mientras que el crecimiento de las levaduras carentes de Pic2 ( $\Delta pic2$ ) únicamente se ve afectado a altas temperaturas (37 $^{\circ}$ C). Mediante ensayos de

complementación, se determinó que el transportador Pic2 solo es capaz de compensar la ausencia de Mir1 cuando es sobreexpresado (Hamel *et al.*, 2004). Mediante experimentos de mutagénesis se determinó que los aminoácidos requeridos para el transporte de fosfatos en Mir1 son His32, Asp39, Lys42, Thr43, Arg44, Thr79, Lys90, Glu126, Glu137, Arg140, Arg142, Lys 179, Lys 187, Asp236 y Arg276 (Briggs *et al.*, 1999; Wohlrab *et al.*, 2002).

En la Figura 7 se muestra un alineamiento de NaSIPP con los TFM Mir1 y Pic2, donde se encuentran señalados con un asterisco los aminoácidos requeridos para el transporte de fosfatos; dichos aminoácidos están conservados en la secuencia de NaSIPP y en los TFM funcionales. Debido a las características arriba mencionadas y aunado a que NaSIPP comparte 50 % de identidad con Pic2 y 40 % con Mir1, se evaluó la función de NaSIPP como transportador de fosfatos mediante un ensayo de complementación de la mutante  $\Delta mir1$  de *S. cerevisiae*. Para probarlo se transformó la cepa mutante BY4741  $\Delta mir1$  con NaSIPP usando el vector de expresión *pYES-DEST52*. De igual forma, se transformaron levaduras  $\Delta mir1$  con los TFM Mir1 y Pic2. Como se observa en la Figura 10, la transformación con NaSIPP rescata parcialmente a la mutante  $\Delta mir1$  tanto en medio líquido (Figura 10A) como en medio sólido (Figura 10B); sin embargo, las transformantes crecen más lento en medio con glicerol (sustrato no fermentable) comparado con las levaduras transformadas con Mir1. Este resultado sugiere que NaSIPP transporta fosfato, pero con una menor eficiencia; posiblemente debido a un efecto del entorno heterólogo o a ciertas propiedades regulatorias o cinéticas.

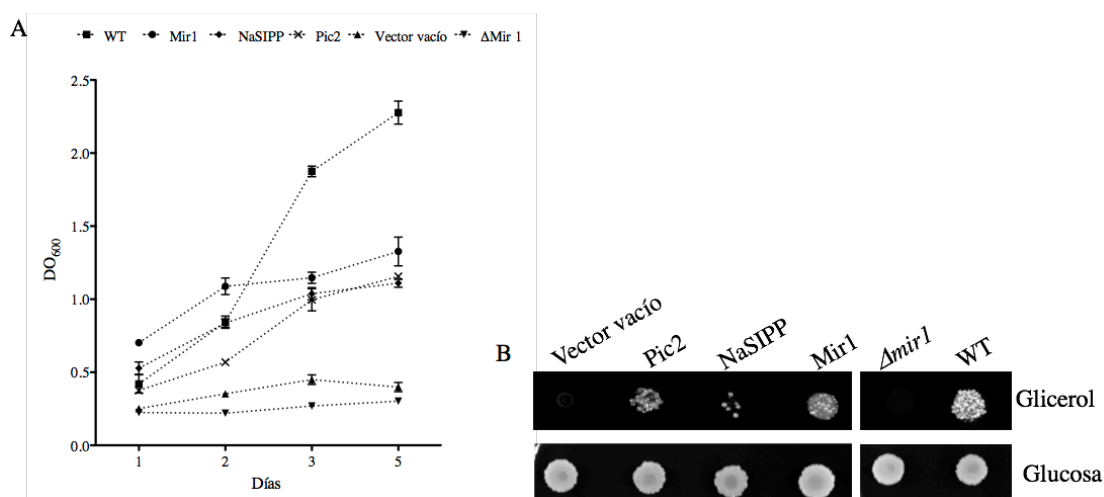


Figura 10. NaSIPP complementa la ausencia de Mir1 en *S. cerevisiae*. (A) Curva de crecimiento de la mutante de levadura  $\Delta mir1$ , la cepa silvestre (WT) y las levaduras  $\Delta mir1$ , transformadas con el plásmido *pYES-DEST52* (vector vacío), con la construcción *Pic2::pYES-DEST52*, *NaSIPP::pYES-DEST52* y *Mir1::pYES-DEST52*. Las levaduras fueron crecidas en medio líquido con glicerol a 30 °C. (B) Las levaduras fueron crecidas en medio sólido con glicerol a 30 °C durante 10 días (panel superior) y en medio sólido con glucosa a 30 °C durante 3 días (panel inferior).

#### **D. Interacción de NaSIPP y NaStEP en células vegetales**

Para confirmar la interacción entre NaSIPP y NaStEP, se realizaron experimentos de BiFC en tubos polínicos de *N. tabacum*. Los granos de polen fueron cobombardados con las construcciones *Lat52::NaStEP:NV* y *Lat52::NaSIPP:CV*. Estas construcciones, se encuentran bajo el control del promotor específico de polen *Lat52* (Twell *et al.*, 1989) y generan las proteínas de fusión NaStEP- N-terminal de Venus (NV) y NaSIPP- C-terminal de Venus (CV) respectivamente; si existe interacción física entre ambas proteínas, debe de recuperarse la fluorescencia de la proteína Venus. Es notable que la restauración de la fluorescencia de Venus se detectó principalmente en pequeños acúmulos alargados que se encuentran distribuidos a lo largo del tubo polínico y tiene un aspecto similar a las mitocondrias (Figura 11A-B). También se realizaron los ensayos inversos, es decir, con el NV y CV hacia el extremo amino de NaStEP y de NaSIPP (NV-NaStEP y CV-NaSIPP), en los cuales se observó el mismo patrón de restablecimiento de la fluorescencia de Venus (datos no mostrados). Por otro lado, en los tubos polínicos cotransformados con el vector vacío y las construcciones NaStEP-NV y NaSIPP-CV respectivamente (Figura 11C-F), no se observó restablecimiento de la fluorescencia.

Para confirmar la interacción entre las proteínas NaStEP y NaSIPP, también se realizaron ensayos de BiFC en plántulas de *A. thaliana*; las cuales fueron transformadas transitoriamente con las construcciones de *pUBQ10::NaStEP:nYFP* y *pUBQ10::NaSIPP:cYFP*. En este caso se emplearon vectores que contenían el promotor de *Ubiquitina-10*, el cual dirige una expresión moderada en plantas, disminuyendo problemas potenciales, como falsos positivos (Grefen *et al.*, 2010). Los resultados en este experimento mostraron un restablecimiento de la fluorescencia de YFP predominantemente en las zonas meristemáticas y de elongación de las raíces (Figura 12A-B); así como en la parte baja del hipocótilo (Figura 12C-D). También se realizaron los ensayos inversos, es decir, con el nYFP y cYFP hacia el extremo amino de NaStEP y de NaSIPP (nYFP-NaStEP y cYFP-NaSIPP), en los cuales se observó el mismo patrón de restablecimiento de la fluorescencia de YFP (datos no mostrados). Por otro lado, no se detectó fluorescencia en las plántulas cotransformadas con las proteínas de fusión NaStEP-nYFP y vector vacío (cYFP); así como NaSIPP-cYFP y vector vacío (nYFP) respectivamente (Figura 12E-L).



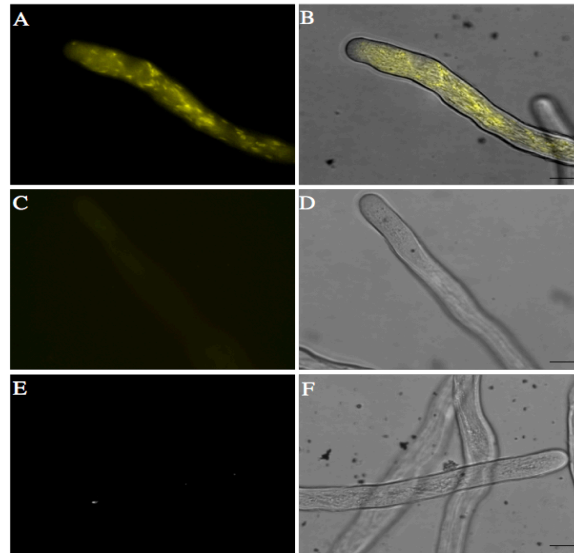


Figura 11. NaSIPP interacciona con NaStEP en tubos polínicos de *Nicotiana*. La interacción entre NaStEP y NaSIPP fue detectada por ensayos de BiFC. Transformación con las construcciones NaStEP-NV y NaSIPP-CV en tubos polínicos de *N. tabacum* transformados por bombardeo con microproyectiles (A) Restablecimiento de la fluorescencia de la proteína Venus en amarillo, (B) Acoplamiento de campo claro y (A), (C-D) Transformación de NaStEP-NV con el vector vacío (CV) en tubos polínicos. (E-F) Transformación de NaSIPP-CV con el vector vacío (NV) en tubos polínicos. Escala: 40  $\mu\text{m}$ .

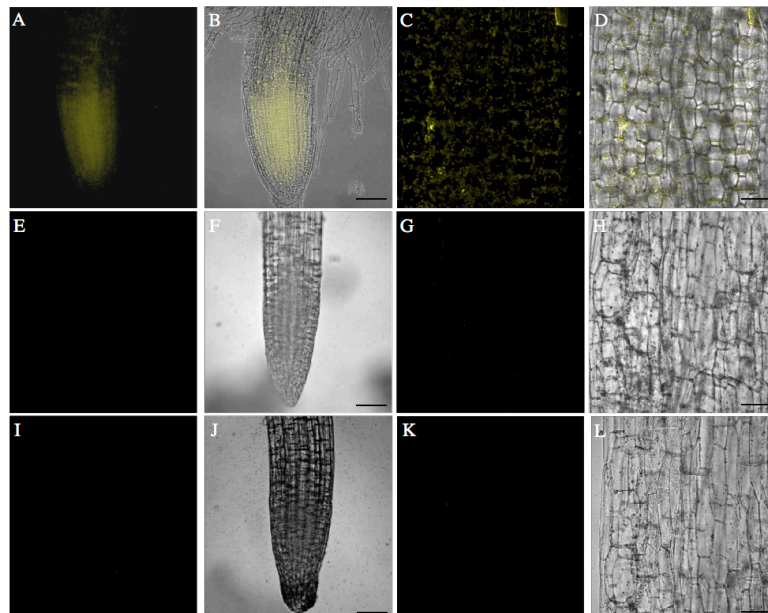


Figura 12. NaSIPP interacciona con NaStEP en plántulas de *A. thaliana*. La interacción entre NaStEP y NaSIPP fue detectada por ensayos de BiFC. (A) Transformación con las construcciones NaStEP-nYFP y NaSIPP-cYFP en raíces de *A. thaliana* (Grefen *et al.*, 2010). (B) Acoplamiento de A con el campo claro. (C) Transformación con las construcciones NaStEP-nYFP y NaSIPP-cYFP en hipocótilos de *A. thaliana*. (D) Acoplamiento de C con el campo claro. (E-H) Transformación de NaStEP-nYFP con el vector vacío (c-YFP) en raíces e hipocótilos de plántulas de *A. thaliana*. (I-L). Transformación de NaSIPP-cYFP con el vector vacío (n-YFP) en raíces e hipocótilos de plántulas de *A. thaliana*. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

### E. La interacción de NaSIPP y NaStEP está asociada a las mitocondrias

Debido a que en los experimentos de BiFC en plántulas de *A. thaliana* se observó un patrón punteado en el restablecimiento de la fluorescencia en la parte baja del hipocótilo, se decidió examinar si la interacción entre NaSIPP y NaStEP estaba asociada a las mitocondrias. Por ello se llevaron a cabo ensayos de BiFC en plántulas de *A. thaliana* y posteriormente se trataron con el marcador mitocondrial MitoTracker Red FM; para determinar si la señal reconstituida de YFP era detectada en las mitocondrias. La Figura 13 muestra que cuando las construcciones NaStEP-nYFP y NaSIPP-cYFP fueron coexpresadas, la fluorescencia de YFP fue restablecida; es notable que la interacción entre NaStEP y NaSIPP (Figura 13A, señal verde) colocaliza con la señal roja del marcador mitocondrial, MitoTracker Red FM (Figura 13B-D).

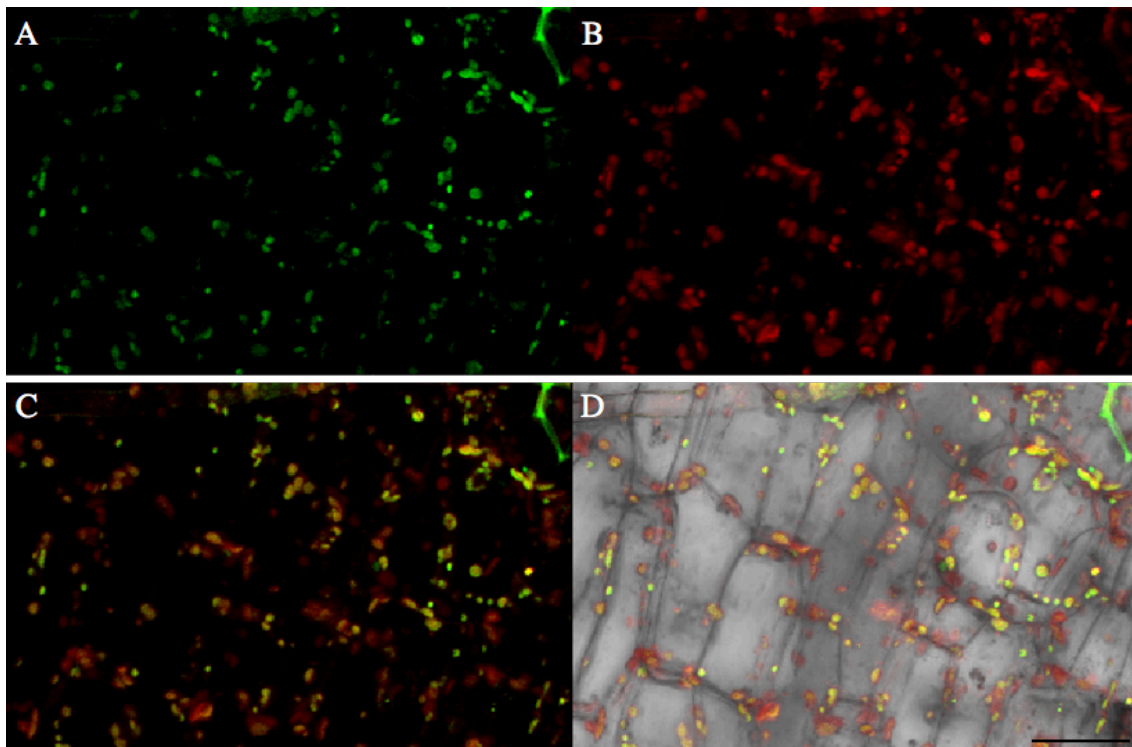


Figura 13. La interacción física entre NaStEP y NaSIPP está asociada a las mitocondrias. Colocalización de la señal de BiFC con el marcador mitocondrial MitoTracker Red FM en plántulas de *A. thaliana*. (A) Localización de la interacción entre NaStEP-nYFP y NaSIPP-cYFP (verde) expresados en células del hipocótilo. (B) Señal de MitoTracker Red FM en rojo. (C, D) Acoplamiento de A y B (amarillo). Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Los ensayos de BiFC generan evidencia de la interacción física entre dos proteínas *in vivo*, sin embargo, involucran la formación de un enlace covalente, provocando que el complejo proteína-proteína formado sea de larga duración. Para proveer mayor evidencia de la interacción entre NaStEP y NaSIPP, empleamos una prueba más dinámica; se

cotransformaron granos de polen de *N. tabacum* mediante biobalística usando las siguientes construcciones: *Lat52::NaStEP-GFP* y *Lat52::NaSIPP-Tomato* y se monitoreó la fluorescencia de GFP y /o Tomato mediante microscopia confocal.

Los resultados revelaron que cuando NaSIPP fue exclusivamente expresado, la fluorescencia de Tomato se distribuyó en pequeñas estructuras en los tubos polínicos (Figura 14A-C). Por otro lado, cuando NaStEP-GFP fue únicamente expresado, se observó una señal en el citoplasma del tubo polínico (Figura 14D-F). Sin embargo, cuando ambas proteínas fueron coexpresadas, el patrón de localización de NaStEP cambió de una distribución citoplasmática a un patrón punteado (Figura 14G-I), sugiriendo que la interacción física entre NaStEP y NaSIPP podría ocurrir mediante una translocación de NaStEP del citoplasma a la mitocondrias.

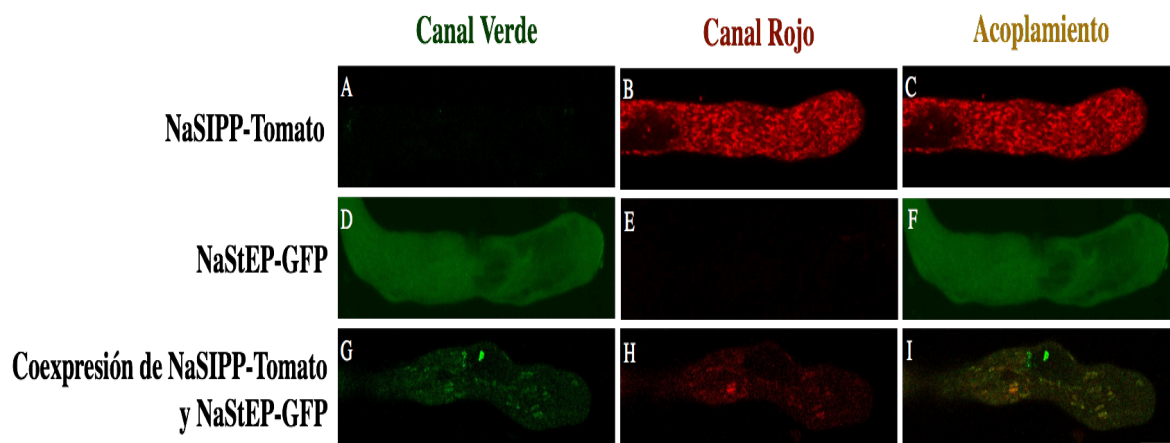


Figura 14. Localización de NaSIPP y NaStEP en tubos polínicos de *Nicotiana*. Patrón de localización de NaSIPP-Tomato en: (A) Canal de verde, (B) Canal rojo, (C) Acoplamiento o merge. Patrón de localización de NaStEP-GFP en: (D) Canal verde, (E) Canal rojo, (F) Acoplamiento o merge. Coexpresión de NaSIPP-Tomato y NaStEP-GFP observado en (G) Canal verde, (H) Canal rojo y (I) Acoplamiento o merge (amarillo). Los tubos polínicos fueron transformados por biobalística. Escala: 10  $\mu$ m.

## F. Expresión espacio-temporal de *NaSIPP*

Mediante ensayos de RT-PCR se determinó el patrón de expresión del transcrito de *NaSIPP* y para complementar este experimento, se realizó un análisis bioinformático para comparar la expresión de *NaSIPP* con otros transportadores de fosfato mitocondrial (TFM). Para ello, se llevo a cabo un análisis de BLAST en el sitio del *National Center for Biotechnology* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que indicó que el cDNA de *NaSIPP* comparte una identidad mayor al 70 % con tres cDNAs que codifican para proteínas tipo-TFM de *N. tabacum*:

*XM\_016632920.1* (20.1), *XM\_016617131.1* (31.1) y *XM\_016600064.1* (64.1). Los ensayos de RT-PCR se realizaron para diferentes órganos de *N. alata* (Figura 15A), en etapas de desarrollo de la antera (Figura 15B) y en polen maduro de especies de *Nicotiana* (Figura 15C). Para este experimento se emplearon oligonucleótidos específicos para cada TFM. Como se observa en la Figura 15A, los transcritos de los TFM 20.1 y 64.1 se expresan tanto en órganos reproductivos (pistilo y polen), como en órganos no reproductivos (raíz, hoja, pétalo y sépalo) y únicamente el RNAm de TFM 31.1 no fue detectado en granos de polen. Además, los transcritos 20.1 y 64.1 fueron amplificados en todas las etapas de desarrollo de la antera evaluadas (Figura 15B); mientras que la presencia del RNAm de *NaSIPP* únicamente fue detectado en polen maduro (Figura 15A-B). Además, cuando se evaluó la presencia de los transcritos de los TFM en polen maduro de diferentes especies de *Nicotiana* (Figura 15C); el RNAm de 20.1 y 64.1 se detectó en la mayoría de especies de *Nicotiana*. En el caso de *SIPP*, fue amplificado en casi todas las especies de *Nicotiana*, con excepción de *N. glauca*. Sin embargo, al obtener las secuencias de los transcritos de *SIPP*, se detectaron inserciones/deleciones en las secuencias de las especies AC de *Nicotiana* (*N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* y *N. benthamiana*); provocando que la secuencia de nucleótidos predicha codifique para proteínas con significantes diferencias a *NaSIPP* o codones de paro prematuros (Figura 16 y Apéndice 3), sugiriendo que es poco probable que esas proteínas sean funcionales. Notablemente, el cDNA de *SIPP* proveniente de especies AI de *Nicotiana* (*N. alata*, *N. rastronensis* y *N. forgetiana*) no tienen cambios en los nucleótidos que afecten su secuencia de aminoácidos (Figura 16 y Apéndice 3), indicando que estas proteínas son probablemente funcionales. Estos datos refuerzan la hipótesis de la participación de *NaSIPP* en el mecanismo de AI en *Nicotiana*.

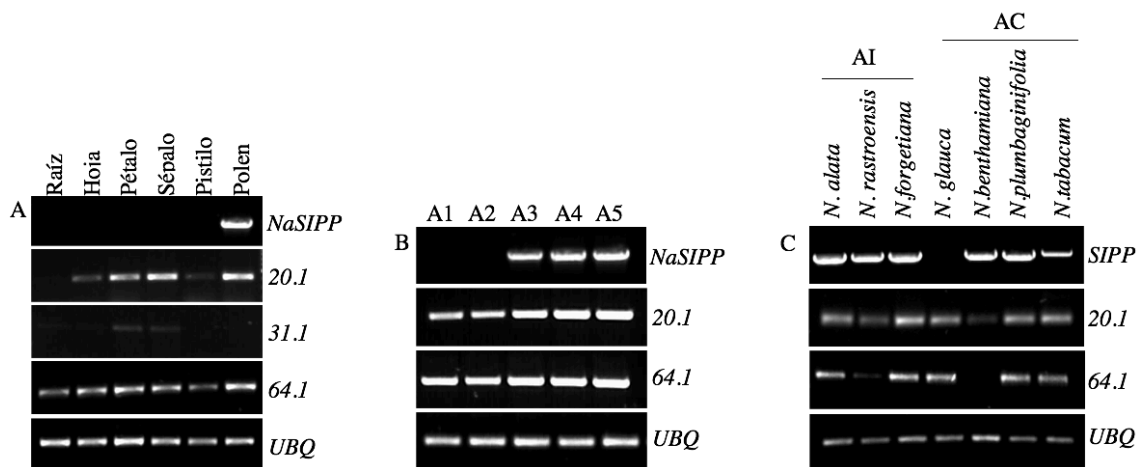


Figura 15. El transcrito de *SIPP* es acumulado específicamente en polen maduro de *Nicotiana*. Expresión de diferentes TFM en (A) Órganos de *N. alata*. (B) Etapas de desarrollo de la antera, A1: 0.5-1.0 cm; A2: 1.1-2.0 cm; A3: 2.1-3.5 cm; A4: 3.5-6.0 cm; A5: 6.0cm-flor madura. (C) Diferentes

entornos genéticos de *Nicotiana*. Se usaron oligonucleótidos específicos para cada cDNA mostrado a la derecha: *NaSIPP*, *XM\_0166322920.1* (20.1); *XM\_016649631.1* (31.1); *XM\_016600064.1* (64.1) y *Ubiquitina (UBQ)*, este último fue usado como control de carga. AI: Autoincompatible, AC: Autocompatible.

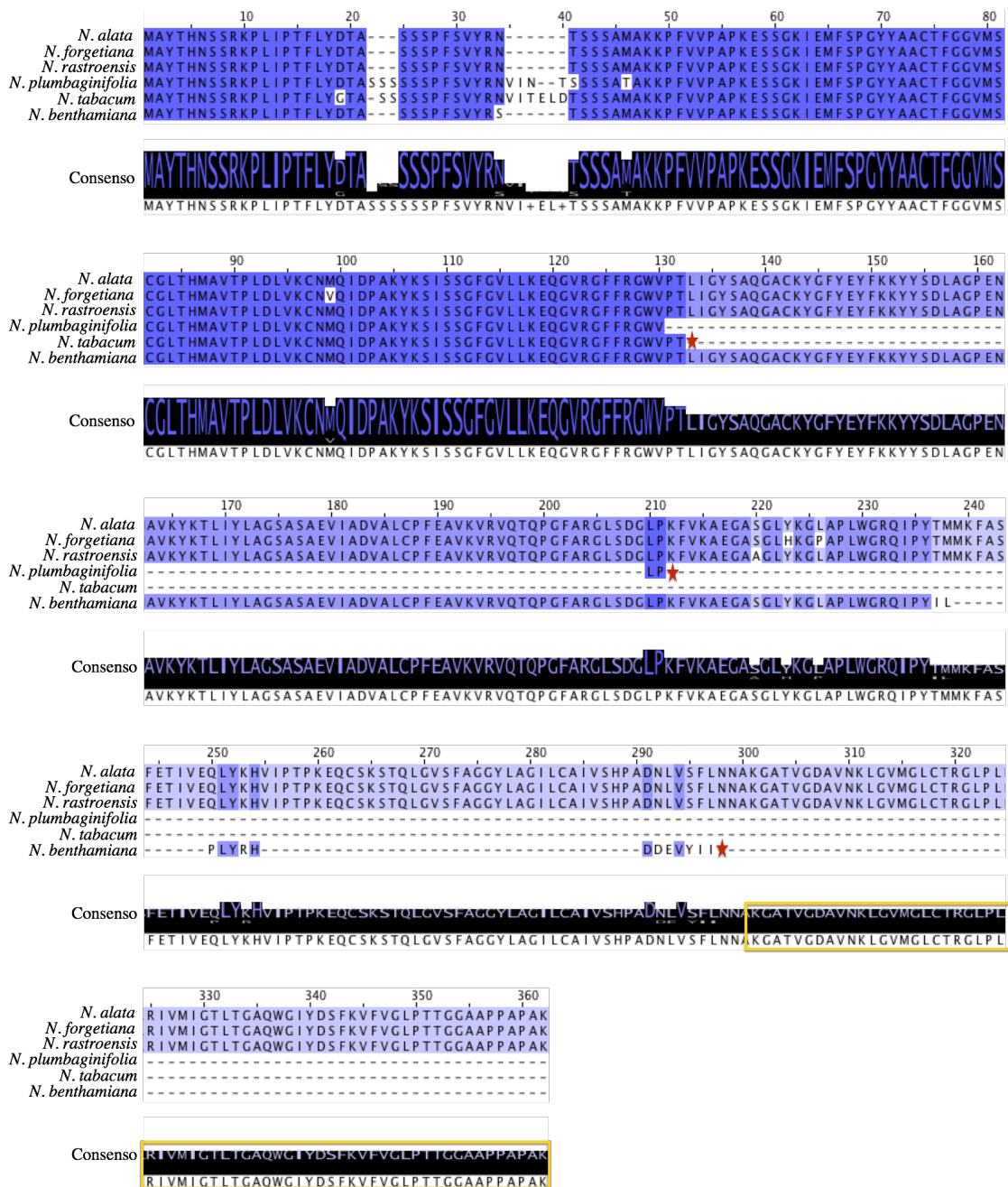


Figura 16. Alineamiento múltiple de la secuencia de *SIPP* de diferentes especies de *Nicotiana*. Las secuencias de aminoácidos predichas fueron deducidas a partir del cDNA de especies AI y AC de *Nicotiana*. El alineamiento fue realizado por MUSCLE (<http://ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>); la intensidad del color azul es proporcional al % de identidad en las secuencias, las estrellas rojas indican el primer codón de paro en las secuencias de especies AC de *Nicotiana*. En un recuadro amarillo se muestra la región con la que se encontró interacción en el ensayo de doble híbrido (García-Valencia, 2013). AI: *N. alata*, *N. raströensis*, *N. forgetiana*. AC: *N. benthamiana*, *N. plumbaginifolia* y *N. tabacum*.

## G. Supresión de NaSIPP en tubos polínicos de *N. alata*

Se evaluó la participación de *NaSIPP* en la vía de rechazo del polen en *Nicotiana*, mediante su silenciamiento en granos de polen. Para este fin, se diseñó un método que involucra la polinización de plantas autoincompatibles de *N. alata*  $S_{A_2}S_{A_2}$  con granos de polen  $S_{A_2}$  transformados mediante biobalística con la construcción de silenciamiento (*RNAi-NaSIPP*), la cual está bajo el control del promotor *NTP303* (específico de polen; Weterings *et al.*, 1995) y se evaluó el crecimiento de los tubos polínicos a través del pistilo después de 72 horas de polinización. Como se observa en el esquema del pistilo (Figura 17), los granos de polen son depositados en el estigma, donde son hidratados y germinan, comenzando el crecimiento de los tubos polínicos, posteriormente penetran el tejido especializado del estilo; en cruza compatibles, los tubos polínicos crecen hasta la base del estilo (zona enmarcada) y alcanzan los óvulos para llevar a cabo la fecundación. Sin embargo, en cruza incompatibles, los tubos polínicos son inhibidos en el primer tercio del estilo.

Cuando los pistilos de *N. alata*  $S_{A_2}S_{A_2}$  se polinizaron con granos de polen  $S_{A_2}$  sin transformar (cruza incompatible), no se observaron tubos polínicos en la base del estilo (Figura 17A y 17E; Apéndice 4); ya que su crecimiento se detuvo en el estigma y en el primer tercio del estilo (situación común en cruza incompatibles de *Nicotiana*); lo cual concuerda con la longitud promedio de los tubos polínicos observados, que fue equivalente al 28 % de la longitud del estilo (Error estándar de la media o SEM= 3.9; n= 28 pistilos analizados). Cuando los granos de polen  $S_{A_2}$  fueron bombardeados con el vector vacío, el crecimiento promedio de los tubos polínicos fue equivalente al 26 % de la longitud del estilo (SEM= 2.9; n= 67 pistilos analizados; Figura 17B y 17E; Apéndice 4). Estos datos muestran un comportamiento similar a los granos de polen sin transformar o tipo silvestre en una crusa incompatible. De hecho, el bombardeo con el vector vacío no tuvo un efecto significativo en la longitud de los tubos polínicos comparado con las polinizaciones realizadas con los granos de polen sin transformar (Apéndice 5).

Por otro lado, cuando los granos de polen fueron bombardeados con la construcción *RNAi-NaSIPP*, se observó un incremento significativamente mayor en el número de tubos polínicos que alcanzaron la base del estilo (Apéndice 4), comparado con las polinizaciones realizadas con los granos de polen sin transformar y granos de polen transformados con el vector vacío (Figura 17C y 17E). La longitud promedio de los tubos polínicos fue equivalente al 64.9 % de

la longitud del estilo (SEM= 2.3; n= 89 pistilos analizados). Al igual, existe una diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) entre los granos de polen transformados con *RNAi-NaSIPP* y los transformados con el vector vacío (Apéndice 5); estos datos indican que *RNAi-NaSIPP* provoca que los tubos polínicos incompatibles crezcan una distancia significativamente mayor, hasta el punto de que varios de los tubos polínicos alcanzan la base del estilo (Apéndice 4); por lo cual se infiere que la supresión de NaSIPP mediante el RNAi afecta el mecanismo de AI, dando soporte a la hipótesis de que NaSIPP está involucrado en la respuesta de AI en *Nicotiana*. Por otro lado, cuando se realizó una cruce compatible, es decir los pistilos  $S_{C10}S_{C10}$  de *N. alata* fueron polinizados con polen  $S_{A2}$  transformado con la construcción *RNAi-NaSIPP*; la mayoría de los tubos polínicos alcanzan la base del estilo (Figura 17D), como es de esperar en cruces compatibles, sugiriendo que *RNAi-NaSIPP* no afecta el proceso de polinización. Al igual, se comparó la germinación *in vitro* de los granos de polen bombardeados con el vector vacío y con la construcción *RNAi-NaSIPP* y no se observaron diferencias significativas en la cantidad de tubos polínicos germinados (datos no mostrados).

Estos resultados proporcionan evidencia de que el polen transformado con la construcción *RNAi-NaSIPP* provoca que los tubos polínicos puedan alcanzar la base del estilo en cruces incompatibles y sugieren que NaSIPP está involucrado en la respuesta de AI en *Nicotiana*, permitiéndonos proponer a NaSIPP como un nuevo gen modificador del polen.

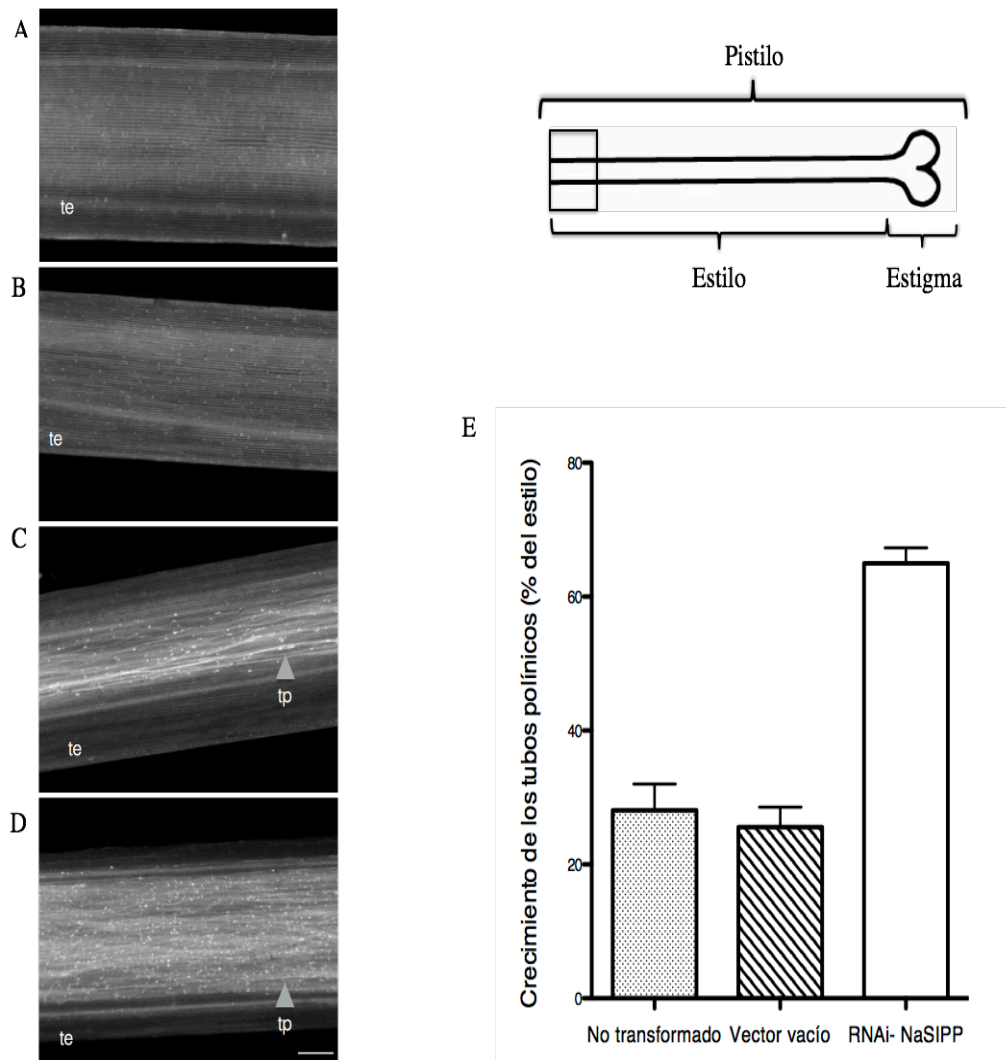


Figura 17. La supresión de NaSIPP en tubos polínicos afecta la AI en *N. alata*. Pistilos de *N. alata* fueron polinizados con polen  $S_{A2}$  y procesados después de 72 h post-polinización. Como se muestra en el diagrama (parte superior derecha), las imágenes fueron tomadas en o cerca de la base del estilo. (A) Pistilos  $S_{A2}S_{A2}$  fueron polinizados con polen sin transformar, se muestra el rechazo de polen alelo *S* específico, no se observan tubos polínicos en la base del estilo; únicamente se observa parte del tejido epidérmico del estilo (te). (B) Pistilos  $S_{A2}S_{A2}$  AI fueron polinizados con polen  $S_{A2}$  bombardeado con vector vacío. (C) Pistilos  $S_{A2}S_{A2}$  AI fueron polinizados con polen  $S_{A2}$  bombardeado con la construcción *RNAi-NaSIPP*; se observan tubos polínicos (tp) en la base del estilo. Los tubos polínicos lucen como hebras brillantes (puntas de flecha gris). (D) Pistilos  $S_{C10}S_{C10}$  AI fueron polinizados con polen  $S_{A2}$  bombardeado con *RNAi-NaSIPP* (cruza compatible). (E) Histograma de la longitud de los tubos polínicos después de que los pistilos  $S_{A2}S_{A2}$  de *N. alata* fueron polinizados con polen  $S_{A2}$  no transformado, con granos de polen  $S_{A2}$  bombardeados con vector vacío y granos de polen  $S_{A2}$  bombardeados con la construcción *RNAi-NaSIPP*. Los resultados indican el promedio y el error estándar de 28 polinizaciones con granos de polen no transformados, 67 polinizaciones con granos de polen transformados con vector vacío y 89 polinizaciones con la construcción *RNAi-NaSIPP*. La barra de error representa el SEM (error estándar de la media), los asteriscos representan el nivel de significancia ( $P < 0.05$ , ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de Dunnett). Escala: 50  $\mu$ m.



## VII. DISCUSIÓN

Debido al papel de NaStEP como gen modificador estigmático en *Nicotiana* y a su ingreso a los tubos polínicos después de la polinización (Jiménez-Durán *et al.*, 2013), propusimos que su función depende de la interacción física con proteínas del polen. Por esta razón, se buscaron interactores proteicos mediante ensayos de doble híbrido (García-Valencia, 2013) e identificamos un nuevo TFM de polen, llamado NaSIPP, el cual interactúa con NaStEP y esta interacción está asociada a la mitocondria. Al igual, damos evidencia de que NaSIPP es un gen involucrado en la respuesta de rechazo del polen en *Nicotiana*.

La interacción de NaStEP con una proteína mitocondrial, como NaSIPP fue inesperada, debido a que estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la proteína estigmática NaStEP tiene actividad inhibitoria de proteasas y es un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en tubos polínicos (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Sin embargo, la interacción de NaStEP con la proteína de membrana NaSIPP, concuerda con algunos reportes, en donde se describe la interacción de inhibidores de proteasas tipo Kunitz con proteínas de membrana, como canales iónicos, induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana (Lancelin *et al.*, 1994; Harvey, 2001; Peigneur *et al.*, 2011; García-Fernández *et al.*, 2016).

La expresión específica de *NaSIPP* en polen maduro de *Nicotiana* y su capacidad para complementar parcialmente a la mutante de levaduras deficiente en el transporte de fosfato (*Amir1*), podrían relacionar a esta proteína con los requerimientos energéticos del tubo polínico. Debido a que una vez que el tubo polínico comienza a crecer, equilibra la presión de turgencia y la extensibilidad de la pared celular apical, lo cual conlleva diferentes procesos que requieren la hidrólisis de ATP como el tráfico vesicular (Zhang *et al.*, 2010), la osmoregulación (Messerli *et al.*, 1999), la síntesis de la pared celular (Winship *et al.*, 2010) y la síntesis de proteínas (Hoekstra y Bruinsma, 1979; Roy *et al.*, 2011).

NaSIPP es expresado en polen maduro tanto de especies AI como AC de *Nicotiana*, pero sus ortólogos en especies AC de *Nicotiana*, presentan mutaciones (inserciones/ deleciones) que provocan corrimientos en el marco de lectura, generando codones de paro prematuros (Figura 16, Apéndice 3), lo cual sugiere que aunque estas proteínas sean traducidas, no serán funcionales. Esta evidencia, hace poco probable la participación de NaSIPP en aspectos generales del metabolismo energético del tubo polínico o de la polinización. Además, el

patrón de expresión de *NaSIPP* en especies AI y la alteración en el fenotipo de AI cuando se empleó la construcción de silenciamiento *RNAi-NaSIPP* en los tubos polínicos, demuestran que *NaSIPP* está involucrado en la respuesta de rechazo del polen en *Nicotiana*.

Los TFM como su nombre lo indica, transportan fosfato citosólico al interior de la mitocondria, ya sea mediante el cotransporte con protones (Pratt *et al.*, 1991), o mediante el intercambio con iones hidroxilo (Stappen *et al.*, 1994). El fosfato, junto con el ADP, son requeridos para la producción de ATP durante la fosforilación oxidativa (Palmieri, 2004). Además, recientes investigaciones han mostrado al TFM como un componente del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial ó PTP (Leung *et al.*, 2008; Gutiérrez-Aguilar *et al.*, 2010; Varanyuwatana y Halestrap, 2012); el cual es un canal no específico que comunica la matriz mitocondrial directamente con el citoplasma (Haworth y Hunter, 1979; Crompton *et al.*, 1987). El PTP generalmente se encuentra cerrado y su apertura puede deberse a diferentes estímulos, incluyendo un exceso de calcio en la matriz mitocondrial (Hunter y Haworth, 1979; Al-Nasser y Crompton, 1986), provocando un incremento en la cantidad de fosfato inorgánico mitocondrial (Crompton y Costi, 1988; Kushnareva *et al.*, 1999; Arpagaus *et al.*, 2002). La apertura del PTP incrementa la permeabilidad mitocondrial inespecífica a solutos y produce el colapso del potencial de membrana (Bhosale *et al.*, 2015); como resultado, se detiene la síntesis de ATP causando una crisis bioenergética (Halestrap *et al.*, 1998; 2004). En un futuro, sería interesante probar si *NaSIPP* es un componente de un tipo-PTP y si su interacción con *NaStEP* puede contribuir a la inhibición del crecimiento del tubo polínico en el rechazo del polen de manera *S* específica en *Nicotiana*.

La apertura del PTP, desencadena la liberación de citocromo c junto con otros factores de muerte celular (Petronilli *et al.*, 1994; Doran y Halestrap 2000), dichos eventos son cruciales para la activación de muerte celular programada (PCD) tanto en animales como en plantas (Beers, 1997; Balk *et al.*, 1999; Stein y Hansen, 1999; Sun *et al.*, 1999; Lam y del Pozo, 2000). A pesar de que en el sistema de AI de *Nicotiana* se desconoce si esto sucede, sería muy interesante explorar esta posibilidad en el futuro, debido a que el mecanismo de PCD ha sido implicado en la respuesta de rechazo del polen en sistemas de incompatibilidad gametofíticos (Thomas y Franklin-Tong, 2004). Asimismo se han reportado diferentes características distintivas de la PCD en especies de Solanaceas; como la disipación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tubos polínicos incompatibles (Wang *et al.*, 2010a), la degradación de DNA nuclear y alteraciones mitocondriales en *Pyrus pyrifolia* (Wang *et al.*,

2010b; 2011) y en *Olea europea* (Serrano *et al.*, 2010), la despolimerización del citoesqueleto de actina en *N. alata* (Roldán *et al.*, 2012); así como alteraciones morfológicas en el retículo endoplásmico y agregación de vesículas en el ápice del tubo polínico en *Solanum peruvianum* (de Nettancourt *et al.*, 1973) y *Brugmansia suaveolens* (Geitmann *et al.*, 1995).

Hasta el momento no se ha demostrado si el mecanismo de AI en *Nicotiana* involucra un programa de PCD, pero las características de NaSIPP y la posibilidad de que la muerte celular programada pueda ser parte de la respuesta de rechazo del polen, hacen a NaSIPP un buen candidato para participar en dicha cascada de señalización. Englobando lo hasta ahora expuesto, se propone el siguiente modelo:

La interacción entre las S-RNasas y SLFs determina el fenotipo de una cruce, es decir, la interacción *S* específica genera una cruce incompatible, mientras que una interacción *S* inespecífica, produce una cruce compatible. Posteriormente, actúan los productos de los genes modificadores *ABCF*, *HT-B*, *NaStEP* y *NaSIPP*. NaStEP ingresa tanto a los tubos polínicos compatibles como incompatibles en tiempos tempranos de la polinización (Jimenez- Durán *et al.*, 2013). En tiempos posteriores, se incorporarían las proteínas HT-B, 120K y las S-RNasas (Goldraj *et al.*, 2006). El transporte de las S-RNasas al interior del tubo polínico en *Malus domestica* y *Petunia inflata* esta mediada por el transportador ABCF (Meng *et al.*, 2010). 120K y las S-RNasas se dirigen a las vacuolas de los tubos polínicos (Goldraj *et al.*, 2006).

En una cruce incompatible, es posible que una porción de NaStEP desarrolle una función citoplásmica, actuando como un inhibidor de proteasas, protegiendo a HT-B de la degradación. Por otro lado, NaStEP interacciona con NaSIPP en la mitocondria; esta interacción podría causar una crisis bioenergética, contribuyendo a la inhibición del crecimiento del tubo polínico. Asimismo, las S-RNasas son liberadas de las vacuolas y ejercen su efecto citotóxico en los tubos polínicos.

Mientras que en una cruce compatible, la interacción entre NaSIPP y NaStEP podría ser impedida o alterada a través de un mecanismo aún desconocido; aunque podría ser por la degradación de NaStEP debido a que en nuestro laboratorio se tienen evidencias de la disminución en sus niveles en tubos polínicos de cruces compatibles (datos no publicados). Lo anterior permitiría que las S-RNasas se mantuvieran contenidas en las vacuolas de los tubos

polínicos (Goldraij *et al.*, 2006), HT-B sería degradada y las mitocondrias se mantendrían saludables para proveer el ATP requerido para el crecimiento de los tubos polínicos.

El objetivo a futuro de esta investigación es proponer un modelo comprensible del mecanismo de AI en *Nicotiana*, identificando los factores requeridos para la vía del rechazo del polen y explicar su participación en el rechazo del polen alelo *S* específico. En este trabajo, dimos evidencia de que *NaSIPP* es un gen involucrado en el mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen propio, lo que abre la puerta al estudio de la participación de las mitocondrias en la respuesta de rechazo del polen en *Nicotiana*.

## VIII. CONCLUSIONES

- NaSIPP es una proteína mitocondrial que interacciona con la proteína estigmática NaStEP y esta interacción se asocia a la mitocondria.
- NaSIPP presenta actividad de transportador de fosfatos, ya que complementa y restaura el fenotipo silvestre de la mutante  $\Delta mir1$  de *S. cerevisiae*.
- *SIPP* es un gen con expresión polen específica. Sus ortólogos de especies AC de *Nicotiana* presentan inserciones/ deleciones en su secuencia generando corrimientos de marco de lectura y codones de paro prematuros.
- La transformación de granos de polen con la construcción *RNAi-NaSIPP* provoca que los tubos polínicos alcancen la base del estilo en cruza incompatibles, es decir el polen no es rechazado de manera alelo *S* específica, lo cual permite concluir que *NaSIPP* está involucrado en la respuesta de AI en *Nicotiana*.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

**Al-Nasser I, Crompton M** (1986) The entrapment of the Ca<sup>2+</sup> indicator arsenazo III in the matrix space of rat liver mitochondria by permeabilization and resealing. Na<sup>+</sup>-dependent and -independent effluxes of Ca<sup>2+</sup> in arsenazo III-loaded mitochondria. *Biochem J* **239**(1): 31-40

**Arpagaus S, Rawlyer A, Braendle R** (2002) Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *J Bio Chem* **277**(3): 1780-1787

**Ashkani J, Rees DJ** (2016) A Comprehensive Study of Molecular Evolution at the Self-Incompatibility Locus of Rosaceae. *J Mol Evol* **82**(2-3): 128-145

**Balk J, Leaver CJ, McCabe PF** (1999) Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett* **463**(1-2): 151-154

**Barret S** (2010) Darwin's legacy: the forms, function and sexual diversity of flowers. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **365**: 351-368

**Bàthori G, Parolini I, Tombola F, Szabò I, Messina A, Oliva M, De Pinto V, Lisanti M, Sargiacomo M, Zoratti M** (1999) Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J Biol Chem* **274**(42): 29607-29612

**Bechsgaard J, Castric V, Charlesworth D, Vekemans X, Schierup M** (2006). The transition to Self-compatibility in *Arabidopsis thaliana* and evolution within S-haplotypes over 10 Myr. *Mol. Biol. Evol.* **23**(9): 1741-1750

**Bedhomme M, Hoffmann M, McCarthy EA, Gambonnet B, Moran RG, Rébeillé F, Ravanel S** (2005) Folate metabolism in plants: an *Arabidopsis* homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts. *J Biol Chem* **280**(41): 34823-34831

**Beecher B, McClure BA** (2001) Expressing self-incompatibility RNases (S-RNases) in transgenic plants. *Methods Mol Biol* **160**: 65-85

**Beers EP** (1997) Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ* **4**(8): 649-661

**Bernatzky R** (1993) Genetic mapping and protein product diversity of the self-incompatibility locus in wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*). *Biochem. Gen.* **31**: 173-184

**Bhosale G, Sharpe JA, Sundier SY, Duchon MR** (2015) Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann N Y Acad Sci* **1350**: 107-116

**Bosch M, Derksen J, Mariani C** (2003) A functional study of stylar hydroxyproline-rich glycoproteins during pollen tube growth. *Sex Plant Reprod* **16**: 87-98

**Bosch M, Franklin-Tong V** (2008) Self-incompatibility in Papaver: signalling to trigger PCD in incompatible pollen. *J Exp Bot* **59**(3): 481-490

**Bredimeijer G, Blaas J** (1981) S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theor Appl Genet* **59**: 185-190

**Briggs C, Mincone L, Wohlrab H** (1999) Replacements of basic and hydroxyl amino acids identify structurally and functionally sensitive regions of the mitochondrial phosphate transport protein. *Biochemistry* **38**(16): 5096-5102

**Busot GY, McClure B, Ibarra-Sánchez CP, Jiménez-Durán K, Vázquez-Santana S, Cruz-García F** (2008) Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *J Exp Bot* **59**(11): 3187-3201

**Cabrillac D, Cock J, Dumas C, Gaude T** (2001) The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat protein. *Nature* **410**(6825): 220-223

**Campanoni P, Sutter JU, Davis CS, Littlejohn GR, Blatt MR** (2007) A generalized method for transfecting root epidermis uncovers endosomal dynamics in *Arabidopsis* root hair. *Plant J* **51**: 322-330

**Chae K, Lord E** (2010) Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins. *Ann Bot* **108**(4): 627-636

**Chapman L, Goring D** (2010) Pollen-pistil interactions regulating successful fertilization in the Brassicaceae. *J Exp Bot* **61**(7): 1987-1999

**Charlesworth D, Willis J** (2009) The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genet* **10**(11): 783-796

**Chen CY, Wong EI, Vidali L, Estavillo A, Hepler PK, Wu HM, Cheung AY** (2002) The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *Plant Cell* **14**(9): 2175-2190

**Cheung A, Wang H, Wu H** (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**(3): 383-393

**Cheung AY, Chen CY, Glaven RH, de Graaf BH, Vidali L, Hepler PK, Wu HM** (2002) Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth. *Plant Cell* **14**(4): 945-962

**Crompton M, Costi A** (1988) Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca<sup>2+</sup>, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca<sup>2+</sup> overload. *Eur J Biochem* **178**(2): 489-501

**Crompton M, Costi A, Hayat L** (1987) Evidence for the presence of a reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* **245**(3): 915-918

**Cruz-García F, Hancock N, Kim D, McClure B** (2005) Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *Plant J* **42**(3): 295-304

**Cruz-García F, McClure B** (2001) *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Netherland

**Darwin, C** (1876) *The Effect of cross and self-fertilization in the vegetable Kingdom*. John Murray, London

**de Graaf B, Knuiman B, Derksen J, Mariani C** (2003) Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of *Nicotiana tabacum*. *J Exp Biol* **54**(380): 55-63

**de Graaf B, Rudd J, Wheeler M, Perry R, Bell E, Osman K, Franklin-Tong V** (2006) Self-incompatibility in *Papaver* targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen. *Nature* **444**(7118): 490-493

**de Nettancourt D** (2001) *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants*. Springer-Verlag, New York



**de Nettancourt D, Devreux M, Bozzini A, Cresti M, Pacini E, Sarfatti G** (1973) Ultrastructural aspects of the self-incompatibility mechanism in *Lycopersicon peruvianum* Mill. *J Cell Sci* **12**: 403-419

**Dixit R, Nasrallah M, Nasrallah J** (2000) Post-transcriptional maturation of the S receptor kinase of Brassica correlates with co-expression of the S-locus glycoprotein in the stigmas of two Brassica strains and in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* **124**(1): 297-311

**Dolce V, Fiermonte G, Palmieri F** (1996) Tissue-specific expression of the two isoforms of the mitochondrial phosphate carrier in bovine tissues. *FEBS Lett* **399**: 95-98

**Doran E, Halestrap AP** (2000) Cytochrome c release from isolated rat liver mitochondria can occur independently of outer-membrane rupture: possible role of contact sites. *Biochem J* **348**:343–350

**Doucet J, Lee HK, Goring DR** (2016) Pollen acceptance or rejection: a tale of two pathways. *Trends Plant Sci* **21**(12): 1058-1067

**Edlund A, Swanson R, Preuss D** (2004) Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell* **16**: S84-S97

**Entani T, Iwano M, Shiba H, Che FS, Isogai A, Takayama S** (2003) Comparative analysis of the self-incompatibility S-locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells* **8**(3): 203-213

**Fiermonte G, Dolce V, Palmieri F** (1998) Expression in *Escherichia coli*, functional characterization, and tissue distribution of isoforms A and B of the phosphate carrier from bovine mitochondria. *J Biol Chem* **273**: 22782- 22787

**Fobis-Loisy I, Gaude T** (2010) Control of fertilization by self- incompatibility mechanisms. *Biol Aujourd'hui* **204**(1): 33-42

**Foote H, Ride J, Franklin-Tong V, Walker E, Lawrence M, Franklin F** (1994) Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(6): 2265-2269

**Franklin-Tong** (2008) Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity and mechanism. Springer, New York

**Franklin-Tong V** (1999) Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell*. **11**(4): 727-738

**Fu Y, Li H, Yang H** (2002) The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and early phase of directional cell expansion during Arabidopsis organogenesis. *Plant Cell* **14**(4): 777-794

**Fukao Y, Hayashi Y, Mano S, Hayashi M, Nishimura M** (2001) Developmental analysis of a putative ATP/ADP carrier protein localized on glyoxysomal membranes during the peroxisome transition in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol* **42**(8): 835-841

**García-Fernández R, Peigneur S, Pons T, Alvarez C, González L, Chávez MA, Tytgat J** (2016) The Kunitz-Type Protein ShPI-1 Inhibits Serine Proteases and Voltage-Gated Potassium Channels. *Toxins (Basel)* **8**(4): 110

**García-Valencia LE** (2013) Interactores proteicos de NaStEP en el polen/ tubo polínico de *Nicotiana glauca*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM

**García-Valencia LE, Bravo-Alberto CE, Cruz-García F** (2013) Avoiding the incest in plants: genetic and biochemical control. *TIP* **16**(1): 57-65

**García-Valencia LE, Bravo-Alberto CE, Wu HM, Rodríguez-Sotres R, Cheung AY, Cruz-García F** (2017) SIPP, a novel mitochondrial phosphate carrier mediates in self-incompatibility. *Plant Physiol* **175**(3): 1105-1120

**Gaude T, Fobis-Loisy I, Miede C** (2006) Control of fertilization by self-incompatibility mechanisms. In: *The molecular biology and biotechnology of flowering*. Jordan B, Wallingford

**Gaude T, McCormick** (1999) Signaling in pollen- pistil interactions. *Semin Cell Dev Biol* **10**(2): 139-147

**Geitmann A, Hudák J, Vennigerholz F, Walles B** (1995) Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of *Brugmansia suaveolens*- Implications for self-incompatibility reaction. *J Plant Physiol* **147**(2): 225-235

**Gibbon B, Kovar D, Staiger C** (1999) Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *Plant Cell* **11**(12): 2349-2363

**Goldberg E, Kohn J, Lande R, Robertson A, Smith S, Iqbal B** (2010) Species selection maintains self-incompatibility. *Science* **330**(6003): 493-495

**Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-García F, McClure BA** (2006) Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* **439** (7078): 805-810

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

**Grefen C, Donald N, Schumacher K, Blatt MR** (2010) A Ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J* **64**(2): 355-365

**Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias D, Goring D** (1998) Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(1): 382-387

**Gutiérrez-Aguilar M, Pérez-Martínez X, Chávez E, Uribe-Carvajal S** (2010) In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the mitochondrial unselective channel. *Arch Biochem Biophys* **494**(2): 184-191

**Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA** (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**(3): 372-385

**Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY** (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* **1366**(1-2): 79-94

**Hamamura Y, Nagahara S, Higashiyama T** (2012) Double fertilization on the move. *Curr Opin Plant Biol* **15**(1): 70-77

**Hamel P, Saint-Georges Y, de Pinto B, Lachacinski N, Altamura N, Dujardin G** (2004) Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Microbiol* **51**:307-317

**Hancock CN, Kent L, McClure BA** (2005) The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J* **43**(5): 716-723

- Harvey AL** (2001) Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon* **39**(1): 15-26
- Haworth RA, Hunter DR** (1979) The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria: II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Arch Biochem and Biophys* **195**(2): 460-467
- Hepler P, Vidali L, Cheung A** (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev* **17**:159-187
- Hiscock S, Allen A** (2008) Diverse cell signaling pathways regulate pollen- stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol* **179**(2): 286- 317
- Hiscock S, McInnis S** (2003) Pollen recognition and rejection during the sporophytic self- incompatibility response: Brassica and beyond. *Trends Plant Sci* **8**(12): 606-613
- Hoekstra FA, Bruinsma J** (1979) Protein synthesis of binucleate and trinucleate pollen and its relationship to tube emergence and growth. *Planta* **146** (5): 559-566
- Hua Z, Kao T** (2006) Identification and characterization of components of a putative Petunia S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* **18**(10): 2531-2553
- Hua Z, Kao TH** (2008) Identification of major lysine residues of S(3)-RNase of Petunia inflata involved in ubiquitin-26S proteasome-mediated degradation in vitro. *Plant J* **54**(6): 1094-1104
- Huang J, Zhao L, Yang Q, Xue Y** (2006) AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *Plant J* **46**(5): 780-793
- Huang S, Blanchoin L, Chaidhry F, Franklin-Tong V, Staiger C** (2004) A gelosin-like protein from Papaver rhoeas pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments. *J Biol Chem* **279**(22): 23364-23375
- Huang S, Lee H, Karunanandaa B, Kao T** (1994) Ribonuclease activity of Petunia inflata S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* **6**(7): 1021-1028
- Hunter DR, Haworth RA** (1979) The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanism. *Arch Biochem Biophys* **195**(2): 453-459
- Hunter P** (2009) Me, myself and I. The genetics and molecular biology behind self-incompatibility and the avoidance of inbreeding in plants. *EMBO Rep* **10**(12): 1297-1300

**Ida K, et al.**, (2001) The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana alata* SF11- RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J Mol Biol* **314**(1): 103- 112

**Ioerger T, Gohlke J, Xu B, Kao T** (1991) Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex Plant Reprod* **4**:81-88

**Ivanov R, Fobis-Loisy I, Gaude T** (2010) When no means no: guide to Brassicaceae self-incompatibility. *Trends Plant Sci* **15**(7): 387-394

**Iwano M, Shiba H, Funato M, Shimosato H, Takayama S, Isogai A** (2003) Immunohistochemical studies on translocation of pollen S-haplotype determinant in self-incompatibility from *Brassica oleracea*. *Plant Cell Physiol* **44**(4): 428-436

**Jiménez-Durán K** (2013) NaStEP: Proteína estigmática esencial en la autoincompatibilidad y regulador positivo de la estabilidad de HT-B en los tubos polínicos de *Nicotiana*. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM

**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 positive regulator of the HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiol* **161**(1): 97-107

**Jordan N, Franklin F, Franklin-Tong V** (2000) Evidence for DNA fragmentation triggers in the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *Plant J* **23**(4): 471-479

**Juárez-Díaz J, McClure B, Vázquez-Santana S, Guevara-García A, León- Mejía P, Márquez-Guzmán J, Cruz-García F** (2006) A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana alata* and reduces S-RNase in vitro. *J Biol Chem* **281**(6): 3418-3424

**Kondo K, McClure B** (2008) New microsome-associated HT-B family proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family. *Mol Plant* **1**(4): 634-644

**Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, Kowiyama** (2002a) Insights into the evolution of self-compatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors. *Plant J* **30**(2): 143-153

**Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, Kowyama Y** (2002b) Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant J* **29**(5): 627-636

**Kubo K, Entani T, Takara A, Wang N, Field AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Isogai A, Kao TH, Takayama S** (2010) Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science* **330**(6005): 796-799

**Kushnareva YE, Haley LM, Sokolove PM** (1999) The role of low (< or = 1mM) phosphate concentrations in regulation of mitochondrial permeability: modulation of matrix free Ca<sup>2+</sup> concentration. *Arch Biochem Biophys* **363**(1): 155-162

**Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y** (2002) An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol* **50**(1): 29-42

**Lam E, del Pozo O** (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* **44**(3): 417-428

**Lancelin JM, Foray MF, Poncin M, Hollecker M, Marion D** (1994) Proteinase inhibitor homologues as potassium channel blockers. *Nat Struct Biol* **1**(4): 246-250

**Lee CB, Kim S, McClure B** (2009) A pollen protein, NaPCCP, that binds pistil arabinogalactan proteins also binds phosphatidylinositol 3-phosphate and associates with the pollen tube endomembrane systems. *Plant Physiol* **149**(2): 791-802

**Lee CB, Swatek KN, McClure B** (2008) Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana glauca* pistil arabinogalactan proteins. *J Biol Chem* **283**(40): 26965-26973

**Lee H, Huang S, Kao T** (1994) S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**(6463): 560-563

**Leroch M, Kirchberger S, Haferkamp I, Wahl M, Neuhaus HE, Tjaden J** (2005) Identification and characterization of a novel plastidic adenine nucleotide uniporter from *Solanum tuberosum*. *J Biol Chem* **280**(18): 17992-8000

**Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP** (2008) The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* **283**(39): 26312-26323

**Li S, Sun P, Williams JS, Kao TH** (2014) Identification of the self-incompatibility locus F-box protein-containing complex in *Petunia inflata*. *Plant Reproduction* **27**(1): 31-45

**Lind J, Bacic A, Clarke A, Anderson M** (1994) A style-specific hydroxiprolin-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant J* **6**(4): 491-502

**Lind JL, Bönig I, Clarke AE, Anderson MA** (1996) A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo. *Sex Plant Reprod* **9**: 75-86

**Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M** (1994) Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signaling hypothesis. *Trends Cell Biol* **4**(7): 231-235

**Logan DC, Leaver CJ** (2000) Mitochondria-target GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J Exp Bot* **51**(346): 865-871

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

**McClure BA, Cruz-García F, Beecher B, Sulaman W** (2000). Factors affecting inter and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann Bot* **85**(1): 113- 123

**McClure BA, Franklin-Tong V** (2006) Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanism involved in “self” pollen tube inhibition *Planta* **224**(2): 233-245

**McClure BA, Haring V, Ebert P, Anderson M, Simpson R, Sakiyama F, Clarke A** (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**(6252): 955-957

**McClure BA, Mou B, Canevascini S, Bernatzky** (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**(23): 13548-13553

**Meng D, Gu Z, Li W, Wang A, Yuan H, Yang Q, Li T** (2014) Apple MdABCF assists in the transportation of S-RNase into pollen tubes. *Plant J* **78**(6): 990-1002

**Messerli MA, Danuser G, Robinson KR** (1999) Pulsatile influxes of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> lag growth pulses of *Lilium longiflorum* pollen tubes. *J Cell Sci* **112**(Pt 10): 1497- 1509

**Murakami H, Blobel G, Pain D** (1990) Isolation and characterization of the gene for a yeast mitochondrial import receptor. *Nature* **347**(6292): 488-491

**Murase K, Shilba H, Iwano M, Che F, Watanabe M, Isogai A, Takayama S** (2004) A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self- incompatibility signaling. *Science* **303**(5663): 1516-1519

**Murffet J, Atherto TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA** (1994) S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele specific pollen rejection. *Nature* **367**(6463): 563-566

**Murffet J, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure BA** (1996) S-RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: Multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *Plant Cell* **8**(6): 943-958

**Nasrallah J, Nasrallah M** (1993) Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* **5**: 1325-1335

**Newbigin E, Anderson M, Clarke A** (1993) Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* **5**: 1315-1324

**O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Koyama Y, Matton DP** (2002) Molecular analysis of the stilar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J* **32** (6): 985-996

**O'Brien M, Major G, Chanta S, Matton D** (2004) Isolation of a S-RNase protein from *Solanum chacoense*: identification of an SBP1 (Ring finger protein) ortholog. *Sex Plant Reprod.* **17**: 81-87

**Palmieri F** (1994) Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett* **346**(1): 48-54

**Palmieri F** (2004) The mitochondrial transport family (SCL25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* **447**(5): 689-709



**Palmieri L, Rottensteiner H, Girzalsky W, Scarcia P, Palmieri F, Erdmann R** (2001) Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J* **20**(18): 5049-5059

**Peigneur S, Billen B, Derua R, Waelkens E, Debaveye S, Béress L, Tytgat J** (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem Pharmacol* **82**(1): 81-90

**Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P** (1994) Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* **1187**: 255-259

**Phelps A, Briggs C, Haefele A, Mincone L, Ligeti E, Wohlrab H** (2001) Mitochondrial phosphate transport protein. Reversions of inhibitory conservative mutations identify four helices and a nonhelix protein segment with transmembrane interactions and Asp39, Glu137, and Ser158 as nonessential for transport. *Biochemistry* **40**(7): 2080-2086

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

**Poulter N, Vavotec S, Franklin-Tong V** (2008) Microtubules are target for self-incompatibility signaling in *Papaver* pollen. *Plant Physiol* **146**(3): 1358-1367

**Pratt RD, Ferreira GC, Pedersen PL** (1991) Mitochondrial phosphate transport. Import of the H<sup>+</sup>/Pi symporter and role of the presequence. *J Biol Chem* **269**: 11240- 11246

**Puerta AR, Ushijima K, Koba T, Sassa H** (2009) Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *J Exp Bot* **60**(4): 1309–1318

**Qiao H, Wang H, Zhao J, Huang J, Zhang Y, Xue Y** (2004) The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* **16**(3): 582-595

**Roldán J, Quiroga R, Goldraij A** (2010) Molecular and genetic characterization of novel S-RNases from a natural population of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Rep* **29**(7): 735- 746

**Roldán J, Rojas HJ, Goldriaaj A** (2012) Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the in vivo self-incompatibility response in *Nicotiana glauca*. *Ann Bot* **110**(4): 787-795

**Roy B, Copenhaver GP, von Arnim AG** (2011) Fluorescence-tagged transgenic lines reveal genetic defects in pollen growth—Application to the Eif3 complex. *PLoS ONE* **6**: e17640

**Rudd J, Franklin F, Lord J, Franklin-Tong V** (1996) Increased phosphorylation of a 26-kD pollen protein is induced by the Self- Incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell* **8**(4): 713-724

**Sassa H, Hirano H** (2006) Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from the self-incompatibility factor HT. *Mol Genet and Genomics* **275** (1): 97-104

**Schopfer C, Nasrallah M, Nasrallah J** (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**(5445): 1697-1700

**Serrano I, Pelliccione S, Olmedilla A** (2010) Programmed-cell-death hallmarks in incompatible pollen and papillar stigma cells of *Olea europaea* L. under free pollination. *Plant Cell Rep* **29**(6): 561-572

**Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY** (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**(12): 1567-1572

**Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao TH** (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* **429**(6989): 302-305

**Snow A, Spira T** (1991) Pollen vigor and the potential for sexual selection in plants. *Nature* **352**(29): 796-797

**Snowman B, Kovar D, Schevchenko G, Franklin-Tong V, Staiger C** (2002). Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self- incompatibility response. *Plant Cell* **14**(10): 2613-2626

**Sommer-Knudsen J, Clarke A, Bacic A** (1996) A galactose-rich, cell wall glycoprotein from styles of *Nicotiana glauca*. *Plant J* **9**(1): 71-83

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

**Stappen R, Krämer R** (1994) Kinetic mechanism of phosphate/phosphate and phosphate/OH<sup>-</sup> antiports catalyzed by reconstituted phosphate carrier from beef heart mitochondria. *J Biol Chem* **269**: 11240- 11246

**Stein JC, Hansen G** (1999) Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol* **121**(1): 71-80

**Stone S, Arnold M, Goring D** (1999) A breakdown of Brassica self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **286**(5445): 1729-1731

**Sun YL, Zhao Y, Hong X, Zhai ZH** (1999) Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett* **462**(3): 317-321

**Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K** (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in Brassica stigma. *Nature*. **403**(6772): 913-916

**Takayama S, et al.**, (2000) The pollen determinant of self-incompatibility in Brassica campestris. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(4): 1920-1925

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

**Thomas SG, Franklin-Tong VE** (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen. *Nature* **429**(6989): 305-309

**Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Masada M, Zhu X, Marchesi E, Kao T-h** (1999) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. *Sex Plant Reprod* **12**:6-13

**Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun , Marchesi E, Kao T-h** (2003) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiol* **131**(4): 1903-1912

**Twell D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick S** (1989) Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol Gen Genet* **217**(2-3): 240-245

**Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H** (2003) Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism **15**(3): 771-781

**Varanyuwatana P, Halestrap AP** (2012) The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion* **12**(1): 120-125

**Vierstra RD** (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* **8**(3): 135-142

**Wandrey M, Trevaskis B, Brewin N, Udvardi MK** (2004) Molecular and cell biology of a family of voltage-dependent anion channel porins in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **134**(1): 182-193

**Wang CL, Wu J, Xu GH, Gao YB, Chen G, Wu JY, Wu HQ, Zhang SL** (2010a) S-RNase disrupts tip-localized reactive oxygen species and induces nuclear DNA degradation in incompatible pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*. *J Cell Sci* **123**(Pt 24): 4301-4309

**Wang CL, Xu GC, Jiang XT, Chen G, Wu J, Wu HQ, Zhang SL** (2010b) S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia*. *Plant J* **57**(2): 220-9

**Wang CL, Zhang SL** (2011) A cascade signal pathway occurs in self-incompatibility of *Pyrus pyrifolia*. *Plant Signal Behav* **6**(3): 420-1

**Wang Y, Tsukamoto T, Yi KW, Wang X, Huang S, McCubbin AG, Kao TH** (2004) Chromosome walking in the *Petunia inflata* self-incompatibility (S-) locus and gene identification in an 881-kb contig containing S2-RNase. *Plant Mol Biol* **54**(5): 727-774

**Watanabe M, Suwabe K, Suzuki G** (2012) Molecular genetics, physiology and biology of self-incompatibility in Brassicaceae. *Proc Jpn Acad* **88**: 519-535

**Wetering K, Schrauwen J, Wullems G, Twell D** (1995) Functional dissection of the promoter of the pollen-specific gene NTP303 reveals novel pollen specific and conserved cis-regulatory element. *Plant J* **8**(1): 55-63

**Wheeler D, Newbigin E** (2007) Expression of 10 S-class SLF-like genes in *Nicotiana glauca* pollen and its implications for understanding the pollen factor of the S locus. *Genetics* **177**(4): 2171-2180

**Wheeler M, Vatovec S, Franklin-Tong V** (2010) The pollen S- determinant in *Papaver*: comparisons with known plant receptor and protein ligand partners. *J. Exp. Bot.* **61**(7): 2015-2025.

**Willi Y, Määttä K** (2010) Evolutionary dynamics of mating system shifts in *Arabidopsis lyrata*. *J Evol Biol* **23**(10): 2123-2131

**Williams JS, Wu L, Lis S, Sun P, Kao TH** (2015) Insight into S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*: recent findings and future directions. *Front Plant Sci* **6**:41

**Winship LJ, Obermeyer G, Geitmann A, Hepler PK** (2010) Under pressure, cell walls set the place. *Trends Plant Sci* **15**(7): 363- 369

**Wohlrab H, Annese V, Haefele A** (2002) Single replacement constructs of all hydroxyl, basic, and acidic amino acids identify new function and structure-sensitive regions of the mitochondrial phosphate transport protein. *Biochemistry* **41**(9): 3254-3261

**Wright S, Barret S** (2010) Evolution, the long-term benefits of self-rejection. *Science* **330**(6003): 459-460

**Wu H, Wang H, Cheung A** (1995) A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* **82**(3): 395-403

**Wu H, Wong E, Ogdahl J, Cheung A** (2000). A pollen tube growth promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant J* **22**(2): 165-176

**Xu G, Ma H, Nei M, Kong H** (2009) Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(3): 835-840

**Zhang Y, He J, Lee D, McCormick S** (2010) Interdependence of endomembrane trafficking and actin dynamics during polarized growth of Arabidopsis pollen tubes. *Plant Physiol* **152**(4): 2200-2210

**Zhao L, Huang J, Zhao Z, Li Q, Sims TL, Xue Y** (2010) The Skp1-like protein SSK1 is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant J* **62**(1): 52-63

**Zhu W, Miao Q, Sun D, Yang G, Wu C, Huang J, Zheng C** (2012) The mitochondrial phosphate transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **7**(8): e43530

## **X. APÉNDICES**

### **A. Apéndice 1. Medios**

#### **Medio para germinación de tubos polínicos de *Nicotiana***

Preparar las siguientes soluciones stock con agua estéril (concentración 100X):

0.1 M KNO<sub>3</sub>

0.16 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

0.08 M MgSO<sub>4</sub>

0.3 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

1 M MES pH 6

#### *Medio sólido*

Adicionar las cinco soluciones arriba mencionadas para que la concentración final sea 1X, además de sacarosa 2 % y agarosa al 0.7 %. Colocar 400-450 µl de este medio en un portaobjetos.

#### *Medio líquido*

Adicionar las cinco soluciones arriba mencionadas para que la concentración final sea 1X, además añadir sacarosa al 2 % y PEG al 14 %.

#### **Medios para levaduras**

##### Medio YPD

1 % Extracto de levadura

2 % Peptona

0.1 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.12 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

2 % Glucosa

##### *Medio YPGal*

1 % Extracto de levadura

2 % Peptona

0.1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.12 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
2 % Galactosa

*Medio YPGli*

1 % Extracto de levadura  
2 % Peptona  
0.1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.12 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
2 % Glicerol

SD-Ura

0.1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.12 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
2 % Glucosa  
0.67 % Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos y sin  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
-Ura DO Supplement Clontech, de acuerdo a las instrucciones del productor.

*SGal-Ura*

0.1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.12 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
2 % Galactosa  
0.67 % Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos y sin  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
-Ura DO Supplement Clontech, de acuerdo a las instrucciones del productor

*SGli-Ura*

0.1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.12 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
2 % Glicerol  
0.67 % Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos y sin  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
-Ura DO Supplement Clontech, de acuerdo a las instrucciones del productor

En el caso de requerir medio sólido, adicionar 2 % de agar.



## **Medio para germinación de *Arabidopsis thaliana***

### *Medio MS 0.5X*

Pesar 2.15 g de sal basal Murashige y Skoog y disolver en 900 ml de agua, ajustar el pH a 7.2  $\pm$  0.05. Aforar a 1000 ml con agua.

## **Medio para el crecimiento de bacterias**

### Medio LB

5.0 g Extracto de levadura

10 g Peptona

5 g NaCl

Disolver y aforar a 1000 ml de agua

En el caso de requerir medio sólido, adicionar 15 g de agar.

## **B. Apéndice 2. Procedimientos adicionales para la transformación por bombardeo**

### *Preparación de partículas de tungsteno activadas*

1. Pesar 60 mg de partículas de tungsteno de 0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro y colocarlas en un tubo de 2.0 ml
2. Agregar 1 ml de etanol al 70 % recién preparado y vortexear vigorosamente durante 30- 60 minutos
3. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos
4. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 segundos
5. Eliminar el etanol y adicionar 1 ml de agua estéril
6. Centrifugar a máxima velocidad, durante 10 segundos y eliminar el sobrenadante
7. Repetir dos veces más los pasos 5-6
8. Resuspender las partículas en 1 ml de glicerol al 50 % estéril
9. Guardar las partículas de tungsteno activadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

### *Preparación de partículas recubiertas con DNA*

1. Mezclar vigorosamente las partículas de tungsteno activadas (descritas arriba), vortexeando durante 30- 60 minutos
2. Colocar el DNA deseado en un tubo de 1.5 ml  
NOTA: Usar entre 1-5  $\mu\text{g}$  de DNA por bombardeo, el volumen ideal debe de ser menor a 5  $\mu\text{l}$  para cada preparación
3. Agregar 25  $\mu\text{l}$  de partículas activadas
4. Adicionar 25  $\mu\text{l}$  de 2.5 M  $\text{CaCl}_2$  y mezclar muy bien con el vortex
5. Agregar 10  $\mu\text{l}$  de 0.1 M espermidina y mezclar muy bien con el vortex durante 15- 30 minutos
6. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 segundos y remover el sobrenadante
7. Adicionar 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 70 % y mezclar muy bien con el vortex
8. Agregar otros 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 70 % y vortexear
9. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 segundos y eliminar el sobrenadante
10. Repetir los pasos 7-9 con etanol al 100 %
11. Resuspender las partículas en 20  $\mu\text{l}$  de etanol al 100 % y colocarlas en el centro de filtro del bombardeo para cada disparo

### C. Apéndice 3. Alineamiento de secuencias de *SIPP* de diferentes especies de *Nicotiana*

Secuencias de *SIPP* de especies AI de *Nicotiana* (*N. alata*, *N. raistroensis* y *N. forgetiana*) y de especies AC de *Nicotiana* (*N. benthamiana*, *N. plumbaginifolia* y *N. tabacum*). Los recuadros indican el primer codón de paro de cada secuencia.

	1										
<i>N. benthamiana</i>	ATGGCCTACA	CACATAACTC	TTCCCGGAAA	CCTTTGATCC	CCACTTTTCT	TTATGACACG	G-----	CTTCTTCTTC			
<i>N. plumbaginifolia</i>	ATGGCCTACA	CACATAACTC	TTCCCGGAAA	CCTTTGATCC	CCACTTTTCT	TTATGACACG	GTTCTTCTTC	CTTCTTCTTC			
<i>N. forgetiana</i>	ATGGCCTACA	CACACAACTC	TTCCCGGAAA	CCTTTGATCC	CCACTTTTCT	TTATGACACG	G-----	CTTCTTCTTC			
<i>N. tabacum</i>	ATGGCCTACA	CACATAACTC	TTCCCGGAAA	CCTTTGATCC	CCACTTTTCT	TTATGGCAGC	G---CTTCT	CTTCTTCTTC			
<i>N. alata</i>	ATGGCCTACA	CACATAACTC	TTCCCGGAAA	CCTTTGATCC	CCACTTTTCT	TTATGACACG	G-----	CTTCTTCTTC			
<i>N. raistroensis</i>	ATGGCCTACA	CACACAACTC	TTCCCGGAAA	CCTTTGATCC	CCACTTTTCT	TTATGACACG	G-----	CTTCTTCTTC			
	81										
<i>N. benthamiana</i>	ACCATTCTCT	GTATACAGAA	--GTA-----	-----	-CATCATCAT	CAGCGATGGC	GAAGAAGCCT	TTTGTTGGTTT	TTTGTTGGTTT		
<i>N. plumbaginifolia</i>	ACCATTCTCT	GTATACAGAA	ATGTTATAAA	TACAT-----	-CATCATCAT	CAGCGATGGC	GAAGAAGCCT	TTTGTTGGTTT	TTTGTTGGTTT		
<i>N. forgetiana</i>	ACCATTCTCT	GTATACAGAA	ATA-----	-----	-CATCATCAT	CAGCGATGGC	GAAGAAGCCT	TTTGTTGGTTT	TTTGTTGGTTT		
<i>N. tabacum</i>	ACCATTCTCT	GTATACAGAA	ATGTGATAAC	TGAGTTGGAT	ACATCATCAT	CAGCGATGGC	GAAGAAGCCT	TTTGTTGGTTT	TTTGTTGGTTT		
<i>N. alata</i>	ACCATTCTCT	GTATACAGAA	ATA-----	-----	-CATCATCAT	CAGCGATGGC	GAAGAAGCCT	TTTGTTGGTTT	TTTGTTGGTTT		
<i>N. raistroensis</i>	ACCATTCTCT	GTATACAGAA	ATA-----	-----	-CATCATCAT	CAGCGATGGC	GAAGAAGCCT	TTTGTTGGTTT	TTTGTTGGTTT		
	161										
<i>N. benthamiana</i>	CGGCACAAA	GGAGTCTTCA	GGTAAGATAG	AGATGTTCTC	ACCTGGTTAT	TACGCTGCTT	GTACTTTTGG	AGGTGTTATG			
<i>N. plumbaginifolia</i>	CGGCACAAA	GGAGTCTTCA	GGTAAGATAG	AGATGTTCTC	ACCTGGTTAT	TACGCTGCTT	GTACTTTTGG	AGGTGTTATG			
<i>N. forgetiana</i>	CGGCACAAA	GGAGTCTTCA	GGTAAGATAG	AGATGTTCTC	ACCTGGTTAT	TACGCTGCTT	GTACTTTTGG	AGGTGTTATG			
<i>N. tabacum</i>	CGGCACAAA	GGAGTCTTCA	GGTAAGATAG	AGATGTTCTC	ACCTGGTTAT	TACGCTGCTT	GTACTTTTGG	AGGTGTTATG			
<i>N. alata</i>	CGGCACAAA	GGAGTCTTCA	GGTAAGATAG	AGATGTTCTC	ACCTGGTTAT	TACGCTGCTT	GTACTTTTGG	AGGTGTTATG			
<i>N. raistroensis</i>	CGGCACAAA	GGAGTCTTCA	GGTAAGATAG	AGATGTTCTC	ACCTGGTTAT	TACGCTGCTT	GTACTTTTGG	AGGTGTTATG			
	241										
<i>N. benthamiana</i>	AGCTGTGGTC	TCACCCATAT	GGCCGTCACC	CCCCTCGATC	TTGTCAAGTG	CAACATGCAG	ATTGATCCTG	CAAAGTACAA			
<i>N. plumbaginifolia</i>	AGCTGTGGTC	TCACCCACAT	GGCCGTCACC	CCCCTCGATC	TTGTCAAGTG	CAACATGCAG	ATTGATCCTG	CAAAGTACAA			
<i>N. forgetiana</i>	AGCTGTGGTC	TCACCCATAT	GGCCGTCACC	CCCCTCGATC	TTGTCAAGTG	CAACATGCAG	ATTGATCCTG	CAAAGTACAA			
<i>N. tabacum</i>	AGCTGTGGTC	TCACCCACAT	GGCCGTCACC	CCCCTCGATC	TTGTCAAGTG	CAACATGCAG	ATTGATCCTG	CAAAGTACAA			
<i>N. alata</i>	AGCTGTGGTC	TCACCCATAT	GGCCGTCACC	CCCCTCGATC	TTGTCAAGTG	CAACATGCAG	ATTGATCCTG	CAAAGTACAA			
<i>N. raistroensis</i>	AGCTGTGGTC	TCACCCATAT	GGCCGTCACC	CCCCTCGATC	TTGTCAAGTG	CAACATGCAG	ATTGATCCTG	CAAAGTACAA			
	321										
<i>N. benthamiana</i>	GAGCATTTCA	TCTGGTTTTG	GTGTTCTGCT	CAAGGAGCAG	GGTGTAGAG	GCTTCTTTAG	GGGTGGGTT	CCTACCCTTGA			
<i>N. plumbaginifolia</i>	GAGCATTTCC	TCTGGTTTTG	GTGTTCTGCT	CAAGGAGCAG	GGTGTAGAG	GCTTCTTTAG	GGGTGGGTT	-CTACCCTTGA			
<i>N. forgetiana</i>	GAGCATTTCA	TCTGGTTTTG	GTGTTCTGCT	CAAGGAGCAG	GGTGTAGAG	GCTTCTTTAG	GGGTGGGTT	CCTACCCTTGA			
<i>N. tabacum</i>	GAGCATTTCC	TCTGGTTTTG	GTGTTCTGCT	CAAGGAGCAG	GGTGTAGAG	GCTTCTTTAG	GGGTGGGTT	CCTA-CCTTGA			
<i>N. alata</i>	GAGCATTTCA	TCTGGTTTTG	GTGTTCTGCT	CAAGGAGCAG	GGTGTAGAG	GCTTCTTTAG	GGGTGGGTT	CCTACCCTTGA			
<i>N. raistroensis</i>	GAGCATTTCA	TCTGGTTTTG	GTGTTCTGCT	CAAGGAGCAG	GGTGTAGAG	GCTTCTTTAG	GGGTGGGTT	CCTACCCTTGA			
	401										
<i>N. benthamiana</i>	TTGGTTACAG	TGCTCAGGGA	GCTTGCAAAAT	ATGGATTCTA	TGAATATTTT	AAGAAATATT	ACTCAGATCT	TGCCGGCCCT			
<i>N. plumbaginifolia</i>	TTGGTTACAG	TGCTCAGGGA	GCTTGCAAAAT	ATGGATTCTA	TGAATATTTT	AAGAAATATT	ACTCAGATCT	TGCCGGCCCT			
<i>N. forgetiana</i>	TTGGTTACAG	TGCTCAGGGA	GCTTGCAAAAT	ATGGATTCTA	TGAATATTTT	AAGAAATATT	ACTCAGATCT	TGCCGGCCCT			
<i>N. tabacum</i>	TTGGTTACAG	TGCTCAGGGA	GCTTGCAAAAT	ATGGATTCTA	TGAATATTTT	AAGAAATATT	ACTCAGATCT	TGCCGGCCCT			
<i>N. alata</i>	TTGGTTACAG	TGCTCAGGGA	GCTTGCAAAAT	ATGGATTCTA	TGAATATTTT	AAGAAATATT	ACTCAGATCT	TGCCGGCCCT			
<i>N. raistroensis</i>	TTGGTTACAG	TGCTCAGGGA	GCTTGCAAAAT	ATGGATTCTA	TGAATATTTT	AAGAAATATT	ACTCAGATCT	TGCCGGCCCT			
	481										
<i>N. benthamiana</i>	GAGAATGCTG	TCAAGTACAA	GACTTTGATA	TACCTTGCTG	GTTCTGCATC	TGCTGAGGTT	ATTGCTGATG	TTGCTCTCTG			
<i>N. plumbaginifolia</i>	GAGAATGCTG	TCAAGTACAA	GACTTTGATA	TACCTTGCTG	GTTCTGCATC	TGCTGAGGTT	ATTGCTGATG	TTGCTCTCTG			
<i>N. forgetiana</i>	GAGAATGCTG	TCAAGTACAA	GACTTTGATA	TACCTTGCTG	GTTCTGCATC	TGCTGAGGTT	ATTGCTGATG	TTGCTCTCTG			
<i>N. tabacum</i>	GAGAATGCTG	TCAAGTACAA	GACTTTGATA	TACCTTGCTG	GTTCTGCATC	TGCTGAGGTT	ATTGCTGATG	TTGCTCTCTG			
<i>N. alata</i>	GAGAATGCTG	TCAAGTACAA	GACTTTGATA	TACCTTGCTG	GTTCTGCATC	TGCTGAGGTT	ATTGCTGATG	TTGCTCTCTG			
<i>N. raistroensis</i>	GAGAATGCTG	TCAAGTACAA	GACTTTGATA	TACCTTGCTG	GTTCTGCATC	TGCTGAGGTT	ATTGCTGATG	TTGCTCTCTG			
	561										
<i>N. benthamiana</i>	CCCTTTCGAG	GCTGTCAAAG	TTCGCGTCCA	AACTCAGCCT	GGTTTTGCC	GAGGCTTGTC	TGATGGGCTT	CCTAAATTG			
<i>N. plumbaginifolia</i>	CCCTTTCGAG	GCTGTCAAAG	TTCGCGTCCA	AACTCAGCCT	GGTTTTGCC	GAGGCTTGTC	TGATGGGCTT	CCTAAATTG			
<i>N. forgetiana</i>	CCCTTTCGAG	GCTGTCAAAG	TTCGCGTCCA	AACTCAGCCT	GGTTTTGCC	GAGGCTTGTC	TGATGGGCTT	CCTAAATTG			
<i>N. tabacum</i>	CCCTTTCGAG	GCTGTCAAAG	TTCGCGTCCA	AACTCAGCCT	GGTTTTGCC	GAGGCTTGTC	TGATGGGCTT	CCTAAATTG			
<i>N. alata</i>	CCCTTTCGAG	GCTGTCAAAG	TTCGCGTCCA	AACTCAGCCT	GGTTTTGCC	GAGGCTTGTC	TGATGGGCTT	CCTAAATTG			
<i>N. raistroensis</i>	CCCTTTCGAG	GCTGTCAAAG	TTCGCGTCCA	AACTCAGCCT	GGTTTTGCC	GAGGCTTGTC	TGATGGGCTT	CCTAAATTG			
	641										
<i>N. benthamiana</i>	TTAAGGCTGA	AGGAGCTTCT	GGGTTATACA	AGGGGCTTGC	TCCTCTCTGG	GGACGACAGA	TACCATACAT	TCTACCATTT			
<i>N. plumbaginifolia</i>	TTAAGGCTGA	AGGAGCTTCT	GGGTTATACA	AGGGGCTTGC	TCCTCTCTGG	GGACGACAGA	TACCAT-----	-----			
<i>N. forgetiana</i>	TTAAGGCTGA	AGGAGCTTCT	GGGTTATACA	AGGGGCTTGC	TCCTCTCTGG	GGACGACAGA	TACCAT-----	-----			
<i>N. tabacum</i>	TTAAGGCTGA	AGGAGCTTCT	GGGTTATACA	AGGGGCTTGC	TCCTCTCTGG	GGACGACAGA	TACCAT-----	-----			
<i>N. alata</i>	TTAAGGCTGA	AGGAGCTTCT	GGGTTATACA	AGGGGCTTGC	TCCTCTCTGG	GGACGACAGA	TACCAT-----	-----			
<i>N. raistroensis</i>	TTAAGGCTGA	AGGAGCTTCT	GGGTTATACA	AGGGGCTTGC	TCCTCTCTGG	GGACGACAGA	TACCAT-----	-----			
	721										
<i>N. benthamiana</i>	TACAGACACG	ATGATGAAAT	TTGCATCATT	TGAAACCAAT	GTGGAACAAC	TGTACAAAAC	TGTGATCCCA	ACACCTAAAG			
<i>N. plumbaginifolia</i>	-----ACACG	ATGATGAAAT	TTGCATCATT	TGAAACCAAT	GTGGAACAAC	TGTACAAAAC	TGTGATCCCA	ACACCTAAAG			
<i>N. forgetiana</i>	-----ACACG	ATGATGAAAT	TTGCATCATT	TGAAACCAAT	GTGGAACAAC	TGTACAAAAC	TGTGATCCCA	ACACCTAAAG			
<i>N. tabacum</i>	-----ACACG	ATGATGAAAT	TTGCATCATT	TGAAACCAAT	GTGGAACAAC	TGTACAAAAC	TGTGATCCCA	ACACCTAAAG			
<i>N. alata</i>	-----ACACG	ATGATGAAAT	TTGCATCATT	TGAAACCAAT	GTGGAACAAC	TGTACAAAAC	TGTGATCCCA	ACACCTAAAG			
<i>N. raistroensis</i>	-----ACACG	ATGATGAAAT	TTGCATCATT	TGAAACCAAT	GTGGAACAAC	TGTACAAAAC	TGTGATCCCA	ACACCTAAAG			
	801										
<i>N. benthamiana</i>	AGCAGTGCAG	TAAATCTACG	CAGCTTGGTG	TGAGCTTTGC	TGGTGGATAT	TTAGCTGGTA	TTCTTTGTGC	TATTTGTGCA			
<i>N. plumbaginifolia</i>	AGCAGTGCAG	TAAATCTACG	CAGCTTGGTG	TGAGCTTTGC	TGGTGGATAT	TTAGCTGGTA	TTCTTTGTGC	TATTTGTGCA			
<i>N. forgetiana</i>	AGCAGTGCAG	TAAATCTACG	CAGCTTGGTG	TGAGCTTTGC	TGGTGGATAT	TTAGCTGGTA	TTCTTTGTGC	TATTTGTGCA			
<i>N. tabacum</i>	AGCAGTGCAG	TAAATCTACG	CAGCTTGGTG	TGAGCTTTGC	TGGTGGATAT	TTAGCTGGTA	TTCTTTGTGC	TATTTGTGCA			
<i>N. alata</i>	AGCAGTGCAG	TAAATCTACG	CAGCTTGGTG	TGAGCTTTGC	TGGTGGATAT	TTAGCTGGTA	TTCTTTGTGC	TATTTGTGCA			
<i>N. raistroensis</i>	AGCAGTGCAG	TAAATCTACG	CAGCTTGGTG	TGAGCTTTGC	TGGTGGATAT	TTAGCTGGTA	TTCTTTGTGC	TATTTGTGCA			

881  
*N. benthamiana* CACCCCTGCTG ATAACCTCGT TTCTTTCCCTC AACAAATGCTA AGGGGGCAAC TGTGGGCGAT GCTGTGAACA AGCTAGGCGT  
*N. plumbaginifolia* CACCCCTGCTG ATAACCTCGT TTCTTTCCCTC AACAAATGCTA AGGGGGCAAC TGTGGGCGAT GCTGTGAACA AGCTAGGCGT  
*N. forgetiana* CACCCCTGCTG ATAACCTCGT TTCTTTCCCTC AACAAATGCTA AGGGGGCAAC TGTGGGCGAT GCTGTGAACA AGCTAGGCGT  
*N. tabacum* CACCCCTGCTG ATAACCTCGT TTCTTTCCCTC AACAAATGCTA AGGGGGCAAC TGTGGGCGAT GCTGTGAACA AGCTAGGCGT  
*N. alata* CACCCCTGCTG ATAACCTCGT TTCTTTCCCTC AACAAATGCTA AGGGGGCAAC TGTGGGCGAT GCTGTGAACA AGCTAGGCGT  
*N. raströensis* CACCCCTGCTG ATAACCTCGT TTCTTTCCCTC AACAAATGCTA AGGGGGCAAC TGTGGGCGAT GCTGTGAACA AGCTAGGCGT

961  
*N. benthamiana* AATGGGTCTT TGTACTCGCG GTCTTCCTCT TCGTATAGTC ATGATTGGTA CACTCACTGG AGCACAATGG GGCATCTATG  
*N. plumbaginifolia* AATGGGTCTT TGTACTCGCG GTCTTCCTCT TCGTATAGTC ATGATTGGTA CACTCACTGG AGCACAATGG GGCATCTATG  
*N. forgetiana* AATGGGTCTT TGTACTCGCG GTCTTCCTCT TCGTATAGTC ATGATTGGTA CACTCACTGG AGCACAATGG GGCATCTATG  
*N. tabacum* AATGGGTCTT TGTACTCGCG GTCTTCCTCT TCGTATAGTC ATGATTGGTA CACTCACTGG AGCACAATGG GGCATCTATG  
*N. alata* AATGGGTCTT TGTACTCGCG GTCTTCCTCT TCGTATAGTC ATGATTGGTA CACTCACTGG AGCACAATGG GGCATCTATG  
*N. raströensis* AATGGGTCTT TGTACTCGCG GTCTTCCTCT TCGTATAGTC ATGATTGGTA CACTCACTGG AGCACAATGG GGCATCTATG

1041  
*N. benthamiana* ACTCTTTCAA AGTTTTGTTT GGCCTGCCAA CGACCGGTGG TGCAGCTCCA CCTGCCCTG CCAAGTGAAG AGGAAAATGT  
*N. plumbaginifolia* ACTCTTTCAA AGTTTTGTTT GGCCTGCCAA CAACCGGTGG TGCAGCTCCA CCTGCCCTG CCAAGTGAAG AGGAAAATAT  
*N. forgetiana* ACTCTTTCAA AGTTTTGTTT GGCCTGCCAA CGACCGGTGG TGCAGCTCCA CCTGCCCTG CCAAGTGAAG AGGAAAATGT  
*N. tabacum* ACTCTTTCAA AGTTTTGTTT GGCCTGCCAA CGACCGGTGG TGCAGCTCCA TCG----- --AAGCGAAG AGGAAAATGT  
*N. alata* ACTCTTTCAA AGTTTTGTTT GGCCTGCCAA CGACCGGTGG TGCAGCTCCA CCTGCCCTG CCAAGTGAAG AGGAAAATGT  
*N. raströensis* ACTCTTTCAA AGTTTTGTTT GGCCTGCCAA CGACCGGTGG TGCAGCTCCA CCTGCCCTG CCAAGTGAAG AGGAAAATGT

1121  
*N. benthamiana* GAAATAATTT ATGATGAAAA TTCTTCTCCA GTACTCAATA TCTCTTTCAT TTACTGGAAG AGGGAAAAATG GAAATGTTTT  
*N. plumbaginifolia* GAAATAATTT ATGATGAAAA TTCTTCTCCA GTACTCAATA TCTCTTTCAT TTACTGGAAG AGGGAAAAATG GAAATGTTTT  
*N. forgetiana* GAAATAATTT ATGATGAAAA TTCTTCTCCA GTACTCAATA TCTCTTTCAT TTACTGGAAG AGGGAAAAATG GAAATGTTTT  
*N. tabacum* G-AATAATTT ATGATGAAAA TTCTTCTCCA GTACTCAATA TCTCTTTCAT TTACTGGAAG AGGGAAAAATG GAAATGTTTT  
*N. alata* GAAATAATTT ATGATGAAAA TTCTTCTCCA GTACTCAATA TCTCTTTCAT TTACTGGAAG AGGGAAAAATG GAAATGTTTT  
*N. raströensis* GAAATAATTT ATGATGAAAA TTCTTCTCCA GTACTCAATA TCTCTTTCAT TTACTGGAAG AGGGAAAAATG GAAATGTTTT

1201  
*N. benthamiana* TCCATCTAAA AGTTTGTFTG AACAGTGTAG GAAATTTTGT GCATTAATTC AAGCTTTGCA GTAAGATCAG ATATTTTGT  
*N. plumbaginifolia* TCCATCTAAA AGTTTGTFTG AACAGTGTAG GAAATTTTGT GCATTAATTC AAGCTTTGCA GTAAGATCAG ATATTTTGT  
*N. forgetiana* TCCATCTAAA AGTTTGTFTG AACAGTGTAG GAAATTTTGT GCATTAATTC AAGCTTTGCA GTAAGATCAG ATATTTTGT  
*N. tabacum* TCCATCTAAA AGTTTGTFTG AACAGTGTAG GAAATTTTGT GCATTAATTC AAGCTTTGCA GTAAGATCAG ATATTTTGT  
*N. alata* TCCATCTAAA AGTTTGTFTG AACAGTGTAG GAAATTTTGT GCATTAATTC AAGCTTTGCA GTAAGATCAG ATATTTTGT  
*N. raströensis* TCCATCTAAA AGTTTGTFTG AACAGTGTAG GAAATTTTGT GCATTAATTC AAGCTTTGCA GTAAGATCAG ATATTTTGT

1281  
*N. benthamiana* GGGAGG-TGA AT----TATC CTCAAGATGG CTGGTTACTG  
*N. plumbaginifolia* GGGATGATGA ATTATATATC CTCAAGATGG CTGGTTACTG  
*N. forgetiana* GGGAGGATGA AT----TATC CTCAAGATGG CTGGTTACTG  
*N. tabacum* GGGAGGATGA AT----TATC CTCAAGATGG CTGGTTACTG  
*N. alata* GGGAGGATGA AT----TATC CTCAAGATGG CTGGTTACTG  
*N. raströensis* GGGAGGATGA AT----TATC CTCAAGATGG CTGGTTACTG

**D. Apéndice 4. Evaluación de la longitud de los tubos polínicos después de las polinizaciones manuales**

Pistilos de *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$  fueron polinizados con: Polen  $S_{A2}$  no transformado, con polen  $S_{A2}$  transformado con vector vacío y con polen  $S_{A2}$  transformado con *RNAi-NaSIPP* mediante bombardeo con microproyectiles. Setenta y dos horas después de la polinización, los pistilos fueron tratados con azul de anilina y se evaluó la longitud de los tubos polínicos en cada caso. Se calculó el promedio y el error estándar del promedio (por sus siglas en inglés SEM).

Tratamiento	Número de pistilos analizados	Número de tubos polínicos observados en el estilo	% del estilo recorrido por los tubos polínicos	
No transformados	7	0	0.0	
	1	2	76.2	
	1	4	45.7	
	1	1	48.6	
	1	2	8.3	
	1	1	100	
	1	2	42.5	
	1	4	40.0	
	2	2	5.1	
	1	1	48.4	
	1	1	48.8	
	1	1	36.6	
	1	2	57.1	
	1	4	15.4	
	1	3	20.6	
	1	1	37.5	
	1	2	20.0	
	1	2	25.6	
	1	1	47.5	
	1	3	42.9	
	1	2	23.5	
	Total de pistilos analizados:			28
	Promedio:			25.42
SEM:			3.92	
Vector vacío	48	0	0.0	

	1	3	64.9
	1	1	77.5
	1	1	48.6
	1	1	48.4
	1	4	66.7
	1	1	26.8
	1	2	23.8
	1	3	73.0
	1	2	60.5
	1	2	32.3
	1	1	92.9
	1	2	71.4
	1	2	77.8
	1	4	42.9
	1	3	34.3
	1	2	36.4
	1	2	35.7
	1	4	32.5
	1	2	69.4
	Total de pistilos analizados:		67
	Promedio:		25.58
	SEM:		2.97
RNAi-NaSIPP	43	0	0.0
	1	2	44.7
	1	16	94.4
	1	3	93.9
	1	1	90.0
	1	10	100.0
	1	4	71.4
	1	2	78.9
	1	2	73.2
	1	3	62.2
	1	5	80.6
	1	3	78.1
	1	1	88.9
	1	2	86.5
	1	2	94.1
	1	2	82.1
	1	2	57.5

1	1	84.0
1	4	94.3
1	4	73.5
1	5	96.7
1	12	100.0
1	11	100.0
1	1	28.9
1	4	87.5
1	2	80.0
1	4	75.0
1	6	83.3
1	2	86.1
1	6	87.8
1	3	87.5
1	4	97.5
1	7	60.0
1	1	100.0
3	5	95.3
1	5	53.5
1	8	65.1
1	2	71.4
1	10	48.8
1	3	70.0
1	4	51.4
1	3	90.7
1	7	39.4
1	5	53.5
1	2	95.7
Total de pistilos analizados:		89
Promedio:		64.98
SEM:		2.31

### E. Apéndice 5. ANOVA de los diferentes tratamientos en las polinizaciones manuales

Los pistilos de *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$  fueron polinizados con: Polen  $S_{A2}$  no transformado, polen  $S_{A2}$  transformado con vector vacío y con polen  $S_{A2}$  transformado con *RNAi-NaSIPP* mediante bombardeo. El análisis fue realizado después de 72 h de la polinización; los estilos fueron tratados con azul de anilina y se evaluó la longitud de los tubos polínicos en cada caso. Para probar si existían diferencias significativas entre tratamientos se realizó un análisis de ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de Dunnett usando GraphPad Prism versión 5.0b para Mac OS X, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

Análisis de varianza (ANOVA) de una vía	
Valor P	< 0.0001
Resumen valor P	***
¿Los tratamientos son significativamente diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	3
F	60.06
R <sup>2</sup>	0.2456
Prueba Bartlett's para varianzas iguales	
Estadística Bartlett's (corregida)	9.748
Valor P	0.0076
Resumen valor P	**
¿Las varianzas difieren significativamente (P < 0.05)?	Si



Tabla ANOVA	SS	df	MS
Tratamiento (entre columnas)	129827	2	64913
Residual (entre columnas)	398787	369	1081
Total	528614	371	

Prueba de Dunnett Comparación Multiple	Promedio de la diferencia	q	Significativo? P < 0.05?	Resumen	95% Intervalo de confianza de la diferencia
Polen no transformado vs Vector vacío	2.507	0.41	No	no es significativo	-11.03 to 16.04
Polen no transformado vs <i>RNAi- NaSIPP</i>	-36.90	6.69	Yes	***	-49.16 to -24.64

## **F. Apéndice 6. Artículos científicos publicados durante los estudios de doctorado**

Cite as: Z. Ge *et al.*, *Science*  
10.1126/science.aao3642 (2017).

# *Arabidopsis* pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling

Zengxiang Ge,<sup>1\*</sup> Tabata Bergonci,<sup>2,3\*</sup> Yuling Zhao,<sup>1</sup> Yanjiao Zou,<sup>2</sup> Shuo Du,<sup>1</sup> Ming-Che Liu,<sup>2</sup> Xingju Luo,<sup>1</sup> Hao Ruan,<sup>4</sup> Liliana E. García-Valencia,<sup>2,5</sup> Sheng Zhong,<sup>1</sup> Saiying Hou,<sup>1</sup> Qingpei Huang,<sup>1</sup> Luhua Lai,<sup>4</sup> Daniel S. Moura,<sup>3</sup> Hongya Gu,<sup>1,6</sup> Juan Dong,<sup>7</sup> Hen-Ming Wu,<sup>2</sup> Thomas Dresselhaus,<sup>8</sup> Junyu Xiao,<sup>1</sup> Alice Y. Cheung,<sup>2†</sup> Li-Jia Qu<sup>1,6†</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory for Protein and Plant Gene Research, Peking-Tsinghua Center for Life Sciences at College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, People's Republic of China. <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Molecular and Cell Biology Program, Plant Biology Program, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA. <sup>3</sup>Dep. Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz," Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil. <sup>4</sup>College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, People's Republic of China. <sup>5</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City DF 04510, Mexico. <sup>6</sup>National Plant Gene Research Center (Beijing), Beijing 100101, People's Republic of China. <sup>7</sup>Waksman Institute of Microbiology, Rutgers University, Piscataway, NJ 08854, USA. <sup>8</sup>Cell Biology and Plant Biochemistry, Biochemie-Zentrum Regensburg, University of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany.

\*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: qulj@pku.edu.cn (L.-J.Q.); acheung@biochem.umass.edu (A.Y.C.)

**In flowering plants, fertilization requires complex cell-to-cell communication events between the pollen tube and the female reproductive tissues, which are controlled by extracellular signaling molecules interacting with receptors at the pollen tube surface. We found that two such receptors in *Arabidopsis*, BUPS1 and BUPS2, and their peptide ligands, RALF4 and RALF19, are pollen tube-expressed and are required to maintain pollen tube integrity. BUPS1 and BUPS2 interact with receptors ANXUR1 and ANXUR2 via their ectodomains, and both sets of receptors bind RALF4 and RALF19. These receptor-ligand interactions are in competition with the female-derived ligand RALF34, which induces pollen tube bursting at nanomolar concentrations. We propose that RALF34 replaces RALF4 and RALF19 at the interface of pollen tube-female gametophyte contact, thereby deregulating BUPS-ANXUR signaling and in turn leading to pollen tube rupture and sperm release.**

In angiosperms, unlike animals, gametes are embraced in multicellular haploid gametophytes. To accomplish sexual reproduction, two nonmotile sperm cells are delivered as passive cargoes of the pollen tube, representing the male gametophyte, to the female gametes (*1*). The guided growth, reception, and rupture of the pollen tube are essential for successful fertilization, which entails signaling, often through receptor-like kinases (RLKs) (*2–6*), between male and female tissues (*7–10*). In *Arabidopsis*, CrRLK1L (*Catharanthus roseus* RLK1-like subfamily) receptors regulate cell expansion (*11–17*) and function in pollen tube reception at the point of contact with the female gametophyte (*2, 3, 18*). FERONIA (FER), a CrRLK1L receptor expressed in the female gametophyte, is essential for pollen tube reception (*18, 19*). Another two CrRLK1L receptors, ANXUR1 and ANXUR2 (ANX1/2), expressed in the pollen tube, prevent precocious pollen tube rupture (*2, 3*). To more comprehensively understand these signaling networks, we identified two CrRLK1L members containing typical extracellular malectin domains and named them Buddha's Paper Seal 1 (BUPS1, At4g39110) and BUPS2 (At2g21480) on the basis of the pollen tube phenotypes of their knockout mutants, as

described below. Promoter-GUS ( $\beta$ -glucuronidase) analysis showed that both *BUPS1* and *BUPS2* are expressed in mature pollen grains and tubes (Fig. 1, A and B, and fig. S1, A to I). Green fluorescent protein (GFP) fusion protein analysis demonstrated that both BUPS1 and BUPS2 proteins are expressed in pollen grains and pollen tubes and localize at the apical plasma membrane of pollen tubes (Fig. 1, C and D, and fig. S1, J and K).

To study the role of BUPS1/2, we generated loss-of-function single and double mutants by CRISPR/Cas9 (*20*). We identified five homozygous single loss-of-function mutants for either *BUPS1* or *BUPS2* (Fig. 1E and fig. S2, A and B) and four homozygous double mutants. None of these mutants exhibited defects in vegetative growth, although mature *bups1* and *bups1 bups2* mutant plants produced shorter than normal siliques (Fig. 1F and fig. S3, A to D). Although the number of seeds per silique in *bups2* was comparable to that of the wild type, *bups1* and *bups1 bups2* plants produced almost no seeds (Fig. 1G). Only male transmission of *bups1* or *bups1 bups2* was defective (Fig. 1H, table S1, and fig. S4, A to D). Two T-DNA-induced mutants, *bups1-T-1* and *bups1-T-2* (fig. S5, A and B), also showed suppressed male

# SIPP, a Novel Mitochondrial Phosphate Carrier, Mediates in Self-Incompatibility<sup>1</sup>[OPEN]

Liliana E. García-Valencia,<sup>a</sup> Carlos E. Bravo-Alberto,<sup>a</sup> Hen-Ming Wu,<sup>b</sup> Rogelio Rodríguez-Sotres,<sup>a</sup> Alice Y. Cheung,<sup>b</sup> and Felipe Cruz-García<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>b</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts 01003

ORCID IDs: 0000-0002-7528-7697 (L.E.G.-V.); 0000-0003-0587-6215 (C.E.B.-A.); 0000-0003-2108-3848 (H.-M.W.); 0000-0002-9443-3207 (R.R.-S.); 0000-0002-7973-022X (A.Y.C.); 0000-0002-3344-6004 (F.C.-G.).

In Solanaceae, the *S*-specific interaction between the pistil *S*-RNase and the pollen *S*-Locus F-box protein controls self-incompatibility (SI). Although this interaction defines the specificity of the pollen rejection response, the identification of three pistil essential modifier genes unlinked to the *S*-locus (*HT-B*, *120K*, and *NaStEP*) unveils a higher degree of complexity in the pollen rejection pathway. We showed previously that *NaStEP*, a stigma protein with homology with Kunitz-type protease inhibitors, is essential to SI in *Nicotiana* spp. During pollination, *NaStEP* is taken up by pollen tubes, where potential interactions with pollen tube proteins might underlie its function. Here, we identified *NaSIPP*, a mitochondrial protein with phosphate transporter activity, as a novel *NaStEP*-interacting protein. Coexpression of *NaStEP* and *NaSIPP* in pollen tubes showed interaction in the mitochondria, although when expressed alone, *NaStEP* remains mostly cytosolic, implicating *NaSIPP*-mediated translocation of *NaStEP* into the organelle. The *NaSIPP* transcript is detected specifically in mature pollen of *Nicotiana* spp.; however, in self-compatible plants, this gene has accumulated mutations, so its coding region is unlikely to produce a functional protein. RNA interference suppression of *NaSIPP* in *Nicotiana* spp. pollen grains disrupts the SI by preventing pollen tube inhibition. Taken together, our results are consistent with a model whereby the *NaStEP* and *NaSIPP* interaction, in incompatible pollen tubes, might destabilize the mitochondria and contribute to arrest pollen tube growth.

Cross-pollination has decisively contributed to the widespread distribution of angiosperms, and in many species the pistil has played an active role in the rejection of self-pollen and the acceptance of pollen coming from genetically unrelated plants. Thus, the pistil has

evolved to some extent to safeguard the species identity as well as to produce a vigorous progeny with new allelic combinations.

Several species avoid self-fertilization through self-incompatibility (SI), a genetically controlled system by the polymorphic *S*-locus (de Nettancourt, 2001). In Solanaceae, Plantaginaceae, and Rosaceae, the *S*-locus includes two tightly linked genes: the male and female determinants. The product of the female determinant is a pistil extracellular glycoprotein known as *S*-RNase (Anderson et al., 1986; McClure et al., 1989). *S*-RNases are secreted to the stylar extracellular matrix and incorporated into both compatible and incompatible pollen tubes (Luu et al., 2000; Goldraij et al., 2006), apparently using an MdABCF transporter localized at the pollen tube membrane as described in apple (*Malus domestica*; Meng et al., 2014).

Once the *S*-RNases are inside the pollen tubes, large amounts of these enzyme molecules are compartmentalized inside the vacuoles. If the cross is incompatible, vacuoles break down, releasing *S*-RNases into the cytoplasm, RNA is hydrolyzed, and the pollen tube stops growing. In contrast, if a compatible cross takes place, the *S*-RNases remain confined in intact vacuoles, and the pollen tubes can grow toward the ovary (Goldraij et al., 2006).

The male *S*-determinant encodes the cytosolic protein called *S*-locus F-box (SLF; Lai et al., 2002; Entani et al.,

<sup>1</sup> This work was supported by grants IN217816 and RN217816 (PAPIIT-UNAM), 329718/234690 (to L.E.G.-V.), and 236602 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and by grants 0955910 (RCN on Integrative Pollen Biology) and 1147165 from the National Science Foundation (to A.Y.C.). Computing resources were provided by the LANCAD-UNAM-DGTIC-215 supercomputing project.

<sup>2</sup> Address correspondence to fcg@unam.mx.

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

F.C.-G. and L.E.G.-V. conceived the project and the original research plan; F.C.-G., L.E.G.-V., and A.Y.C. designed the experiments; L.E.G.-V. and C.E.B.-A. performed most of the experiments; H.-M.W. provided technical advice and discussion on experimental design to L.E.G.-V.; R.R.-S. calculated the *NaSIPP* three-dimensional model; L.E.G.-V., F.C.-G., and A.Y.C. analyzed data; F.C.-G. and L.E.G.-V. wrote the article with contributions from all the authors.

[OPEN] Articles can be viewed without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.01884](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.01884)

2003; Ushijima et al., 2003; Sijacic et al., 2004; Wang et al., 2004). An important characteristic of SLF is an F-box domain at the N terminus. F-box proteins are a component of the SCF (Skp1, Cullin-1, and F-box protein) E3 ligase complex, which is involved in ubiquitin-mediated protein degradation by the 26S proteasome (Qiao et al., 2004; Hua and Kao, 2008; Williams et al., 2015). Within the SCF complex, Cullin-1 is a scaffold and Skp1 connects the scaffold to an F-box protein, which, in turn, recruits the target protein (Vierstra, 2003; Xu et al., 2009).

Several *SLF* genes have been identified at the *S*-locus in Solanaceae and Rosaceae, subfamily Maloidea (Wang et al., 2004; Wheeler and Newbigin, 2007; Ashkani and Rees, 2016). In particular, in *S*<sub>2</sub>- and *S*<sub>3</sub>-haplotypes of *Petunia inflata*, 17 *SLF* genes have been found to aid the recognition of several S-RNase variants (Sijacic et al., 2004; Kubo et al., 2010; Williams et al., 2015). Based on the specificity of these interactions, multiple SLF proteins expressed in a specific pollen *S*-haplotype have been proposed to collaboratively recognize and detoxify nonself S-RNases, allowing only self S-RNases to exert their cytotoxic effect on self pollen (Kubo et al., 2010; Williams et al., 2015).

Although the interaction between SLF and S-RNase defines the *S*-specific pollen rejection, there are modifier genes unlinked to the *S*-locus that also are essential to the SI response (de Nettancourt, 2001; Zhang and Xue, 2008; McClure et al., 2011). To date, three pistil modifier genes have been identified: *120K* (Hancock et al., 2005), *HT-B* (McClure et al., 1999), and *NaStEP* (Jiménez-Durán et al., 2013).

The HT-B protein presents a C-terminal domain rich in Asn and Asp (McClure et al., 1999; Kondo and McClure, 2008). HT-B is expressed only in mature pistils and has been described in *Solanum*, *Nicotiana*, and *Petunia* spp. (McClure et al., 1999; Kondo et al., 2002; O'Brien et al., 2002; Sassa and Hirano, 2006; Puerta et al., 2009). In the particular case of *Solanum habrochaites*, there is no *HT-B* gene, but there is a related *HT-A* gene, which may act as a substitute for the *HT-B* function in this species (Covey et al., 2010). Immunolocalization assays show that HT-B, like S-RNases, is taken up by compatible and incompatible pollen tubes during pollination (Goldraij et al., 2006). In incompatible crosses, HT-B levels decrease slightly in pollen tubes; however, in compatible crosses, HT-B levels inside pollen tubes decrease by 75% to 97% (Goldraij et al., 2006; Jiménez-Durán et al., 2013). Apparently, HT-B is needed to halt pollen tube growth, and in agreement, the down-regulation of *HT* genes results in the breakdown of SI in *Nicotiana* (McClure et al., 1999), *Petunia* (Puerta et al., 2009), and *Solanum* (Kondo et al., 2002; O'Brien et al., 2002) spp.

The arabinogalactan glycosylated protein 120K accumulates abundantly in the extracellular matrix in mature styles of *Nicotiana glauca* (Schultz et al., 1997); like S-RNases, 120K is taken up by pollen tubes and targeted to vacuoles (Lind et al., 1996; Goldraij et al., 2006). Loss-of-function assays show that 120K is essential to

SI, because its suppression by RNA interference (RNAi) disrupts self-pollen rejection (Hancock et al., 2005). Protein-protein interaction experiments gave evidence of 120K complexes with style proteins, including S-RNases, NaPELP III, Nap11 (Cruz-García et al., 2005), and the pollen C2 domain-containing protein NaPCCP. This last protein also associates with the endomembrane system via phosphatidylinositol 3-phosphate (Lee et al., 2008, 2009).

NaStEP (*N. alata* Stigma-Expressed Protein) is an abundant stigma-specific protein of SI *Nicotiana* spp. (Busot et al., 2008). In mature papillary stigmatic cells, NaStEP remains stored in the vacuoles, but upon pollination, the cell wall of these papillary cells becomes punctured and NaStEP relocates to the stigmatic exudate (Busot et al., 2008), and from there it can be taken up by compatible and incompatible pollen tubes (Jiménez-Durán et al., 2013). NaStEP is homologous to Kunitz-type protease inhibitors (Busot et al., 2008) and inhibits subtilisin *in vitro*, in a specific manner (Jiménez-Durán et al., 2013). RNAi-mediated suppression of NaStEP prevents *S*-specific pollen rejection (Jiménez-Durán et al., 2013). Likewise, NaStEP protects HT-B stability in pollen tubes by a yet unidentified mechanism, because when NaStEP is absent, HT-B is degraded inside pollen tubes in both compatible and incompatible crosses (Jiménez-Durán et al., 2013). This last evidence, suggests an interaction of these two modifier genes at some point of the pollen rejection pathway in *Nicotiana* spp., which currently is vaguely known. Consequently, it becomes important to determine if additional pollen proteins are required by NaStEP to exert its function in pollen rejection.

Here, a mitochondrial NaStEP-interacting protein was identified and designated as NaSIPP (*N. alata* Self-Incompatibility Pollen Protein), and convincing evidence of the ability of NaSIPP to recruit NaStEP to the mitochondria in pollen tubes is provided. In addition, *NaSIPP* transcript was detected specifically in mature pollen of SI and SC (self-compatible) *Nicotiana* spp. Notably, the *NaSIPP* orthologs in SC species have accumulated extensive mutations in the coding region, so that the encoded product is unlikely to produce a functional protein. According to these data and further evidence given below, NaSIPP represents a novel mitochondrial protein with phosphate carrier activity that is essential to SI.

## RESULTS

### Identifying NaStEP Pollen Protein Partners

To identify pollen and pollen tube proteins possibly interacting with NaStEP, we performed a yeast two-hybrid assay using NaStEP as bait to screen a *Nicotiana glauca* pollen/pollen tube cDNA library fused to a transcription factor activation domain (AD), according to Fields and Song (1989). Positive clones were selected under stringent conditions for further analysis.

From the above experiment, we recovered a cDNA encoding the C-terminal end of an MPC (Mitochondrial Phosphate Carrier)-like protein. To confirm that the interaction was mediated by the bait (NaStEP) and prey (MPC sequence) pair, we cotransformed yeast with an empty vector (Binding Domain or BD) or the bait (BD-NaStEP) and the candidate prey protein and selected positive transformants under stringent medium. From this assay, we only recovered clones coexpressing the BD-NaStEP fusion and the AD-C-terminal end of MPC-like cDNA (Fig. 1A). In addition, in a similar assay, NaStEP was not found to interact with Mir1, an MPC from *Saccharomyces cerevisiae*.

The cDNA coding the C-terminal end of MPC-like was 431 bp long. Northern-blot analysis using this cDNA as probe showed the accumulation of this MPC-like transcript specifically in mature *N. rastronensis* pollen (Supplemental Fig. S1). Therefore, we cloned its full-length cDNA by 5' RACE from *N. rastronensis* and *N. alata*. The resulting sequence was named NaSIPP.

When tested by yeast two-hybrid assay, the full-length NaSIPP cDNA remained positive for interaction with NaStEP. Therefore, the NaSIPP C terminus has enough exposure in the complete protein to account for its interaction with NaStEP.

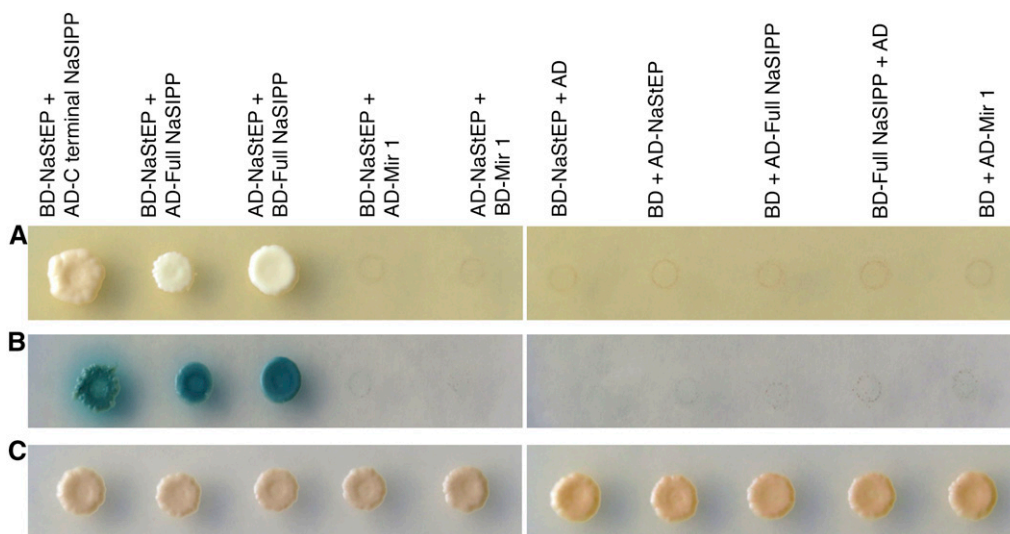
### NaSIPP Belongs to the Phosphate Carrier Family

According to a multiple sequence alignment of NaSIPP and other MPC sequences from both functionally characterized and putative MPCs (Supplemental Fig. S2A), NaSIPP belongs to the MPC subfamily within the mitochondrial carrier family, which includes a

number of membrane proteins known to transport solutes across the mitochondrial membranes (Palmieri et al., 2011). Three tandem repeats of a domain, known as mitochondrial carrier domain (PROSITE PS50920, PFAM PF00153, and IPR00193; Palmieri, 2004) are conserved in the primary sequences of all mitochondrial carrier family members. Each domain is about 100 amino acids long and contains two hydrophobic transmembrane segments connected through a hydrophilic loop and is characterized by the sequence motif PX[D/E]XX[K/R]X[K/R] (20–30 residues) [D/E]GXXXX[W/Y/F][K/R]G (Palmieri, 1994, 2004). This signature has been used to identify mitochondrial carriers in eukaryotic sequenced genomes (Palmieri, 1994, 2004).

A phylogenetic analysis of 21 MPC sequences from yeast, plants, and animals based on amino acid sequences (Supplemental Fig. S2B) clearly defined a plant and animal clade. Notably, this sequence comparison shows *S. cerevisiae* Pic2 as a closer relative to the animal and plant MPC than to Mir1, a second homolog encoded in the *S. cerevisiae* genome.

The MPC plant sequences could be further separated into three subgroups: (1) legume MPC (*Glycine max* and *Medicago truncatula*), sharing 95.3% sequence identity; (2) Solanaceae MPC (five sequences sharing 84.8% sequence identity); and (3) a diverse set of plant sequences from different plant families that were clustered together, although they do not form a well-defined group. The Solanaceae subgroup is represented by five MPCs, and the higher identity is between the two carriers from *Solanum* spp., with 99.2% identity, followed by the *Nicotiana* spp. carriers, which share 98.8% identity. NaSIPP formed part of this subgroup and presents a high identity with a *Nicotiana tomentosiformis* MPC, followed



**Figure 1.** NaStEP interacts with the pollen protein NaSIPP. Interaction between NaStEP and NaSIPP was detected by a yeast two-hybrid assay. A, Cotransformed *S. cerevisiae* growing on the quadruple dropout, or QDO, medium (synthetic dextrose [SD]/Trp-Leu-Ade-His). B, Yeast growth on QDO medium supplemented with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (X- $\alpha$ -Gal) and aureobasidin; positive interactions support growth and turn blue. C, Yeast growth on double dropout, or DDO, medium (SD/Trp-Leu). Full NaSIPP, The whole NaSIPP protein; Mir1, MPC of *S. cerevisiae*. BD and AD empty vectors were used as negative controls.

by the *Solanum* spp. carriers (95.3%) and the *Ipomoea* spp. MPC (88.3%).

### Expression of NaSIPP Rescues the Mitochondrial Defect of the Yeast Mutant $\Delta mir1$

Because the NaSIPP sequence has MPC protein family features, we evaluated its ability to complement the  $\Delta mir1$  mutant of *S. cerevisiae*. The amino acids known to be required for phosphate transport in Mir1 are His-32, Lys-42, Thr-43, Thr-79, Lys-90, Glu-126, Arg-140, Arg-142, Lys-179, Lys-187, Asp-236, and Arg-276. When these residues are mutated, the ability to transport phosphate is suppressed (Briggs et al., 1999; Phelps et al., 2001; Wohlrab et al., 2002). Sequence alignment of NaSIPP with multiple functional and putative MPCs showed high conservation in these 12 residues for NaSIPP (Supplemental Fig. S2A), in agreement with its possible phosphate transport function.

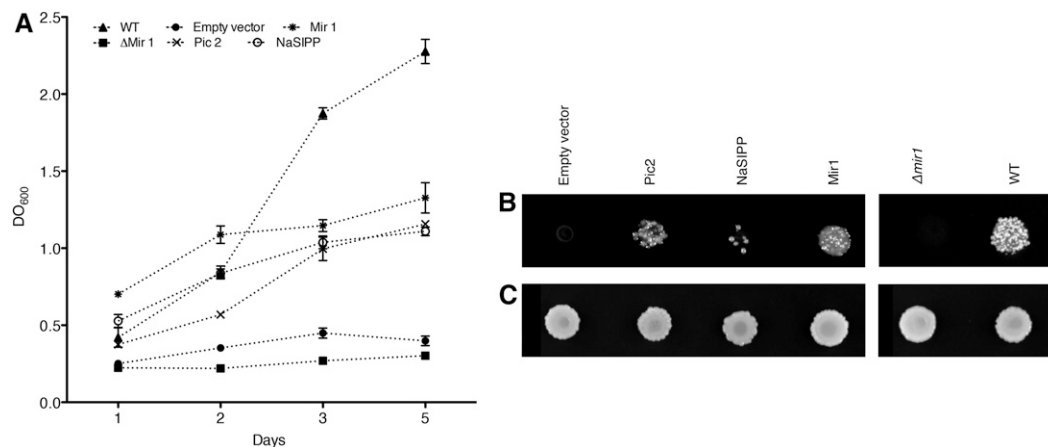
In *S. cerevisiae*, there are two functionally redundant MPCs, Mir1 and Pic2. Mir1 is more abundant than Pic2 under normal conditions (Murakami et al., 1990), whereas the expression of Pic2 is induced by high temperature (Hamel et al., 2004). NaSIPP shares 50% identity with Pic2 and 40.3% with Mir1, which offered an opportunity to evaluate whether NaSIPP rescues the  $\Delta mir1$  mutant. To test this, we transformed the  $\Delta mir1$  *S. cerevisiae* strain with NaSIPP using the yeast expression vector *pYES-DEST52*. As shown in Figure 2, NaSIPP partially rescued the  $\Delta mir1$  mutant, although transformants grew slower in glycerol (a nonfermentable substrate) compared with those transformed by Mir1. According to this result, NaSIPP can provide phosphate transport to the yeast mutant, but with reduced efficiency. Differences between NaSIPP and Mir1 in kinetic or regulatory properties, or the absence of some unidentified factor, may

limit NaSIPP function in yeast, but that issue was beyond the scope of this study.

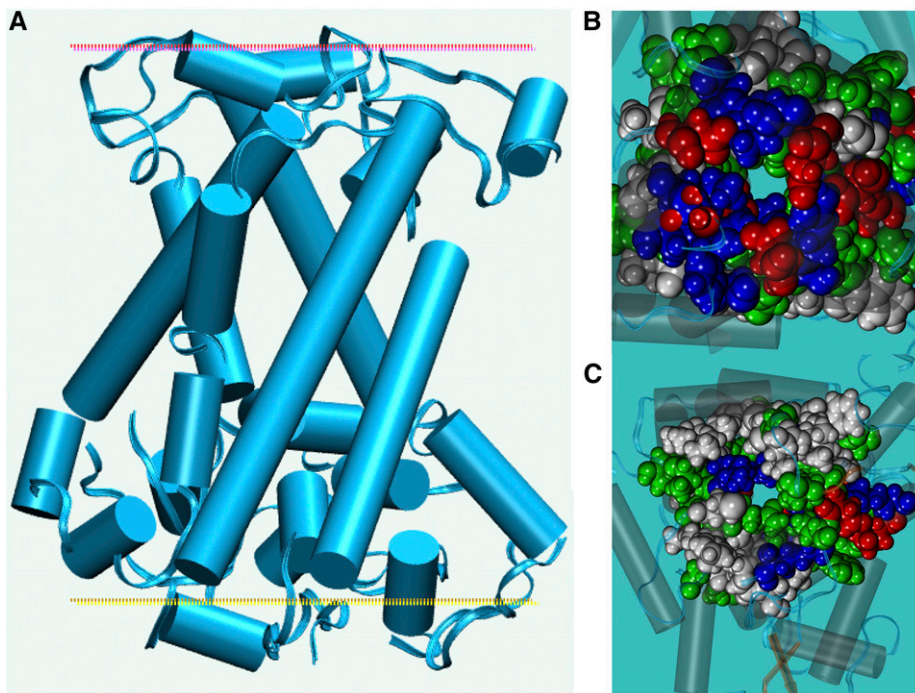
### NaSIPP Three-Dimensional Model

Mitochondrial carrier members have divergent sequences (15%–20% identity) but share predicted membrane topologies with six transmembrane helices, as do NaSIPP and ATP/ADP translocators. The yeast mitochondrial ATP/ADP translocator was used as a template to model NaSIPP, and extensive molecular dynamics simulations in an explicit mixed-lipid membrane, with explicit water and ions, were used to improve the model (see “Materials and Methods”). The final model had an Rd.HMM score considered as highly reliable (Martínez-Castilla and Rodríguez-Sotres, 2010), similar to those found for NMR experimental solutions of protein three-dimensional structures, and the scoring method has a very low false positive rate. The predicted structure of NaSIPP had an all- $\alpha$  structure, forming a core of six transmembrane regions (Fig. 3A). The upper soluble domain had a discoidal shape (Fig. 3A, red dotted line), while the bottom domain was quasi-globular (Fig. 3A, yellow dotted line). Both N and C termini were on the bottom domain.

The three-dimensional model of this protein has a central channel dominated by positive (at neutral pH) and neutral polar side chains (Fig. 3B), but the entrance at the top had several negatively charged chains (Fig. 3C). In this model, Asp-298 forms a salt bridge with Arg-316, which obstructs the pore, but a pH change could allow protonation of the acidic side chains to open the gate and allow phosphate transport. Thus, the model's structural features are consistent with the partial complementation found of the  $\Delta mir1$  mutant by NaSIPP.



**Figure 2.** NaSIPP is a phosphate transporter and partially complements the absence of Mir1 in *S. cerevisiae*. A, Growth curve of the yeast mutant  $\Delta mir1$ , the wild-type (WT) strain, and the  $\Delta mir1$  yeast transformed with the plasmid *pYES-DEST52* (empty vector) and with construct *Pic2::pYES-DEST52*, *NaSIPP::pYES-DEST52*, and *Mir1::pYES-DEST52*. Yeast were grown on liquid glycerol medium at 30°C. B, Yeast were grown on solid glycerol medium at 30°C for 10 d. C, Yeast replica plated on solid Glc medium were incubated for 3 d at 30°C.



**Figure 3.** Schematic representation of the predicted three-dimensional structure of NaSIPP. A, The model is shown as a cartoon from the membrane side. B and C, Translucent cartoon representations shown from the top (B), showing the region indicated by the red dotted line in A, and from the bottom (C), showing the region indicated by the yellow dotted line in A. Amino acid atoms are represented as Van der Waals spheres and colored by amino acid type: red, acidic; blue, basic; green, polar neutral; light gray, hydrophobic. These images were prepared using Visual Molecular Dynamics (Humphrey et al., 1996).

### Subcellular Localization of NaSIPP

Several members of the mitochondrial carrier family localize to mitochondria, although some have been localized in the plasma membrane, specifically in the caveolae microdomain (Lisanti et al., 1994; Bãthori et al., 1999), or in small vesicles (Wandrey et al., 2004), peroxisomes, glyoxisomes, or plastids (Fukao et al., 2001; Palmieri et al., 2001; Bedhomme et al., 2005; Leroch et al., 2005). Thus, to determine the precise subcellular localization of NaSIPP, we expressed NaSIPP fused with the tomato (*Solanum lycopersicum*) fluorescent protein and under the control of the pollen-specific promoter *Lat52* (*Lat52::NaSIPP-Tomato*) in transiently transformed *Nicotiana tabacum* pollen tubes. Furthermore, NaSIPP-Tomato signal was analyzed in these pollen tubes in the presence of the mitochondrial marker Mit-GFP (mitochondrial targeting sequence fused to GFP; Logan and Leaver, 2000). The results indicated that the NaSIPP-Tomato fluorescence signal was associated with motile organelles throughout the pollen tube cytoplasm, which displayed a movement similar to a reverse-fountain pattern (Fig. 4A; Supplemental Movie S1), characteristic of elongating pollen tubes (Cheung and Wu, 2008). Cotransformation of the mitochondrial marker Mit-GFP (Fig. 4B) showed clear overlap of NaSIPP-Tomato and Mit-GFP on the same motile organelles observed previously (Fig. 4C, yellow signal; Supplemental Movie S2), providing evidence of NaSIPP mitochondrial localization in *N. tabacum* pollen tubes.

To obtain further support for the mitochondrial localization of NaSIPP, we transiently expressed the construct *NaSIPP-GFP* in *Arabidopsis thaliana* seedlings via *Agrobacterium tumefaciens*, along with

staining with the mitochondrial marker MitoTracker Red FM. We found NaSIPP-GFP fluorescence signal colocalizing with MitoTracker Red FM (Fig. 4, D–G), indicating that the necessary information to target NaSIPP to the plant mitochondria is contained within its amino acid sequence.

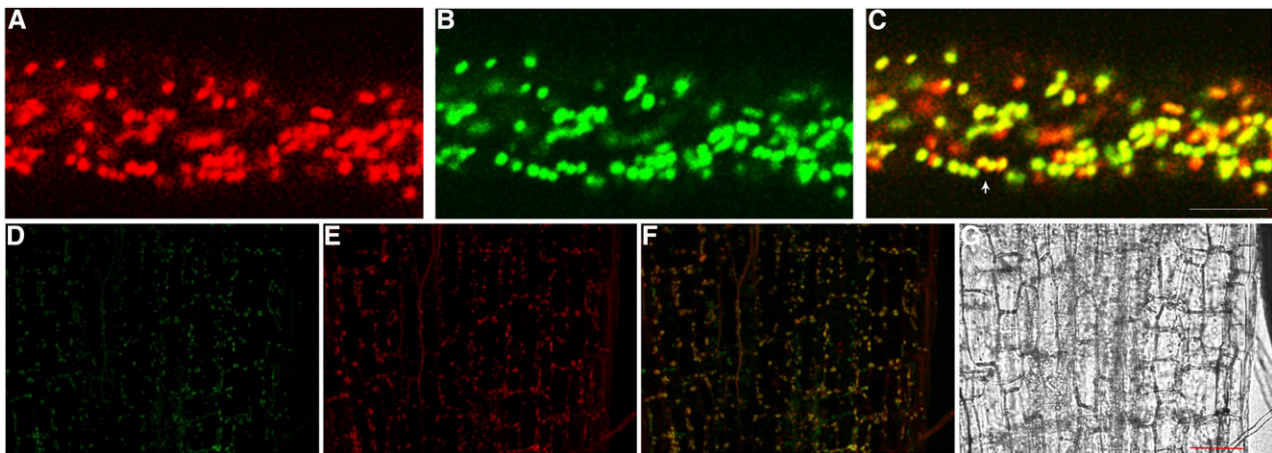
### Interaction between NaStEP and NaSIPP in Plant Cells

To establish the interaction between NaStEP and NaSIPP in plant cells, we performed a bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay. We used vectors containing the *Ubiquitin10* promoter that drives a moderate expression in plant cells and mitigates potential problems, such as false positive (Grefen et al., 2010).

We fused each gene to the N- and C-terminal halves of yellow fluorescent protein (YFP) and used them to transform *A. tumefaciens*. Transient coexpression of NaStEP and NaSIPP constructs in roots and hypocotyl epidermis of *Arabidopsis* seedlings led to the restoration of YFP fluorescence, prominently in the meristematic and elongation zones of the roots (Fig. 5, A–C) and lower hypocotyl (Fig. 5, D–F). Fluorescence was not observed in seedlings cotransformed with either half of the split YFP vector in combination with an empty vector (Supplemental Fig. S3, A–H).

Additionally, we performed a BiFC assay in *N. tabacum* pollen tubes. We fused each gene to the N- and C-terminal halves of the Venus protein and under the control of the pollen-specific promoter *Lat52*. Even though the frequencies of transient expression were low, ranging from 0.001% to 0.002%, the transient coexpression





**Figure 4.** Subcellular localization of NaSIPP. A to C, Coexpression of NaSIPP-Tomato with the mitochondrial marker Mit-GFP. Labeled compartments in *N. tabacum* pollen tubes expressing NaSIPP-Tomato (red; A), Mit-GFP (green; B), and merge (yellow; C) are shown. The white arrow shows the colocalization of NaSIPP-Tomato and Mit-GFP. The pollen grains were transformed by microprojectile bombardment. Bar = 5  $\mu\text{m}$ . D, Transiently transformed Arabidopsis seedlings expressing the *35S::NaSIPP-GFP* construct (green) in hypocotyl cells. E, MitoTracker Red FM signal is observed in red. F, Merge of D and E (yellow). G, Bright field. Bar = 50  $\mu\text{m}$ .

of NaStEP and NaSIPP constructs in transformed *N. tabacum* pollen tubes led to the restoration of Venus fluorescence, mainly in small sausage-shaped organelles resembling mitochondria that were distributed throughout the pollen tube (Fig. 5, G–I). Fluorescence was not observed in pollen tubes cotransformed with either half of the split Venus vector in combination with an empty vector (Supplemental Fig. S3, I–F). These data demonstrate the NaStEP-NaSIPP interaction in vivo, both in pollen tubes and in other heterologous plant tissues.

#### The Interaction of NaSIPP and NaStEP Is Associated with Mitochondria

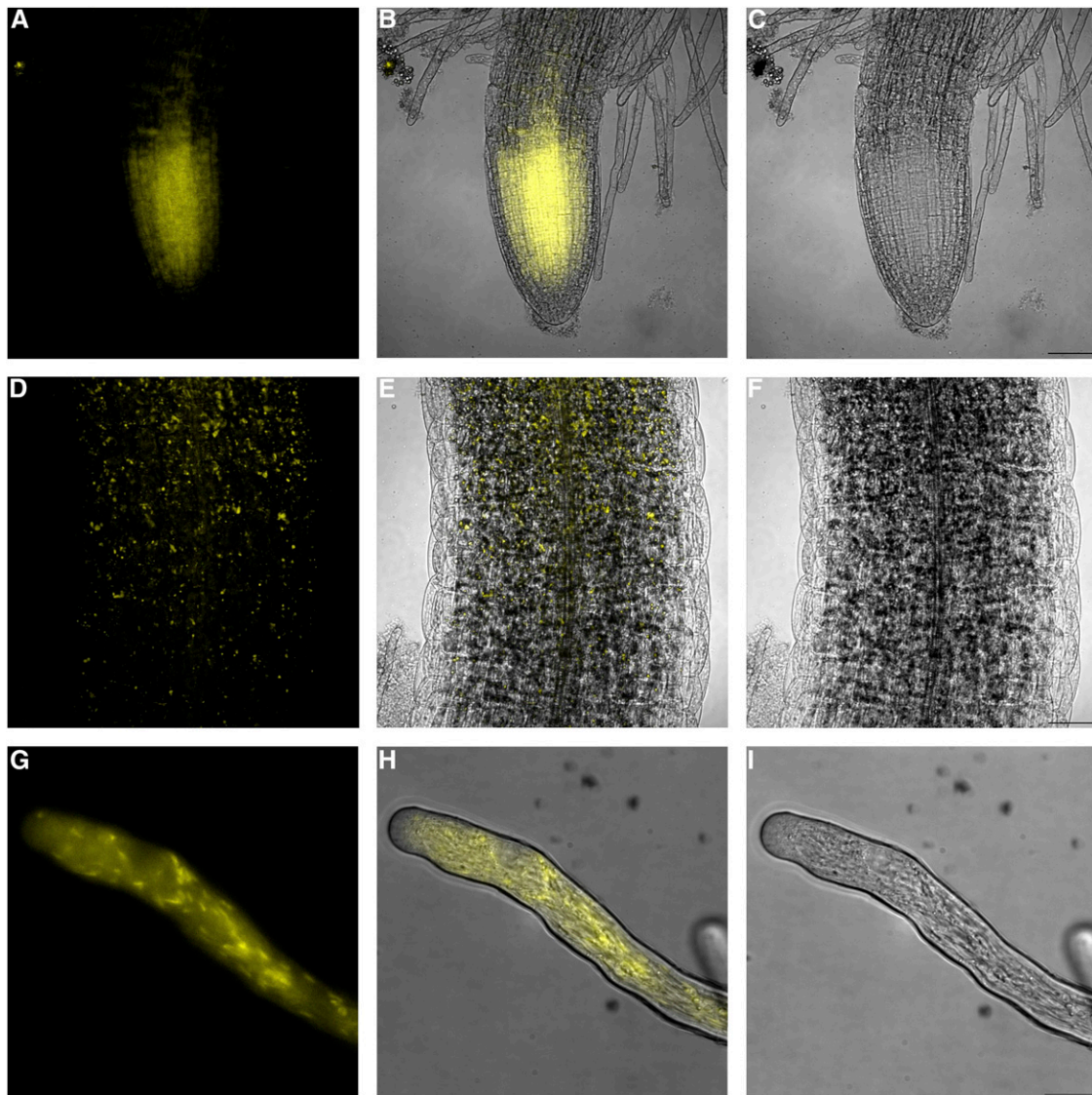
To examine if the NaSIPP-NaStEP complex associates with the mitochondria, we performed a BiFC assay in Arabidopsis seedlings, which were also treated with MitoTracker Red FM, in order to determine whether the reconstituted YFP signal could be detected in mitochondria. Figure 6A shows NaStEP-nYFP and NaSIPP-cYFP constructs coexpressed in Arabidopsis seedlings, where the YFP fluorescence was reestablished, as shown before, and how NaStEP and NaSIPP (Fig. 6A, green signal) colocalize with the MitoTracker Red FM signal coming from mitochondria (Fig. 6, B–D). Altogether, these data give evidence of an in vivo complex between NaStEP and NaSIPP located in mitochondria. The time resolution of the events is not enough to indicate whether the complex forms in the mitochondria or a preformed complex is targeted to this organelle, and this could be one of the questions to answer in the future.

BiFC complementation provides evidence of the interaction between two proteins in vivo, but since it involves a covalent bond, the complex has an extended

long life. To provide further evidence of the interaction between NaStEP and NaSIPP using a more dynamic probe, *N. tabacum* pollen grains were transformed by microprojectile bombardment using both constructs, *Lat52::NaStEP-GFP* and *Lat52::NaSIPP-Tomato*, and the GFP and/or Tomato fluorescence was monitored by confocal microscopy. When NaSIPP was expressed alone, the red Tomato fluorescence was distributed to discrete structures in pollen tubes (Fig. 7A). By contrast, NaStEP-GFP signal was distributed randomly in the pollen tube cytoplasm (Fig. 7B). When both proteins were coexpressed, the localization pattern of NaStEP changed from a cytoplasm distribution to a punctate pattern (Fig. 7, C–E), suggesting again a physical interaction between NaStEP and NaSIPP, which apparently mediates the translocation of the cytoplasmic NaStEP to the mitochondria.

#### The NaSIPP Transcript Accumulates Highly in Mature Pollen of *Nicotiana* spp.

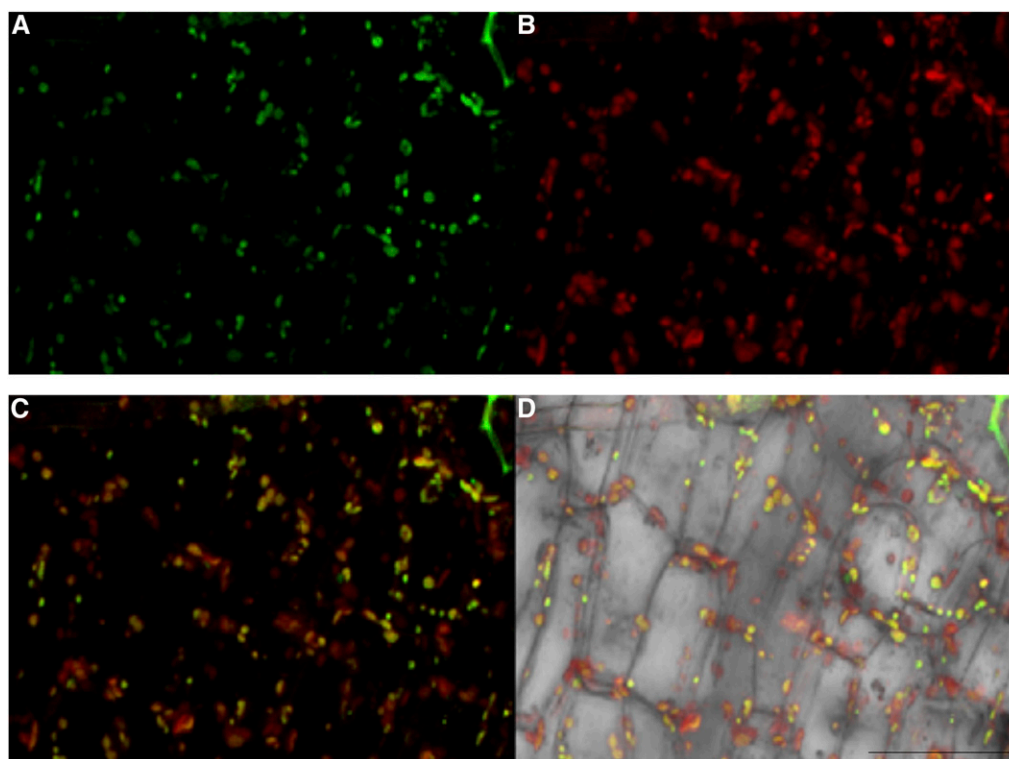
A BLAST analysis on the National Center for Biotechnology Information site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with *NaSIPP* cDNA as probe found three *MPC-like* cDNAs of *N. tabacum* sharing high identity to the NaSIPP coding sequence: XM\_016632920.1 (20.1), XM\_016617131.1 (31.1), and XM\_016600064.1 (64.1). The expression patterns of these *MPC-like* mRNAs were compared with those of *NaSIPP* transcript by reverse transcription-PCR analysis, using specific primers for each *MPC-like* transcript, and in several *N. alata* organs (Fig. 8A), developing anthers at various stages (Fig. 8B), and mature pollen from *Nicotiana* spp. (Fig. 8C). The results show the *MPC-like* 20.1 and 64.1 transcripts expressed on reproductive and no reproductive tested



**Figure 5.** NaStEP interacts with NaSIPP in plant cells. Interaction between NaStEP and NaSIPP was detected by BiFC assay. A, Coexpression of NaStEP-nYFP and NaSIPP-cYFP constructs in roots transiently transformed in Arabidopsis seedlings. B, Merge of A and C. C, Bright field. Bar = 50  $\mu$ m. D, Coexpression of NaStEP-nYFP and NaSIPP-cYFP constructs in hypocotyls transiently transformed in Arabidopsis seedlings. E, Merge of D and F. F, Bright field. The YFP fluorescence is shown in yellow. Bar = 50  $\mu$ m. G, Coexpression of NaStEP-NVenus and NaSIPP-CVenus constructs of *N. tabacum* pollen tubes transformed by microprojectile bombardment. H, Merge of G and I. I, Bright field. The Venus fluorescence is shown in yellow. Bar = 40  $\mu$ m.

organs and *MPC-like 31.1* mRNA detected on all organs, with the exception of pollen grains. Besides, the *20.1* and *64.1* transcripts were amplified in all the anther development stages evaluated, whereas *NaSIPP* mRNA was detected only in mature pollen (Fig. 8, A and B). In addition, when we tested the presence of *MPC-like* transcripts in mature pollen of different *Nicotiana* spp. (Fig. 8C), the *20.1* and *64.1* mRNAs were present in most of the *Nicotiana* spp. In the case of *SIPP*, a cDNA was amplified with high similarity to the *NaSIPP* cDNA in all the *Nicotiana* spp., with the only exception being *Nicotiana glauca*. Nevertheless, when all of these cDNAs were sequenced, we found insertions/deletions in the sequences from SC

*Nicotiana* spp. (*Nicotiana plumbaginifolia*, *N. tabacum*, and *Nicotiana benthamiana*), and the nucleotide sequences are predicted to encode for proteins with significant differences from *NaSIPP*, including frame-shift mutations and/or premature stop codons. If expressed, the putative corresponding protein products are unlikely to be functional (Supplemental Fig. S4, A and B). By contrast, all the *SIPP* cDNAs from SI *Nicotiana* spp. (*N. alata*, *N. rastronsis*, and *Nicotiana forgetiana*) show better conservation in their amino acid sequences (Supplemental Fig. S3, A and B) and appear to encode proteins sharing all the features associated with their predicted functions, in agreement with their possible participation in the SI response.



**Figure 6.** Physical interaction between NaStEP and NaSIPP occurs in mitochondria. Colocalization of the BiFC signal with the mitochondrial marker MitoTracker Red FM is shown in Arabidopsis seedlings. A, Localization of the interaction between NaStEP-nYFP and NaSIPP-cYFP (green) expressed in hypocotyl cells. B, MitoTracker Red FM signal is observed in red. C and D Merged signals (yellow). Arabidopsis seedlings were transiently transformed. Bar = 50  $\mu\text{m}$ .

### NaSIPP Suppression in Pollen Tubes

To test if NaSIPP plays a role in SI, we transformed *N. alata*  $S_{A2}$  pollen by microprojectile bombardment with the construct *RNAi-NaSIPP* under the control of the *NTP303* promoter (*NTP303p*). The transformed pollen grains were used to pollinate SI *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$  pistils (incompatible cross), and we evaluated the effect on pollination, observing pollen tube growth through the style after 72 h of pollination (Fig. 9A). If NaSIPP is playing a role in pollen rejection, its suppression would allow pollen tubes to reach the base of the style in an incompatible cross (when the *S*-allele in pollen matches with one of the pistil *S*-alleles); otherwise, pollen tube growth should be inhibited in the upper one-third of the style, as happens in the SI *N. alata*.

When SI *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$  pistils were pollinated with untransformed  $S_{A2}$  pollen (incompatible cross), the pollen tubes did not reach the base of the style (Fig. 9B), as expected, because the pollen tube growth was inhibited in the upper segment of the style. Here, the average length of the pollen tube was equivalent to 28% of the style length ( $SE = 3.9$ ;  $n = 28$  pistils analyzed; Fig. 9F; Supplemental Table S1).

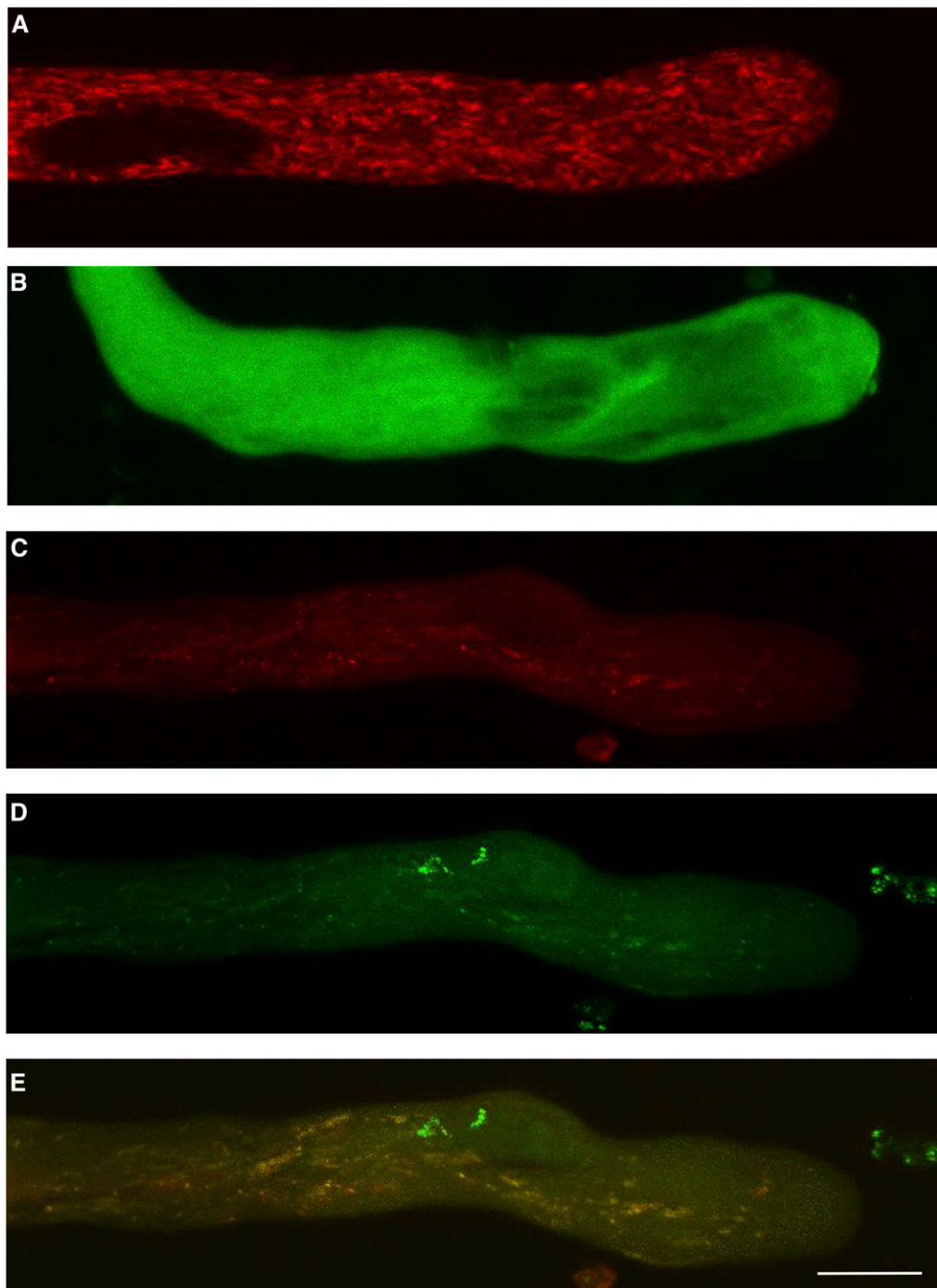
Pollen transformed with the empty vector displayed a similar behavior to the wild-type pollen, and the average pollen tube growth was equivalent to 26% of the style ( $SE = 2.9$ ;  $n = 67$  pistils analyzed; Fig. 9, C and F; Supplemental Tables S1 and S2).

Transformation of pollen grains with *RNAi-NaSIPP* resulted in a notable increase in the number of pollen tubes reaching the base of the style over those pollen tubes coming from untransformed pollen or pollen transformed with the empty vector (Fig. 9, D and F), and the average length of the pollen tube was equivalent to 64.9% of the style ( $SE = 2.3$ ;  $n = 89$  pistils analyzed). Moreover, the difference was statistically highly significant ( $P < 0.0001$ ; Supplemental Tables S1 and S2) between the pollen transformed with *RNAi-NaSIPP* and the pollen transformed with the empty vector. As predicted, RNAi made normally incompatible pollen tubes grow significantly longer, and many did reach the base of the style, suggesting that the RNAi-mediated suppression of NaSIPP expression impairs SI and giving further support to the proposed role of NaSIPP as a novel pollen modifier gene, essential to the SI response in *Nicotiana* spp.

On the other hand, when we pollinated SI *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  pistils with  $S_{A2}$  pollen bombarded with the construct *RNAi-NaSIPP*, most of the pollen tubes reached the base of the style (Fig. 9E), as expected for a compatible cross.

### DISCUSSION

In this study, we identified a novel pollen MPC, NaSIPP, that interacts with NaStEP, and the resulting



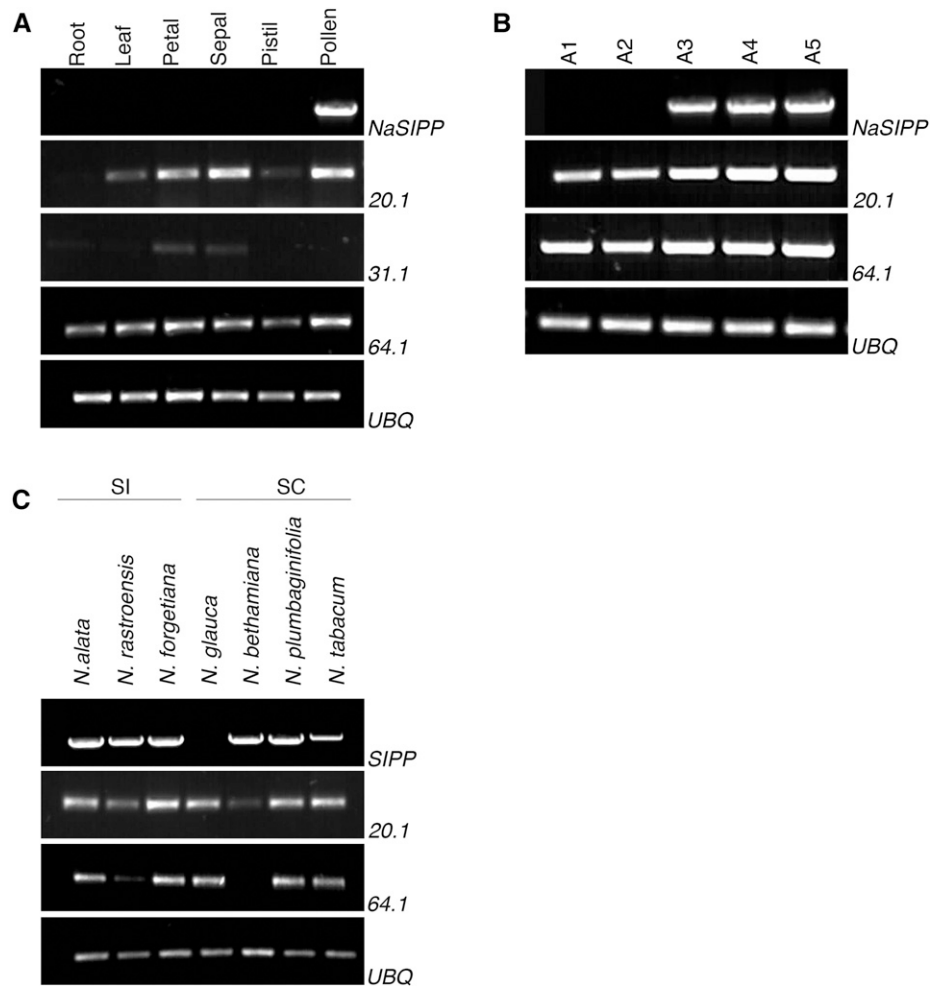
**Figure 7.** Interaction between NaStEP and NaSIPP occurs in the mitochondria of pollen tubes. A, Localization pattern of NaSIPP-Tomato (red). B, NaStEP-GFP (green). C, Coexpression of NaSIPP-Tomato with NaStEP-GFP on the red channel. D, The green channel. E, Merge (yellow). The pollen tubes were transformed by microprojectile bombardment. Bar = 10  $\mu$ m.

complex was found associated to the mitochondria. Likewise, evidence is provided of *NaSIPP* being an essential gene in the pollen rejection response in *Nicotiana* spp.

The interaction of NaStEP with a mitochondrial protein like NaSIPP was initially unexpected, because

we previously demonstrated the role of the stigma-located NaStEP protein as a proteinase inhibitor and its ability to enhance HT-B stability inside the vacuoles of pollen tubes (Jiménez-Durán et al., 2013). However, the interaction of NaStEP with the mitochondrial membrane protein NaSIPP agrees with some reports describing

**Figure 8.** The *NaSIPP* transcript is accumulated specifically in mature pollen of *Nicotiana* spp. A, mRNA levels of different MPCs in different organs of *N. alata*. B, Developmental anther stages: A1, 0.5 to 1 cm; A2, 1.1 to 2 cm; A3, 2.1 to 3.5 cm; A4, 3.5 to 6 cm; A5, 6 cm, mature flower. C, Detection of transcripts in different genetic *Nicotiana* spp. backgrounds. Primers used were specific for the genes shown at the right: *NaSIPP*, XM\_0166322920.1 (20.1), XM\_016649631.1 (31.1), and XM\_016600064.1 (64.1). Ubiquitin (*UBQ*) was used as a loading control.



Kunitz-type inhibitors interacting with membrane ion channels, which are able to induce membrane permeability changes (Lancelin et al., 1994; Harvey, 2001; Peigneur et al., 2011; García-Fernández et al., 2016).

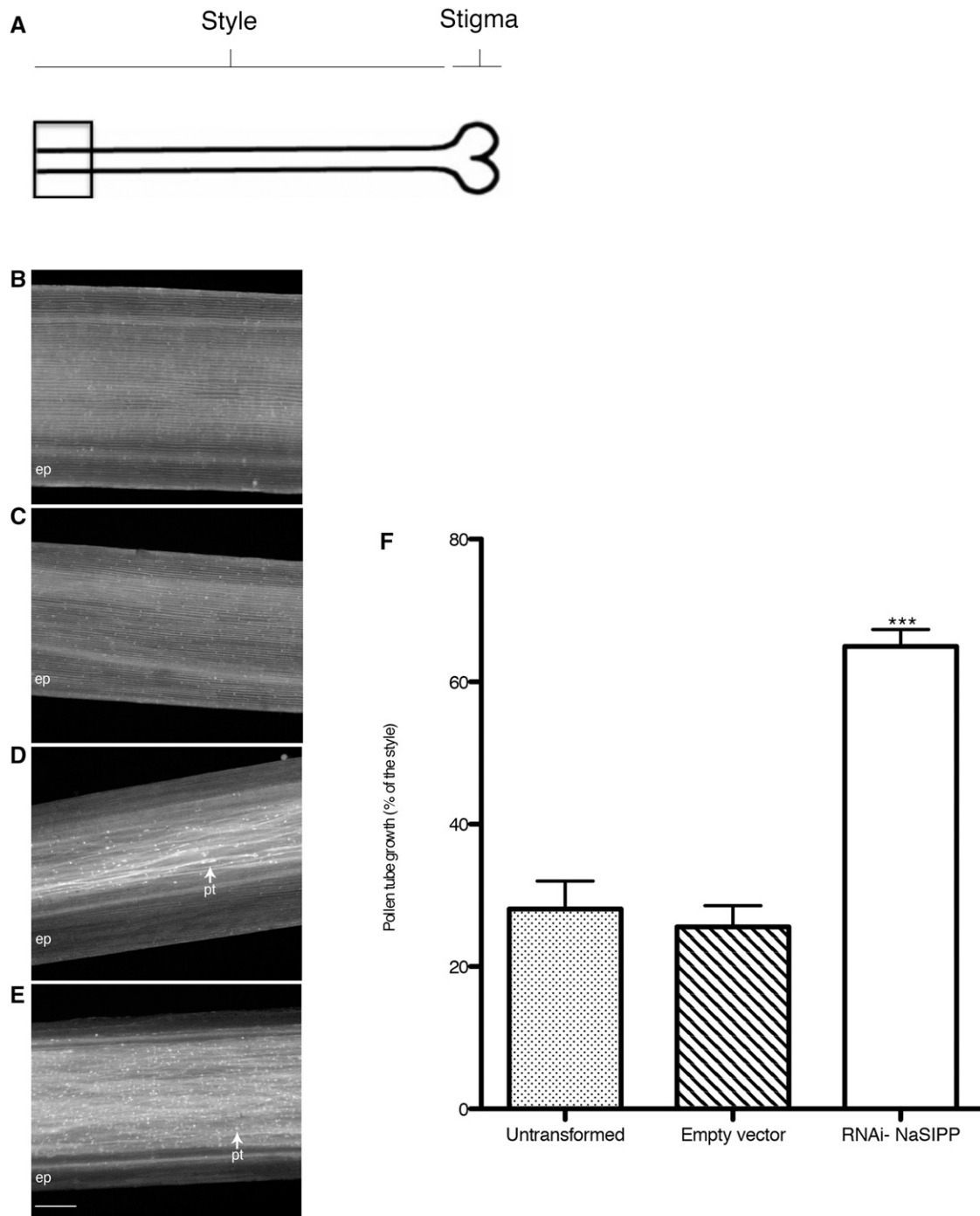
The specific expression of *NaSIPP* in mature pollen and its ability to complement a phosphate transport-deficient mutant could relate this protein to energy requirements during pollen tube growth. The *NaSIPP* transcript was found expressed in mature pollen of both SI and SC *Nicotiana* spp.; however, their orthologs in SC *Nicotiana* spp. have accumulated frame-shifting mutations that generate premature stop codons, and even if those proteins are translated, they are unlikely to be functional (Supplemental Fig. S4B). Therefore, the expression pattern of the functional *NaSIPP* in SI *Nicotiana* spp. backgrounds and the SI disruption when *NaSIPP* was suppressed are strongly consistent with a key role for this protein in the SI response in *Nicotiana* spp., probably after its interaction with NaStEP.

Recent evidence points to some MPCs as structural components of the permeability transition pore (PTP; Leung et al., 2008; Gutiérrez-Aguilar et al., 2010; Varanyuwatana and Halestrap, 2012). The PTP is a nonspecific channel in the mitochondrial membrane

(Haworth and Hunter, 1979; Crompton et al., 1987), and it is usually closed. The opening of the PTP may result from a number of stimuli, including a calcium overload of the mitochondrial matrix (Hunter and Haworth, 1979; Al-Nasser and Crompton, 1986), which triggers an increase in the mitochondrial inorganic phosphate pools (Crompton and Costi, 1988; Kushnareva et al., 1999; Arpagaus et al., 2002).

An open PTP allows an unrestricted movement of solutes, increasing the mitochondrial permeability and producing the collapse of mitochondrial membrane potential (Bhosale et al., 2015). As a result, ATP synthesis stops and a cellular energy crisis take place (Halestrap et al., 1998, 2004). If *NaSIPP* is a component of PTP-like, its interaction with NaStEP might be part of the mechanism of PTP opening and cause the pollen tube to stop growing as part of the *S*-specific pollen rejection response. Many aspects of this proposal are still hypothetical and should be challenged by further studies, some of which are in progress in our group.

The opened PTP has been shown to mediate the cytochrome *c* release, along with other cell death factors (Petronilli et al., 1994; Doran and Halestrap, 2000), which are early crucial events in both the animal and



**Figure 9.** Suppression of NaSIPP in pollen tubes disrupts SI in *N. alata*. Pistils from SI *N. alata* were pollinated with  $S_{A2}$  pollen and prepared for imaging after 72 h of pollination. A, As shown in the diagram, the field of view is at or very near the base of the style. B, SI *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$  pistils pollinated with untransformed  $S_{A2}$  pollen. Epidermal tissue (ep) also is visible. The untransformed control pollen shows normal *S*-allele-specific pollen rejection because no  $S_{A2}$  pollen tubes are evident. C, SI *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$  pistils pollinated with  $S_{A2}$  pollen bombarded with the empty vector. D, Pollen tubes reaching the base of a style of SI *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$ , pollinated with  $S_{A2}$  pollen bombarded with the construct *RNAi-NaSIPP*. Pollen tubes (pt) appear as fiber with brightly stained callose plugs (arrow). E, SI *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  pistils with  $S_{A2}$  pollen bombarded with the construct *RNAi-NaSIPP*. F, Histogram of pollen tube lengths after SI *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$  pistils were pollinated with untransformed  $S_{A2}$  pollen, with pollen grains bombarded with empty vector, and with the construct *RNAi-NaSIPP*. Results are averages and SE of 28 pollinations with untransformed pollen grains, 67 pollinations with pollen grains transformed with the empty vector, and 89 pollinations with pollen grains transformed with the *RNAi-NaSIPP* construct. The error bars represent SE; asterisks represent statistical significance ( $P < 0.05$ , one-way ANOVA with Dunnett's posttest).

plant intrinsic pathway of programmed cell death (PCD) activation (Beers, 1997; Balk et al., 1999; Stein and Hansen, 1999; Sun et al., 1999; Lam and del Pozo, 2000). However, we do not know if this happens in SI in *Nicotiana* spp., and it would be interesting to explore in the future, since PCD has been implicated in the gametophytic pollen rejection response (Thomas and Franklin-Tong, 2004) and different hallmarks of PCD also have been reported in other species, such as *Pyrus pyrifolia* (Wang et al., 2009; Wang and Zhang, 2011), *Olea europaea* (Serrano et al., 2010), and *N. alata* (Roldán et al., 2012).

Although whether the SI response in *Nicotiana* spp. involves a PCD program has yet to be tested, the features of NaSIPP and the possibility that PCD might be part of the pollen rejection response in *Nicotiana* spp. make NaSIPP a good candidate for an active role if such an SI-specific cascade takes place in these species.

It is well known that interaction between S-RNase and SLF determines either the compatibility or incompatibility phenotype. But further evidence indicated the participation of HT-B, NaStEP, and NaSIPP somewhere downstream of this interaction. NaStEP enters both compatible and incompatible pollen tubes early in pollination (Jiménez-Durán et al., 2013), and considering its properties, NaStEP might play roles at the cytoplasm and at the mitochondria in the pollen rejection response. Thus, in an incompatible cross, NaStEP might function as a proteinase inhibitor protecting HT-B from degradation. On the other hand, there is evidence that NaStEP in the pollen tube interacts with NaSIPP in the mitochondria, and this interaction could create an energy crisis and contribute to pollen tube growth inhibition. Somehow in a compatible cross, the interaction between NaSIPP and NaStEP might be impaired or altered, through an unknown mechanism, related to the unspecific S-allele interaction between SLF and S-RNase. Under this last condition, we postulate that the S-RNases remain confined to intact vacuoles, HT-B would be degraded, and the mitochondria would stay healthy to provide ATP and support the growth of the pollen tubes toward the ovary.

Our future goal is to propose a comprehensive model of the SI mechanism by identifying all the factors required in the S-RNase-dependent pollen rejection pathway and their participation in the SI response-related mechanism. Here, we give evidence that NaSIPP is an essential gene for SI, and our findings suggest a possible pivotal participation of mitochondria in the SI *Nicotiana* spp. response.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Materials

SI *Nicotiana alata* ( $S_{A2}S_{A2}$ ,  $S_{C10}S_{C10}$  genotype), SC *Nicotiana glauca*, and SC *Nicotiana tabacum* 'Praecox' have been described previously (Murfett et al., 1994, 1996; Beecher and McClure, 2001). SC *Nicotiana plumbaginifolia* (inventory no. TW107) and SI *Nicotiana forgetiana* (inventory no. TW50) were gifts from Bruce McClure's laboratory. SI *Nicotiana glauca* and *Nicotiana benthamiana* have been described previously (Jiménez-Durán et al., 2013). *N. tabacum* variety Petit

Havana SR1 was used for pollen transformation. All the plants were grown in soil under greenhouse conditions.

### Yeast Two-Hybrid Assay, Clone Identification, and Sequencing

#### NaStEP Bait

The cDNA of *NaStEP* (accession no. EU253563) was amplified using the following primers: forward, 5'-CCGGAATTCTCATCTTTCACCTCCACCAATCC-CATTGTC-3'; and reverse, 5'-GCGCTGCAGTTATGCATCAGTCTTCTGGA-ATTCTCGAAGAC-3'. The PCR product was cloned into a pGBKT7 vector (Clontech). Transformation of the *NaStEP* construct was performed in *Saccharomyces cerevisiae* Y2HGold cells, according to the manufacturer's instructions (Yeastmaker Yeast Transformation System 2, Clontech).

#### Pollen-Pollen Tube cDNA Library

mRNA was purified from total RNA from *N. glauca* pollen and pollen tubes (germinated during 16 h at 30°C) using the PolyAtract mRNA Isolation System (Promega). Total RNA was isolated with TRIzol (Invitrogen). For cDNA library construction, a 1:1 mix of mRNA from pollen and pollen tubes was used for cDNA synthesis using the CDS III and CDS III/6 primers, according to the manufacturer's instructions (Make Your Own Mate & Plate Library System; Clontech). The *S. cerevisiae* strain employed was Y187.

The cDNA library was screened using *BD-NaStEP* as bait. The screening was performed using yeast mating. Transformed cells were plated on QDO/X- $\alpha$ -gal medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) supplemented with 40  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> X- $\alpha$ -gal, according to the manufacturer's instructions (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System; Clontech).

Positive interactions were confirmed by yeast mating between the *BD-NaStEP* and *AC-prey* proteins and then growing on DDO and QDO/X- $\alpha$ -gal/aureobasidin A medium; the plates contained 125 ng mL<sup>-1</sup> aureobasidin A, according to the manufacturer's instructions (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System; Clontech).

#### Full NaSIPP cDNA Cloning

RNA was isolated from *N. alata* and *N. glauca* mature pollen with TRIzol (Invitrogen), and cDNA was prepared using the SMARTer RACE cDNA Amplification kit (Clontech). A full-length clone was recovered, cloned into pGEM-T-Easy, and sequenced.

#### Confirmation of NaStEP-Full Length NaSIPP Interaction by Yeast-Two Hybrid Analysis

The cDNAs of *NaStEP* and *NaSIPP* were amplified using the following primers: forward, 5'-CACCATGTCATCTTTCACCTCCCA-3'; reverse, 5'-TGCATCAGTCTTCTGGAATTTCTC-3'; and forward, 5'-CACCATGGCC-TACACACAACACT-3'; reverse, 5'-CTTGGCAGGGGCAGGTG-3', respectively. As a negative control, *Mir1* was used; the cDNA of *Mir1* was amplified using the following primers: forward, 5'-CACCATGTCGTGTCTGTCT-3'; and reverse, 5'-ATGACCACCACCACCAATTTCT-3'. PCR products were cloned into pENTR-D-TOPO vector (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. A subsequent LR reaction was performed in pDEST32 and pDEST22 (Invitrogen) for *NaSIPP*, *NaStEP*, and *Mir1*. Yeast transformation of those constructs was performed in Y2HGold and Y187 cells, according to the manufacturer's instructions (Yeastmaker Yeast Transformation System 2; Clontech).

Positive interactions were confirmed by yeast mating and then growing on DDO and QDO/X- $\alpha$ -gal/aureobasidin A medium; the plates contained 125 ng mL<sup>-1</sup> aureobasidin A, according to the manufacturer's instructions (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System; Clontech).

#### Transformation of Arabidopsis Seedlings

*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 cells carrying the clones of interest were grown during a first cycle (20 h, 200 rpm, and 28°C) in 5 mL of Luria-Bertani medium with 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> rifampicin and 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> spectinomycin. A second cycle of growth was started by inoculation of an aliquot from the first culture at a 1:1,000 dilution in fresh medium and then culturing until late exponential growth phase (OD<sub>600</sub> of 1.5–2). The bacteria were harvested and

resuspended in 10 mM MgCl<sub>2</sub> with 100 μM acetosyringone (Sigma-Aldrich) and incubated for 1 h. For cocultivation with *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), the bacteria were resuspended in 0.5× Murashige and Skoog basal salt medium (Sigma-Aldrich), pH 7.2, with 0.003% Silwet-77 to a final OD<sub>600</sub> of 0.5 (Campanoni et al., 2007).

## Transformation of Pollen Grains

### Pollen Tubes

Five milligrams of mature pollen grains of *N. tabacum* ( $8 \times 10^5$  cells, as counted with TC20; Bio-Rad) was used in each bombardment trial and suspended in 500 μL of pollen germination medium (Cheung et al., 2002). The pollen suspension was dispersed in 35-mm petri dishes with germination medium and solidified with 0.7% agarose. The slides were maintained in the dark in a humid chamber at 26°C to 28°C. After 8 to 12 h, the pollen tubes were observed.

Transient transformation of pollen grains was accomplished with microprojectile bombardment equipment from Bio-Rad (Biolistic PDS-1000/He) according to Chen et al. (2002) and with the manufacturer's recommended protocol. The pollen grain samples were bombarded twice to increase the yield of transformed pollen tubes. The pollen tubes were observed directly on glass slides. On average, 25 pollen tubes were counted for each sample, unless indicated otherwise. The average transformation efficiency was roughly 0.003%.

### Subcellular Localization

For subcellular localization in pollen tubes, the constructs were under the control of the pollen-specific promoter *Lat52* (Twell et al., 1989): 5 μg of *Lat52::NaSIPP-Tomato* and 3 μg of *Lat52::Mito-GFP* (Logan and Leaver, 2000) were mixed with 10 μL of spermidine (0.1 M), 25 μL of CaCl<sub>2</sub> (2.5 M), and 25 μL of tungsten particles (60 mg mL<sup>-1</sup>). The pollen grains were transformed and germinated as described above. A Nikon E800 confocal microscope was used to observe the fluorescence.

The construct *35S::NaSIPP-GFP* was used to transform *A. tumefaciens* strain GV3101 cells, which were used for *Arabidopsis* seedling transformation (described above). A solution of 20 nm MitoTracker Red FM (Invitrogen) was used as a mitochondrial marker.

## Complementation of the $\Delta mir1$ Yeast Mutant

### Strains, Media, and Plasmids

The yeast strains *BY4741 MAT $\alpha$ ; his3  $\Delta$ 1; leu2  $\Delta$ 0; met15  $\Delta$ 0; ura3  $\Delta$  (WT) and *BY4741 MAT $\alpha$ ; his3  $\Delta$ 1; leu2  $\Delta$ 0; met15  $\Delta$ 0; ura3  $\Delta$ 0; YJR077c: kanMX4 ( $\Delta mir1$ ) were used for the complementation test. The yeast strains were a gift from Salvador Uribe-Carvajal's laboratory.**

The cDNA of *Pic2* was amplified using the following primers: forward, 5'-CACCATGGAGTCCAATAAACAACC-3'; and reverse, 5'-ATAAGAAATGCGCCGCTAACCCGGTGGTTGGTAA-3'. The PCR product were cloned into pENTR-D-TOPO vector (Invitrogen). The constructs *Pic2::pENTR NaSIPP::pENTR* and *Mir1::pENTR* (described above) was used for LR recombination in *pYES-DEST52* vector (Invitrogen).

Yeast transformation with the *NaSIPP*, *Pic2*, *Mir1*, and empty vector (*pYES-DEST52*) constructs was performed in *Mir1* BY4741 cells, according to the manufacturer's instructions (Yeastmaker Yeast Transformation System 2; Clontech). The transformed yeasts were grown on selective medium (-Ura; Clontech).

### Growth Conditions

The strains *WT* and *Mir1* BY4741 were incubated in yeast peptone dextrose preculture medium for 24 h at 30°C under agitation at 200 rpm, subsequently cultured in YPGal (carbon source, Gal) medium for 24 h at 30°C under agitation at 200 rpm, and finally cultured in YPGly (carbon source, glycerol) medium for 5 d at 30°C under agitation at 200 rpm.

Transformed yeasts were incubated in SD-Ura (carbon source, Glc) preculture medium for 24 h at 30°C, subsequently cultured in SGal-Ura (carbon source, Gal) medium for 24 h at 30°C under agitation at 200 rpm, and then cultured in SGly-Ura (carbon source, glycerol) medium for 5 d at 30°C under agitation at 200 rpm. The evaluation of growth was realized every day according to the OD<sub>600</sub>.

For the evaluation of growth in solid medium, an aliquot of 100 μL of the YPGal and SGal-Ura cultures was taken and spotted on plates that contained glycerol medium (YPGly and SGly-Ura) and 2% agar (w/v).

## RNA Transcript Analysis

RNA was isolated with TRIzol (Invitrogen) from *N. alata* pistil, pollen, sepal, leaf, root, and petal materials as well as from anthers at different developmental stages (A1, 0.5–1 cm; A2, 1.1–2 cm; A3, 2.1–3.5 cm; A4, 3.5–6 cm; and A5, 6 cm, mature flower). Mature pollen RNA (stage A5) was isolated from the following species: *N. alata*, *N. forgetiana*, *N. rastroensis*, *N. glauca*, *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum*, and *N. benthamiana*. cDNA was made from all RNA samples using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions.

The cDNA of *NaSIPP* was amplified using the following specific primers: forward, 5'-GACACGGCTTCTTCTTACCATTCTC-3'; and reverse, 5'-TCTTCACTTGGCAGGGGCA-3'. The cDNA of *MPC-like* from *N. tabacum* XM\_016632920.1 (LOC107808402) was amplified using the following specific primers: forward, 5'-ATGGAGTATATTGATCCTGCAAAGTACA-3'; and reverse, 5'-TCGTGTATGGTATCTGTCGTCC-3'. The cDNA of *MPC-like* from *N. tabacum* XM\_016617131.1 (LOC107823043) was amplified using the following specific primers: forward, 5'-ATGGCGTTTCCAGATAGCTCGACT-3'; and reverse, 5'-GGTGTCCGAATGACATGTTTATAGAGTTG-3'. The cDNA of *MPC-like* from *N. tabacum* XM\_016600064.1 (LOC107779610) was amplified using the following specific primers: forward, 5'-ATGGAGAAGTACAGCCGTCA-3'; and reverse, 5'-TTGGTAATCCATCTGACAATCCCCT-3'.

## RNAi Construction, NaSIPP Suppression, and Pollination Phenotype

The *NTP303* promoter was amplified using the following primers: forward, 5'-CCGAGGTCCTGATACACTCGCAAC-3'; and reverse, 5'-CCGCTCGAGCATGACGTTGTTTT-3'. The PCR product contains the *XhoI* and *PpuMI* restriction sites and was inserted at the RNAi vector *pBADc*.

The construct *NaSIPP::pENTR* (described above) was used for LR recombination into the RNAi vector to generate sense and antisense *NaSIPP* (*RNAi-NaSIPP*).

Freshly collected *S*<sub>A2</sub> pollen grains of *SIN. alata* were transiently transformed with 5 μg of *RNAi-NaSIPP* construct by microprojectile bombardment, as described above. The pollen grains were used to pollinate *S*<sub>A2</sub>*S*<sub>A2</sub> pistils (incompatible cross) and *S*<sub>C10</sub>*S*<sub>C10</sub> pistils (compatible cross). Effects on pollination behavior were evaluated by staining style squashes with decolorized Aniline Blue (Kho and Baer, 1968). The pollen tubes were counted, and their growth along the style was evaluated at 72 h after pollination, using an AmScope FM320T microscope.

## Development of a Reliable Model for the Three-Dimensional Structure of NaSIPP

Taking advantage of the distant relationship to ATP/ADP translocators, *NaSIPP* models were obtained from SAMT-T08 (Karplus, 2009), I-TASSER (Zhang, 2008), and HHpred (Karplus et al., 1998)/modeller (Eswar et al., 2007) and scored for biological appropriateness using Rd.HMM (Martínez-Castilla and Rodríguez-Sotres, 2010). The most appropriate prediction (Rd.HMM) was placed in a mixed-lipid membrane (Martínez et al., 2009) and subjected to molecular dynamics simulations (NPT cubic box, TIP3P water, 0.15 M NaCl PME electrostatics, SHAKE for C-H bonds,  $\Delta t$  2 fs, AMBER 99SB-ildn force-field, 9), with the following temperature and time scheme: (1) 313 K, 100 ns; 328 K, 100 ns; (2) five rounds of 298 to 413 K heating; 413 K, 3 ns; 413 to 320 K cooling, 10 ns; 320 to 298 K cooling, 6 ns; (3) five rounds of 298 to 413 K heating, 3 ns; 398 K, 10 ns; 398 to 320 K cooling, 6 ns; 320 to 298 K cooling, 6 ns. Conformers were recovered by clustering the 320 to 298 K trajectory sections, and their energy was minimized. The conformer with the highest Rd.HMM had departed significantly from the starting template but was comparable in quality to NMR structural solutions (score of ~0.4 times the length of the *NaSIPP* amino acid sequence; Martínez-Castilla and Rodríguez-Sotres, 2010).

## BiFC Assay

### *Arabidopsis* Seedlings

The *NaSIPP::pENTR* and *NaStEP::pENTR* (described above) constructs were used for LR recombination in *pUBC-nYFP* and *pUBC-cYFP* vectors (Grefen et al., 2010), yielding the *NaStEP-nYFP* and *NaSIPP-cYFP* fusion proteins. The



BiFC analyses were performed by transient transformation of Arabidopsis seedlings (described above). A solution of 20 nM MitoTracker Red FM (Invitrogen) was used as a mitochondrial marker.

## N. tabacum Pollen Tubes

Seven micrograms of *Lat52::NaSIPP-CVenus* and *Lat52::NaStEP-NVenus* constructs were mixed with 10  $\mu\text{L}$  of spermidine (0.1 M), 25  $\mu\text{L}$  of  $\text{CaCl}_2$  (2.5 M), and 25  $\mu\text{L}$  of tungsten particles (60 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). The pollen grains were transformed and germinated as described above. A fluorescence microscope was used to observe the reestablishment of Venus fluorescence.

In addition, the pollen grains were cobombarded with NaStEP-NV and empty vector (CV), or with the NaSIPP-CV and empty vector (NV), as described above. A rapid screening was performed looking for fluorescence on all the glass slides where the pollen grains were deposited. Then, a screening was carried out with selected preparations, performing detailed observations of the pollen tubes. An average of 200 pollen tubes were analyzed.

For the coexpression assays of NaStEP-GFP and NaSIPP-Tomato in pollen tubes, 5  $\mu\text{g}$  of the *Lat52::NaSIPP-Tomato* construct and 7  $\mu\text{g}$  of the *Lat52::NaStEP-GFP* construct were used. The transient transformation of pollen grains was done as described above.

## Microscopic Observations

Confocal images were obtained on Olympus FV1000 and Nikon E800 microscopes. GFP fluorescence was excited with the 458- or 488-nm argon laser lines; YFP and Venus fluorescence was excited with the 514-nm laser line; Aniline Blue fluorescence was excited with the 390-nm laser line; MitoTracker Red FM (Invitrogen) and Tomato fluorescence was excited with the 581-nm laser line. Emitted light was collected through an NFT515 dichroic and 505- to 530-nm (GFP), 535- to 590-nm (YFP), 380- to 390-nm (Aniline Blue), and 600- to 650-nm (MitoTracker Red FM; Invitrogen) band-pass filters.

## Accession Number

Sequence data from this article can be found in the GenBank database under nucleotide sequence BankIt1982585 Seq KY471417.

## Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

**Supplemental Figure S1.** The *NaSIPP* transcript is detected specifically in mature pollen in *N. glauca*.

**Supplemental Figure S2.** Sequence alignment of *NaSIPP*, functional and putative MPCs.

**Supplemental Figure S3.** BiFC assay controls.

**Supplemental Figure S4.** Sequence alignment of different *Nicotiana* spp. *SIPP* sequences.

**Supplemental Table S1.** Evaluation of pollen tube length after RNAi-*NaSIPP* pollen transformation.

**Supplemental Table S2.** *NaSIPP* suppression disrupts S-specific pollen rejection.

**Supplemental Movie S1.** *Lat52::NaSIPP-Tomato* localization.

**Supplemental Movie S2.** Coexpression of *Lat52::NaSIPP-Tomato* and *Lat52::Mit-Green*.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yanjiao Zou for assistance in microprojectile bombardment, Jorge Herrera Díaz for assistance in yeast complementation assays, Javier Andres Juárez-Díaz for assistance in BiFC assays, Karina Jiménez-Durán for confocal microscopy support, Yuridia Cruz-González Zamora for technical assistance, María Teresa Olivera-Flores for greenhouse support, and Janai M. García-Valencia for assistance with imaging. We thank the anonymous reviewers for the thoughtful comments scientifically and for improving the presentation of our data. We also thank the RCN on Integrative Pollen Biology for facilitating

collaboration. We thank the UNAM-DGTIC staff for help in the compilation and maintenance of the required software.

Received December 12, 2016; accepted August 30, 2017; published September 5, 2017.

## LITERATURE CITED

- Al-Nasser I, Crompton M (1986) The entrapment of the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator arsenazo III in the matrix space of rat liver mitochondria by permeabilization and resealing:  $\text{Na}^+$ -dependent and -independent effluxes of  $\text{Ca}^{2+}$  in arsenazo III-loaded mitochondria. *Biochem J* **239**: 31–40
- Anderson MA, Cornish EC, Mav SL, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Boning I, Greg B, Simpson RJ, Roche PJ, et al (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* **321**: 38–44
- Arpagaus S, Rawlyer A, Braendle R (2002) Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants. *J Biol Chem* **277**: 1780–1787
- Ashkani J, Rees DJ (2016) A comprehensive study of molecular evolution at the self-incompatibility locus of Rosaceae. *J Mol Evol* **82**: 128–145
- Balk J, Leaver CJ, McCabe PF (1999) Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett* **463**: 151–154
- Báthori G, Parolini I, Tombola F, Szabó I, Messina A, Oliva M, De Pinto V, Lisanti M, Sargiacomo M, Zoratti M (1999) Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J Biol Chem* **274**: 29607–29612
- Bedhomme M, Hoffmann M, McCarthy EA, Gannon B, Moran RG, Rébeillé F, Ravanel S (2005) Folate metabolism in plants: an Arabidopsis homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts. *J Biol Chem* **280**: 34823–34831
- Beecher B, McClure BA (2001) Expressing self-incompatibility RNases (S-RNases) in transgenic plants. *Methods Mol Biol* **160**: 65–85
- Beers EP (1997) Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ* **4**: 649–661
- Bhosale G, Sharpe JA, Sundier SY, Duchon MR (2015) Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death. *Ann N Y Acad Sci* **1350**: 107–116
- Briggs C, Mincone L, Wohlrab H (1999) Replacements of basic and hydroxyl amino acids identify structurally and functionally sensitive regions of the mitochondrial phosphate transport protein. *Biochemistry* **38**: 5096–5102
- Busot GY, McClure B, Ibarra-Sánchez CP, Jiménez-Durán K, Vázquez-Santana S, Cruz-García F (2008) Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *J Exp Bot* **59**: 3187–3201
- Campanoni P, Sutter JU, Davis CS, Littlejohn GR, Blatt MR (2007) A generalized method for transfecting root epidermis uncovers endosomal dynamics in Arabidopsis root hairs. *Plant J* **51**: 322–330
- Chen CY, Wong EL, Vidali L, Estavillo A, Hepler PK, Wu HM, Cheung AY (2002) The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *Plant Cell* **14**: 2175–2190
- Cheung AY, Chen CY, Glaven RH, de Graaf BH, Vidali L, Hepler PK, Wu HM (2002) Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth. *Plant Cell* **14**: 945–962
- Cheung AY, Wu HM (2008) Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 547–572
- Covey PA, Kondo K, Welch L, Frank E, Sianta S, Kumar A, Nuñez R, Lopez-Casado G, van der Knaap E, Rose JK, et al (2010) Multiple features that distinguish unilateral incongruity and self-incompatibility in the tomato clade. *Plant J* **64**: 367–378
- Crompton M, Costi A (1988) Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by  $\text{Ca}^{2+}$ , inorganic phosphate and oxidative stress: a potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload. *Eur J Biochem* **178**: 489–501
- Crompton M, Costi A, Hayat L (1987) Evidence for the presence of a reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* **245**: 915–918
- Cruz-García F, Hancock CN, Kim D, McClure B (2005) Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *Plant J* **42**: 295–304

- de Nettancourt D (2001) Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. Springer-Verlag, New York
- Doran E, Halestrap AP (2000) Cytochrome c release from isolated rat liver mitochondria can occur independently of outer-membrane rupture: possible role of contact sites. *Biochem J* **348**: 343–350
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Che FS, Isogai A, Takayama S (2003) Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells* **8**: 203–213
- Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, Pieper U, Sali A (2007) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 2**: Unit 2.9
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–246
- Fukao Y, Hayashi Y, Mano S, Hayashi M, Nishimura M (2001) Developmental analysis of a putative ATP/ADP carrier protein localized on glyoxysomal membranes during the peroxisome transition in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol* **42**: 835–841
- García-Fernández R, Peigneur S, Pons T, Alvarez C, González L, Chávez MA, Tytgat J (2016) The Kunitz-type protein ShPI-1 inhibits serine proteases and voltage-gated potassium channels. *Toxins (Basel)* **8**: 110
- Goldraj A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-García F, McClure B (2006) Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* **439**: 805–810
- Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K, Blatt MR (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J* **64**: 355–365
- Gutiérrez-Aguilar M, Pérez-Martínez X, Chávez E, Uribe-Carvajal S (2010) In *Saccharomyces cerevisiae*, the phosphate carrier is a component of the mitochondrial unselective channel. *Arch Biochem Biophys* **494**: 184–191
- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion: a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**: 372–385
- Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* **1366**: 79–94
- Hamel P, Saint-Georges Y, de Pinto B, Lachacinski N, Altamura N, Dujardin G (2004) Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Microbiol* **51**: 307–317
- Hancock CN, Kent L, McClure BA (2005) The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J* **43**: 716–723
- Harvey AL (2001) Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon* **39**: 15–26
- Haworth RA, Hunter DR (1979) The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Arch Biochem Biophys* **195**: 460–467
- Hua Z, Kao TH (2008) Identification of major lysine residues of S(3)-RNase of *Petunia inflata* involved in ubiquitin-26S proteasome-mediated degradation in vitro. *Plant J* **54**: 1094–1104
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**: 33–38, 27–28
- Hunter DR, Haworth RA (1979) The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* **195**: 453–459
- Jiménez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, Cruz-García F (2013) NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. *Plant Physiol* **161**: 97–107
- Karplus K (2009) SAM-T08, HMM-based protein structure prediction. *Nucleic Acids Res* **37**: W492–W497
- Karplus K, Barrett C, Hughey R (1998) Hidden Markov models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics* **14**: 846–856
- Kho YO, Baer J (1968) Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* **17**: 298–302
- Kondo K, McClure B (2008) New microsome-associated HT-family proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family. *Mol Plant* **1**: 634–644
- Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, Kowayama Y (2002) Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant J* **29**: 627–636
- Kubo K, Entani T, Takara A, Wang N, Fields AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Isogai A, et al (2010) Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science* **330**: 796–799
- Kushnareva YE, Haley LM, Sokolove PM (1999) The role of low (< or = 1 mM) phosphate concentrations in regulation of mitochondrial permeability: modulation of matrix free C<sup>32+</sup> concentration. *Arch Biochem Biophys* **363**: 155–162
- Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y (2002) An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol* **50**: 29–42
- Lam E, del Pozo O (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* **44**: 417–428
- Lancelin JM, Foray MF, Poncin M, Hollecker M, Marion D (1994) Proteinase inhibitor homologues as potassium channel blockers. *Nat Struct Biol* **1**: 246–250
- Lee CB, Kim S, McClure B (2009) A pollen protein, NaPCCP, that binds pistil arabinogalactan proteins also binds phosphatidylinositol 3-phosphate and associates with the pollen tube endomembrane system. *Plant Physiol* **149**: 791–802
- Lee CB, Swatek KN, McClure B (2008) Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana glauca* pistil arabinogalactan proteins. *J Biol Chem* **283**: 26965–26973
- Leroch M, Kirchberger S, Haferkamp I, Wahl M, Neuhaus HE, Tjaden J (2005) Identification and characterization of a novel plastidic adenine nucleotide uniporter from *Solanum tuberosum*. *J Biol Chem* **280**: 17992–18000
- Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP (2008) The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* **283**: 26312–26323
- Lind JL, Böning I, Clarke AE, Anderson MA (1996) A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo. *Sex Plant Reprod* **9**: 75–86
- Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M (1994) Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* **4**: 231–235
- Logan DC, Leaver CJ (2000) Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J Exp Bot* **51**: 865–871
- Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M (2000) S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* **407**: 649–651
- Martínez L, Andrade R, Birgin EG, Martínez JM (2009) PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* **30**: 2157–2164
- Martínez-Castilla LP, Rodríguez-Sotres R (2010) A score of the ability of a three-dimensional protein model to retrieve its own sequence as a quantitative measure of its quality and appropriateness. *PLoS ONE* **5**: e12483
- McClure B, Cruz-García F, Romero C (2011) Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann Bot (Lond)* **108**: 647–658
- McClure B, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13548–13553
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955–957
- Meng D, Gu Z, Li W, Wang A, Yuan H, Yang Q, Li T (2014) Apple MdABCF assists in the transportation of S-RNase into pollen tubes. *Plant J* **78**: 990–1002
- Murakami H, Blobel G, Pain D (1990) Isolation and characterization of the gene for a yeast mitochondrial import receptor. *Nature* **347**: 488–491
- Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA (1994) S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**: 563–566
- Murfett J, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure BA (1996) S-RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *Plant Cell* **8**: 943–958
- O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowayama Y, Matton DP (2002) Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J* **32**: 985–996

- Palmieri F** (1994) Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett* **346**: 48–54
- Palmieri F** (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* **447**: 689–709
- Palmieri F, Pierri CL, De Grassi A, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J* **66**: 161–181
- Palmieri L, Rottensteiner H, Girzalsky W, Scarcia P, Palmieri F, Erdmann R** (2001) Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J* **20**: 5049–5059
- Peigneur S, Billen B, Derua R, Waelkens E, Debaveye S, Béress L, Tytgat J** (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem Pharmacol* **82**: 81–90
- Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P** (1994) Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* **1187**: 255–259
- Phelps A, Briggs C, Haefele A, Mincone L, Ligeti E, Wohlrab H** (2001) Mitochondrial phosphate transport protein: reversions of inhibitory conservative mutations identify four helices and a nonhelix protein segment with transmembrane interactions and Asp39, Glu137, and Ser158 as nonessential for transport. *Biochemistry* **40**: 2080–2086
- Puerta AR, Ushijima K, Koba T, Sassa H** (2009) Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *J Exp Bot* **60**: 1309–1318
- Qiao H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y, Xue Y** (2004) The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* **16**: 582–595
- Roldán JA, Rojas HJ, Goldraij A** (2012) Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the in vivo self-incompatibility response in *Nicotiana glauca*. *Ann Bot (Lond)* **110**: 787–795
- Sassa H, Hirano H** (2006) Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Mol Genet Genomics* **275**: 97–104
- Schultz CJ, Hauser K, Lind JL, Atkinson AH, Pu ZY, Anderson MA, Clarke AE** (1997) Molecular characterisation of a cDNA sequence encoding the backbone of a style-specific 120 kDa glycoprotein which has features of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant Mol Biol* **35**: 833–845
- Serrano I, Pelliccione S, Olmedilla A** (2010) Programmed-cell-death hallmarks in incompatible pollen and papillar stigma cells of *Olea europaea* L. under free pollination. *Plant Cell Rep* **29**: 561–572
- Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao TH** (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* **429**: 302–305
- Stein JC, Hansen G** (1999) Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol* **121**: 71–80
- Sun YL, Zhao Y, Hong X, Zhai ZH** (1999) Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett* **462**: 317–321
- Thomas SG, Franklin-Tong VE** (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature* **429**: 305–309
- Twell D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick S** (1989) Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol Gen Genet* **217**: 240–245
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H** (2003) Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* **15**: 771–781
- Varanyuwatana P, Halestrap AP** (2012) The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion* **12**: 120–125
- Vierstra RD** (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* **8**: 135–142
- Wandrey M, Trevaskis B, Brewin N, Udvardi MK** (2004) Molecular and cell biology of a family of voltage-dependent anion channel porins in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **134**: 182–193
- Wang CL, Xu GH, Jiang XT, Chen G, Wu J, Wu HQ, Zhang SL** (2009) S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia* in vitro. *Plant J* **57**: 220–229
- Wang CL, Zhang SL** (2011) A cascade signal pathway occurs in self-incompatibility of *Pyrus pyrifolia*. *Plant Signal Behav* **6**: 420–421
- Wang Y, Tsukamoto T, Yi KW, Wang X, Huang S, McCubbin AG, Kao TH** (2004) Chromosome walking in the *Petunia inflata* self-incompatibility (S-) locus and gene identification in an 881-kb contig containing S2-RNase. *Plant Mol Biol* **54**: 727–742
- Wheeler D, Newbigin E** (2007) Expression of 10 S-class SLF-like genes in *Nicotiana glauca* pollen and its implications for understanding the pollen factor of the S locus. *Genetics* **177**: 2171–2180
- Williams JS, Wu L, Li S, Sun P, Kao TH** (2015) Insight into S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*: recent findings and future directions. *Front Plant Sci* **6**: 41
- Wohlrab H, Annese V, Haefele A** (2002) Single replacement constructs of all hydroxyl, basic, and acidic amino acids identify new function and structure-sensitive regions of the mitochondrial phosphate transport protein. *Biochemistry* **41**: 3254–3261
- Xu G, Ma H, Nei M, Kong H** (2009) Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 835–840
- Zhang Y** (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**: 40
- Zhang Y, Xue Y** (2008) Molecular biology of S-RNase-based self-incompatibility. In VE Franklin-Tong, ed, *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, pp 193–215

## EVITANDO EL INCESTO EN LAS PLANTAS: CONTROL GENÉTICO Y BIOQUÍMICO

Liliana E. García-Valencia, Carlos E. Bravo-Alberto  
y Felipe Cruz-García\*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. C.P. 04510, Deleg. Coyoacán, México, D.F. E-mail: \* fcg@unam.mx

### RESUMEN

Para evitar la endogamia muchas plantas con flores hermafroditas evolucionaron con un mecanismo para reconocer y rechazar su propio polen y que se conoce como sistema de autoincompatibilidad (AI). En muchos casos la AI está controlada genéticamente por un solo locus altamente polimórfico, conocido como locus *S*. Esta región del DNA incluye dos unidades transcripcionales fuertemente ligadas. Una de ellas codifica la determinante femenina (expresada en el pistilo) y la otra a la determinante masculina (expresada en el polen). En esta revisión se discuten los principales avances en el mecanismo de AI gametofítica dependiente de S-RNasas, el cual está presente en Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae. En estas familias, la determinante femenina codifica una ribonucleasa (S-RNasa) y la determinante masculina una proteína con caja F (SLF/SFB). Además, se describe la participación de genes modificadores no codificados en el locus *S* y que son esenciales en la AI, así como la posible función de sus productos en el mecanismo de rechazo del polen. Finalmente, proponemos un modelo que incluye los principales sucesos descritos a la fecha.

**Palabras Clave:** Genes modificadores, *Nicotiana*, rechazo del polen, sistemas de autoincompatibilidad, SLF, S-RNasa.

### ABSTRACT

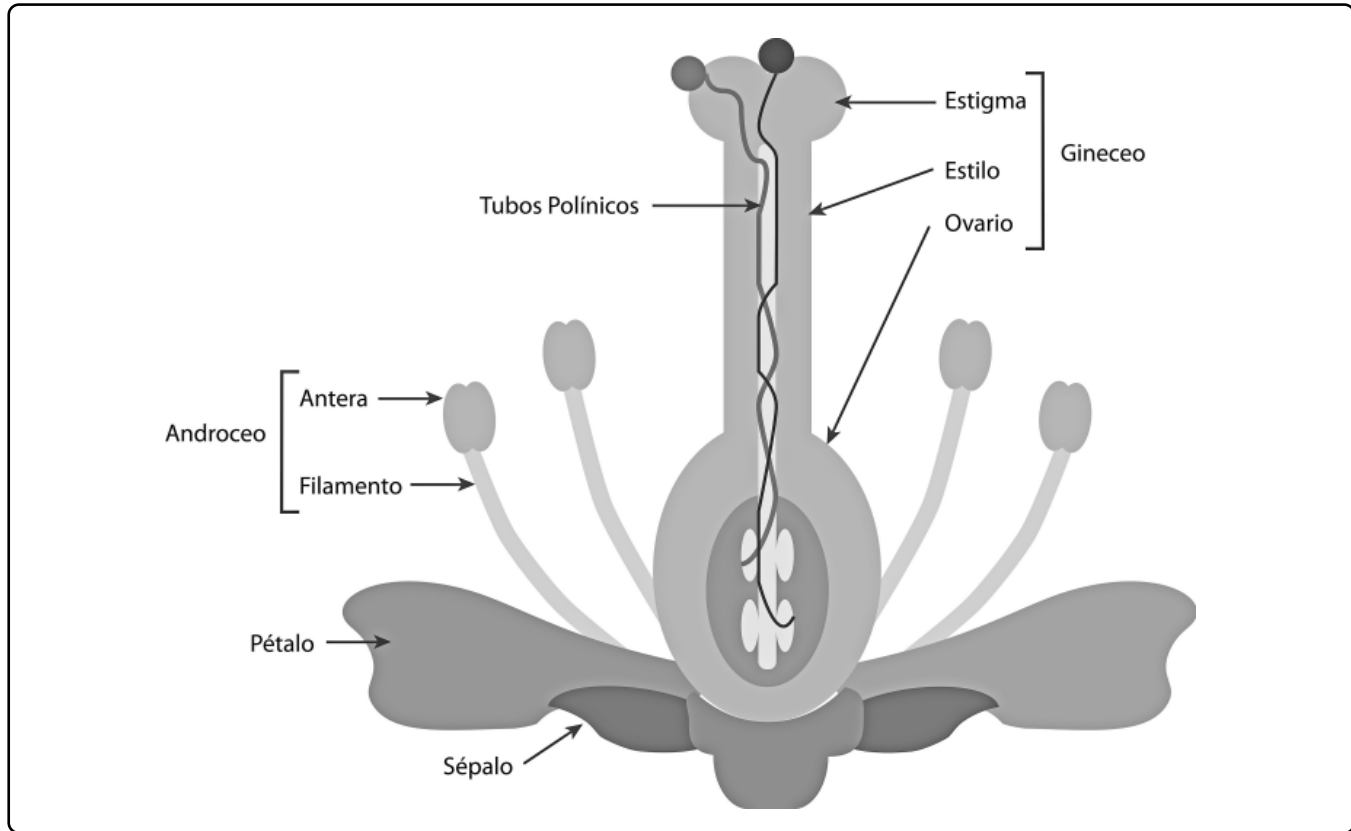
To avoid endogamy many flowering plants evolved a mechanism to recognize and reject their self-pollen, which is known as self-incompatibility (SI) system. In many cases the SI is genetically controlled by a single and highly polymorphic locus known as the *S*-locus. This DNA region carries two tightly linked transcriptional units. One of them encodes the female determinant (pistil expressed) and the second one the male determinant (pollen expressed). In this review, we discuss the most relevant advances in the SI mechanism in S-RNase based systems, which are present in Solanaceae, Rosaceae and Plantaginaceae. In these families, the female determinant encodes a ribonuclease named S-RNase and the male determinant encodes a protein called SLF/SFB (*S*-locus F-Box). We finally describe the role of the modifier genes, not coded by *S*-locus, in the pollen rejection response and propose a model including the main events so far described.

**Key Words:** Modifiers genes, *Nicotiana*, pollen rejection, self-incompatibility systems, SLF, S-RNase.

### INTRODUCCIÓN

**E**l desarrollo de la reproducción sexual fue un gran salto en la evolución y representó que las mutaciones al azar no fueran la única fuente de variabilidad genética. Sin embargo, este tipo de reproducción trajo consigo las siguientes paradojas: Cómo evitar la reproducción con individuos genéticamente relacionados para no acumular los

efectos deletéreos de la endogamia y, por otro lado, cómo evitar la reproducción inter-especie para no generar individuos estériles. En el caso de los animales, lo han resuelto por su capacidad de seleccionar parejas a través del olfato, la visión, el tacto, etc. y de conductas que estimulan el apareamiento con parejas genéticamente diferentes<sup>1</sup>. En las plantas se carece de estas posibilidades y estrategias de selección de parejas lo que junto con la condición de hermafroditismo (flores que contienen las estructuras reproductivas femeninas (pistilo) y masculinas (estambres) (Figura 1) aumenta la probabilidad de la



**Figura 1.** La flor con sus diferentes órganos. Las flechas indican los pétalos, sépalos, pistilo o gineceo (compuesto por estigma, estilo y ovario) y los estambres o androceo (compuestos por anteras y filamentos). En esta imagen también se observa el crecimiento de tubos polínicos a través del estilo para fecundar los óvulos que se encuentran en el ovario.

autopolinización y la autofecundación y, por lo tanto, de endogamia<sup>2</sup>.

Charles Darwin, realizó estudios para explicar por qué la reproducción cruzada prevalece en la naturaleza. Los experimentos que Darwin realizó en 57 especies de plantas que se autopolinizan y en aquellas que no, confirman la hipótesis de que la autopolinización es perjudicial para la progenie producida, debido a que se presenta una disminución del vigor y de la fertilidad en la mayoría de las especies estudiadas<sup>3</sup>.

Para promover la polinización cruzada varias especies de plantas desarrollaron adaptaciones morfológicas, como la separación espacial de los pistilos y estambres (hercogamia) y adaptaciones fisiológicas como la maduración diferencial de los órganos reproductivos (dicogamia). Sin embargo, estas barreras no son del todo eficientes, porque la restricción del flujo de polen entre individuos relacionados genéticamente es limitada. Para sobreponerse a este problema, algunas especies desarrollaron un mecanismo genético de reconocimiento del polen propio, conocido como autoincompatibilidad (AI), definida como la incapacidad de una

planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización<sup>2</sup>.

La AI está controlada por el locus *S* que es multialélico y que determina la especificidad del reconocimiento del polen. En el locus *S* se encuentran al menos dos genes estrechamente ligados, uno de ellos es expresado en el polen (determinante masculina) y otro es expresado en el pistilo (determinante femenina). Los productos de estos genes interaccionan para determinar si el polen es compatible o incompatible<sup>2</sup>.

El locus *S* se ha ubicado cerca del centrómero y la muy cercana proximidad de las dos determinantes evita la recombinación entre ambos genes, lo que da como resultado su herencia como una unidad mendeliana, conocida como haplotipo *S*<sup>4</sup>. El número de alelos *S* presentes en una población puede ser muy grande y variar de especie a especie<sup>5</sup>.

La AI puede ser clasificada en dos tipos: gametofítica y esporofítica. La mayor parte de las familias de interés comercial tienen un sistema de AI gametofítico (Solanaceae, Plantaginaceae, Rosaceae y Papaveraceae). Este tipo de control

genético es llamado así porque el fenotipo *S* del polen está determinado por su genotipo haploide. El polen es rechazado cuando el haplotipo *S* del polen coincide con alguno de los dos haplotipos *S* del pistilo en un heterocigoto, en caso contrario el polen es aceptado (Figura 2A)<sup>6</sup>.

En el sistema de AI esporofítico (mayormente estudiado en Brassicaceae) el fenotipo *S* del polen está determinado por el genotipo diploide (esporofito) de la antera donde se desarrolló (Figura 2B)<sup>7</sup>.

Estudios recientes han generado importantes hallazgos a nuestro entendimiento del mecanismo molecular de la AI en algunas especies<sup>8-11</sup>. Esta revisión explorará los hechos más relevantes del sistema de AI gametofítico dependiente de las S-RNasas, en las familias Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae.

### ¿Quiénes son los responsables de la AI dependiente de S-RNasas?

#### Determinante femenina (S-RNasa)

En 1981 Bredimeijer y Blaas identificaron glicoproteínas específicas del pistilo que cosegregaban con un haplotipo *S* en

*Nicotiana alata*<sup>12</sup>. Estas proteínas mostraron actividad de ribonucleasa, por lo que fueron nombradas S-RNasas<sup>13</sup>.

Experimentos de pérdida y ganancia de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* y *Petunia* demostraron que las S-RNasas determinan la respuesta de AI en el pistilo<sup>14-16</sup>. Por ejemplo, la transformación de los híbridos de *N. langsdorffii* x *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  que expresan los transgenes que codifican a la  $S_2$ -RNasa o a la  $S_{C10}$ -RNasa, rechazan el polen  $S_{A2}$  o  $S_{C10}$ , un fenotipo que las plantas sin transformar no presentan<sup>16,17</sup>.

Las S-RNasas son proteínas altamente divergentes, tienen un rango de similitud de secuencia de 38-98%. A pesar de esta amplia diversidad en su secuencia, estas ribonucleasas contienen cinco regiones conservadas (C1-C5) y dos dominios hipervariables (HVa y HVb). Las regiones C2 y C3 comparten un alto grado de similitud con las correspondientes regiones de la RNasa T2 y de otras RNasas. En estas regiones se encuentran dos histidinas conservadas (His32 e His90)<sup>18</sup>. Para demostrar que estas His participan en la catálisis, fueron reemplazadas por mutagénesis dirigida, lo que provocó que las plantas transgénicas con esta S-RNasa mutada fueran incapaces de rechazar su

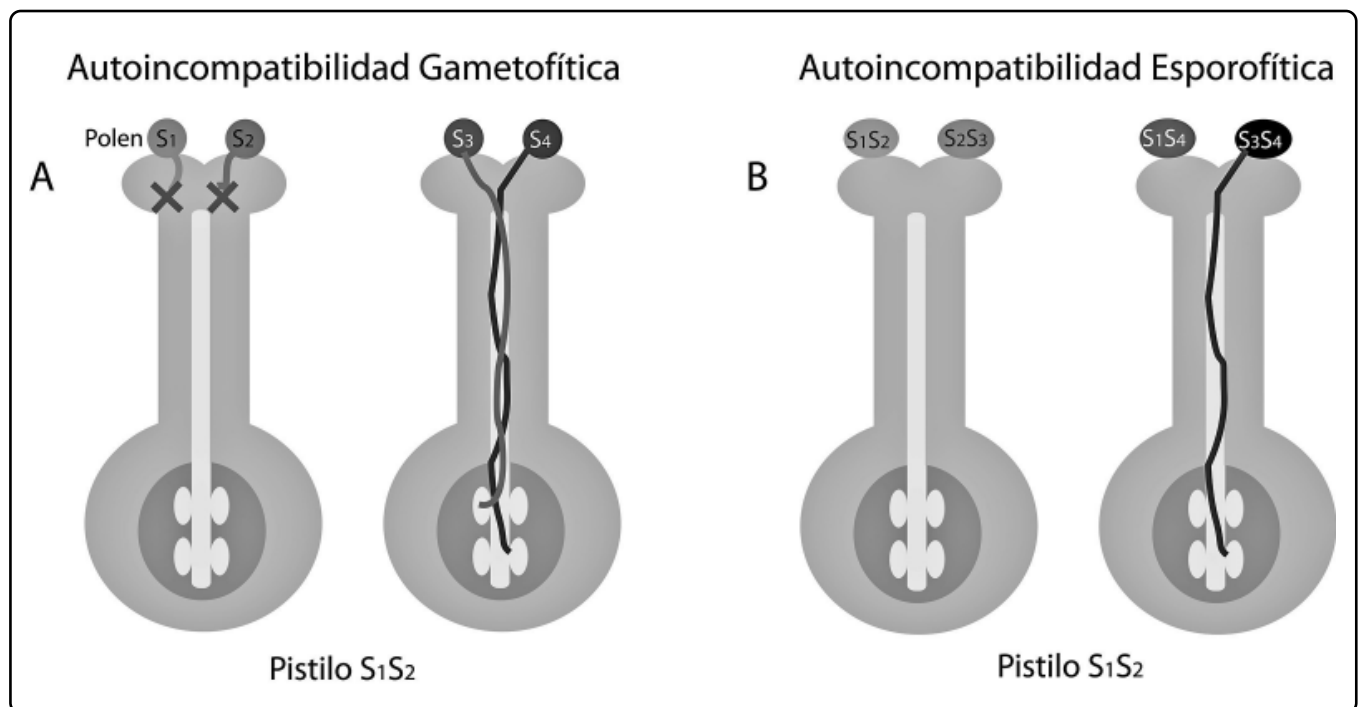


Figura 2. A) Rechazo del polen en sistemas de AI gametofítica (AIG). La AIG es determinada por el haplotipo *S* del genoma haploide del polen, el polen que tenga los haplotipos  $S_1$  o  $S_2$  serán rechazados (izquierda), mientras que el polen  $S_3$  podrá ser germinado y aceptado para fertilizar la planta  $S_1S_2$  (derecha). El polen incompatible usualmente germina pero su crecimiento es inhibido en el estilo. 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 en la superficie del estigma, si algunas de las dos proteínas *S* en la cubierta 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 (derecha), el polen podrá germinar y ser aceptado para fecundar al óvulo.

propio polen, debido a la incapacidad de la S-RNasa para degradar el RNA del tubo polínico (TP). Ésta fue una evidencia sólida de que la actividad de la ribonucleasa era necesaria en la respuesta de AI<sup>14</sup>.

Hasta el momento, se conoce que las S-RNasas entran al TP tanto en cruza compatibles como incompatibles y son almacenadas en una de sus vacuolas. En cruza 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 cruza compatible la vacuola con las S-RNasas se mantiene estable<sup>19</sup> permitiéndole al TP alcanzar el ovario.

### Determinante masculina (SLF/SFB)

Estudios moleculares recientes revelaron que la determinante masculina del locus *S* en sistemas de AI basados en S-RNasa es SLF (*S*-Locus F box) en Solanaceae y Plantaginaceae y SFB en Rosaceae<sup>20</sup>. Experimentos de ganancia de función en Plantaginaceae y Solanaceae demostraron que el gen *SLF* determina la respuesta de AI en el polen<sup>21,22</sup>.

*SLF* es un gen de aproximadamente 1,4 kb que es expresado únicamente en la antera y en los granos de polen, y su expresión es haplotipo *S* específica. *SLF* codifica una proteína que contiene un dominio con una caja F en su extremo amino terminal<sup>22</sup>, al igual que dos dominios variables (Va y Vb) y dos dominios hipervariables (HVa y HVb) hacia el extremo carboxilo terminal<sup>23,24</sup>.

La mayoría de las proteínas con caja F, están involucradas en la degradación de proteínas mediada por ubiquitilación y el proteosoma 26S. Las proteínas con caja F usualmente funcionan como un adaptador que une a proteínas sustrato específico al complejo SCF-E3, es por ello que se asume que SLF podría participar en un complejo SCF (SKP1/Culina/Caja F)<sup>25,26</sup>.

Mediante ensayos de doble híbrido en levadura, se encontró que SLF de *Arthrinium hispanicum* interacciona con una proteína homóloga de SKP1, denominado SSK1 (SLF-interacting SKP1 like-1)<sup>27</sup>.

Con base en ensayos *in vitro* y de doble híbrido en levaduras, se determinó que las interacciones físicas entre la S-RNasa y SLF con un haplotipo *S* diferente eran más fuertes que las interacciones entre la S-RNasa y SLF con un haplotipo *S* idéntico<sup>28</sup>. Estos datos permiten suponer que en una cruza compatible SLF podría interaccionar con alta afinidad con las S-RNasas no específicas y mediar su degradación mediante ubiquitilación y el proteosoma 26S, mientras que en una cruza incompatible la interacción *S* específica entre SLF y la S-RNasa sería más débil y, por lo tanto, no ocurriría la ubiquitilación<sup>28</sup>. Aunque también existe la posibilidad de que tanto las S-RNasas *S* específicas como las no *S* específicas podrían ser ubiquitiladas, pero con diferentes

grados (mono y poliubiquitilación) y de esta manera ser transportadas a diferentes destinos<sup>25</sup>.

Mediante estudios de inmunocitoquímica se detectó la localización de SLF en el citoplasma del TP y en la periferia del retículo endoplásmico<sup>29</sup>. Diferentes experimentos han demostrado que la cara citosólica de las membranas del retículo endoplásmico es el mayor sitio de degradación proteosomal, lo cual concuerda con el modelo propuesto de ubiquitilación de las S-RNasas<sup>30</sup>.

La limitada diversidad alélica de SLF (aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos) comparada con la de las S-RNasas es incongruente, ya que la cercanía de estos genes en el locus *S* y su inexistente recombinación, hace suponer que ambos genes deberían tener tasas de mutación similares, para que SLF pudiera reconocer un gran repertorio de S-RNasas altamente divergente en el TP. Sin embargo, en especies AI de Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae se ha observado que en el loci *S*, existe una sola copia del gen de la S-RNasa y múltiples genes tipo *SLF*. Trabajos realizados en *Petunia inflata* demuestran que hay varios genes tipo *SLF* ligados al locus *S* y cada una de estas variantes, podría interactuar con un subconjunto específico de S-RNasas con diferente haplotipo *S*, compensando así la poca diversidad genética de la determinante masculina con respecto a la de las S-RNasas<sup>31</sup>. De esta manera, las isoformas de SLF actuarían de una manera colaborativa para contender contra diferentes S-RNasas.

### ¿Más genes involucrados?

La interacción *S* específica entre la S-RNasa y SLF determina, por definición, el rechazo o la aceptación del polen. Sin embargo, se han encontrado otros genes no ligados al locus *S* y que son esenciales en el mecanismo de la AI, los cuales son conocidos como genes modificadores (GM). Los GM se clasifican en tres grupos<sup>32,33</sup>:

El grupo I que está integrado por genes cuyos productos afectan directamente la expresión de las determinantes de especificidad (*S-RNasa* y *SLF*).

El grupo II está compuesto por factores que interaccionan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad sin afectar su expresión. Por lo tanto, son factores que se requieren específicamente para el rechazo del polen. Un ejemplo de GM pertenecientes a este grupo son *HT-B* (*High Top-Band*), *120K* y *NaStEP* (*N. alata Stigma Expressed Protein*)<sup>34-36</sup>.

El grupo III incluye genes que participan tanto en la respuesta de AI como en procesos generales durante la polinización y en la interacción polen-pistilo. En este grupo podrían clasificarse a las proteínas TTS, PELPIII, NaTrxh, SBP1 y NaPEPII<sup>37-40,28</sup> (Bravo-Alberto y Cruz-García, no publicado).

De los tres grupos de GM descritos a la fecha sólo se ha evaluado la participación en la incompatibilidad de *HT-B*, *120K* y *NaStEP* mediante experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas, de los cuales se hace la siguiente descripción:

### HT-B

Fue identificado por su expresión preferencial en estilos de *N. alata* (especie AI) pero no en aquéllos de *N. plumbaginifolia* (especie autocompatible)<sup>34</sup>.

HT-B es una proteína de 8.6 kDa, con un dominio constituido de 20 residuos de asparagina y ácido aspártico hacia el extremo carboxilo<sup>41</sup>. HT-B únicamente es expresada en pistilos maduros de plantas AI y se ha descrito en tres géneros de la familia Solanaceae: *Solanum*, *Nicotiana* y *Petunia*<sup>34,39,42,43</sup>.

Experimentos de inmunolocalización en *Nicotiana* muestran que *HT-B* ingresa tanto a los TPs compatibles como incompatibles, pero que en las cruza compatibles esta proteína es degradada en el interior del TP<sup>19</sup>.

Experimentos para suprimir la expresión de *HT-B* mostraron que las plantas transgénicas de *Solanum*, *Nicotiana* y *Petunia*<sup>34,39,42-44</sup> fueron incapaces de rechazar su propio polen.

Asimismo, Kondo *et al.* (2002), determinaron que aunque el gen *HT-B* también está presente en especies autocompatibles, su secuencia contiene codones de paro prematuros, por lo que no es posible generar una proteína funcional.

### 120K

120K es una arabinogalactoproteína de 120 kDa, es por ello que se conoce así, se localiza en el pistilo de especies autocompatibles e incompatibles de *Nicotiana*<sup>35</sup>.

La función de 120K fue probada mediante su supresión por RNAi (RNA interferente). El fenotipo observado en las plantas transgénicas fue la incapacidad de rechazar el polen con el mismo haplotipo *S* que el pistilo receptor, poniendo de manifiesto la participación de 120K en la AI<sup>35</sup>.

Mediante estudios de inmunolocalización se determinó que 120K, al igual que la S-RNasa, se incorpora desde la matriz extracelular del estilo a las vacuolas de los TPs en crecimiento, tanto en cruza compatibles como incompatibles<sup>19</sup>.

### NaStEP

NaStEP se expresa única y abundantemente en estigmas maduros de diferentes especies incompatibles de *Nicotiana*<sup>45</sup>. NaStEP es una proteína que pertenece a los inhibidores de proteasa tipo Kunitz, los cuales forman parte de la familia de inhibidores de tripsina<sup>46</sup>. En congruencia con esto, recientemente se encontró que NaStEP en efecto es un inhibidor de proteasas, ya que es capaz de inhibir la actividad de la proteasa subtilisina<sup>36</sup>; sin

embargo, se desconoce con certeza si es la actividad de inhibidor de proteasas la que participa en el mecanismo del rechazo del polen.

La proteína NaStEP es almacenada en las vacuolas de las células del estigma, de donde es liberada cuando los estigmas son polinizados<sup>45</sup>. Una vez que NaStEP se encuentra en el exudado estigmático, esta proteína entra a los TPs no importando su haplotipo *S*<sup>36</sup>.

Experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* demostraron que cuando *NaStEP* se encuentra silenciado por un RNAi, se pierde la capacidad de reconocer y rechazar el polen con el mismo haplotipo *S* que el pistilo, lo que indica claramente que *NaStEP* es un gen estigmático esencial en el rechazo del polen en *Nicotiana*<sup>36</sup>.

Un fenómeno interesante que sucede en un entorno genético con *NaStEP* silenciado, es que la proteína HT-B se degrada en los TPs incompatibles y compatibles<sup>36</sup>, un hecho contrario a lo que ocurre en plantas silvestres AI de *N. alata*, donde HT-B sólo es degradada en los TPs de cruza compatibles<sup>19</sup>. Este dato es relevante, ya que permite proponer a NaStEP como un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en la respuesta de AI en *Nicotiana*.

### Interacciones entre proteínas involucradas en el mecanismo de AI

El mecanismo de la AI puede ser considerado un rompecabezas, en el cual aún faltan muchas piezas por descubrir, es por ello que se han buscado las proteínas que pueden interactuar con los actores hasta ahora conocidos como las determinantes (S-RNasa y SLF) y los genes modificadores estilares (HT-B, NaStEP y 120K). A pesar de que se han encontrado diversas interacciones físicas entre las proteínas involucradas en el mecanismo de AI, se desconoce el papel que estos complejos moleculares puedan jugar en el mecanismo de rechazo o aceptación del polen. En la Tabla I se muestran los complejos proteicos que se han descrito a la fecha mediante pull-down, por ensayos de doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae* o por co-inmunoprecipitación. La formación de tres de estos complejos ocurre entre proteínas estilares (por ejemplo: NaStEP-HT-B y S-RNasa-120K-PELP III), entre proteínas del polen (por ejemplo: SLF-SSK1; SLF-SBP1), entre proteínas del estilo y del polen (por ejemplo: S-RNasa-SLF, S-RNasa-SBP1, 120K-NaPCCP). Aunque la funcionalidad de estos complejos no se ha demostrado *in planta* mediante experimentos de pérdida o ganancia de función, garantizan estudios futuros para determinar su función en la respuesta del rechazo del polen y el orden en que éstos actúan.

Como se puede deducir de la Tabla I, se conocen ya varios de los componentes involucrados en la AI dependiente de S-RNasas; sin embargo, existen evidencias genéticas y bioquímicas que indican que en el mecanismo molecular del



Proteína anzuelo	Proteína con la que interactúa	Función de la proteína interactora	Referencia
S-RNasa	SLF <sup>a,b,c</sup>	Determinante masculina	Qiao <i>et al.</i> , 2004 <sup>21</sup> Hua y Kao, 2006 <sup>28</sup>
	SBP1 <sup>a,b</sup> (S-RNasa Binding Protein 1)	Posible componente del complejo E3 ligasa	Hua y Kao, 2006 <sup>28</sup> Hua <i>et al.</i> , 2008 <sup>49</sup>
	120K <sup>b,c</sup>	Genmodificador	Cruz-García <i>et al.</i> , 2005 <sup>47</sup>
	TTS <sup>b,c</sup>	Incrementa el crecimiento del TP	Cruz-García <i>et al.</i> , 2005 <sup>47</sup>
	PELPIII <sup>b,c</sup> (proteína tipo extensina)	Desconocida	Cruz-García <i>et al.</i> , 2005 <sup>47</sup>
	PGPS/D3 <sup>b,c</sup>	Desconocida	Guo <i>et al.</i> , 2006 <sup>48</sup>
SLF	S-RNasa <sup>a,b,c</sup>	Determinante femenina	Qiao <i>et al.</i> , 2004 <sup>21</sup> Hua y Kao, 2006 <sup>28</sup>
	SSK1 <sup>a,b</sup>	Adaptador que une a SLF y una proteína tipo Culina-1	Huang <i>et al.</i> , 2006 <sup>27</sup>
	SBP <sup>a,b</sup>	Posible componente del complejo E3 ligasa	Hua y Kao, 2006 <sup>28</sup>
120K	S-RNasa <sup>b,c</sup>	Determinante femenina	Cruz-García <i>et al.</i> , 2005 <sup>47</sup>
	SBP1 <sup>b</sup>	Posible componente del complejo E3 ligasa	Hua y Kao, 2006 <sup>28</sup> Hua <i>et al.</i> , 2008 <sup>49</sup>
	NaPCCP <sup>b</sup>	Posible transporte de arabinogalactoproteínas	Lee <i>et al.</i> , 2008 <sup>50</sup>
HT-B	NaStEP <sup>a</sup>	Genmodificador	García-Valencia y Cruz-García, no publicado

Interacciones físicas demostradas por ensayos de doble híbrido en *S. cerevisiae*<sup>(a)</sup>, por *pull-down*<sup>(b)</sup>, o por co-inmunoprecipitación<sup>(c)</sup>, respectivamente.

Tabla 1. Interacciones físicas entre proteínas involucradas en la AI dependiente de S-RNasas.

rechazo del polen hay otros actores, cuya contribución es esencial en la AI. Es por ello que en nuestro grupo de investigación nos hemos dado a la tarea de identificar nuevos GM tanto del pistilo como del polen, hasta el momento hemos identificado tres genes (*NaPEPII*, *NaSIPP* y *NaP11*) con un alto potencial de participar en el rechazo del polen. Para evaluar si estos genes son esenciales para el rechazo del polen en *N. alata* se están realizando experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana*.

### Modelo de rechazo del polen

El siguiente modelo del mecanismo del rechazo del polen trata de incorporar a las determinantes de especificidad y a los GM, que se sabe por experimentos de pérdida de función, son esenciales en el rechazo del polen en solanáceas.

En este modelo (Figura 3) se propone que una vez que los granos de polen llegan al estigma estos germinan sin importar su haplotipo *S*, y sus TPs se dirigen al ovario a través del tejido de transmisión del estilo. Durante esta jornada los TPs van incorporando a su citoplasma, probablemente por endocitosis, proteínas como la S-RNasa, 120K, HT-B, y NaStEP<sup>19,36</sup>. Algunas

proteínas como las S-RNasas y 120K son compartimentalizadas en una de las vacuolas de los TPs<sup>19</sup>.

Por definición la interacción *S* específica entre la S-RNasa (determinante femenina) y SLF (determinante masculina) desencadena la cascada bioquímica que conduce al rechazo o aceptación del polen.

Además, se propone que la interacción *S* específica entre la S-RNasa y SLF en una cruce incompatible estabiliza a la proteína HT-B, la que directa o indirectamente ocasionaría la liberación masiva de las S-RNasas al citoplasma del TP, por una ruptura de la vacuola que las contiene, lo cual es precedido por desorganización de los filamentos de actina<sup>51</sup>. Una vez en el citoplasma del TP las S-RNasas actúan como citotoxinas degradando su RNA y ocasionando eventualmente su muerte. Por lo contrario, en una cruce compatible, HT-B es degradada en el TP y la vacuola con las S-RNasas permanece intacta permitiendo que el TP alcance el ovario<sup>19</sup>. Bajo este escenario, la proteína NaStEP juega un papel muy importante protegiendo la degradación prematura de HT-B en el TP, ya que esta incorpora al TP una vez que los granos de polen han germinado en el

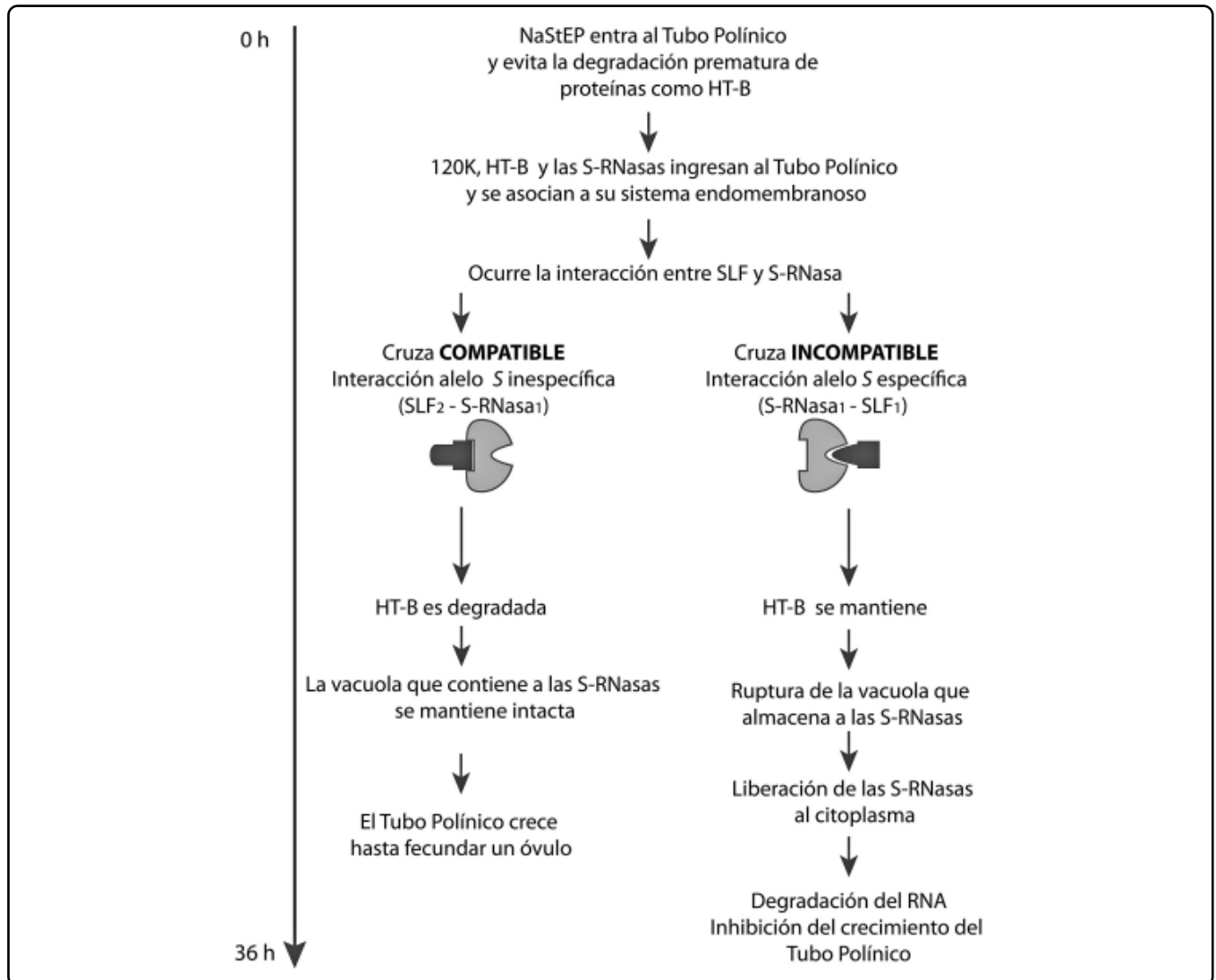


Figura 3. Modelo del mecanismo de rechazo del polen propio basado en S-RNasa. Se indica en una línea de tiempo, de 0 a 36 horas posteriores a la polinización, los diferentes eventos que han sido demostrados tanto en polinizaciones compatibles como en incompatibles.

estigma, en plantas transgénicas de *Nicotiana* que no acumulan a NaStEP, la proteína HT-B es degradada en el TP tanto en cruces compatibles e incompatibles, ocasionando que los TP alcancen los ovarios en ambos tipos de cruces<sup>36</sup>.

### PERSPECTIVAS

A pesar de los importantes avances que se han logrado en el estudio de la AI en sistemas basados en S-RNasa, es evidente que aún existen varias preguntas por responder como: ¿SLF ubiquitila diferencialmente a las S-RNasas o se auto-ubiquitila para su degradación por el proteosoma 26S?, ¿qué otras proteínas participan en el mecanismo bioquímico del rechazo del polen?, ¿cómo se degrada o estabiliza la proteína HT-B en el TP?, ¿cuáles son las señales que promueven la liberación de las S-RNasas del

compartimento vacuolar?, ¿cómo es que la proteína NaStEP regula la estabilidad de HT-B?, ¿cuál es el mecanismo por el que HT-B afecta la estabilidad de la vacuola que contiene a las S-RNasas?

El entendimiento de la AI pueden proveer una oportunidad sin precedentes para manipular las barreras intra e inter-específicas presentes en las plantas y su futura aplicación en la agricultura.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado parcialmente por DGAPA (IN210312) y el CONACyT (81968). Carlos E. Bravo Alberto y Liliana E. García Valencia son apoyados con una beca de doctorado por el CONACyT.

## REFERENCIAS

- Hunter, P. Me, myself and I. The genetics and molecular biology behind self-incompatibility and the avoidance of inbreeding in plants. *EMBO Rep.* **10(12)**, 1297-1300 (2009).
- De Nettancourt, D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants (Heidelberg Springer, New York, 2001).
- Darwin, C. The Effect of Cross and Self-fertilization in the Vegetable Kingdom (John Murray, London, 1876).
- Cruz-García, F. & McClure, B. in Current Trends in the Embryology of Angiosperms (ed. Bhojwani, S.S. & Soh, W.Y.) 167-196 (Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2001).
- Dickinson, H., Crabbe, M. & Gaude, T. Sporophytic self-incompatibility systems: S gene products. *Int. Rev. Cytol.* **140**, 525-561 (1992).
- Newbigin, E., Anderson, M. & Clarke, A. Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* **5**, 1315-1324 (1993).
- Nasrallah, J. & Nasrallah, M. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* **5**, 1325-1335 (1993).
- Takayama, S. & Isogai, A. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **15**, 467-487 (2005).
- Franklin-Tong. Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity and mechanism (Heidelberg Springer, Berlin, 2008).
- McClure, B. Darwin's foundation for investigating self-incompatibility and the progress toward a physiological model for S-RNase-based SI. *J. Exp. Bot.* **60**, 1069-1081 (2009).
- McClure, B., Cruz-García, F. & Romero, C. Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann. Bot.* **108(4)**, 647-658 (2011).
- Bredimeijer, G. & Blaas, J. S-Specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theor. Appl. Genet.* **59**, 185-190 (1981).
- McClure, B. *et al.* Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**, 955-957 (1989).
- Huang, S., Lee, H., Karunanandaa, B. & Kao, T. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* **6(7)**, 1021-1028 (1994).
- Lee, H.S., Huang, S. & Kao, T. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**, 560-563 (1994).
- Murffet, J., Atherton, T., Mou, B., Gasser, C. & McClure, B. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**, 563-566 (1994).
- Murffet, J. *et al.* S-RNase and inter-specific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self- incompatible and self-compatible species. *Plant Cell* **8**, 943- 958 (1996).
- Ioerger, T., Gohlke, J., Xu, B. & Kao, T. Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* **4**, 81-87 (1991).
- Goldraij, A. *et al.* Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self compatible *Nicotiana*. *Nature* **439**, 805-810 (2006).
- Ushijima, K. *et al.* The S haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* **39(4)**, 573-586 (2004).
- Qiao, H. *et al.* The F-box protein AhSLF-S<sub>2</sub> physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* **16**, 582-595 (2004).
- Sijacic, P. *et al.* Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self incompatibility. *Nature* **429**, 302- 305 (2004).
- Ikeda, K. *et al.* Primary structural features of S-haplotype-specific F box protein, SFB, in *Prunus*. *Sex. Plant Reprod.* **16**, 235-243 (2004).
- Yamame, H. & Tao, R. Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of S-genotyping in Rosaceous fruit trees. *Engei Gakkai Zasshi* **78**, 137-157 (2009).
- Zhang, Y., Zhao, Z. & Xue, Y. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 21- 42 (2009).
- Chen, G. *et al.* "A life or death decision" for pollen tubes in S-RNase-based self-incompatibility. *J. Exp. Bot.* **61(7)**, 2027-2037 (2010).
- Huang, J., Zhao, L., Yang, Q. & Xue, Y. AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *Plant J.* **46**, 780-793(2006).
- Hua, Z. & Kao, T. Identification and characterization of components of a putative *Petunia* S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* **18**, 2531-2553 (2006).
- Wang, H. & Xue, Y. Subcellular localization of the S locus F-box protein AhSLF-S<sub>2</sub> in pollen and pollen tubes of self- incompatible *Antirrhinum*. *J. Integr. Plant Biol.* **47**, 76-83 (2005).
- Sommer, T., Jarosch, E. & Lenk, U. Compartment-specific functions of the ubiquitin-proteasome pathway. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **142**, 97-160 (2001).
- Kubo, K. *et al.* Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based Self-incompatibility. *Science* **330**, 796-799 (2010).
- McClure, B., Cruz-García, F., Beecher, B. & Sulaman, W. Factors affecting inter and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann. Bot.* **85**, 113-123 (2000).
- McClure, B. New views of S-RNase-based self-incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9(6)**, 639-646 (2006).
- McClure, B., Mou, B., Canevascini, S. & Bernatzky, R. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13548-13553 (1999).
- Hancock, C., Kent, L. & McClure, B. The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* **43**, 716-723 (2005).
- Jiménez-Durán, K. *et al.* NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of the HT-B stability in *Nicotiana* pollen tubes. *Plant Physiol.* **161**, 97-107 (2013).
- Cheung, A., Wang, H. & Wu, H. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**, 383-393 (1995).
- De Graaf, B., Knuiman, B., Derksen, J. & Mariani, C. Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.* **54(380)**, 55-63 (2003).
- O'Brien, M. *et al.* Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self- incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J.* **32**, 985-996 (2002).
- Juárez-Díaz, J. *et al.* A novel Thioredoxin *h* is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **281**, 3418-3424 (2006).
- Kondo, K. & McClure, B. New microsome-associated HT-family

- proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family. *Mol. Plant* **1**(4), 634-644 (2008).
42. Kondo, K. *et al.* Cultivated tomato has defects in both *S-RNase* and *HT* genes required for stylar function of self- incompatibility. *Plant J.* **29**, 627-636 (2002).
43. Sassa, H. & Hirano, H. Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Mol. Genet. Genomics* **275**, 97-104 (2006).
44. Puerta, A., Ushijima, K., Koba, T. & Sassa, H. Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor *HT-B* of *Petunia*. *J. Exp. Bot.* **60**, 1309-1318 (2009).
45. Busot, G. *et al.* Pollination in *Nicotiana alata* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *J. Exp. Bot.* **59**(11), 3187-3201 (2008).
46. Oliva, M., Silva, M., Sallai, R., Brito, M. & Sampaio, M. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie* **92**, 1667-1673 (2010).
47. Cruz-García, F., Hancock, C., Kim, D. & McClure, B. Stylar glycoproteins bind to S-RNase *in vitro*. *Plant J.* **42**, 295- 304 (2005).
48. Guo, Y., Zhang, Y. & Xue, Y. *Petunia* germinating pollen S/D3 interacts with S-RNases in *Petunia hybrida* Vilm. *J. Integr. Plant Biol.* **48**, 584-590 (2006).
49. Hua, Z.H., Fields, A. & Kao, T.H. Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Mol. Plant* **1**(4), 575-585 (2008).
50. Lee, C., Swatek, K. & McClure, B. Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana alata* pistil arabinogalactan proteins. *J. Biol. Chem.* **283**(40), 26965-26973 (2008).
51. Roldán, J., Rojas, H. & Goldraij, A. Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the *in vivo* self-incompatibility response in *Nicotiana alata*. *Ann. Bot.* **110**(4), 787-795 (2012).