



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**LA FUNCIÓN DE LA ALEURAÍNA EN LA RESPUESTA DEL RECHAZO DEL TUBO
POLÍNICO EN *NICOTIANA***

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
OSCAR DANIEL ROSILLO SALAZAR**

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. Felipe Cruz García
Facultad de Química, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Soledad Funes Argüello, Instituto de Fisiología, UNAM
Jorge Vázquez Ramos, Facultad de Química, UNAM**

Ciudad de Universitaria, Cd. Mx. Mayo, 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 se realizó bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM.

Al comité tutor integrado por el Dr. Jorge Vázquez Ramos, la Dra. Soledad Funes Argüello y el Dr. Felipe Cruz García.

Al jurado de examen integrado por el Dr. Eleazar Martínez, el Dr. Diego González, la Dra. Sobeida Sánchez, el Dr. Javier Plascencia y la Dra. Patricia León.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al programa de maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas.

A la Facultad de Química.

A la M. en C. Yuridia Cruz por su apoyo técnico.

A mis compañeros de laboratorio Daniela Torres, Edgar Nájera, Luis Ramos y Renata.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

Al PAEP por el apoyo otorgado para asistir y presentar este trabajo en la Conferencia XVI de Solanáceas en la Universidad de California, Davis.

Al proyecto DGAPA IN217816 y al CONACYT 236602.

Abreviaturas

AC	Autocompatible
AI	Autoincompatible
BASTA	Glufosinato de Amonio
BP-80	Transportador de proteínas BP-80
Ca ²⁺	Ión de Calcio
cDNA	DNA codificante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dsRNA	RNA de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FRB	Buffer de carga de RNA
HT-B	Proteína <i>High Top Band</i>
Hg	Mercurio
kDa	Kilodalton
MCS	Sitio de clonación múltiple
mRNA	RNA mensajero
NaStEP	Proteína específica del estigma de <i>Nicotiana alata</i>
PBS	Buffer de fosfatos
PCD	Muerte Celular Programada
PCI	Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PSI	Libras por pulgadas cuadradas
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA interferente
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
S-RNasa	Ribonucleasa del locus S
RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa
SLF	Proteína con caja F del locus S
TGN	Red Trans Golgi
TP	Tubo polínico
120K	Proteína de 120 kDa

ÍNDICE

Abreviaturas	3
ÍNDICE	4
INDICE DE FIGURAS	5
INDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Control de la reproducción en angiospermas	7
1.2. Autoincompatibilidad	8
1.3. Autoincompatibilidad en Brassicaceae	9
1.4. Autoincompatibilidad en Papaveraceae	11
1.5. Autoincompatibilidad del tipo Solanaceae	12
1.6. Factores no ligados al locus S	14
1.7. Modelo para la compartimentalización de la S-RNasa	16
1.8. Aleuraina, una proteasa vacuolar	18
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos particulares	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Amplificación del cDNA de la aleuraina de <i>N. alata</i>	23
4.1.1. Extracción de RNA total	23
4.1.2. Síntesis de cDNA y RT-PCR	24
4.1.3. Clonación del cDNA de la Aleuraina	25
4.1.2. Transformación bacteriana	27
4.1.3. Extracción de plásmido MiniPrep	27
4.1.4. Análisis bioinformático	28
4.2. Obtención de pBA- Aleuraina RNAi	28
4.2.1. Síntesis de pBA-Aleuraina RNAi	28
4.2.2. Purificación de pBA-Aleuraina (MaxiPrep)	32
4.3. Vida media e inmunolocalización de la aleuraina en tubos polínicos	33
4.3.1. Germinación <i>in vitro</i> de tubos polínicos	33
4.3.2. Determinación de la vida media de la aleuraina en tubos polínicos	33
4.3.3. Inmunolocalización de la aleuraina en tubos polínicos	34
4.4. Transformación de polen mediante bombardeo	35
4.4.1. Recubrimiento de partículas de tungsteno con DNA	35
4.4.2. Preparación de granos de polen para expresión transitoria	36
4.4.3. Transformación de granos de polen mediante bombardeo	36
4.4.4. Germinación <i>in vitro</i> de polen transformado con GFP	37
4.4.5. Polinización y observación de pistilos polinizados mediante fluorescencia	37
5. RESULTADOS	39
5.1. Determinación de la secuencia del cDNA de aleuraina de <i>N. alata</i>	39
5.2. Análisis de la expresión de la aleuraina en <i>Nicotiana</i>	42
5.3. Análisis de patrones de expresión similares a elementos de la incompatibilidad	48
5.4. Análisis de procesamiento diferencial en cruzas AI y AC de <i>Nicotiana</i>	49
5.5. Obtención del plásmido pBA-aleuraina RNAi	50
5.6. Transformación de polen por bombardeo	53
6. DISCUSIÓN	59
7. CONCLUSIÓN	69
PERSPECTIVAS	70
Referencias	71
ANEXO	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Señalización mediada por el receptor-S cinasa en el estigma de <i>Brassica</i>	10
Figura 2. Cascada de señalización mediada por la proteína-S en polen de Papaveraceae.....	12
Figura 3. Autoincompatibilidad gametofítica mediada por S-RNasas.....	14
Figura 4. Modelo de la compartimentalización de la S-RNasa.....	18
Figura 5. Esquema del vector pGEM-T.....	26
Figura 6. Plásmidos pENTR TM /S-TOPO y pBA-DC.....	31
Figura 7. Secuencia del cDNA y aminoácidos de la aleuraína de <i>N. alata</i>	41
Figura 8. Expresión de la aleuraína en diferentes tejidos y órganos de <i>Nicotiana</i>	43
Figura 9. Diferencia de abundancia de la aleuraína en anteras fértiles e infértiles.....	43
Figura 10. Detección por RT-PCR del mRNA de la aleuraína en anteras, polen y tubos polínicos.....	45
Figura 11. Expresión de la aleuraína en diferentes etapas de maduración de la antera.....	46
Figura 12. Inmunolocalización de la aleuraína en tubos polínicos a 5 y 20 horas.....	48
Figura 13. Detección por RT-PCR del mRNA de la aleuraína en las antera de especies de <i>Nicotiana</i>	47
Figura 14. Expresión y procesamiento de la aleuraína en pistilos de cruza compatibles e incompatibles en <i>Nicotiana</i>	50
Figura 15. Obtención del plásmido pBA-pNTP303::aleuraína RNAi.....	52
Figura 16. Transformación de tubos polínicos con GFP.....	54
Figura 17. Polinización de pistilos con polen transformado.....	57
Anexo 1. Alineamiento de las secuencias de cDNA completo de las proteínas del tipo aleuraína en diferentes géneros.....	76
Anexo 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la aleuraína de diferentes géneros.....	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos utilizados en la transformación de polen de <i>N. alata</i>	38
---	----

RESUMEN

La reproducción sexual en angiospermas es un proceso complejo que inicia con la polinización. Para evitar la autofecundación, *Nicotiana* posee un mecanismo genético denominado autoincompatibilidad (AI), controlado por el locus S, éste codifica dos genes, *S-RNasa* y *SLF* (determinantes del pistilo y polen respectivamente). La interacción S-específica de ambas proteínas determina el rechazo del tubo polínico (TP). También existen genes modificadores, como *120K*, *HT-B* y *NaStEP* que codifican proteínas esenciales en la AI. De acuerdo con el modelo de la compartimentalización, tanto en cruza compatibles como incompatibles, la *S-RNasa* y *120K* se integran a la vacuola central (VC) del TP por endocitosis, conteniendo el efecto citotóxico de la *S-RNasa*. La interacción de *S-RNasa-SLF* del mismo haplotipo lleva a la estabilidad de la proteína *HT-B*, provocando el rompimiento de la VC y la muerte del TP. Por el contrario, en una cruce compatible *HT-B* es degradada, por lo que la VC permanece intacta, así el TP puede alcanzar el ovario. Cabe mencionar, que *NaStEP* protege a *HT-B* de la degradación prematura, por lo que posteriormente, esta proteína debe ser degradada en una cruce compatible. El mecanismo de degradación de proteínas implicadas en la AI permanece desconocido.

Dentro de la VC del TP, se identificó a una proteasa de cisteína que colocaliza con la *S-RNasa* y *120K*, llamada aleuraína, característica que la convierte en una candidata partícipe en el rechazo del TP. Además, esta proteasa se encuentra implicada en la muerte celular y la senescencia en plantas. De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se propone que el papel de las proteasas presentes en el TP, particularmente el de la aleuraína, sea preponderante en la respuesta de rechazo del polen propio. El polen transformado genéticamente mediante bombardeo con un plásmido capaz de generar Aleuraína-RNAi fue utilizado para realizar cruza autoincompatibles y con ello, se observó que los tubos polínicos del polen transformado eran capaces de alcanzar la base del estilo, por lo que es probable que la actividad proteolítica de esta peptidasa tenga un rol importante en la AI.

Queda por refinar nuestro conocimiento para ubicar a la aleuraína dentro de esta cascada bioquímica y el posible desencadenamiento del proceso de muerte celular mediado por proteasas durante la AI.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Control de la reproducción en angiospermas

El grupo de las angiospermas es uno de los linajes con mayor éxito evolutivo, el cual, depende de su adaptación reproductiva, la flor (Scheffers *et al.*, 2012). La reproducción sexual en las plantas con flor es un proceso complejo. Ésta se inicia con la polinización, la llegada del grano de polen procedente de las anteras masculinas a los tejidos femeninos organizados en el pistilo. El pistilo consta de tres estructuras básicas: el estigma en la parte superior, el ovario en la inferior y el estilo, una estructura tubular que une el estigma con el ovario. El polen es metabólicamente quiescente y altamente desecado cuando se libera de las anteras. Al llegar al estigma, el grano de polen se hidrata y germina emitiendo el tubo polínico, el cual crece a través del estilo hasta llegar al ovario. Allí el tubo penetra en el óvulo y alcanza el saco embrionario, una estructura multicelular que contiene el gameto femenino. En el interior del saco, el tubo descarga dos células espermáticas. Una de ellas, el gameto masculino, se fusiona con la célula generativa u ovocélula para formar el cigoto; a partir de este surge mediante divisiones celulares sucesivas, el embrión que dará lugar a una nueva planta. La otra célula espermática se une con los dos núcleos polares de la célula central del saco embrionario y origina el endospermo, el tejido de nutrición que alimentará al embrión en sus primeros estadios de crecimiento. El embrión y el endospermo están protegidos dentro de la semilla, al interior del fruto. Este evento de doble fusión de células y núcleos masculinos y femeninos se conoce como fecundación doble (Edlund *et al.* 2004; Goldraij 2014).

La mayoría del polen es transportado por acción la mecánica de insectos, viento, agua y otros animales, incluso en algunas especies, se deposita directamente en el estigma de la misma planta, de manera que la autopolinización ocurre. Por lo que las plantas ejercen poco control respecto a la entrecruza con otros organismos, es por esto que, las plantas con flores han desarrollado mecanismos etiológicos, estructurales y bioquímicos para el control de su reproducción. La reproducción en angiospermas es altamente selectiva. De todos los granos de polen que llegan al pistilo, la planta favorece la germinación y el crecimiento de los más apropiados para

la supervivencia de la especie. Algunas angiospermas poseen flores imperfectas, es decir, con dos tipos de flores, sean éstas masculinas o femeninas, en un mismo organismo (monoico) o en distintos (dioico). Pero la mayoría de plantas presentan flores perfectas (hermafroditas) donde coexisten el órgano masculino (estambres) y el femenino (pistilo). La proximidad entre las estructuras reproductivas en flores hermafroditas aumenta la probabilidad de que ocurra la autofecundación (de Nettancourt, 2001). El logro evolutivo de las especies ha estado y sigue favorecido por la variabilidad, por lo que, si este evento de autofecundación ocurriese de manera reiterada, provocaría la disminución de la variabilidad genética en una especie a causa de la endogamia. Para evitar esto, las flores perfectas pueden presentar dos tipos morfológicos diferentes (heteromórficas). Pero las flores que simplemente la misma estructura (homomórficas), necesitan para el control de su fecundación de mecanismos de incompatibilidad genéticos y bioquímicos.

1.2. Autoincompatibilidad

La incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autofecundación o la fecundación entre organismos genéticamente muy relacionados es conocida bajo el nombre de autoincompatibilidad (AI). Si el grano de polen resulta apto para la planta y forma el tubo polínico se dice que es compatible, e incompatible si es rechazado, no germina o el tubo polínico no alcanza el óvulo (Goldraij, 2014). Los sistemas de autoincompatibilidad son de los mecanismos más importantes usados por las angiospermas para el control de su reproducción. Muchas familias de plantas con flor han de evitado de varias maneras la autofecundación y han desarrollado mecanismos genético-bioquímicos que les permiten reconocer el polen propio, inhibir su crecimiento y con ello promover la polinización cruzada. Lo que les permite a algunas angiospermas aumentar sus capacidades de sobrevivencia y reproducción, además de contribuir a la diversidad genética de las especies (Ávila-Castañeda *et al.* 2011).

Cabe mencionar que el término de AI no representa un único mecanismo, sino que comprende un conjunto de sistemas de reconocimiento divergentes. La única cualidad en común entre estos mecanismos no relacionados, es que residen en un

locus multialélico y altamente polimórfico, al cual han denominado locus-S para todos los casos. Este locus consiste de al menos dos genes ligados, uno funciona como la determinante femenina en el pistilo y el otro como la masculina en el polen. Estos genes son heredados de manera conjunta debido a su proximidad y al ser polimórficos, las variantes de estos complejos génicos son conocidos como haplotipos-S. El locus-S se encuentra cerca del centrómero y la muy cercana proximidad de ambos genes evita la recombinación entre ambos, por lo que su herencia es del tipo mendeliana. El número de alelos S presentes en una población puede ser muy grande y variar de especie a especie (García-Valencia, *et al.*, 2013). La inhibición del polen ocurre cuando se encuentran expresadas las determinantes con el mismo haplotipo-S, tanto en el polen, como en el pistilo, mediante interacción proteína-proteína. En un principio, se identificaron estas determinantes en la familia Brassicaceae, más tarde otro esquema de AI en Solanaceae, Rosaceae y Scrophulariaceae, estas tres comparten la misma determinante femenina; y finalmente en Papaveraceae otro mecanismo distinto. A pesar de esto, los mecanismos de AI de estos grupos no presentan similitudes, lo que sugiere una evolución independiente y que probablemente hayan surgido múltiples veces en diferentes linajes de angiospermas (Takayama *et al.*, 2005).

1.3. Autoincompatibilidad en Brassicaceae

Existen dos tipos de AI, la gametofítica y la esporofítica, diferenciadas por el comportamiento genético del fenotipo de incompatibilidad del polen. El fenotipo en la AI gametofítica depende de su genoma haploide mientras que en la esporofítica depende del genoma diploide de la planta parental (Takayama *et al.*, 2005). En la gametofítica, la AI está determinada por las proteínas expresadas en el gametofito, el polen es rechazado cuando el único alelo-S expresado en el polen es igual a uno de los dos S-alelos expresados en el pistilo. (de Nattancourt, 2001). Por el contrario, en la familia Brassicaceae, la AI es del tipo esporofítica. Los tubos del polen no se desarrollan de manera apropiada en el estigma cuando expresan el mismo haplotipo que posee el progenitor del polen. El rechazo del polen resulta en la anulación de la hidratación del polen o un rápido arresto del crecimiento del tubo polínico sobre el

estigma. El locus-S, en Brassicaceae, consta de tres genes, *SKR* (Receptor-S cinasa), *SP11* (Proteína del locus-S 11) y *SLG* (glicoproteína del locus-S). La determinante femenina, *SKR*, es un receptor cinasa en la membrana plasmática de las células papilares del estigma. *SP11* es la determinante masculina, expresado principalmente en el tapetum de las anteras y se acumula en la pared celular del polen durante su maduración. Cuando ocurre la polinización, *SP11* penetra la pared celular de las células papilares y se une a *SKR* de manera S- específica. Esta unión induce la autofosforilación de *SKR*, que conlleva a una cascada de señalización y resulta en el rechazo del polen propio. *SLG* no es esencial para el reconocimiento del polen pero se localiza en la pared de células papilares, promoviendo la respuesta de AI en algunos haplotipos (Figura 1). Aunque la cascada de señalización no se encuentra bien entendida, se cree que la degradación de mediada por proteosomas de algunos sustratos resulta en el rechazo del polen (Takayama *et al.*, 2005; Giranton *et al.* 1995).

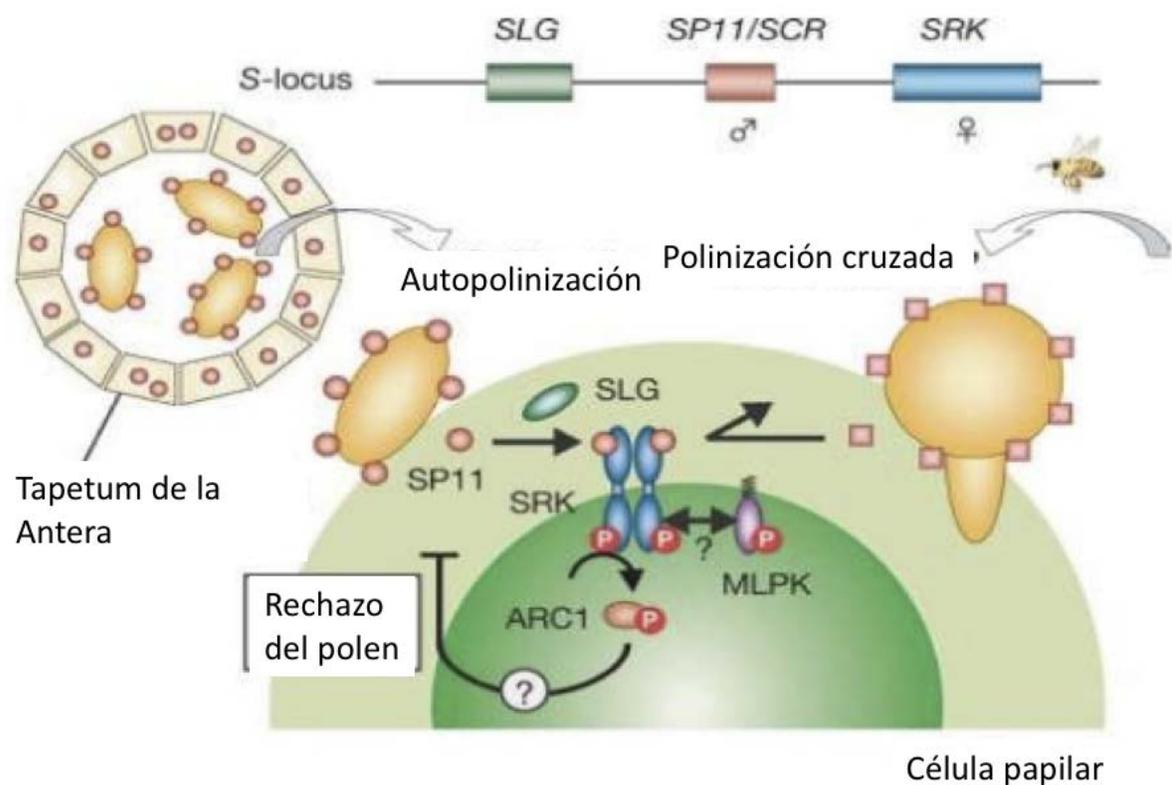


Figura 1. Señalización mediada por el receptor-S cinasa en el estigma de *Brassica*. (Tomado y traducido al español de Takayama, *et al.*, 2005.)

1.4. Autoincompatibilidad en Papaveraceae

En la familia Papaveraceae, una proteína secretada en el estigma llamada PrsS (*Papaver rhoeas* stigmatic S), donde interactúa de manera S-específica con la determinante masculina en el polen PrpS (*Papaver rhoeas* pollen S) e induce la entrada de Ca^{2+} hacia el tubo polínico creciente, lo que desencadena una cascada de señalización que controla a varios componentes. El citoesqueleto de F-actina se despolimeriza rápidamente, al igual que los microtúbulos. Las pirofosfatasas inorgánicas se encuentran fosforiladas, lo que inhibe su actividad y reduce la capacidad de biosíntesis del polen. Estos eventos resultan en la inhibición del tubo polínico. P56, es otro blanco que se activa en la AI, la cual es una MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos) importante en la transducción que señala a la muerte celular programada. Al igual que posteriormente, varias proteasas con actividades del tipo caspasa son activadas, lo que resulta en la muerte celular programada del polen, con ello se garantiza que la fecundación del polen no pueda ocurrir en una situación de incompatibilidad (Poulter *et al.*, 2010). SBP un proteoglucano integral de la membrana plasmática del polen, de cual, se especula que funciona como un receptor accesorio. La concentración de iones de calcio se incrementa en el interior del tubo polínico a partir del almacenado en compartimentos intracelulares y de fuentes extracelulares. Este incremento lleva al desencadenamiento de una cascada de señalización que resulta en una inhibición rápida del crecimiento del tubo polínico y finalmente con la muerte de los tubos incompatibles (Figura 2).

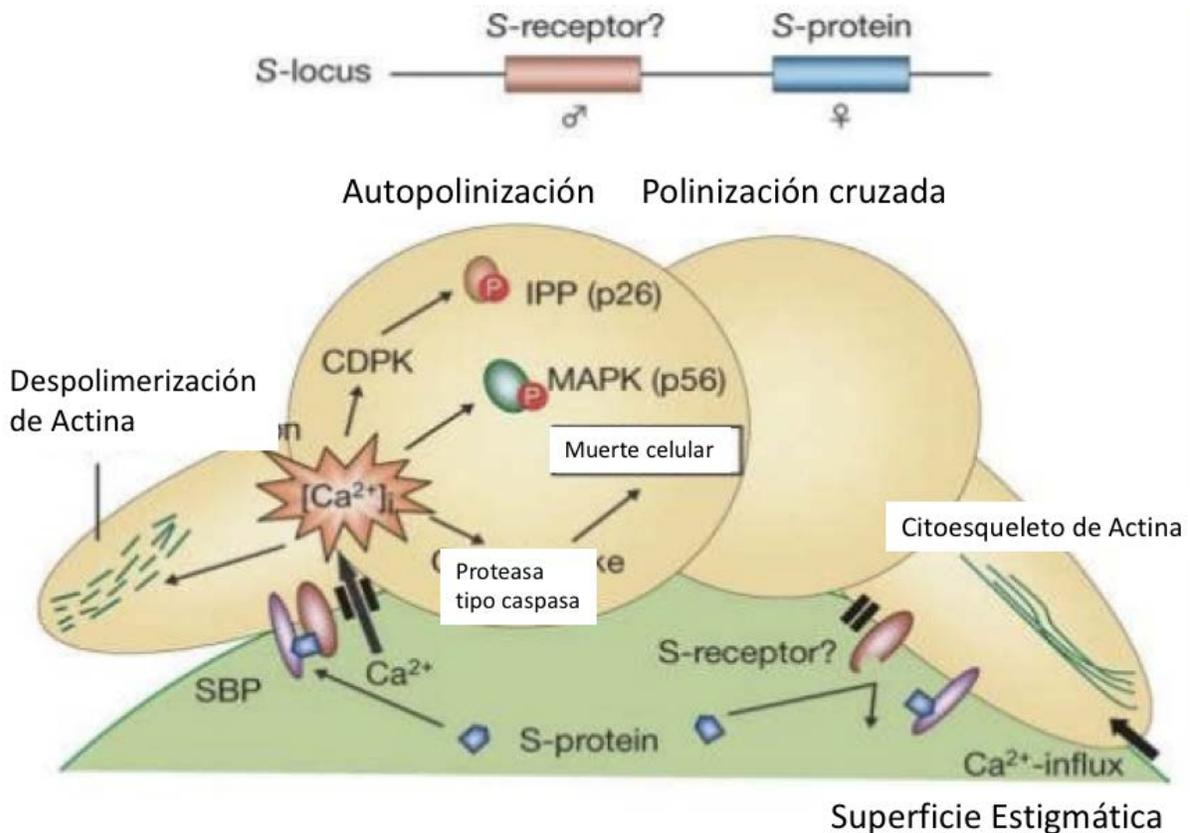


Figura 2. Cascada de señalización mediada por la proteína-S en polen de Papaveraceae. (Tomado y traducido al español de Takayama, *et al.*, 2005)

1.5. Autoincompatibilidad del tipo Solanaceae

La autoincompatibilidad (AI) en las familias Solanaceae, Rosaceae y Scrophulariaceae es un mecanismo determinado genéticamente para el reconocimiento y rechazo del polen propio o polen de plantas muy relacionadas genéticamente. En los primeros estudios bioquímicos acerca de la autoincompatibilidad en *Nicotiana glauca*, se observó que es un mecanismo donde intervienen glicoproteínas con actividad de RNasa involucradas en la inhibición del crecimiento del tubo polínico (McClure *et al.*, 1989). Más tarde, se descubrió que este tipo de incompatibilidad gametofítica está controlada por un locus, el cual, contiene un gen que controla la especificidad en el pistilo, el gen de la S-RNasa que codifica glicoproteínas con actividad de RNasa; y otro gen que la controla en el polen llamado SLF (S-locus F-box) el cual codifica una proteína con un dominio del tipo caja F,

generalmente, este tipo de dominios están involucrados en la degradación de proteínas mediada por ubiquitilación y el proteosoma 26S. Ya que el locus-S es altamente polimórfico, existe un conjunto de proteínas con una función similar, pero con características de reconocimiento distintas. Tan sólo en *Nicotiana*, las S-RNasas son realmente divergentes, con una identidad en su secuencia de aminoácidos en un rango del 38% al 98% (McCubbin, 2000). La interacción S-específica entre la S-RNasa y SLF determina, por definición, el rechazo o la aceptación del polen mediante el desencadenamiento de una cascada bioquímica. Sin embargo, el mecanismo exacto de cómo se lleva a cabo el rechazo del polen con el mismo haplotipo-S aún es desconocido (Sijacic *et al.*, 2004).

La mayoría de los tejidos de las plantas, al poseer una dotación cromosómica doble, poseen dos haplotipos para el locus S. Pero en los gametos, la información genética está reducida a la mitad, por ello, en el polen se produce una sola variante de SLF. El pistilo, al formar parte del cuerpo vegetativo, expresa dos variantes de S-RNasa. El rechazo o aceptación del polen dependerá de si coincide o no el haplotipo de SLF con cualquiera de las dos S-RNasas del pistilo. Es decir, una planta que posea los haplotipos S_1S_2 expresará en el pistilo S-RNasa₁ y S-RNasa₂. A su vez, el polen de ésta será de dos tipos SLF₁ y SLF₂. Al ocurrir la autofecundación se reconocerá a cualquiera de los dos tipos de polen propio y se disparará el mecanismo de rechazo. En cambio, si una planta con los haplotipos S_2S_3 recibe el polen de una planta S_1S_2 . El polen SLF₂ resultará incompatible en el pistilo de la planta S_2S_3 por la presencia de S-RNasa₂. Pero el polen SLF₁ crecerá normalmente (Goldraij, 2014) (Figura 3).

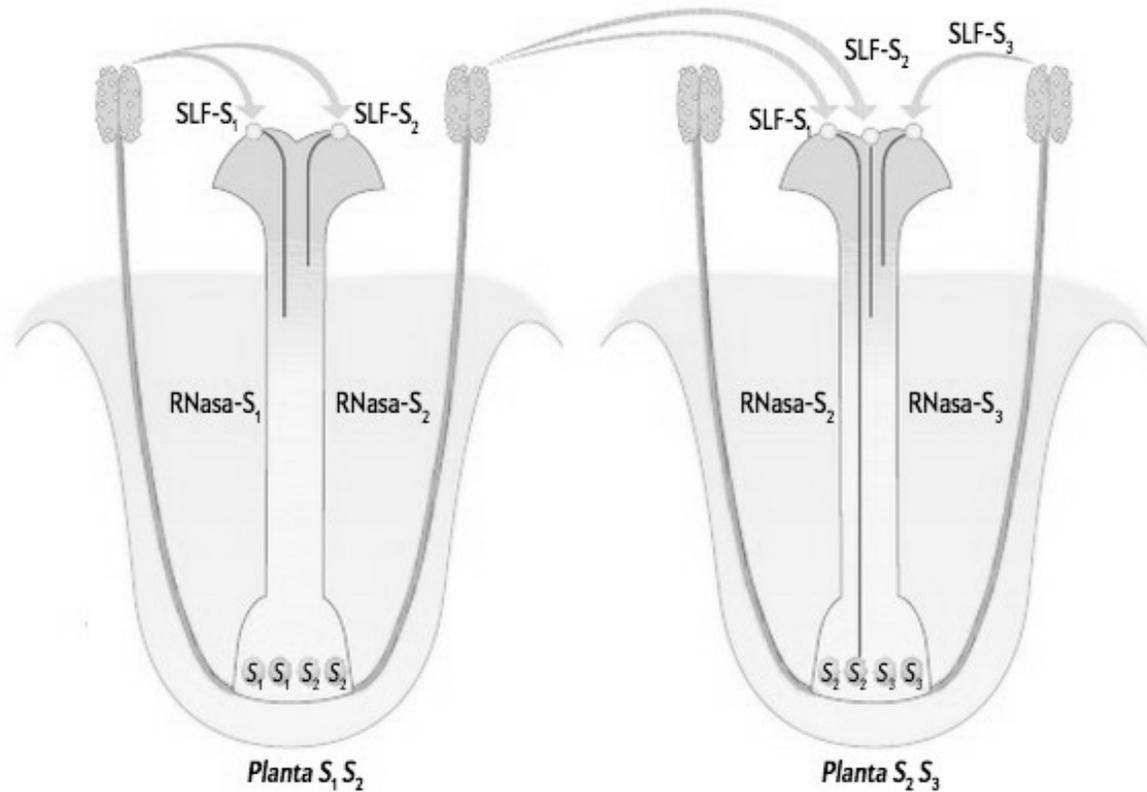


Figura 3. Autoincompatibilidad gametofítica mediada por S-RNasas.
Tomada de Goldraij, 2014.

1.6. Factores no ligados al locus S

Además de las proteínas codificadas en el locus-S, también se ha reportado que existen otras proteínas necesarias en la cascada bioquímica de la AI (Goldraij *et al.*, 2006, McClure, 2004). Los genes que codifican a estas proteínas se les conoce como genes modificadores, se sabe que sus productos interaccionan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad, sin afectar la expresión de los genes codificados en el locus-S (McClure *et al.* 1999, Hancock *et al.*, 2005). Algunos ejemplos de las proteínas codificadas por los genes modificadores son: HT- B (High Top-Band), una proteína de 8.6 kDa cuya función permanece desconocida y es específica de estilos inmaduros de *Nicotiana* y *Petunia*; NaStEP (*Nicotiana alata* Stigma Expressed Protein), un inhibidor de proteasas tipo Kunitz abundante en los estigmas de especies autoincompatibles de *Nicotiana*; y 120K, una

arabinogalactoproteína estilar de 120 kDa, la cual puede formar complejos con las S-RNasas. Se ha evaluado la participación de las proteínas mencionadas anteriormente en la AI, mediante experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas, cuando los genes de estas proteínas son silenciados la capacidad del rechazo del polen se pierde debido al papel en la cascada del rechazo del polen propio de acuerdo al modelo de la compartimentalización, el cual se menciona posteriormente. (Jiménez-Duran *et al.*, 2013, Hancock *et al.*, 2005).

El papel del pistilo es multifuncional, se sabe que provee factores que dan direccionalidad al crecimiento del tubo polínico, así como brinda soporte físico y nutricional para su desarrollo. En él también se producen otros factores necesarios para el reconocimiento y rechazo del polen. En general, todos los factores generados en el pistilo involucrados en las interacciones polen-pistilo, necesitan ser secretados a la matriz extracelular. La S-RNasa, HTB, 120K y NaStEP son producidas en las células del tejido central o de transmisión y son segregadas al espacio extracelular, donde son asimiladas por el tubo polínico en crecimiento. Experimentos de inmunocitoquímica han revelado que 120K se aloja en el tonoplasto del tubo polínico y demarca los límites del compartimento donde es almacenada la S-RNasa. En ciertas condiciones, el factor 120k forma complejos con las S-RNasas. Se especula que 120K en conjunto con otras proteínas del pistilo, faciliten el alojamiento de S-RNasa en el interior de la vacuola del tubo polínico. En el caso de HT-B, por medio de ensayos bioquímicos y de inmunocitoquímica, se ha comprobado que en las polinizaciones compatibles la estabilidad de HT-B es mucho menor que en las incompatibles. Este hallazgo concuerda con el hecho que en las plantas transgénicas con una expresión de HT-B muy reducida o nula, las polinizaciones resultan siempre compatibles, independientemente del haplotipo del polen utilizado en el ensayo. Ello sugiere que la degradación de HT-B es un requisito indispensable para la incompatibilidad. La degradación de HT-B también está relacionada con la presencia de NaStEP, en plantas transgénicas donde el gen correspondiente está silenciado, HT-B se degrada, por lo que las plantas fenotípicamente pierden la capacidad de rechazar el polen propio, convirtiendo a esta proteasa en un gen modificador de la autoincompatibilidad (Jiménez- Durán *et al.*, 2013).

1.7. Modelo para la compartimentalización de la S-RNasa

Se ha postulado un mecanismo para integrar a los factores implicados en la AI y explicar cómo se rechaza el polen, conocido bajo el nombre de modelo para la compartimentalización de las S-RNasas (Goldraij *et al.*, 2006, Figura 4). Cuando el grano de polen queda depositado en el estigma, germina y su tubo polínico (TP) se dirige al ovario a través del tejido de transmisión del estilo. Conforme crece el TP, tanto en cruza compatibles como incompatibles, algunas proteínas que se encuentran en la matriz extracelular del tejido de transmisión se van incorporando por endocitosis de manera no específica. Mediante este mecanismo, porciones de la membrana celular del tubo polínico se invaginan y se adentran formando vesículas. Éstas contienen las moléculas endocitadas, de esta manera, las proteínas ingresan al TP pero aisladas del citoplasma. Las vesículas siguen lo que se conoce como ruta o tráfico de endomembranas: tienden a fusionarse con compartimentos mayores que a su vez, también se unen y forman vacuolas. A través de la ruta, la S-RNasa llega al interior de la vacuola y la molécula 120K a la membrana. Con ello, se lleva a cabo la resistencia a la citotoxicidad de la S-RNasa, una vez que la vacuola tiene su efecto citotóxico bajo control, evitando el acceso a su sustrato (Goldraij *et al.*, 2006; McClure, 2006). Las proteínas HT-B y NaStEP también son incorporadas al TP, aunque se desconoce con precisión si son incorporados a la vacuola (McClure *et al.*, 1999). Se ha postulado que el factor HT-B también establece alguna clase de interacción que lo mantiene localizado en el sistema de membranas internas al tubo polínico. Una cantidad minoritaria de S-RNasa accede al citoplasma (posiblemente a partir del retículo endoplásmico por transporte retrogrado) del polen para interactuar con la proteína SLF en una reacción de reconocimiento S-específico. Si SLF posee un haplotipo distinto al de la S-RNasa, el resultado de la interacción dará lugar a una polinización compatible, y si ambos coinciden, resultará incompatible. Se ha propuesto que la interacción entre el mismo haplotipo lleva a la estabilidad de la proteína HT-B, lo que provoca el rompimiento del compartimento vacuolar, y con ello, la liberación de las S-RNasas donde actúan como citotoxinas degradando al RNA y provocando la muerte del TP. Por el contrario, en una cruce compatible HT-B es degradada de manera aún desconocida, lo que tiene como consecuencia que la

vacuola permanezca intacta y que el TP pueda alcanzar el ovario. Otras enzimas hidrolíticas habitualmente almacenadas también podrían contribuir a la detención del crecimiento y rechazo del tubo (Goldraij et al., 2006).

Además, se ha propuesto que el inhibidor de proteasas tipo Kunitz (NaStEP) protege a HT-B de la degradación prematura (García-Valencia *et al.*, 2013). La evidencia genética indica que NaStEP es un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en el TP, ya que su ausencia, HT-B se degrada en los TP de cruza compatibles e incompatibles. Si NaStEP protege a HT-B de la degradación, se plantea que también esta proteína debe ser degradada en una crusa compatible, para permitir que se degrade HT-B y el TP escape al efecto de las S-RNasas. Hasta la fecha no se conoce el mecanismo mediante el cual ocurra la degradación de proteínas de importancia para el rechazo del polen. La compartimentalización de la S-RNasa se observa tanto en tubos polínicos compatibles e incompatibles como en pistilos con HT-B y 120K silenciadas. Estas evidencias señalan que el rompimiento no depende solo de la interacción entre la determinante del polen y la S-RNasa, sino que requiere de factores adicionales del pistilo. HT-B es de particular interés ya que su estabilidad se requiere para que se dé la respuesta de incompatibilidad, y esta estabilidad depende de la interacción específica entre las determinantes.

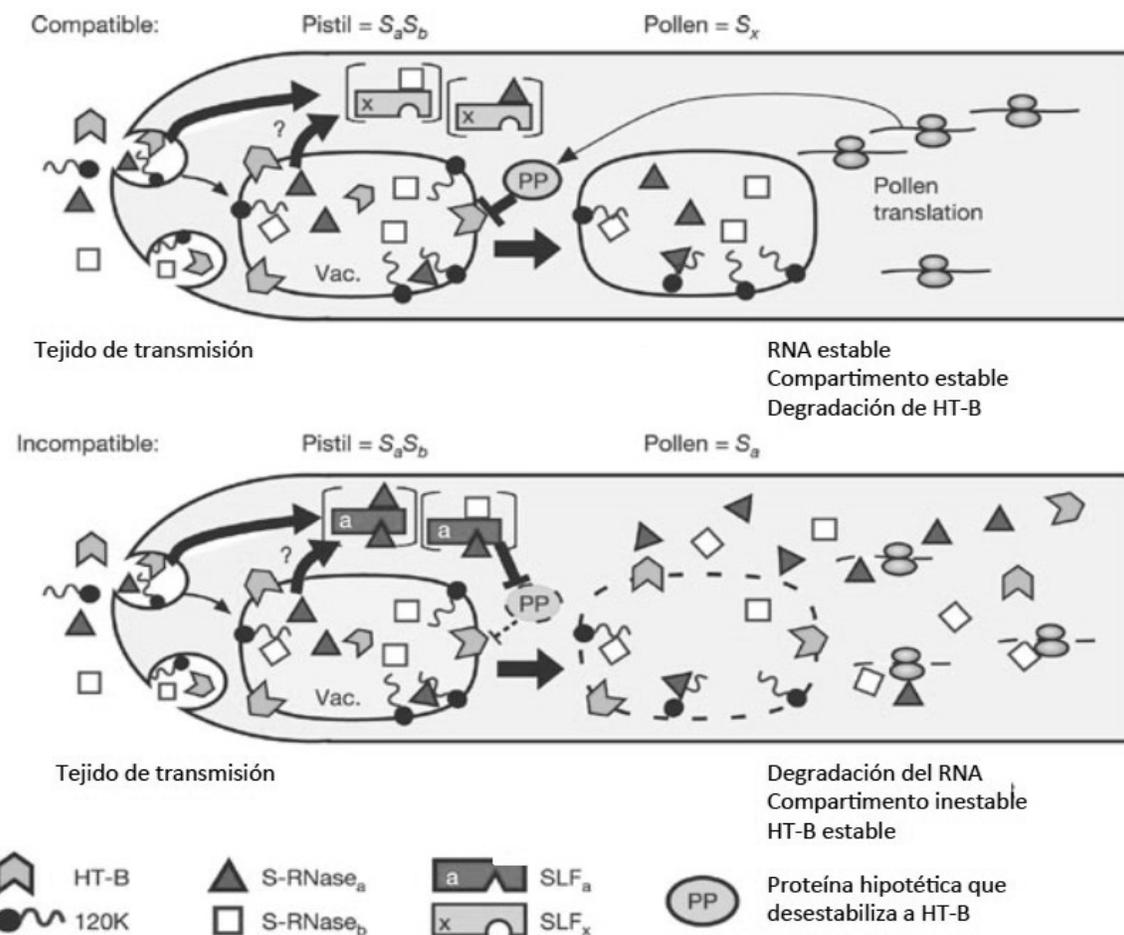


Figura 4. Modelo de la compartimentalización de la S-RNasa. Tomado y traducido al español de Goldraij *et al.*, 2006.

1.8. Aleuraina, una proteasa vacuolar

La vacuola, al ser un organelo de la célula vegetal tiene múltiples funciones. En ella se depositan enzimas líticas y degradadoras como las nucleasas y proteasas. El confinamiento de estas enzimas resulta indispensable para preservar la integridad de las proteínas y los ácidos nucleicos de la célula; garantiza la destrucción del material celular de manera controlada y en el momento oportuno. A pesar de que se ha reportado la participación de algunas proteínas dentro de la cascada de bioquímica responsable del rechazo del tubo polínico en especies autoincompatibles, aún no se conoce exactamente como HT-B se degrada para que ocurra la fecundación en cruza compatibles. Como se puede observar en la Figura 4, se plantea que existe una

proteína hipotética (PP) que desestabiliza a HT-B dentro de la cascada bioquímica. O bien, como NaStEP es un protector de la degradación de HT-B, debe existir un factor que también degrade a NaStEP para que el tubo polínico se desarrolle en una cruz compatible.

Dentro de la vacuola del TP, se ha observado mediante ensayos de inmunocitoquímica a una proteasa de cisteína que colocaliza con la S-RNasa y 120K conocida como aleuraína (Goldraij, 2006). Esta proteasa se utilizó en el experimento anteriormente indicado como un marcador de vacuolas líticas, debido a que se sabe que la aleuraína colocaliza con diferentes marcadores de enzimas vacuolares de acuerdo con experimentos de fraccionamiento celular en plantas de tabaco (Holwerda *et al.*, 1992). Las proteasas de cisteína son enzimas ubicuas involucradas en la degeneración celular y pertenecen a una larga familia enzimática que se encuentra en animales, plantas y microorganismos, la cual, tiene un papel importante en la degradación de proteínas. La mayoría de las proteasas de cisteína pertenecen a las familias del tipo papaína, metacaspasa o legumaína; siendo las del tipo papaína las más ampliamente investigadas entre las proteasas de cisteína. Muchas de estas moléculas se encuentran activas en ambientes con pH ácido, como el apoplasto, la vacuola y los lisosomas, y están implicadas en una variedad de eventos como la muerte celular programada en varios tejidos, incluyendo la xilogénesis, la senescencia de las hojas y flores, y el desarrollo y germinación de las semillas. Se ha reportado que las proteasas de cisteína, son las enzimas mayoritariamente responsables de la hidrólisis de muchas proteínas de almacenamiento como hordeínas y glutelina en los cultivos (Grzonka *et al.* 2001). En *N. tabacum* el gen de una proteasa de cisteína *NtCP56* se expresa fuertemente en anteras. En las plantas transgénicas antisentido para *NtCP56*, la degradación del tapetum se retarda y el desarrollo del polen se interrumpe tempranamente. Esto sugiere un papel importante de las proteasas en el desarrollo del polen. Ya sea que ésta active proteínas hidrolíticas que degradan las macromoléculas celulares o funcione como una enzima hidrolítica. Aunque su papel durante el desarrollo del polen aún debe ser esclarecido (Zhang *et al.*, 2009).

El hecho de que la aleuraína tenga actividad de proteasa y que además se encuentre dentro de la misma vacuola que otras proteínas implicadas en el rechazo del tubo

polínico, la convierte en un candidato probable para tener un papel en la cascada bioquímica del rechazo del polen propio, en el cual, la degradación de algunos elementos es necesario para su regulación. La aleuraína está cercanamente relacionada con la enzima lisosomal de mamíferos catepsina H y se encuentra asociada a las membranas de vacuolas líticas de plantas (Rogers *et al.*, 1985). Ambas enzimas son únicas dentro del grupo de las proteasas de cisteína porque tienen actividad de aminopetidasa y mínima actividad de endoproteasa (Rogers *et al.*, 1997). La aleuraína de cebada es sintetizada como una proenzima de 42 kDa, y posee un péptido señal de 21 aminoácidos en el extremo amino específico para el receptor de clasificación vacuolar BP-80. Esta proenzima se transloca al lumen del retículo endoplásmico donde se le escinde de su péptido señal, para finalmente ser procesada proteolíticamente en una forma madura en un compartimento acidificado de la ruta de secreción vacuolar (Howlerda *et al.* 1993). El receptor BP-80 es el responsable de determinar que la aleuraína pase de la cara trans del aparato de Golgi a una ruta de vesículas de clatrina que la lleva a un compartimento prevacuolar que eventualmente dará origen a la vacuola lítica de la planta. También se ha reportado que esta proteasa es importante en la muerte celular en plantas y juega un papel importante en la senescencia de las plantas en *Brassica oleracea* (Eason *et al.* 2005). Esto fue determinado mediante la obtención de plantas transformadas con *Agrobacterium*, con el fin de suprimir la expresión de esta proteasa. Los floretes de las plantas transgénicas presentaban un retardo en el cambio de color de verde a amarillo después de ser colectados y almacenados a 20 °C, además de contener significativamente mayor cantidad de clorofila. E incluso una mayor cantidad de proteína soluble extraída de los floretes después de la colecta en comparación con las plantas del tipo silvestre.

Lo descrito con anterioridad indica que las actividades de proteasas parecen tener un papel preponderante en la respuesta del rechazo del polen en *Nicotiana*. Sin embargo, a la fecha no se han identificado a la(s) proteasa(s) que degradan a las proteínas que participan en la AI como: HT-B, 120K, S-RNasa y *NaStEP*. De esta manera, un candidato interesante a considerar es la aleuraína, una proteasa que colocaliza en la vacuola del TP con las S-RNasas y 120K (Goldraij *et al.*, 2006).

2. HIPÓTESIS

La actividad de proteasa de la aleuraina dentro de los tubos polínicos de especies autoincompatibles de *Nicotiana* es esencial en la respuesta del rechazo del polen propio.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar si la aleuraina es una proteasa que posee una función esencial en la respuesta al rechazo del polen propio en *Nicotiana*.

3.2. Objetivos particulares

- Caracterizar la expresión de la aleuraina en diferentes tejidos de *Nicotiana*.
- Generar una construcción específica para producir un RNAi de aleuraina en polen.
- Transformar granos de polen de *N. alata* para suprimir la expresión de la aleuraina en tubos polínicos.
- Evaluar el efecto de la supresión de la aleuraina cruzas autoincompatibles.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el propósito de saber si la aleuraína es una proteasa que podría tener un papel en la respuesta del rechazo del polen, se transformó genéticamente polen S_{A_2} con un plásmido capaz de sintetizar un RNAi específico para la aleuraína en el polen y tubos polínicos. El polen transformado se utilizó para polinizar pistilos en $S_{A_2}S_{A_2}$ con el fin de observar si con la disminución de esta proteína los tubos polínicos son capaces de llegar hasta la base del pistilo, es decir, si se rompe el mecanismo de autoincompatibilidad.

En esta sección se describen los protocolos utilizados para la clonación y determinación de la secuencia de la aleuraína en *Nicotiana alata*, síntesis del plásmido capaz de generar un RNAi específico de la aleuraína en polen, determinación de la cinética de la aleuraína en tubos polínicos, transformación genética y observación mediante fluorescencia de los tubos polínicos en pistilos polinizados.

4.1. Amplificación del cDNA de la aleuraína de *N. alata*

La secuencia del cDNA de la aleuraína no se encuentra reportada para *N. alata*, por lo que determinarla resultó muy importante en toda la metodología y para ello se realizaron los procedimientos descritos a continuación.

4.1.1. Extracción de RNA total

Se extrajo RNA total a partir de 100 mg de muestra (hoja, polen, anteras, pistilos, etc. de *N. alata*). La muestra fue homogeneizada con mortero y pistilo utilizando nitrógeno líquido, una vez pulverizada, se recolectó en tubos para centrifuga de 1.5 mL, se resuspendió en 1 mL de Trizol® y se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente para lograr una completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se le añadieron 0.2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente mediante inversión y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos y se colocó la fase acuosa en un tubo distinto que contenía 0.5 mL de isopropanol. Se incubó a 4 °C durante 10 minutos y luego se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue removido dejando el botón de RNA, el

cual se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Se centrifugó y se dejó secar por 10 minutos. El RNA fue resuspendido en 30 μ L de agua destilada estéril.

Se cuantificó el RNA en NanoDrop2000 (Thermo Scientific), se ajustó la concentración de RNA total a 100 ng por cada microlitro. Se determinó la integridad del RNA extraído mediante el corrimiento electroforético de las muestras en geles desnaturizantes que contienen lo siguiente: agarosa 0.6g, agua DEPC 23.1 mL (1.5 mL DEPC:3.5 mL agua destilada), buffer MAE 10X (MOPS 200 mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM) 3 mL, formaldehído 30% 2.43 mL y bromuro de etidio 0.5 μ L (0.5 mg/mL). A las muestras se les añadió buffer FRB (formamida 50%, azul de bromofenol 0.1% y xilencianol 0.1% en solución 1 mM de EDTA, pH 8) y se incubaron a 65 °C durante diez minutos antes del cargado.

4.1.2. Síntesis de cDNA y RT-PCR

La síntesis del cDNA se realizó a partir de 3 μ g de RNA total tratado con DNasaI de acuerdo con el protocolo de Transcriptasa reversa M-MLV (Sigma). En un tubo de 200 μ L se añadieron los siguientes reactivos: 1 μ L de dNTPs (2.5 mM), 1 μ L de oligo dT (10 mM), 3 μ L de RNA total y 5 μ L de agua DEPC. La mezcla se homogenizó con ayuda de una pipeta y se incubó 10 minutos a 70 °C. Luego, se colocó en hielo y se le añadieron 4 μ L de buffer 5X M-MLV retrotranscriptasa, 1 μ L de retrotranscriptasa y 5 μ L de H₂O. Se incubó la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente y después 50 minutos a 37 °C. Posteriormente, la enzima fue inactivada a 85 °C durante 10 minutos. El cDNA de una sola cadena se utilizó para hacer PCR punto final y fue almacenado a -20 °C.

Con el cDNA extraído ya sea de hojas, anteras, granos de polen, tubos polínicos etc., se realizaron PCRs punto final con las siguientes condiciones 5 μ L de Dream Taq PCR Master Mix (2X), 0.25 μ L (10 μ M) de oligonucleótidos Aleu Fwd (5'- 3') y Aleu Rv (5'- GTC GAC GAA TTC TCA GGC AAC GAC AGG GTA-3'), 1 μ L de cDNA de la muestra correspondiente y 3.5 μ L de agua libre de nucleasas. Los ciclos de la PCR utilizados fueron: desnaturalización inicial 3 minutos a 95 °C, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 58 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1

minuto, además de una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Estas condiciones se utilizaron con el fin de detectar la presencia del transcrito de la aleuraína en diversos tejidos.

En caso de realizar una PCR semicuantitativa se estandarizaron las cantidades de cDNA que debían utilizarse con base en la presencia del transcrito del gen de la ubiquitina con los oligonucleótidos Ubq Fw 5'-GACAAGGTGACGGGTTGACT-3' y Ub Rv 5'-AGATCCAGGACAAGGAGGGT-3'. Una vez estandarizado se se realizó el PCR semicuantitativo de la aleuraína con los oligonucleótidos Fwd 5'-TTGCCAGAGACGAAAGACTGGAGGGAAGCGT-3' y Rev 5'-AGGGTAGGATGCGCAAGTTGCAATACCACACT-3', utilizando como estándar nuevamente al gen de la ubiquitina. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 58 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min, además de una extensión final a 72 °C durante 5 min.

4.1.3. Clonación del cDNA de la Aleuraína

Con base en alineamientos realizados con Clustal O (1. 2. 4) multiple sequence alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools>) utilizando secuencias de cDNA completo y homólogas en *Petunia*, *Oryza*, *Zea* y *Arabidopsis* (Anexo 1), se diseñaron oligonucleótidos en regiones conservadas del cDNA de aleuraína con el fin de obtener un amplicón utilizando cDNA total de *N. alata*. Los oligos se diseñaron con base en la secuencia de *Petunia* ya que es una planta perteneciente a la misma familia (Solanaceae). Los oligos utilizados fueron AleuPe Fwd 5'-TTGCCAGAGACGAAAGACTGGAGGGAAGCGT-3' y AleuPe Rev 5'-AGGGTAGGATGCGCAAGTTGCAATACCACACT-3'. Para ello se utilizó a la polimerasa DreamTaq®, la cual deja extremos cohesivos A-3' útiles en la clonación del tipo TA utilizada en el vector pGEM (Figura 5).

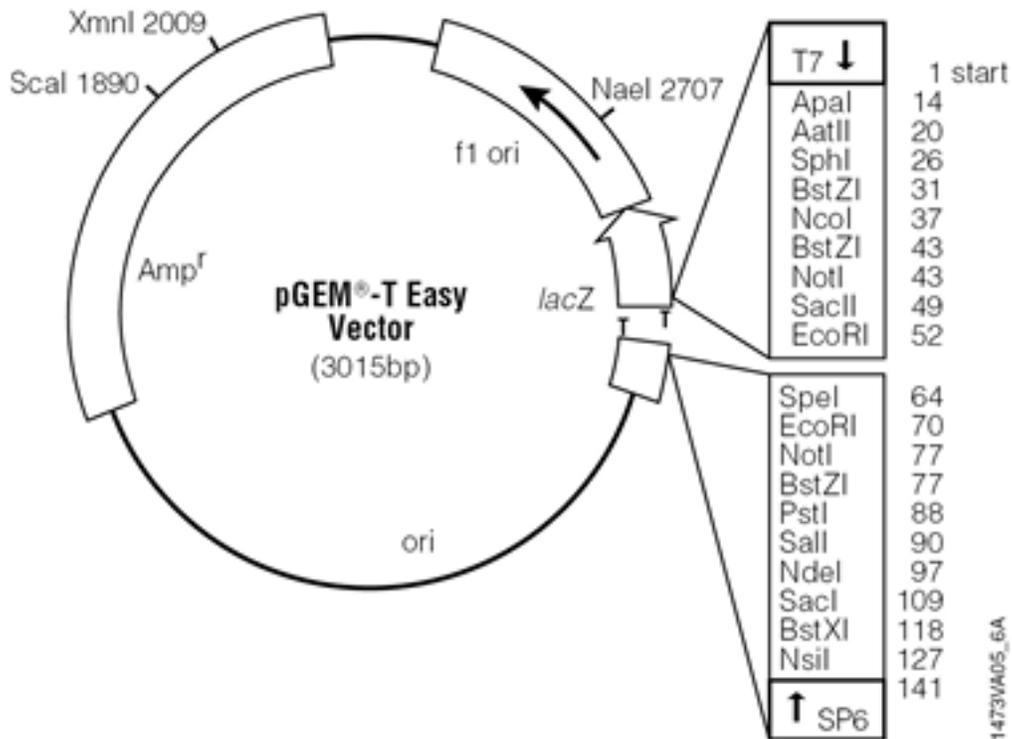


Figura 5. Esquema del vector pGEM-T. Se observa el sitio de clonación tipo TA, el MCS (*lacZ*), marcador de selección (Amp^r) y un sitio de origen de replicación (*f1 ori*). El vector de clonación contiene el sitio de clonación múltiple dentro del gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa. Cuando se añade IPTG se induce la transcripción del gen *lacZ*. Si el inserto fue ligado correctamente en el sitio de clonación múltiple entonces no hay coloración.

La reacción de PCR contenía los siguientes reactivos: 5 μ L de Dream Taq PCR Master Mix (2X), 0.25 μ L (10 μ M) de oligonucleótidos, 1 μ L de cDNA de *N. alata* y 3.5 μ L de agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 3 minutos a 95 $^{\circ}$ C, 30 ciclos de desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C por 30 segundos, alineamiento a 58 $^{\circ}$ C por 30 segundos y extensión a 72 $^{\circ}$ C por 1 minuto, además de una extensión final a 72 $^{\circ}$ C durante 5 minutos.

Se realizó una electroforesis de la reacción de PCR y se purificó a partir de agarosa el amplicón deseado. Este fragmento de DNA se utilizó para hacer la reacción de clonación la cual contenía los siguientes reactivos: 2.5 μ L de 2X *Rapid Ligation Buffer*, T4 DNA *Ligase*, 0.5 μ L pGEM[®]-T *Easy Vector*, 1.5 μ L de inserto (100 ng), 0.5 μ L T4 DNA *Ligase* (3 Weiss units/ μ L) en un volumen total de 5 μ L. La reacción fue incubada durante una hora a temperatura ambiente. Se transformó una cepa de *E. coli* (One Shot [®] TOP 10 Competent Cells) quimiocompetente con 2 μ L de la reacción de

acuerdo al protocolo de transformación bacteriana mostrado a continuación. Las colonias fueron analizadas mediante *White/blue screening* en medio selectivo (LB con ampicilina 100 µg, IPTG 0.1 mM y X-gal (100 µg)).

Cabe mencionar que una vez confirmada la presencia de un transcrito correspondiente al de la aleuraína se diseñaron oligonucleótidos para abarcar el cDNA correspondiente marco de lectura completo de la aleuraína, es decir, los oligos Aleu Fwd (5'-CAC CGG ATC CGG ACC GGC TAC CTT CG-3') y Aleu Rv (5'-GTC GAC GAA TTC TCA GGC AAC GAC AGG GTA-3') y se determinó utilizando los mismos pasos descritos con anterioridad.

4.1.2. Transformación bacteriana

Para este procedimiento se debe preparar previamente cajas con medio LB sólido (0.5 g de NaCl, 0.5 g de extracto de levadura, 1 g de peptona y 1.5 g de agar en 100 mL de agua) con el antibiótico deseado (100 µL de ampicilina, 100 µL de kanamicina, 50 µL de espectinomicina o 50 µL de cloramfenicol en concentraciones de 100 mg/mL).

Se colocó en hielo un tubo de la cepa de *E. coli* One Shot® TOP 10 Competent Cells, se añadió 1-5 µL de reacción de ligación/plásmido y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos. Se incubó exactamente por 30 segundos en 42 °C en un termobloque e inmediatamente se colocó en hielo. Se añadieron 250 µL de medio S.O.C. estéril al tubo. Se dejó incubando a 37 °C por 1 hora en agitación a 225 rpm. Se plaquearon 50 µL de las células en el medio LB con el antibiótico correspondiente y se dejó incubar a 37 °C toda la noche. Las colonias se analizaron mediante extracción de plásmido, PCR o secuenciación.

4.1.3. Extracción de plásmido MiniPrep

Para este procedimiento se utilizó el kit Zippy™ Plasmid Miniprep Kit. Primero, se sembró una colonia aislada en 3 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente y se incubó a 37 °C con agitación a 140 rpm, durante 16 horas. Se centrifugó el cultivo a máxima 14,000 r.p.m. durante un minuto. Se decantó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 600 µL de H₂O. A la reacción se le añadieron 100 µL de 7X *Lysis Buffer* y se mezcló por inmersión con una incubación posterior de 2 minutos a

temperatura ambiente. Fueron añadidos 350 μ L de *Neutralization buffer* que contiene RNasa y se mezcló por inversión. La reacción fue centrifugada a 16,000g por 4 minutos. El sobrenadante fue transferido a una columna Zymo-Spin INN sobre un tubo colector y centrifugado a 16,000 g por 15 segundos. Se descartó el líquido del tubo colector y se añadieron 200 μ L de *Endo Wash Buffer* y se centrifugó por 30 s. Luego se añadieron 400 μ L de *Zyppy Wash Buffer* y se centrifugaron a 16,000 g por 1 min. La columna fue transferida a un tubo de 1.5 mL y se añadieron 30 μ L de agua de grado molecular. Se dejó incubando 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó para recuperar el DNA en el tubo. El DNA plasmídico fue cuantificado a 260 nm utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se secuenció el inserto en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

4.1.4. Análisis bioinformático

La identificación de la secuencia de nucleótidos fue establecida usando el programa NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Altschul *et al.*, 1997). Las herramientas bioinformáticas disponibles en el sitio (<http://expasy.org>) fueron utilizadas para analizar la proteína deducida. Al igual que el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la aleuraína respecto a las de otras especies realizado con Clustal O (1. 2. 4) multiple sequence alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools>) (Anexo 2). Los dominios estructurales y características fueron analizados de acuerdo a la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>, Rawlings *et al.*, 2006).

4.2. Obtención de pBA- Aleuraína RNAi

4.2.1. Síntesis de pBA-Aleuraína RNAi

La obtención de una construcción en un plásmido capaz de dirigir la síntesis de un RNAi específico para la aleuraína fue necesaria para determinar si esta proteasa tiene alguna implicación en la respuesta de rechazo del tubo polínico en *Nicotiana*. Una vez conocida la secuencia de la aleuraína para *N. alata* se utilizó el fragmento de cDNA correspondiente a la aleuraína para insertarlo en el plásmido pBA-DC RNAi, diseñado para sintetizar RNAi. Este plásmido consta de un promotor CaMV 35S, un

sitio de recombinación attR1 → attR2, un intrón del gen *WRKY*, un sitio de recombinación attR2 → attR1, un terminador de la transcripción, un marcador de selección de resistencia a espectinomicina. Además entre cada sitio de recombinación se encuentra codificado el cassette de genes de resistencia a cloranfenicol y *ccdB*, los cuales son sustituidos por el cDNA de la aleuraina (correspondiente al marco de lectura abierto) después de la recombinación mediada por la LR clonasa. Cabe mencionar que se ha reportado que el promotor CaMV 35S promueve la expresión de genes a niveles muy bajos respecto a genes constitutivos en granos de polen y tubos polínicos, por lo que se optó por cambiar el promotor por el de *NTP303* cuyo gen bajo su regulación se expresa a niveles superiores en el polen (Hulzink *et al.*, 2002).

Se utilizaron los oligonucleótidos AleuF (5'- CAC CGG ATC CGG ACC GGC TAC CTT CG - 3') y AleuR (5'- GTC GAC GAA TTC TCA GGC AAC GAC AGG GTA -3') para amplificar el cDNA correspondiente a la región codificante del gen de la aleuraina. Se estandarizaron las condiciones de PCR con el kit DreamTaq Master Mix 2X. Luego, se continuó con la purificación del amplicón a partir del gel de agarosa. Este se introdujo al vector de clonación pENTR/D-TOPO (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 6a). Y se realizó la transformación de bacterias *E. coli* químicamente competentes *E. coli* One Shot Match1 (Thermo). Éstas se plaquearon en medio LB sólido con kanamicina (100 µL/mL). La colonias se analizaron mediante PCR y el uso de enzimas de restricción. El vector de entrada pENTR D-TOPO (Figura 9a) brinda la posibilidad de insertar el gen con una dirección específica, añadiéndole a uno de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen de interés cuatro nucleótidos (5'-CACC-3'), además, el vector posee los sitios de recombinación attL1 y attL2, que flanquean al inserto de interés, los cuales son útiles para transferir este segmento de DNA a un vector de salida (Gateway) que posea los sitios attR1 y attR2, mediante una reacción de recombinación LR.

El plásmido pBA-DC-RNAi, ha sido diseñado con el fin de generar RNA interferente (RNAi) y con ello silenciar un gen de interés. El plásmido pBA-DC RNAi posee dos sitios attR1 y dos sitios attR2 que se encuentran posicionados de tal manera que una vez que se lleva a cabo la reacción LR, un cDNA queda en sentido y otro en antisentido, separados con un fragmento del intrón *WRKY*, con el fin se produzca un

RNA de doble cadena (dsRNA) en el tejido u organismo transgénico. En este caso, era necesario generar un RNAi específico para regular postranscripcionalmente a la aleuraína en el polen (Jang *et al.*, 2007). Las colonias positivas se aislaron y se utilizaron para la purificación de plásmido con el inserto de interés. Se realizó una reacción de recombinación LR entre los plásmidos pENTR:aleuraína y pBA-DC RNAi (Figura 6b), mediante el uso de la enzima LR clonasa siguiendo las instrucciones del kit Gateway LR Clonase *Enzyme Mix* (Figura 6c). Se transformaron bacterias *E. coli* químicamente competentes One Shot TOP10. Se seleccionaron las colonias en medio LB sólido con espectinomicina (100 µL/mL). Las colonias resultantes se colocaron en cajas petri con medio LB sólido que contenían espectinomicina (100 µL/mL) con cloranfenicol (50 µL/mL), en conjunto con la misma colonia nuevamente en espectinomicina (100 µL/mL). Se analizaron aquellas colonias que únicamente crecieron en espectinomicina, pero no en espectinomicina con cloranfenicol. Se extrajo plásmido de estas colonias y se analizaron mediante PCR y con enzimas de restricción. Se intentó llevar a cabo la amplificación de todo el cassette de silenciamiento (Sentido/Intrón/Antisentido) únicamente con el oligonucleótido forward pero no se tuvo éxito. Por lo que se decidió continuar el análisis con enzimas de restricción que pudieran extraer todo el cassette de aleuraína RNAi (sentido-WRKY-antisentido), con las enzimas *XhoI* y *SacI*, por lo que se observó un fragmento mediante el corrimiento electroforético de alrededor de 3,300 pb, el se purificó y fue analizado por restricción el cual debía ser cortado en dos fragmentos en por la enzima *HindIII* en un extremo del intrón *WRKY* cercano al cDNA en sentido. Los resultados fueron confirmados mediante secuenciación. El promotor CaMV 35S fue removido del plásmido pBA-DC RNAi mediante enzimas de restricción (*pPumi* y *XhoI*) e intercambiado el promotor de NTP303, un promotor específico de polen de *N. tabacum*.

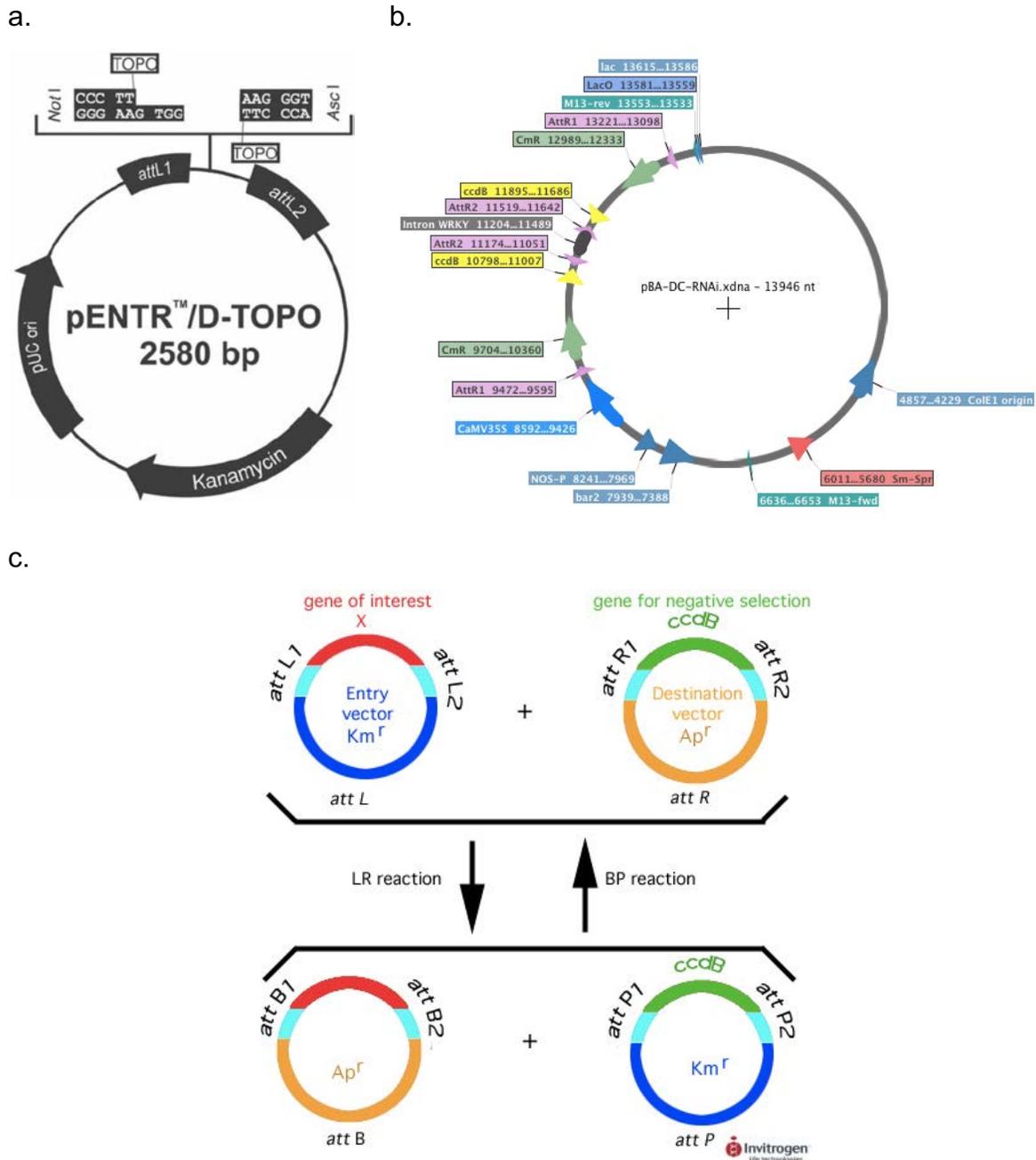


Figura 6. Plásmidos pENTR™/S-TOPO y pBA-DC. Se observan los plásmidos utilizados para la síntesis del plásmido capaz de generar un RNAi para la aleuraina pBA-Aleuraina RNAi. **a.** Plásmido pENTR donde se observa a las topoisomerasas que ayudarán a darle una dirección al inserto el cual contiene un extremo 5'-CACC, además de que se encuentra flanqueado por los sitios de recombinación attL1 y attL2. Este plásmido posee un marcador de selección de resistencia a kanamicina y un sitio de origen pUC ori. **b.** Se observa el plásmido pBA-DC el cual posee dos sitios de recombinación en sentido y antisentido flanqueados por las secuencias attR1 y attR2 e incluyen al gen *ccdB* y a *cmr^r*, además ambos sitios se encuentran separados por el intron WRKY. Este cassette para generar un consta del promotor CaMV 35S. Además de los genes de resistencia a espectinomicina, BASTA y un sitio de replicación Col1E. **c.** Esquema del proceso de recombinación LR.

4.2.2. Purificación de pBA-Aleuraína (MaxiPrep)

Se incubó la cepa transformada con el plásmido pBA-Aeluraína RNAi en 2 mL de medio LB selectivo durante 6 horas, se inoculó esta mismo cultivo en 500 mL de medio LB empleando un matraz de 2 L y se dejó incubando en agitación durante una noche. Se centrifugó el cultivo a 6,000 rpm por 10 minutos a 4 °C en dos frascos de 250 mL, la pastilla fue resuspendida en 5 mL de la solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH8), se le añadió 10 mL de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se agitó suavemente. Se añadió 7.5 mL de solución III (NaCH₃COO-3H₂O 3M, pH 5) y se mezcló por inversión seguido de una incubación en hielo por 30 minutos. Se centrifugó a 9,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se añadió un volumen de isopropanol frío. Se incubó a -20°C por una noche y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, para luego disolverla en 3 mL de H₂O, y adicionar 3 mL de LiCl 5M frío. Se mezcló y se centrifugó a 9,000 rpm durante 10 minutos. Se decanto cuidadosamente para disolver la pastilla en 0.5 de H₂O que contenga 10 µL de RNasa libre de DNasa y se dejó incubar a 37 °C en un tubo de 1.5 mL. Se adicionaron 0.5 mL de NaCl 1.6 M y PEG 8000 13%, se mezcló y se centrifugó a 13,000 rmp por 5 min a 4 °C.

Se eliminó el sobrenadante, se disolvió la pastilla en 0.5 mL de H₂O, se agregó 0.5 de PCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 24:25:1) y se agitó con vórtex. Se centrifugó a máxima velocidad y se recuperó la fase acuosa. Se añadieron 2/3 del volumen de acetato de amonio (10 M) y 2 volúmenes de etanol. Se homogenizó por inversión y se incubó toda la noche.

Se centrifugó a 14,000 por 15 minutos y se lavó dos veces con 1 mL de etanol 70% recuperando la pastilla después de centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos cada uno. Se secó la pastilla utilizando *speedback* y se resuspendió en 200 µL de H₂O.

4.3. Vida media e inmunolocalización de la aleuraína en tubos polínicos

4.3.1. Germinación in vitro de tubos polínicos

La germinación de tubos polínicos se llevó a cabo en cajas de Petri de vidrio esterilizadas con medio líquido de germinación especial para *Nicotiana* a 30 °C medio de germinación posee las siguientes características:

- 1 mM KNO₃
- 1.6 mM H₃BO₃
- 0.8 mM MgSO₄
- 3 mM Ca(NO₃)₂ 4H₂O
- 10 mM MES pH 6.0
- 2% Sacarosa
- 14% PEG 4000

En 1 mL de medio debe germinarse aproximadamente 20,000 granos de polen (aproximadamente el polen de 4 flores de *N. alata* o bien 0.0028 g). Con este medio se puede observar que más del 90% del polen ha germinado a las 2 horas de incubación. Para recuperar los tubos polínicos se utilizó el sistema de filtración de vacío.

4.3.2. Determinación de la vida media de la aleuraína en tubos polínicos

Se recolectó polen fresco y se incubó en 8 cajas Petri 0.1 g de polen con 5 mL del medio de germinación previamente descrito para cada una durante 1 hora a 30 °C, a 6 cajas se les añadió cicloheximida a una concentración final de 50 µg /mL y se les dejó incubando durante 30 minutos más, a una caja utilizada como control se añadió el volumen correspondiente de DMSO (excipiente de la cicloheximida) para ser utilizado como control. Luego se centrifugaron los tubos polínicos para eliminar el medio con el antibiótico y se dieron dos lavados con medio de germinación. Y se volvieron a colocar en cajas Petri durante diferentes tiempos. Se extrajo proteína total de tubos polínicos con buffer de acetato de sodio 50 mM, NaCl 50 mM con la

concentración recomendada del fabricante de inhibidor de proteasas Complete de Roche. Se analizó la presencia de la aleuraina mediante *Western blot* para inferir la vida media de la proteasa.

La inmunolocalización mediante *Western blot* se realizó siguiendo las siguientes condiciones: Se realizó el corrimiento electroforético de 10 µg de proteína total en geles de poliacrilamida al 12%. Se realizó la transferencia semiseca de las proteínas del gel a una membrana de PVDF de 0.45 µm. A continuación realizó un bloqueo de la membrana, para posteriormente ser incubada con el anticuerpo primario monoclonal (anti-aleuraina de ratón 1:10,000, Rogers *et al.*, 1997) durante toda una noche. Luego fue incubado con anticuerpo de cabra, anti-ratón 1:10,000 acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich™) durante 1 h 30 min. Esta enzima presenta actividad cuando la membrana es incubada en 10 mL de una solución pH 9.5 (Tris 12.1 g/L, NaCl₂ 5.8 g/L y MgCl₂ 1 g/L), 100 µL de *Nitrotetrazolium Blue Chloride* (33 mg / mL en dimetilsulfóxido al 70%) y 100 µL de una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo-fosfato (17 mg/ml en DMSO).

4.3.3. Inmunolocalización de la aleuraina en tubos polínicos

Para determinar la localización de aleuraina en tubos polínicos a diferentes tiempos, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica (inmunolocalización). Para ello, se utilizaron tubos polínicos en diferentes tiempos de germinación (5 y 20 h) y fueron fijados en una solución de 4% formaldehído disuelto en PBS 1x, a 4°C durante una noche. Después de la fijación, fueron enjuagados cinco veces con buffer PBS, durante cinco minutos en cada lavado. Posteriormente los tubos polínicos se deshidrataron al sumergirse en una serie gradual de etanol a diferentes concentraciones (30, 50, y 70 %) durante media hora en cada una de las concentraciones, y permanecieron en etanol 70 % toda la noche. Los tubos polínicos fueron montados en portaobjetos especiales cargados positivamente con con poli-L-lisina. Se dejaron secar los portaobjetos durante 24 horas para maximizar la fijación de los tubos polínicos a estos.

Se realizaron dos enjuagues para rehidratar a los tubos polínicos con buffer PBS, cada enjuague duró 5 minutos. Una vez hidratados, se delimitó el área del corte con un

marcador hidrofóbico (Pan Pen®) y se agregaron al centro del portaobjetos aproximadamente 300 µl de solución de bloqueo (BSA al 10% en PBS). Los tubos polínicos se incubaron en esta solución por una hora en una cámara húmeda. Se realizaron tres enjuagues de 5 minutos cada uno con PBS, y se agregó el anticuerpo primario (α -aleuraína en ratón, a concentración 1:200 en solución de bloqueo) y se dejó incubar una noche a 4°C en una cámara húmeda. Se realizaron tres enjuagues de 5 minutos cada uno con PBS y se agregó el anticuerpo secundario (α -ratón conjugado al fluoróforo Alexa-568®) y los tubos se incubaron a 4°C en oscuridad durante cuatro horas en una cámara húmeda. Se realizaron tres enjuagues de 5 minutos cada uno con PBS. Las preparaciones se montaron con un medio de montaje con DAPI, y las observaciones se realizaron en un microscopio confocal de fluorescencia.

4.4. Transformación de polen mediante bombardeo

Para transformar genéticamente polen de *Nicotiana* se utilizó la técnica de bombardeo con partículas de tungsteno recubiertas con diferentes plásmidos, ya sea con un plásmido capaz de expresar de manera transitoria a GFP para confirmar la transformación exitosa del polen, o bien, uno que nos permita silenciar a la aleuraína y observar que ocurre con el mecanismo de la autoincompatibilidad una vez llevada acabo la polinización.

4.4.1. Recubrimiento de partículas de tungsteno con DNA

Las partículas fueron preparadas de acuerdo a lo descrito a continuación. Se agitaron micropartículas de tungsteno conservadas en glicerol (60 µg/100 µL) por 5 minutos en vórtex y se prepararon alícuotas de 50 µL en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Se agregaron 5 µL de DNA plasmídico indicados en la tabla 1 (1 µg/µL), posteriormente 50 µL de CaCl₂ (2.5 M) y 20 µL finalmente espermidina (0.1 M), estos dos últimos reactivos funcionan en la adhesión del DNA a las micropartículas y a la estabilidad del DNA. Se mezclaron los reactivos mediante agitación suave y luego se dejó incubando por 30 minutos en hielo, alternados con varios ciclos de agitación breve y suave. Las partículas ya recubiertas se lavaron justo antes de distribuirlas en el *macrocarrier*, esto con el fin de prolongar el tiempo de incubación de la unión del DNA con las partículas.

Para realizar el lavado de partículas, se centrifugaron a máxima velocidad por 60 segundos y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 140 μ L de etanol al 70% y se agitó muy suavemente para homogenizar, se centrifugó y se desechó nuevamente el sobrenadante. Se repitieron los mismos pasos del lavado anterior pero en esta ocasión utilizando etanol absoluto y para finalmente resuspender las partículas las en 50 μ L de etanol absoluto. Las partículas se aplicaron y distribuyeron sobre el centro del *macrocarrier* previamente ajustado al *macrocarrier holder*. Se esperaron 5 minutos para permitir que se evaporara todo el etanol, de manera que las partículas quedaran adheridas al *macrocarrier* y que fueran capaces de desprenderse de él al momento de realizar el disparo.

4.4.2. Preparación de granos de polen para expresión transitoria

En cuanto a la preparación del polen para ser transformado, se colectaron 50 mg polen un día antes de la realización de cada bombardeo. Cada vez que el polen fue colectado se tomaron 5 mg, los cuales se utilizaron para hacer germinación *in vitro* en medio líquido con el fin de para verificar su viabilidad y capacidad de germinar. Cualquier colecta de polen con problemas en la germinación fue descartada.

En cajas petri de 35 mm con 1 mL de medio sólido de germinación de tubos polínicos de *Nicotiana* (1 mM KNO₃, 1.6 mM H₃BO₃, 0.8 mM MgSO₄, 3 mM Ca(NO₃)₂ 4H₂O, 10 mM MES pH 6.0, 8% sacarosa y 0.8 % agarosa) se colocaron 6 mg de polen fresco resuspendido en 50 μ L del mismo medio pero sin agarosa. El polen fue distribuido de manera uniforme sobre la superficie de la caja Petri con movimientos circulares. Cada muestra recibió dos disparos, para aumentar la eficiencia de transformación.

Es importante mencionar que el polen transformado fue colectado de flores de la misma planta que poseía las flores que fueron seleccionadas para ser emasculadas y posteriormente polinizadas. Además, los pistilos polinizados correspondían a los de flores jóvenes en estado desarrollado y completamente funcional.

4.4.3. Transformación de granos de polen mediante bombardeo

Se sumergieron los discos de ruptura rápidamente en isopropanol absoluto, para eliminar su carga electrostática y se colocó uno por cada disparo en el soporte del disco de ruptura. La transformación se llevó a cabo con una presión de helio de 120 psi a una distancia de 10 cm entre el filtro del dispositivo de bombardeo y el material que sería transformado, en estado de vacío de 20-22 in Hg.

4.4.4. Germinación *in vitro* de polen transformado con GFP

Para observar los tubos polínicos transformados con el plásmido pNTP3030::GFP fue necesario después del bombardeo, realizar una resuspensión de los tubos polínicos en medio líquido de cultivo *in vitro*, para lavar las partículas de tungsteno incrustadas al medio de cultivo. Luego, el polen fue depositado en una caja Petri de 6 mm de diámetro recubierta con papel aluminio, en agitación constante de 40 r.p.m. a temperatura ambiente durante un lapso de 8 a 10 horas. Una vez transcurrido este tiempo de germinación, se observaron los tubos polínicos en un microscopio de fluorescencia.

Plásmido	Promotor	Función
pMit-GFP	NTP303	Dirige la expresión de GFP recombinante con una localización mitocondrial.
pPB-Aleuraína RNAi	NTP303	Dirige la transcripción de un RNAi específico para la aleuraína de <i>N. alata</i>

Tabla 1. Plásmidos utilizados en la transformación de polen de *N. alata*.

4.4.5. Polinización y observación de pistilos polinizados mediante fluorescencia

El polen transformado en cajas petri fue lavado con medio de cultivo líquido y recuperado en tubos de 1.5 mL, se realizaron 2 enjuagues para eliminar las partículas de tungsteno libres. Se centrifugó a 6000 rpm durante 10s. Se eliminó la mayor cantidad de sobrenadante. Para poder observar los tubos polínicos crecidos dentro del pistilo, primero, se polinizaron pistilos de flores emasculadas antes de la antesis, ya sea con polen transformado mediante bombardeo o polen silvestre y se permitió el crecimiento de los tubos polínicos durante 72 horas. Se colectaron los pistilos y se colocaron en una solución fijadora de etanol y ácido acético (3:1) durante 24 horas o hasta que la clorofila de los pistilos se perdió. Posteriormente, los pistilos se colocaron

en una solución de sulfito de sodio al 10% y se suavizaron mediante el uso de la autoclave durante 5 minutos. Se transfirieron los pistilos a una solución de azul de anilina 0.1% por lo menos 12 horas a 4 °C. Se montaron los estilos en portaobjetos con un poco de la solución de anilina, se les colocó un cubreobjetos y se selló con barniz transparente. Se observaron los pistilos bajo microscopio de epifluorescencia a 360 nm.

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de la secuencia del cDNA de aleuraína de *N. alata*

Con base en secuencias de cDNAs homólogos de otras plantas como la orizaína del arroz, CCP2 del maíz o PeTH3 de *Petunia*, fue posible obtener un amplicón de un tamaño molecular de alrededor de 1100 pb, presente en hojas jóvenes de *N. alata*. El análisis de secuenciación reveló que el cDNA corresponde a la aleuraína de *Nicotiana alata*, este posee un marco de lectura abierto con una longitud de 1083 bases, el cual codifica a una proteína de 360 aminoácidos con una masa molecular de 38.92 kDa y un punto isoeléctrico de 6.65 estimados (Figura 7a). Dentro del mismo género, únicamente se encuentra reportada una predicción de la secuencia de la aleuraína en tabaco, con la cual, posee un porcentaje de identidad del 96% (Domoto *et al.*, 1995; Tournaire *et al.*, 1996). Además, el análisis de alineamiento de secuencias de tipo local indicó que es homóloga a varias proteínas con secuencias *aleurain-like*, cuya expresión se ve aumentada durante la senescencia en *N. tabacum*, *S. lycopersicum* y *Z. mays* (Eason *et al.*, 2005). Este análisis también indicó que se encuentra altamente conservada respecto a la secuencia de aminoácidos de otros géneros, familias y clases de plantas, e incluso con la catepsina H en humanos, lo que sugiere que la función de esta proteína debe ser muy importante en la fisiología de diversos organismos.

La secuencia de aminoácidos de la proteína fue analizada con el fin de determinar si ésta posee motivos similares a otras proteasas, si presenta péptido señal, si posee un sitio de procesamiento postranscripcional, etc. Las proteasas se encuentran clasificadas dentro de distintas familias. De acuerdo con un número de características estructurales encontradas en la secuencia de *N. alata* que son detalladas a continuación, se corroboró que la secuencia analizada pertenecía a las peptidasas de la familia C1.

El análisis de hidropatía de la secuencia de la aleuraína de *N. alata* deducida con el código genético universal indicó que la secuencia posee un péptido señal en el extremo N-terminal, comprendiendo los aminoácidos 1 al 22, el cual se hipotetiza que

funciona en la translocación de la preproteína al retículo endoplásmico, este extremo hidrofóbico sería cortado por un péptido señal peptidasa después del Asn 22. Después de este proceso se generaría una proteína con un tamaño molecular de 36.75 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6.36 estimados. La comparación entre la aleuraína de *N. alata*, NTCP-23 y orizaína gamma reveló que comparten un motivo de unión 31NPIRQV (Anexo 2) al receptor vacuolar BP-80, lo que sugiere que una vez que los ribosomas que se encuentran sintetizando a esta proteína se unen al retículo endoplásmico rugoso, las proteínas entran a través de la membrana del retículo cotraduccionalmente. Las proteínas solubles se colocan en el lumen del retículo y subsecuentemente son llevadas a las vacuolas líticas (Figura 7a).

En la secuencia del cDNA de la aleuraína también se encuentra codificado un dominio inhibidor de proteasa I-29 presente en otras proteínas homólogas, el cual sería removido por una proteasa de maduración de la aleuraína, dejando a la aleuraína en su forma nativa con un tamaño calculado de 23.26 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 4.49. Aunque de acuerdo con lo reportado, la masa molecular aparente de la proteína es mayor en análisis de western blot debido a que la aleuraína posee dos glicosilaciones como modificaciones postraduccionales, cuyos sitios de glicosilación corresponden a los aminoácidos 127NCS (asparagina-cisteína-serina) y 256 NIT (asparagina-isoleucina-treonina) en *N. alata* (Figura 7b). Además, el análisis indicó que la aleuraína posee también un dominio catalítico de peptidasa del tipo C1-A, la triada catalítica cisteína-histidina-asparagina (167C-307H-327N), los sitios activos 160Q (glutamina), 305N (asparagina), 327S (serina), y 328W (triptófano), los residuos de cisteína para la formación de puentes disulfuro, que le brindan una gran estabilidad a la proteasa en un ambiente ácido (164C, 198C, 240C, 298C), y el sitio potencial de corte (143L) de procesamiento postranscripcional (Figura 7b). También, el motivo ERFNIN de las proteasas de cisteína en las catepsinas H y L humanas se encuentra presente en la secuencia de aminoácidos de la aleuraína de *N. alata* (Ueda *et al.*, 2000).

a.

```

ATGTCCTCGTTTCTCACTCCTATTGGCTCTCGTCGTTGCCGGTGGCCTTTTCGCCGCCGCACTCGCCGGGCGGACCTTCGCCGATGAGAATCCGATT < 99
M S R F S L L L A L V V A G G L F A A A L A G P A T F A D E N P I
    10      20      30      40      50      60      70      80      90

AGGCAAGTCGTTTCCGACGTTTACATGAGCTGGAGAACGGAATTCCTCAAGTCGTCGGCCAACTCGCCATGCTCTCTCCTTCGCTCGTTTGCTCAC < 198
R Q V V S D G L H E L E N G I L Q V V G Q T R H A L S F A R F A H
    100     110     120     130     140     150     160     170     180     190

AGGTATGGGAAGAGGTACGAGTCAGTAGAGGAGATAAAGCAAAGGTCGAGGATTTCTGGACAATTTGAAGATGATTCGATTCATAACAAAAAGGA < 297
R Y G K R Y E S V E E I K Q R F E V F L D N L K M I R S H N K K G
    200     210     220     230     240     250     260     270     280     290

TTATCATACAAACTCGGCGTCAATGAGTTTACTGATCTAACACGGGATGAGTTCGGGAGAGACAGGTTGGGGGCGAGCTCAAACGTTTCAGCCACCACA < 396
L S Y K L G V N E F T D L T R D E F R R D R L G A A Q N C S A T T
    300     310     320     330     340     350     360     370     380     390

AAGGCAATCTCAAGCTCACTAGCGCCGTTCTGCCGGAGACGAAAGACTGGAGGGAAGCTGGGATTTGACCCAGTCAAGAATCAGGGCAAGTGCGGA < 495
K G N L K L T S A V L P E T K D W R E A G I V S P V K N Q G K C G
    400     410     420     430     440     450     460     470     480     490

TCTTGCTGGACATTCAGCACTACTGGTGCCTAGAACGAGCATATAGCCAAGCATTGGGAAGGGAATCTCTCTATCTGAGCAGCAGCTTGTGGAGTGT < 594
S C W T F S T T G A L E A A Y S Q A F G K G I S L S E Q Q L V D C
    500     510     520     530     540     550     560     570     580     590

GCTGGAGCTTTTAATAACTTTGGCTGCAATGGTGGGCTCCCATCACAAGCCTTTGAGTATATTAATCCAATGGTGGTCTTGACACTGAAGAAGCATAT < 693
A G A F N N F G C N G G L P S Q A F E Y I K S N G G L D T E E A Y
    600     610     620     630     640     650     660     670     680     690

CCATCACTGGCAAGAATGGCTTATGTAATTTCTCATCAGAAAATGTTGGTGTCAAAGTCATCGATTCTGTCAATATTACCCTGGGTGCTGAAGATGAA < 792
P Y T G K N G L C K F S S E N V G V K V I D S V N I T L G A E D E
    700     710     720     730     740     750     760     770     780     790

CTAAAATACCGGTTGCATTTGGTTAGGCCGTTAGTATAGCTTTGAGGTGATAGAAGGTTTCAAACAATACAAGAGTGGTGTATACAGCAGCACAGAA < 891
L K Y A V A L V R P V S I A F E V I E G F K Q Y K S G V Y S S T E
    800     810     820     830     840     850     860     870     880     890

TGGCGCAACTCCCATGGATGTAACCATGCTGTTCTTGCTGTGGGTTACGGCGTTGAAAATGGTGTTCCTTATTGGCTCATCAAGAATTCATGGGGA < 990
C G N T P M D V N H A V L A V G Y G V E N G V P Y W L I K N S W G
    900     910     920     930     940     950     960     970     980

GCAGATTTGGGTGACAACGGATACTTTAAAATGGAGATGGGAAAGAACATGTGTGGTATTGCCACTTGGCATCTACCCCTGTCGTTGCCTGA < 1083
A D W G D N G Y F K M E M G K N M C G I A T C A S Y P V V A *
    1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080

```

b.

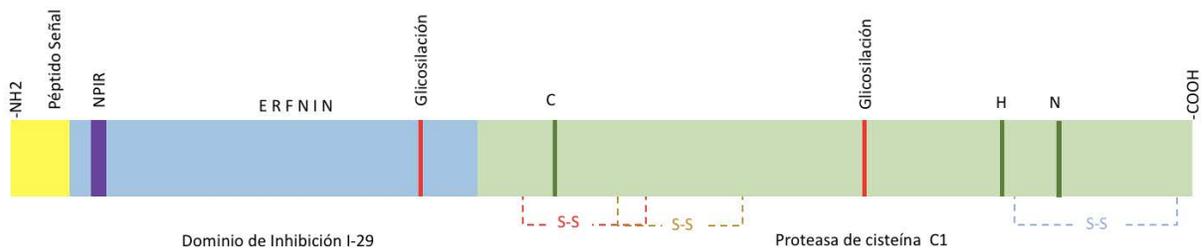


Figura 7. Secuencia del cDNA y aminoácidos de la aleuraína de *N. alata*.

a. Secuencia del marco de lectura abierto (1083 pb) y de aminoácidos (360 aa) de la aleuraína de *N. alata*. **b.** Esquema de la estructura de la aleuraína, el cual posee un péptido señal, en el extremo amino, un dominio de inhibición de proteasas y un dominio catalítico de proteasas de cisteína de la familia C1.

5.2. Análisis de la expresión de la aleuraína en *Nicotiana*

Por otro lado, mediante un inmunoanálisis utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal primario anti-aleuraína de cebada (Rogers *et al.*, 1997), se observó la presencia de la proteasa en diferentes órganos y tejidos, incluyendo hojas, pistilo, anteras, sépalos y pétalos. Con esta técnica se detectan 3 bandas (36, 29 y 26 kDa aproximadamente) (Figura 8).

La proteína se encuentra en todos los órganos analizados de *Nicotiana*, pero en la anteras su expresión es mayor. Esto, sugiere que en esta estructura, la proteasa posea un papel importante. Además, se observó que existe una correlación entre la abundancia de la proteína y el estado de maduración de las anteras, siendo en la etapa madura, la mayor presencia de aleuraína. Cabe mencionar que existe una mayor cantidad de proteasa en anteras con polen en comparación con anteras infértiles incapaces de producir polen, lo que sugiere que el polen contribuye a la gran cantidad de proteasa detectada mediante *Western-blot* (Figura 9).

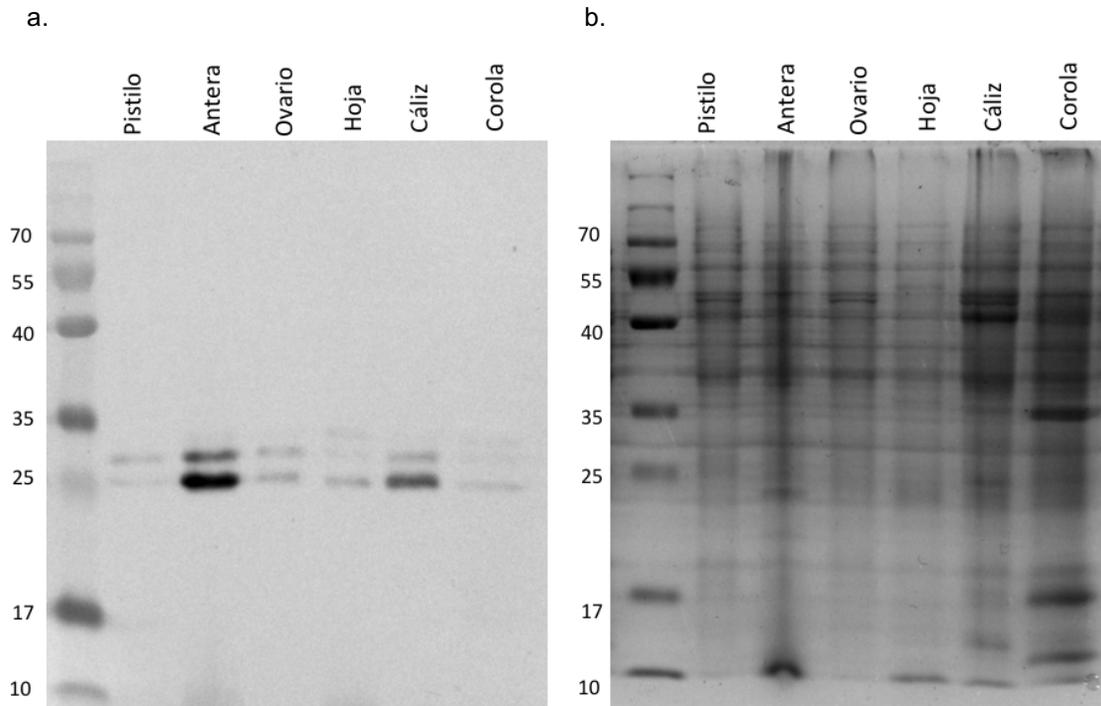


Figura 8. Expresión de la aleuraina en diferentes tejidos y órganos de *Nicotiana*.

a. Se observa que la proteasa se expresa abundantemente en anteras de *N. alata* en comparación con diferentes órganos y tejidos como pistilo, ovario, pétalos, sépalos y hojas. Western blot con anti-aleuraina 1:10,000 y anti-ratón con fosfatasa alcalina 1:10,000. b. gel de proteína teñido con azul de coomassie..

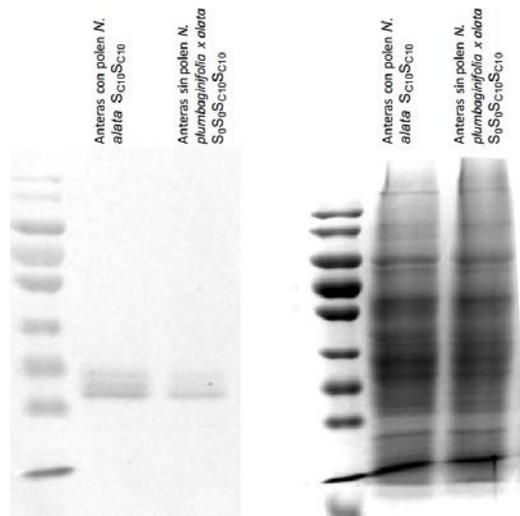
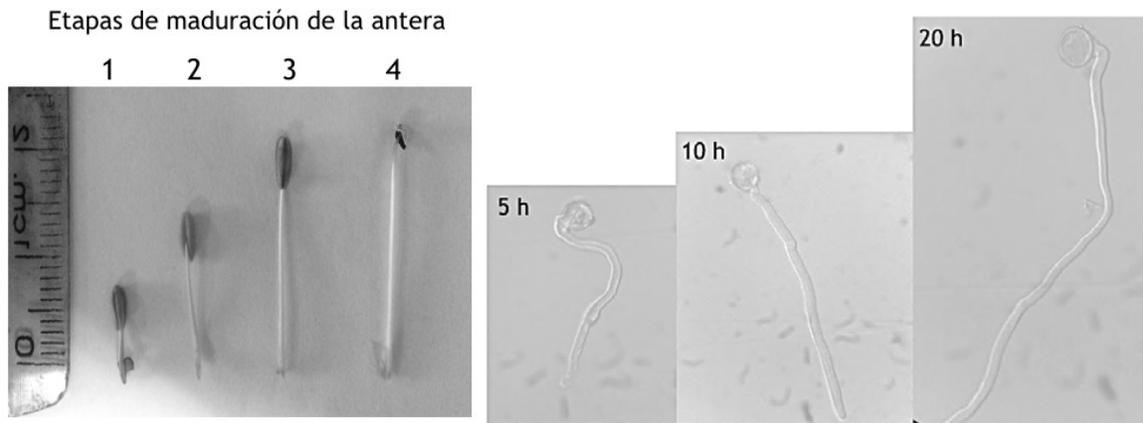


Figura 9. Diferencia de abundancia de la aleuraina en anteras fértiles e infértiles. Se observa la detección de la aleuraina mediante *Western blot*. El contenido de proteasa es mayor en anteras fértiles, capaces de producir polen viable, en comparación de anteras infértiles, sin polen. Indica que una parte del contenido de proteasa detectada en antera proviene del grano de polen maduro.

La aleuraina se encuentra presente en tubos polínicos a 36 horas de germinación (Goldraij et al., 2006), por lo que resultó necesario conocer más acerca del patrón de expresión en diferentes etapas del desarrollo de la antera y por supuesto, en granos de polen y tubos polínicos a diferentes tiempos de crecimiento. Se analizó la presencia del mRNA de aleuraina y de la proteína mediante RT-PCR y ensayos de *Western-blot* en cuatro diferentes etapas de maduración de la antera y 4 tiempos de germinación del polen (0, 5, 10 y 20 horas) para conocer su cinética (Figura 10a). Se encontró que el transcrito de la aleuraina se encuentra al menos desde etapas inmaduras del polen y con una mayor abundancia relativa en etapas maduras de las anteras (3 y 4). Durante la germinación del tubo polínico, los niveles de transcrito no varían de manera perceptible (Figura 10b). Y de acuerdo con la inmunodetección de la proteasa, ésta se encuentra expresada en todas las etapas de desarrollo de la antera, siendo en anteras maduras donde se observa una mayor cantidad de la proteína en estado maduro (Figura 11a y 11c). En cambio, en el polen se puede observar que la proteína se encuentra en el grano de polen pero la cantidad de ésta disminuye durante la germinación del tubo polínico. El objetivo de analizar en el polen y tubo polínico la presencia del transcrito y proteína, radica en que precisamente es en esta estructura donde se desea silenciar post-transcripcionalmente mediante el uso de un RNAi.

a.



b.

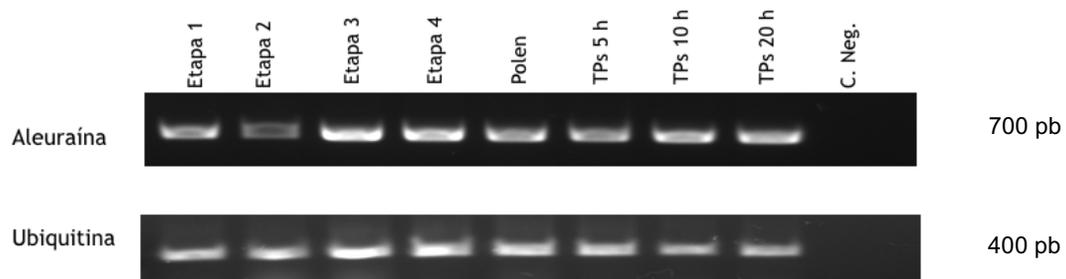


Figura 10. Detección por RT-PCR del mRNA de la aleuraína en anteras, polen y tubos polínicos. a. Diferentes etapas de maduración de las anteras (izquierda) etapa 1 (botón menor a 1 cm), etapa 2 (botón de 2 cm de longitud), etapa 3 (botón antes de la antesis), etapa 4 (flor madura), además de diferentes tiempos de germinación de tubos polínicos a la derecha (5, 10 y 20 horas aproximadamente). b. Se observan los amplicones obtenidos mediante PCR utilizando el cDNA de diferentes etapas de maduración de las anteras, en los granos de polen y diferentes tiempos de germinación de tubos polínicos (5, 10 y 20 horas).

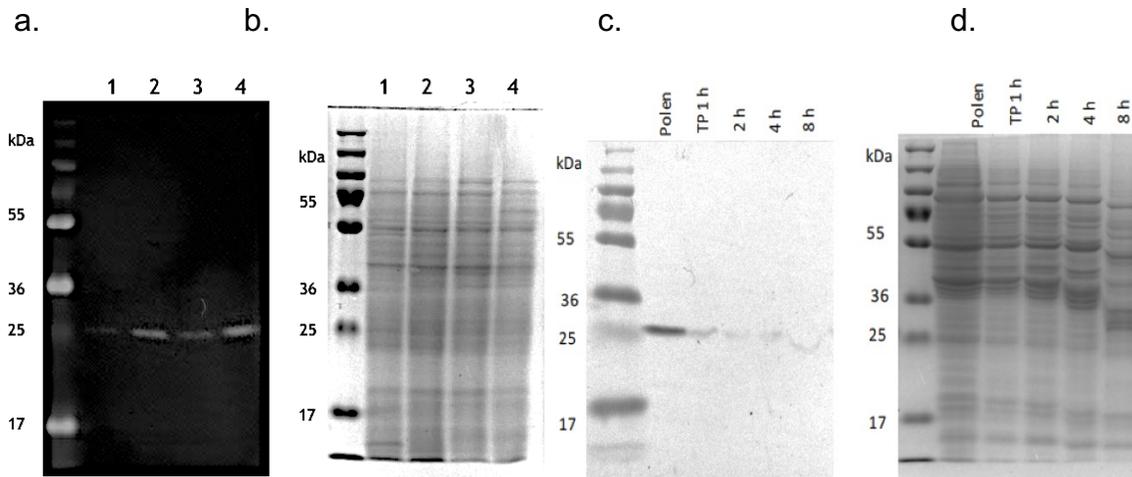


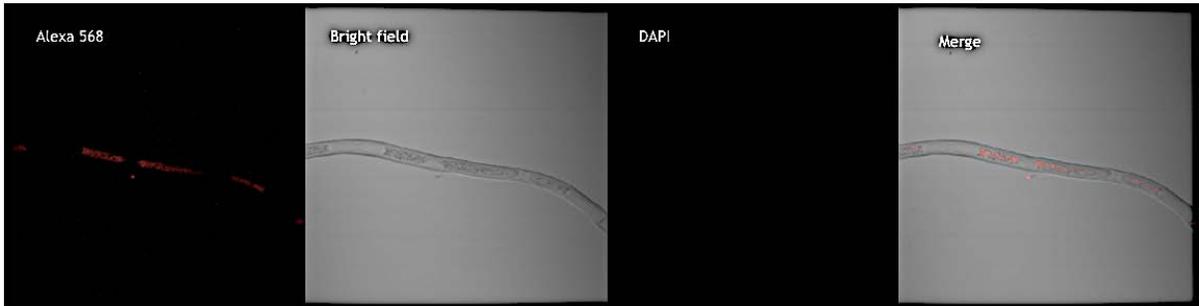
Figura 11. Expresión de la aleuraina en diferentes etapas de maduración de la antera
a. *Western blot* de la aleuraina durante la maduración de la antera, revelado con fluorescencia (anti-aleuraina 1:10,000 y anti-ratón acoplado a peroxidasa 1:10,000). **b.** Gel de proteína de anteras teñido con azul de coomassie). **c.** *Western blot* de la aleuraina a diferentes horas de germinación del polen (derecha, anti-aleuraina 1:10,000 y anti-ratón con fosfatasa alcalina 1:10,000) **d.** Gel de proteína de polen y tubos polínicos teñido con azul de coomassie.

De acuerdo con los resultados de la inmunodetección de la aleuraina en diferentes tiempos de elongación del tubo polínico (Figura 11c), parece que la cantidad de aleuraina disminuye conforme el tubo polínico crece. Durante la elongación del tubo polínico se generan periódicamente tapones de calosa, cuya función es aislar las partes más viejas del tubo y mantener al citoplasma cerca de la punta de crecimiento (Qin *et al.*, 2012). Fue necesario detectar mediante inmunolocalización a la proteasa durante la elongación del tubo polínico para observar si hay presencia de la aleuraina en etapas tardías de crecimiento del tubo polínico. Según lo observado, la aleuraina se encuentra presente en las vacuolas de los tubos polínicos a las 5 y 20 horas de germinación *in vitro* (Figuras 12a, 12b). También, esta técnica reveló que la proteína se encuentra preferentemente cercana a la región apical del mismo, además de encontrarse en una notable mayor abundancia a las 20 horas después de la germinación. No se observa fluorescencia en todos los tubos polínicos mediante este método debido a que se optó por adherir directamente tubos polínicos a portaobjetos cargados positivamente con L-lisina sin realizar ninguna inclusión o cortes histológicos, de los cuales al encontrarse la gran mayoría físicamente intactos, únicamente en algunos tubos polínicos los anticuerpos primario y secundario pudieron

penetrar.

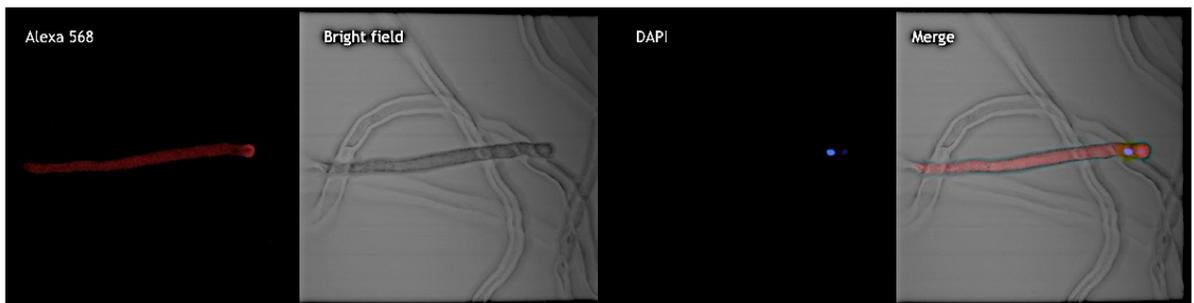
a.

Tubos polínicos 5h - anti-aleuraina



b.

Tubos polínicos 20h - anti-aleuraina



c.

Control sin anticuerpo primario

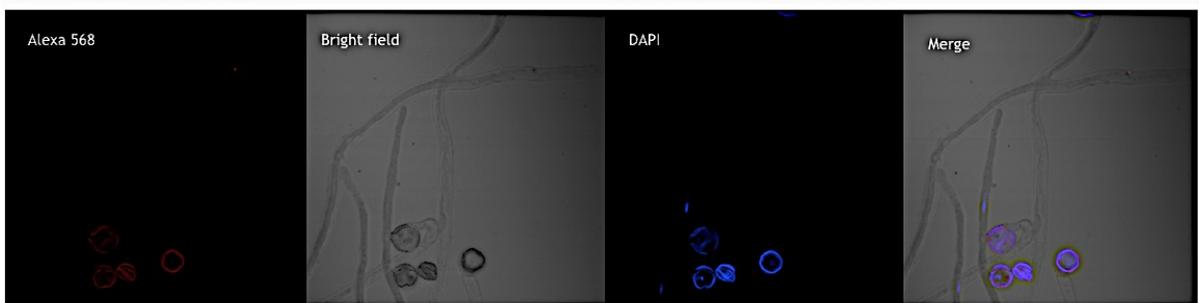


Figura 12. Inmunolocalización de la aleuraina en tubos polínicos a 5 y 20 horas.

a. Inmunolocalización de la aleuraina en tubos polínicos de *N. alata* con 5 horas de germinación, la fluorescencia roja corresponde a la detección de la aleuraina mediado por un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Alexa 568. La aleuraina se observa dentro de la vacuola del tubo polínico que prácticamente abarca todo el ancho del tubo polínico. b. Inmunolocalización de la aleuraina a 20 horas después de la geminación del tubo polínico. Se observa la presencia de la aleuraina en la parte apical de los tubos polínicos. También, se observan algunos núcleos en dentro del tubo polínico teñidos con DAPI. c. Control Negativo el cual no contiene el anticuerpo monoclonal anti-aleuraina También se puede apreciar autofluorescencia de los granos de polen en el control en los canales de fluorescencia para Alexa 568 y DAPI.

5.3. Análisis de patrones de expresión similares a elementos de la incompatibilidad

Ya que dentro del género *Nicotiana* existen tanto especies autoincompatibles como autocompatibles, se examinó la presencia de transcrito de proteasas tipo aleuraína en diferentes especies, utilizando cDNA total de anteras maduras con polen y un par de oligonucleótidos complementarios a regiones altamente conservadas de la aleuraína en otras especies. Se sabe que en algunas especies los genes implicados en la autoincompatibilidad poseen patrones de expresión distintos en especies compatibles respecto a las incompatibles (Busot *et al.*, 2008). La figura 13 muestran que tanto en las anteras de especies autoincompatibles (*N. alata*, *N. rastroensis*) como autocompatibles (*N. benthamiana*, *N. glauca*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia* y *N. sylvestris*) se expresa el gen de la proteasa. La única excepción fue *N. tabacum* en la cual no se detectó transcrito.

a.

b.

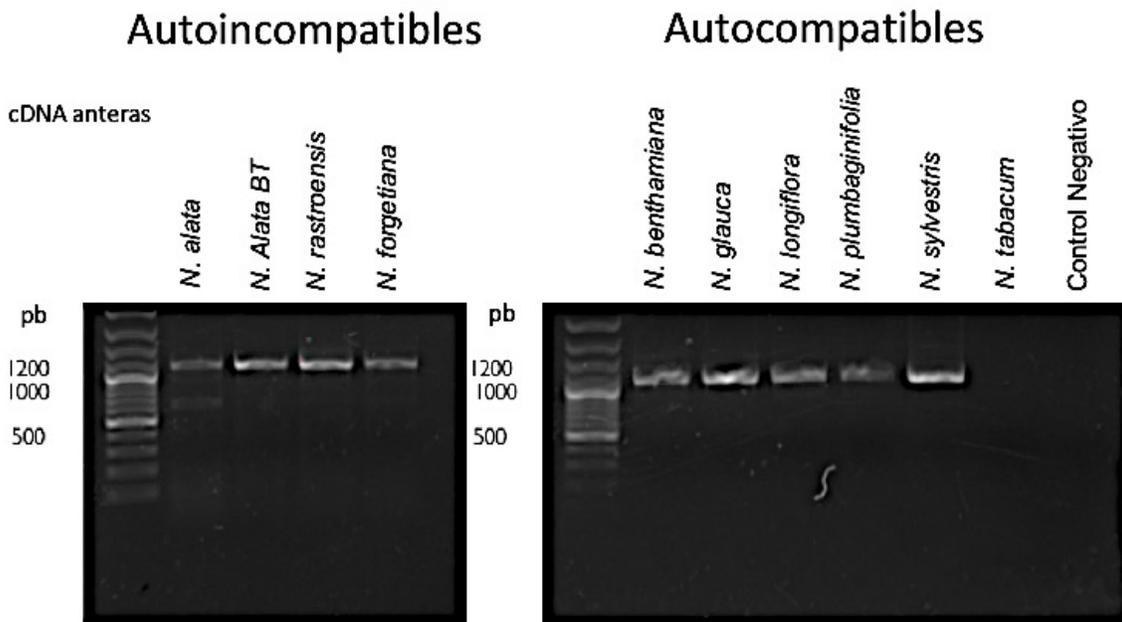


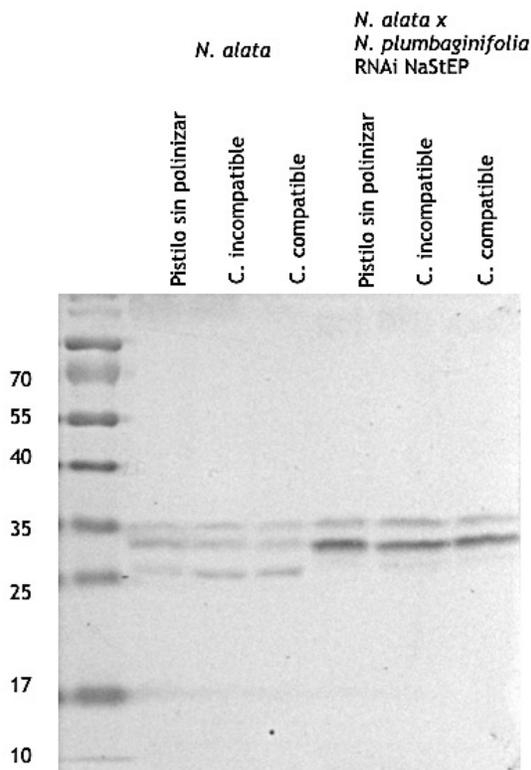
Figura 13. Detección por RT-PCR del mRNA de la aleuraína en las antera de especies de *Nicotiana*.

a. Se observan los resultados de un RT-PCR, en el cual, el cDNA de aleuraína es detectado en las especies autoincompatibles (*N. alata*, *N. rastroensis* y *N. forgetiana*). b. También es detectado en especies autoincompatibles (*N. benthamiana*, *N. glauca*, etc.) con excepción de *N. tabacum*.

5.4. Análisis de procesamiento diferencial en cruzas AI y AC de *Nicotiana*

La proteína de maduración de la aleuraína es otra proteasa de cisteína llamada RD21, del inglés *responsive to dessication 21*. Esta proteasa vacuolar posee la característica que en su extremo carboxilo tiene un dominio de granulina, el cual, interactúa con la proteína 120k en *Nicotiana* (Lee *et al.*, 2008) y un inhibidor vacuolar de proteasas del tipo Kunitz en *Arabidopsis* (Boex-Fontvieille *et al.*, 2005). *NaStEP* pertenece a esta clase de inhibidores, por lo que su posible función sea, una vez incorporado al tubo polínico, inhibir el proceso de maduración de proteasas implicadas en la muerte celular programada. En este caso, resultó interesante determinar si la aleuraína posee un estado de procesamiento distinto en cruzas de *N. alata* $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}$ (incompatibles) y $S_{A2}S_{A2} \times S_{C10}$ (compatibles), además de las cruzas en un híbrido *N. plumbaginifolia* \times *alata* tetrahaploide que expresa un RNAi para *NaStEP*. Las cruzas realizadas para este tetrahaploide en este experimento fueron: $S_0S_0S_{C10}S_{C10} \times S_{A2}$ y $S_0S_0S_{C10}S_{C10} \times S_{C10}$. Los resultados indicaron que no hay diferencias en el procesamiento, pues se observa el mismo patrón de la aleuraína en muestras de cruzas compatibles e incompatibles así como en pistilos sin polinizar en *N. alata*, ni en el híbrido (Figura 14). Cabe mencionar que en el híbrido no se detectó la última banda de aproximadamente (26 kDa) correspondiente a la aleuraína en estado maduro sin glicosilación.

a.



b.

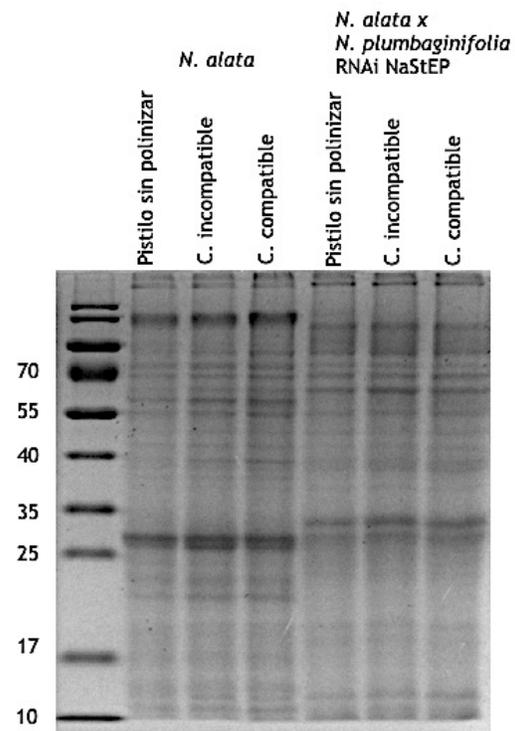


Figura 14. Expresión y procesamiento de la aleuraina en pistilos de cruza compatibles e incompatibles en *Nicotiana*.

a. Inmunodetección por western blot de la aleuraina en cruza compatibles e incompatibles de *N. alata* y el *N. alata* x *N. plumbaginifolia* NaStEP RNAi (anti-aleuraina 1:10,000 y anti-ratón con fosfatasa alcalina 1:10,000). **b.** SDS PAGE teñido con azul de Coomassie.

5.5. Obtención del plásmido pBA-aleuraina RNAi

Se obtuvo de manera exitosa un plásmido que contenía al marco de lectura abierto de la aleuraina, en la Figura 9a se observa una digestión en donde se ve un fragmento de alrededor de 1000 pb correspondiente al cDNA de la aleuraina. Se realizó una reacción de recombinación con el mix enzimático LR, utilizando el vector de entrada pENTR:aleuraina y el vector de salida pBA-DC RNAi, con lo que se obtuvo el plásmido con ambas copias del cDNA de la aleuraina en sentido y antisentido. Posteriormente se linealizó con las enzimas XhoI y SacI al plásmido pBA-DC con el promotor de NTP303 para intercambiar al cassette que contiene el gen letal ccdB y la resistencia a cloranfenicol por el cassette de la aleuraina en sentido-antisentido (Figura 15c). Se

corroboró la inserción del cDNA de la aleuraína en ambos sentidos con el uso de dos diferentes oligonucleótidos (F WRKY: 5'- CTT CTC CAA CCA CAG GAA TTC ATC -3' Y R WRKY: 5'- GCA GAG GAG GAG AAG CTT CTA G -3') que se alinearan en ambas hebras de la región del intrón *WRKY* utilizados como oligonucleótidos *reverse* cada uno en conjunto con el oligonucleótido Aleu Fwd (utilizado como oligonucleótido *forward*) que alinea con el inserto de aleuraína tanto en sentido como antisentido. De esta manera, mediante PCR se obtuvo la amplificación de dos fragmento de 1200 pb que corresponden al cDNA en sentido y antisentido respectivamente (Figura 15c y d). Al tener contar con un plásmido con estas características, cuando sea transcrita esta construcción, el RNA será capaz de formar un RNA de doble cadena, característica esencial para los RNAi. Además, en la Figura 15b se puede contemplar un análisis mediante enzimas de restricción del plásmido pBA-DC con el promotor de *CaMV 35s* y la construcción que posee al promotor de *NTP303*.

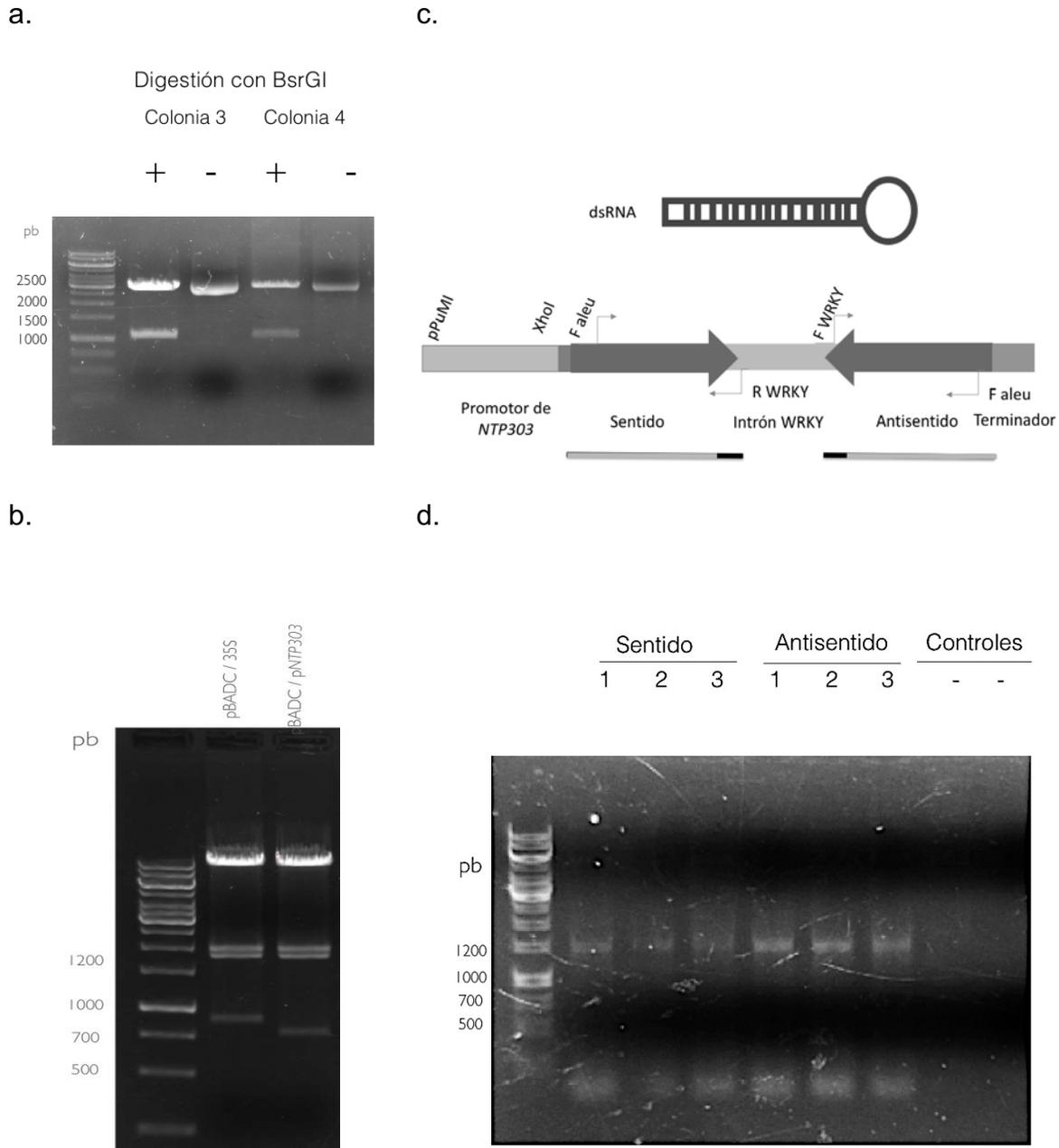


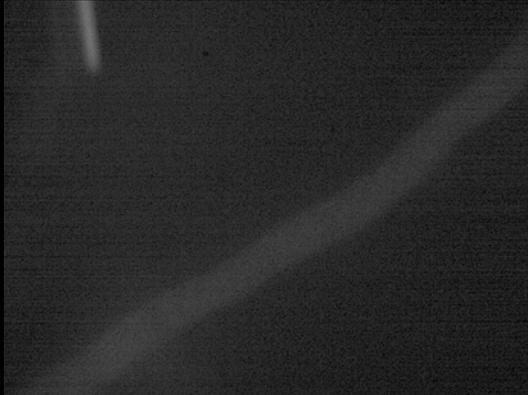
Figura 15. Obtención del plásmido pBA-pNTP303::aleurain RNAi. **a)** Digestión del plásmido pENTR:aleurain con la enzima *BsrGI*. **b)** Digestión de los plásmidos pBADc:pNTP303 y pBADc:p35S con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*. **c)** Esquema del plásmido pBA:NTP303::aleurain RNAi, en el cual se representa al promotor de *NTP303* específico de polen, a los insertos en sentido y antisentido de la aleurain, el loop *WRKY* del dsRNA y un terminador de la transcripción. Las líneas inferiores representan los amplicones que se obtienen con un oligonucleótido complementario al cDNA de la aleurain (*F aleu*) y otros dos complementarios al intrón *WRKY* (*F WRKY* y *R WRKY*) para corroborar las inserciones en ambos sentidos. **d)** Amplificación del inserto de la aleurain en sentido y antisentido de tres plásmidos distintos y sus respectivos controles negativos.

5.6. Transformación de polen por bombardeo

Con el fin de corroborar si las condiciones diseñadas para la transformación de polen eran adecuadas, se realizaron pruebas de transformación de polen mediante bombardeo con partículas de tungsteno cubiertas con un plásmido del cual se tiene la seguridad que es capaz de expresar una proteína verde fluorescente recombinante (GFP, del inglés *green fluorescent protein*), la cual posee una señal de destino mitocondrial y el promotor de *NTP303* específico de polen (García-Valencia *et al.*, 2017). Una vez llevado a cabo el bombardeo, la actividad de GFP fue detectada aproximadamente 8 horas después. El polen germinó en medio de cultivo líquido, en oscuridad y a temperatura ambiente para una mayor estabilidad de GFP. Se observó que el método de transformación mediante bombardeo funciona, aunque la eficiencia no es muy alta ya que la actividad de GFP fue detectada en un bajo porcentaje de tubos polínicos después de las 8 horas de germinación además, la señal de fluorescencia es muy débil por lo que sería difícil detectarla en tubos polínicos creciendo sobre pistilos, debido a que los tejidos tienen autofluorescencia cuando son excitados a la longitud de onda específica para GFP (Figura 16). Al igual que lo observado en la inmunolocalización para aleuraina, la actividad de la proteína fluorescente fue detectada principalmente en la parte apical de los tubos polínicos, que es la parte donde se encuentra confinada la mayor porción del citoplasma y de los organelos.

a. Expresión transitoria de GFP (8 h)

GFP



Campo claro



b. Expresión transitoria de GFP (10 h)

GFP

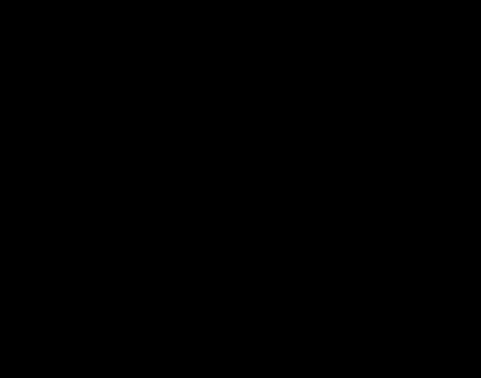


Campo claro



c. Control Negativo

GFP



Campo claro



Figura 16. Transformación de tubos polínicos con GFP. Es posible transformar tubos polínicos mediante bombardeo, se observa un tubo polínico transformado con la construcción pMIT-GFP. Se observa la fluorescencia de la proteína GFP (izquierda).

Una vez comprobado que el polen transformado es capaz de expresar la proteína verde fluorescente, se realizó la transformación de polen con la construcción de pBA-NTP303::aleuraína RNAi con el fin de observar si la ausencia de la aleuraína en tubos polínicos rompe con el mecanismo de autoincompatibilidad. Los bombardeos se realizaron en tres eventos distintos y por duplicado con el fin de asegurarse que el resultado que se obtuviera fuese constante. Además, en cada bombardeo fue necesario tomar los controles necesarios, así como como corroborar la viabilidad de germinación del polen. Para esto, el polen colectado 24 horas antes del bombardeo fue germinado *in vitro*, y se descartaron aquellas muestras de granos polen que no germinaran en un porcentaje mayor al 90%. Las flores seleccionadas fueron emasculadas antes de la dehiscencia de sus anteras con el fin de evitar autopolinización. Los bombardeos se sincronizaron para que las flores estuvieran completamente desarrolladas para la fecundación sin estar completamente maduras (casi senescentes), ya que en pistilos muy maduros puede llevar a falsos positivos. En todos los experimentos se comparó respecto a un pistilo polinizado, ya sea de un pistilo de una cruce compatible $S_{A_2}S_{A_2} \times S_{C_{10}}$ (Figura 17d) o de una incompatible $S_{A_2}S_{A_2} \times S_{A_2}$ (Figura 17e). En los pistilos $S_{A_2}S_{A_2}$ no polinizados (Figura 17h), cuando son colocados bajo el microscopio únicamente pueden observarse las paredes celulares que corresponden a las de la epidermis dorsal, a comparación de los pistilos polinizados compatibles e incompatibles, en los cuales se logran ver puntos e incluso hilos fluorescentes que indican la presencia de la calosa depositada durante la elongación de los tubos polínicos, la calosa es teñida con azul de anilina. En cruces incompatibles $S_{A_2}S_{A_2} \times S_{A_2}$ la gran mayoría de los tubos polínicos germinan pero no son capaces de alcanzar la base del pistilo, en promedio no rebasan mas allá de la mitad de la longitud total del pistilo, es decir se elongan a un tamaño aproximado de 2.5 cm. En cambio, prácticamente todo el polen que germina en el estigma de la flor en una cruce compatible es capaz de alcanzar al ovario (Figura 17c).

Otro de los puntos más importantes para obtener un resultado confiable, es que el polen utilizado en cruces incompatibles y para los bombardeos provenga de la misma planta, con el fin de asegurar la autofecundación y evitar contaminación de polen

provenientes de plantas fenotípicamente similares pero con un genotipo distinto.

En cuanto a la transformación del polen, se utilizaron dos controles: un control negativo que se bombardeó polen con balas de tungsteno sin ser recubiertas con DNA en la cruce llamada $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-Control-Negativo}$ (Figura 17g), y otro control, con balas de tungsteno recubiertas con el DNA que dirige la síntesis de GFP, o bien la cruce $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-pMit-GFP}$ (Figura 17f) probado anteriormente en la germinación *in vitro*, aparte del bombardeo de polen con balas de tungsteno recubiertas con el plásmido pBA-aleurain RNAi, nombrada como $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-aleurain RNAi}$ (Figura 17a). Para comprobar la viabilidad de germinación del polen después del tratamiento, se realizaron polinizaciones con polen transformado $S_{A2}\text{-aleurain RNAi}$ de pistilos $S_{C10}S_{C10}$ en los cuales al ser una cruce compatible los tubos polínicos fueron capaces de llegar hasta la base (Figura 17b), aunque en menor cantidad respecto al control de cruces compatibles sin bombardear $S_{A2}S_{A2} \times S_{C10}$ ya que la cantidad de polen recuperada del medio de cultivo sólido es menor además al estar suspendidos en una solución acuosa, es difícil que se queden adheridos al pistilo debido al mucilago impermeable presente en toda la planta de *N. alata*.

Respecto a las cruces $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-Control-Negativo}$ (Figura 17g) y $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-pMit-GFP}$ (Figura 15f) se observa que el polen germina en el estigma pero muy pocos tubos polínicos llegan a la mitad del pistilo. En ninguna de las repeticiones, ni replicas, se observa que los tubos polínicos sean capaces de alcanzar el ovario. Lo que indica que ni las balas de tungsteno, ni el DNA exógeno son capaces de promover la ruptura de la respuesta al rechazo del polen propio.

Lo que se observó fue que algunos de los tubos polínicos del polen transformado en cruces incompatibles ($S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-aleurain RNAi}$, Figura 17a) son capaces de llegar hasta la base del pistilo en 72 horas, aunque son varios los tubos los que alcanzan la base del pistilo, pero en comparación de los observados en cruces compatibles $S_{C10}S_{C10} \times S_{A2}\text{-aleurain RNAi}$ (Figura 17b) la cantidad de tubos polínicos fue menor, debido a la eficiencia de transformación por este método (0.01- 0.03%).

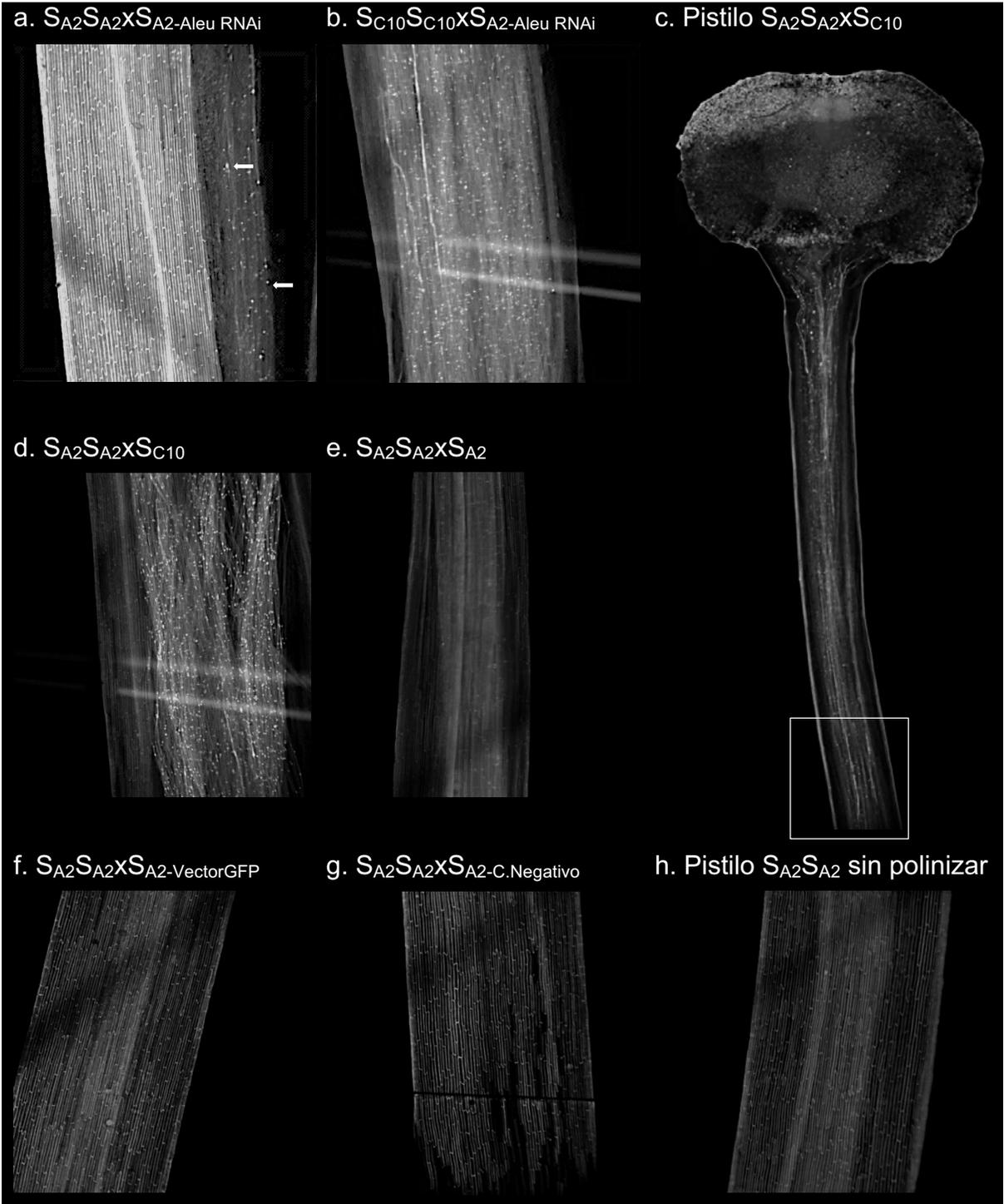


Figura 17. Polinización de pistilos con polen transformado. **a.** Se observa el extremo del estilo más cercano al ovario de un pistilo de *N. alata* en una cruce autoincompatible utilizando polen transformado con pBA-aleu RNAi ($S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-Aleu-RNAi}$), se aprecian los tubos polínicos alcanzando al ovario 72 horas después de la polinización. Los tapones de calosa depositados durante el crecimiento del tubo polínico emiten fluorescencia cuando son teñidos con azul de anilina (flechas blancas). Esta imagen corrobora que después del silenciamiento de la aleuraina, el polen transformado es capaz de germinar y alcanzar la base del estilo. Aunque el número es bajo debido a la eficiencia de transformación. **b.** Cruza compatible utilizando polen transformado con pBA-aleu RNAi ($S_{C10}S_{C10} \times S_{A2}\text{-Aleu RNAi}$), se observa como el polen transformado $S_{A2}\text{-Aleu RNAi}$ tiene un crecimiento perfectamente normal en un pistilo con el genotipo $S_{C10}S_{C10}$. **c.** Reconstrucción de imágenes de un pistilo en una cruce compatible ($S_{A2}S_{A2} \times S_{C10}$), en el pistilo se muestra un recuadro blanco que corresponde a la base del pistilo y donde se encuentra la porción del pistilo elegido para determinar la autoincompatibilidad en el resto de las imágenes. Se puede observar claramente al estigma recubierto de granos de polen y los tubos polínicos a lo largo del estilo hasta alcanzar al ovario. **d.** Cruza compatible de tipos silvestres $S_{A2}S_{A2} \times S_{C10}$, se observa el crecimiento normal de un gran número de tubos polínicos llegando hasta la base. **e.** Cruza incompatible $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}$, no se observa ningún tubo polínico que haya alcanzado la base del pistilo después de las 72 h. **f.** Cruza incompatible utilizando polen transformado con un vector que dirige la expresión de GFP ($S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-VectorGFP}$), aún en presencia de DNA externo, los tubos polínicos no son capaces de llegar a la base del pistilo. **g.** Cruza incompatible con polen bombardeado únicamente con balas de tungsteno ($S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-C.Negativo}$), no hay ningún tubo polínico capaz de alcanzar el ovario cuando el polen es bombardeado, corroborando que las balas de tungsteno por si mismas no son capaces de romper con el mecanismo de la autoincompatibilidad. **h.** Pistilo $S_{A2}S_{A2}$ sin polinizar, se observan claramente los contornos de las células epidermales del pistilo y en medio del pistilo el tejido de transmisión y haces vasculares con una mayor fluorescencia. Se observan las mismas características de éste en las cruces $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}$, $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-VectorGFP}$ y $S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}\text{-C.Negativo}$.

6. DISCUSIÓN

En las plantas con flores, la polinización y fecundación son pasos cruciales para la reproducción sexual. El grano de polen germina formando un tubo polínico para el transporte de los gametos masculinos al gametofito femenino durante la reproducción sexual (Hulskamp *et al.*, 1995; Johnson and Preuss, 2002; Lord and Russell, 2002). La evolución favoreció que el pistilo de varias especies tuvieran la función de reconocer y rechazar el polen propio, evitando la endogamia, o bien para promover a la entrecruza. Aun así, el reconocimiento del polen y su aceptación o rechazo, es un proceso complejo, y diversos factores son requeridos durante estos eventos (Busot *et al.*, 2008). Estudios en diferentes géneros de angiospermas han demostrado que existen varios genes implicados en el proceso de crecimiento del tubo polínico (de Graaf *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). En *Nicotiana*, la S-Rnasa cuya actividad citotóxica es contenida dentro de la vacuola del tubo polínico, es necesaria para el rechazo del polen propio, al igual que SLF. La estabilidad del compartimento vacuolar en una cruce compatible está relacionada con la estabilidad de la proteína HT-B, la cual debe ser degradada por alguna proteína aún desconocida, para que la vacuola se mantenga intacta y con ello el tubo polínico pueda crecer hasta alcanzar el ovario. Por ello, en este trabajo se propone que el papel de las proteasas presentes en el tubo polínico sea preponderante en la respuesta de rechazo del polen propio.

Dentro de las vacuolas de los tubos polínicos, en conjunto con las S-RNasas, varias proteasas se encuentran confinadas. Dicho compartimento es el lugar donde ocurre gran parte de la actividad proteolítica, cuyos sustratos enzimáticos incluyen desde polipéptidos, hasta complejos proteicos, e incluso organelos. Las vacuolas tienen diversos papeles en la respuesta a cambios en el desarrollo, a condiciones ambientales y notablemente en degradación de proteínas durante la senescencia y la muerte celular. La proteasa de cisteína, aleuraína, se encuentra colocalizando dentro de la vacuola del tubo polínico junto con la S-RNasa y 120K en cruces tanto compatibles como incompatibles, éstas últimas forman parte de la cascada bioquímica del rechazo del polen propio, por lo que la aleuraína podría tener un papel importante en la autoincompatibilidad.

Debido a que para *Nicotiana* no se encontraba reportada ninguna secuencia de aleuraína, la amplificación de este fragmento de cDNA, su clonación y secuenciación nos permitieron tener la primer secuencia de cDNA para el género correspondiente. La secuencia encontrada posee un alto porcentaje de similitud con otras secuencias predichas en bases de datos reportadas para el mismo género. La aleuraína de *N. glauca* respecto a otras secuencias, se encuentra altamente conservada, ya sea entre diferentes géneros de dicotiledóneas o monocotiledóneas e incluso respecto a la catepsina H en humanos. Lo que indica que la función enzimática de este tipo de proteasa no soporta muchos cambios en su secuencia. El hecho de que esta proteasa se encuentre altamente conservada y expresada de manera ubicua en *Nicotiana* indica que posee una función fisiológica muy importante para el desarrollo normal de la planta.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la aleuraína se expresa con mayor abundancia en anteras maduras con polen, lo que sugiere que quizás la función de esta proteasa tenga una mayor relevancia en la fisiología de la antera y la maduración del polen. En diversos estudios, se ha demostrado que hay un incremento de actividad de proteasas de cisteína durante el desarrollo de la antera, e incluso algunas son específicas durante etapas tardías de la maduración la antera, un proceso que involucra la muerte celular programada del *tapetum* (DeGuzman *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2014). Este aumento está correlacionado con eventos morfológicos y bioquímicos durante la microesporogénesis, que requiere de diferentes enzimas entre ellas algunas proteolíticas, nutrientes y precursores de esporopolenina. El desarrollo del polen es un proceso dinámico que involucra la síntesis de proteínas *de novo* (Lee *et al.*, 2004), además de la formación y degradación del *tapetum*, que otorga nutrientes al polen en desarrollo (Ku *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos, confirman la presencia de mRNA de la aleuraína, en diferentes etapas de la antera, en el polen y los tubos polínicos. Existe una mayor abundancia de mRNA en etapas tardías del desarrollo de la antera en correlación con la abundancia de la proteína analizada por *Western-blot*. Es importante mencionar que hay presencia del transcrito tanto en polen como en diferentes horas de germinación de los tubos polínicos, ya que es en polen donde se llevó a cabo el silenciamiento

mediante un RNAi. En general, se ha reportado que las proteasas provenientes del polen se localizan frecuentemente en la pared del polen, en las secreciones por parte del polen cuando éste es hidratado y dentro del tubo polínico durante la germinación (Radlowski, 2005).

Lo observado mediante la técnica de *Western-blot*, indicó que la abundancia de la aleuraína parece disminuir durante el crecimiento del tubo polínico, lo que indicaría que un ensayo de pérdida de función en tubos polínicos no sería viable, por lo que se realizó una técnica de inmunolocalización por fluorescencia de la aleuraína en tubos polínicos. De acuerdo con lo observado en la inmunolocalización de la proteasa en tubos polínicos a diferentes horas de germinación, la aleuraína se encuentra confinada en la vacuola lítica y compartimentos prevacuolares, en su gran mayoría en la parte apical de los tubos polínicos. Es justo en la parte apical donde también se encuentra confinada la mayor parte del citoplasma debido a la acción de los tapones de calosa, que funcionan como una barrera mecánica para prevenir que el citoplasma en el ápice fluya de regreso (Ünal *et al.*, 2013). Es por estas estructuras que aparentemente hay una disminución de la aleuraína en tubos polínicos respecto al polen sin hidratar, ya que un gran porcentaje de la masa total de los tubos polínicos corresponde a la pared celular y agua que se ha quedado confinada, en las partes más antiguas del tubo. También se reportó en experimentos previos que el transportador de la aleuraína, BP-80, fusionado a la proteína reportera GFP, posee la misma distribución en los tubos polínicos de *L. longiflorum* respecto los observados en ese experimento. (Wang *et. Jiang*, 2011). Igualmente, en la inmunolocalización se observa que la proteína tiene una mayor abundancia conforme tubo polínico se va elongando, lo que indica que la función de esta proteína es requerida durante esta etapa, e incluso se ha postulado que en general, hay un compromiso entre la actividad proteolítica presente en el polen y su tasa de germinación (Radlowski, 1994). Cabe mencionar que esta técnica implementada para realizar inmunolocalización directamente en tubos polínicos podría ser utilizada en futuros estudios, haciendo posible que la observación de tubos polínicos y la localización de sus proteínas de interés, sea más sencillo. Las modificaciones hechas a esta técnica confirieron una ventaja respecto al método tradicional de inclusión en parafina ya que debido al tamaño de los tubos polínicos se dificulta su inclusión, además de que estos colapsan o al ser cortados en micrótopo

se vuelven trozos irreconocibles y con ello obtener cortes histológicos útiles para este propósito es casi imposible.

La aleuraína se encuentra expresada ubicuamente, es decir, se expresa en todas las partes de la planta, tanto en hojas como pistilos, anteras, pétalos, sépalos, polen, etc., además se encuentra presente en diferentes etapas de maduración de sus órganos y tejidos. Se observó una mayor tendencia en el incremento de su expresión en anteras maduras con polen y en tubos polínicos con mayor tiempo de crecimiento de manera *in vitro*.

Algunos los genes modificadores de la autoincompatibilidad se expresan espacialmente diferente. Como es el caso de HT-B y NaStEP, los cuales son expresados únicamente en pistilos funcionalmente maduros para la reproducción. Además algunos otros genes modificadores se expresan diferencialmente tanto en plantas autocompatibles como en autoincompatibles incluso siendo plantas correspondientes al mismo género de *Nicotiana*, por ejemplo NaStEP, que se encuentra expresado únicamente en especies autocompatibles (Busot *et al.*, 2008). Pero el transcrito de la aleuraína se encontró tanto en especies autocompatibles, como en autoincompatibles, con excepción de *N. tabacum* (autocompatible) en la cual no se detectó transcrito de la aleuraína en anteras maduras con polen (Busot *et al.*, 2008).

El patrón de bandeo que se observan en las diferentes inmunodetecciones mediante Western blot está relacionado con el procesamiento de la preproaleuraína (Jiang *et al.*, 1998), el cual involucra dos pasos secuenciales llamados: *clipping* donde se le remueven aproximadamente 9 kDa del extremo amino y *trimming* donde se remueve 1 kDa extra (Howlerda *et al.*, 1990). La masa molecular que se predice para estas proteínas mediante el software *Serial Cloner* y el observado mediante inmunodetección varía, la masa es ligeramente mayor como se detectó mediante *Western-blot* con respecto al tamaño esperado, debido a que la proteína también posee dos glicosilaciones importantes para el correcto funcionamiento de la aleuraína. El hecho de que esta proteasa conste con dos sitios de glicosilación y varios puentes disulfuro, además de su actividad proteolítica, complicó la obtención de proteínas recombinantes y por ello no se pudo hacer un ensayo de actividad, en el cual incubar

a la aleuraina con proteínas de interés en la autoincompatibilidad resultaría en una buena aproximación para saber si es capaz de degradar a las proteínas blanco hipotéticas.

Se ha reportado que la proteasa encargada de la maduración de la aleuraina en *Brassica*, es una proteasa de cisteína llamada RD21 (del inglés, *Responsive to desiccation 21*) y tiene la característica de poseer un dominio de granulina en el extremo carboxilo (Halls *et al.*, 2005). Esta proteasa vacuolar del tipo papaína, se ha visto que es capaz de interactuar con un inhibidor tipo Kunitz (Boex-Fontvielle *et al.*, 2015) y con la proteína 120K (Lee *et al.*, 2008). La interacción de RD21 con un inhibidor tipo Kunitz resulta interesante, ya que NaStEP que es un inhibidor de la misma familia. Por lo que fue importante conocer el estado de maduración en el procesamiento de la aleuraina en presencia o ausencia de NaStEP en plantas silvestres o transgénicas respectivamente. Pero en plantas donde se encontraba suprimido NaStEP no se observa ningún procesamiento diferencial de la aleuraina en presencia o no del inhibidor de proteasas tipo Kunitz NaStEP, aunque los resultados indicaron que hay una mayor cantidad de la proteasa aleuraina en un estado de procesamiento intermedio.

Por otra parte, la obtención de un plásmido capaz de sintetizar un RNAi para disminuir la traducción del mRNA de la aleuraina fue crucial en los ensayos de pérdida de función de la proteasa. El plásmido pBA-aleuraina RNAi posee la capacidad de generar un RNAi específico para la aleuraina de *N. alata* en polen, ya que posee el cDNA de la aleuraina en sentido y antisentido separados por un *loop* (intrón *WRKY*), regulado por el promotor de *NTP303*. Después de la polinización de pistilos $S_{A2}S_{A2}$ con polen S_{A2} transformado con el plásmido pBA-aleuraina RNAi (S_{A2} -aleurain RNAi), varios tubos polínicos lograron llegar a la base de los pistilos en cruza incompatible ($S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}$ -aleurain RNAi), a diferencia del polen bombardeado con un vector vacío ($S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}$ -pMit-GFP) y sin DNA ($S_{A2}S_{A2} \times S_{A2}$ -Control Negativo). Las frecuencias de expresión transitoria fueron bajas, pero concuerda con experimentos realizados anteriormente, en el cual, se reportaron eficiencias de transformación en un rango de 0.01 a 0.03% por cada bombardeo, siguiendo un método muy similar (Huang *et al.*, 2005). También, se realizó una expresión transitoria del plásmido pMit-GFP, capaz de

dirigir la expresión de GFP en tubos polínicos, y con ello se percibió señal de la proteína fluorescente en los tubos polínicos después de 8 y 10 horas del bombardeo, lo que indica que el método de transformación utilizado en este trabajo es óptimo para conseguir la expresión de un transgen en tubos polínicos.

Cabe resaltar que se optó por realizar el silenciamiento de la aleuraina directamente en el grano polen por diversas razones, entre las cuales implican el tiempo y la dificultad de obtención de una planta transgénica. Aunque la razón principal yace en que al realizar un silenciamiento de la aleuraina, al ser ésta una proteína ubicua y de gran importancia fisiológica, se esperaría un efecto pleiotrópico; es decir que el silenciamiento de un solo gen podría ser responsable de distintos efectos fenotípicos no relacionados. También, al haber una mayor tendencia de aumento en la cantidad de proteasa en anteras maduras conforme a la maduración de las anteras, se esperaría que su silenciamiento inclusive pueda causar infertilidad.

En el caso de la polinización incompatible ambos tejidos interactúan en la eliminación del polen inapropiado. La actividad de las enzimas y su interacción con sus correspondientes sustratos afectan a todos los fenómenos que tienen lugar durante la interacción polen-pistilo (de Graaf et al., 2001). Las enzimas proteolíticas del polen, así como las localizadas en los órganos generativos femeninos, participan activamente en los procesos de adhesión, hidratación, señalización, germinación del tubo polínico y su crecimiento en el tejido de transmisión del pistilo. (Swanson et al., 2004, Stead et al., 1980, Luu et al., 1997). Existe una formación de complejos compuestos por las proteínas secretadas al tejido de transmisión y las proteínas de la pared del polen que facilitan la hidratación del polen compatible. La falta de un componente o la falta del procesamiento de una proteína sustrato de la aleuraina podría llevar a fenotipos distintos durante el proceso de reconocimiento del polen.

En *Nicotiana*, el mecanismo de autoincompatibilidad se caracteriza porque las SRNAsas son secuestradas dentro de las vacuolas de los tubos polínicos, para contener su actividad citotóxica. En cruza incompatibles, la vacuola se rompe liberando las SRNAsas al citoplasma para degradar el RNA y llevar a la muerte del polen (Goldraij et al., 2006). En este mismo género, se ha reportado que un tipo de muerte celular se encuentra asociado al colapso de la membrana vacuolar, resultando en la liberación

de proteínas hidrolíticas hacia el citoplasma para la degradación de componentes citoplasmáticos. Es bien conocido que la vacuola central, es el compartimento lítico más grande en una célula vegetal madura y contiene la mayor parte de la actividad hidrolítica. La muerte celular programada ha sido descrita en variedad de procesos del desarrollo en plantas, en la cual destaca precisamente el patrón de expresión de ciertas proteasas de cisteína, ya sea por su aumento o expresión específica en un estado de estrés o senescencia, e incluso este comportamiento ha sido considerado como un marcador de dicho proceso (Swidzinski *et al.*, 2002). Así, la muerte celular programada permite la eliminación selectiva de células no deseadas en el organismo y lo convierte en un elemento necesario en los procesos del desarrollo.

Las proteasas de procesamiento vacuolar son un importante conjunto de proteasas de cisteína involucradas en la senescencia, a las cuales se les ha atribuido diferentes e importantes papeles en la degradación proteica, reciclamiento de aminoácidos y activación de proteínas blanco durante la muerte celular. Muchas de las proteasas de cisteína contribuyen al funcionamiento correcto de la célula y su actividad está regulada durante la transcripción y la traducción, pero también por modificaciones post-traduccionales, así como por sus propios inhibidores. Muchas de ellas son sintetizadas con un prodominio autoinhibitorio que debe ser removido proteolíticamente para activar a la enzima. Las proteasas de cisteína son las enzimas mayormente asociadas al complejo de degradación proteico durante la senescencia. Aunque también están involucradas en otros procesos como la germinación y defensa contra patógenos.

Existe una correlación entre la abundancia de la aleuraína y un estado de senescencia. Incluso, es conocida como un marcador estándar de ésta. Su transcripción ocurre en todos los estados de maduración de los diferentes tejidos pero incrementa bajo la senescencia natural o causada por estrés. La aleuraína de acuerdo a lo observado se encuentra expresada abundantemente dentro de los tubos polínicos de *Nicotiana*. Por lo que la ausencia de esta proteína en el tubo polínico podría contribuir a evitar su actividad hidrolítica sobre sus sustratos y con ello, un retardo en el proceso de muerte del mismo. Debido a que la aleuraína tiene moderada actividad endoproteolítica y es expresada constitutivamente, es una proteasa aparentemente

diferente a otras proteasas que solo están involucradas en el catabolismo de proteínas. Su papel puede ser más preciso que la simple degradación de proteínas, quizás, pueda estar involucrada en eventos proteolíticos como la activación de algunas otras enzimas vacuolares (Holwerda y Rogers, 1992). La actividad de la aleuraina es compatible con la idea de que la de la planta puede procesar algunas proteínas blanco durante la muerte celular, además de tener un papel en la degradación de la proteínas, por ejemplo, en el proceso de la germinación de semillas. La permeabilización de la membrana vacuolar liberaría a la aleuraina hacia citoplasma, donde podría procesar y degradar una serie de sustratos y proteínas diana, activando o contribuyendo de gran manera a una señalización hacia la muerte celular del tubo polínico. Una alternativa a esta propuesta, integraría el papel de la aleuraina en la degradación y reciclaje de compuestos citoplasmáticos, incluyendo un papel durante la autofagia. Esta podría ser otra ruta por la cual la inhibición de la aleuraina puede disminuir la PCD, ya que recientemente se ha demostrado que la autofagia y la PCD de la planta están íntimamente ligadas.

La función básica de una proteasa es procesar a las proteínas y, de ese modo, modulan irreversiblemente las propiedades del sustrato. Como consecuencia del corte o de una serie de procesamientos, las proteínas obtienen una función distinta, son activadas o simplemente pierden su función al ser degradadas. Las proteasas se sintetizan generalmente como precursores inactivos que requieren activación, más a menudo mediante proteólisis limitada, siendo por lo tanto sustratos de ellas mismas. Tal señalización de proteasas como una forma de transducción de señales, es por lo tanto irreversible, y difiere de otros mecanismos de señalización. Debido a esta irreversibilidad, la señalización de la proteasa es una forma eficaz de guiar a una célula a su muerte; una vez que el programa ha comenzado, no puede ser revertida o prevenida (Turk y Stoka, 2007).

Una vez en el citoplasma, la aleuraina podría procesar una serie de sustratos, que conllevarían a la muerte celular del tubo polínico, mediar la activación inicial de algunas de las enzimas vacuolar, que luego degradan la membrana vacuolar e iniciar la cascada proteolítica que conduce a PCD. Esto plantea de inmediato nuevos enfoques en el papel de las proteasas en el rechazo del polen, así como también, invita a continuar con estudios enfocados a determinar cuáles son los sustratos

celulares de la aleuraina y si la ésta puede desencadenar la muerte celular por sí misma, o bien, descifrar cuál es la ruta de señalización hacia muerte celular. El mecanismo mediante el cual la aleuraina participa en la senescencia y muerte celular aún no está claro. Pero el silenciamiento de ésta se ha reportado que retarda el progreso en la senescencia de floretes en *Brassica* (Eason *et al.*, 2004), resultados que también son consistentes con lo observado en las hojas *Arabidopsis* (Pružinská *et al.*, 2017). En los cuales mencionan que posiblemente que la senescencia de debe a un desbalance en la disponibilidad de aminoácidos, que en algunos organismos, se ha observado que en etapas tardías de la senescencia se encuentra gran cantidad de aminoácidos disponibles (Soudry *et al.*, 2005).

Parece probable que la enzima esté involucrada en distintos pasos del desarrollo de la planta, así como en la germinación del tubo polínico, en el correcto crecimiento durante el reconocimiento del polen mediante la degradación proteolítica dentro de la vacuola o bien una vez liberada al citoplasma. Al parecer, es natural la intensificación de los procesos catabólicos que ocurren en el compartimento vacuolar durante el rechazo del tubo polínico, que requiere de una rápida movilización de proteínas. Es difícil determinar sin ambigüedad, si la enzima tiene actividad sobre algún sustrato necesario en el mecanismo de la autoincompatibilidad, durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico, si es un elemento crucial en el desencadenamiento de la muerte celular o desempeña otras funciones como el reciclamiento de aminoácidos. Sin embargo, la función de la aleuraina en el correcto rechazo del grano de polen es evidente.

Hay gran diversidad de estructuras y de composiciones bioquímicas en los pistilos, lo que sugiere la existencia de diversos mecanismos para asegurar y controlar la fecundación. Dentro de una sola especie de plantas resulta ingenuo asumir que el control en la perpetuación de la especie esté determinado por un mecanismo único de interacción polen-pistilo (Cheung *et al.*, 2000). Los resultados presentes en esta tesis indican que el polen que alcanzó la base de los estilos autoincompatibles debido a la supresión del gen de la aleuraina, lo cual nos permite proponer a la aleuraina como una proteasa importante en la respuesta del rechazo del polen propio en *Nicotiana*. Sin embargo se requieren realizar futuros análisis para comprender con una mejor

profundidad las implicaciones que tiene la actividad proteolítica de la aleurafina durante la respuesta al rechazo del tubo polínico.

7. CONCLUSIÓN

La actividad proteolítica de los tubos polínicos de *Nicotiana* parece llevar a cabo una función esencial en la correcta respuesta al rechazo del tubo polínico en cruza autoincompatibles. Es notable que la actividad proteolítica de enzimas presentes en las vacuolas líticas, es preponderante para la respuesta al rechazo. Así como la interacción de éstas con sus correspondientes sustratos, afecta a todos los fenómenos que tienen lugar durante la interacción polen-pistilo. La falta de un componente como resultado de la acción de la proteasa provocaría alteraciones en la capacidad de evitar la autofecundación. La participación de la aleuraina en esta respuesta puede estar inmersa en una cascada que provoca el desencadenamiento de muerte celular programada, aunque queda por refinar nuestro conocimiento de la participación de proteasas en dicho proceso en las plantas, para colocar a la aleuraina en relación con las demás proteasas involucradas y cómo es que se relaciona con el mecanismo de la autoincompatibilidad. Sin duda, los procesos de degradación proteica ocurren durante el rechazo del tubo polínico. Estos resultados indican que la presencia de esta enzima es crucial en el correcto desarrollo del tubo polínico en cruza incompatibles, ya sea dentro de la vacuola, o bien, una vez liberada al citoplasma. Aunque es difícil determinar sin ambigüedad si la enzima tiene actividad sobre algún sustrato partícipe del mecanismo de la autoincompatibilidad, si facilita la muerte celular mediante el control del balance de aminoácidos o desempeña otras funciones aún no esclarecidas. Sin embargo, la participación de la proteasa en la germinación, elongación y aceptación o rechazo del grano de polen es evidente.

PERSPECTIVAS

El propósito de futuros estudios será un mejor entendimiento del papel de las proteasas en procesos que ocurren durante la polinización, germinación, reconocimiento y el rechazo o la aceptación del tubo polínico, para poder integrar el papel de las proteasas en de la autoincompatibilidad modelo actual.

Además resulta particularmente interesante saber si la vacuola se mantiene intacta en o no en tubos polínicos que llegan a la base del pistilo después de la polinización con polen transformado en cruza compatibles, y conocer cuáles son los sustratos celulares o proteínas blanco de la aleuraina para determinar el papel de la proteasa durante la cascada bioquímica hacia el arresto del crecimiento en el tubo polínico.

Referencias

- Ávila-Castañeda BA, Cruz-García F. (2011). Sistema de incompatibilidad gametofítica en plantas: una oportunidad para evitar la endogamia. *Mensaje Bioquímico*, 35:67-78.
- Boex-Fontvielle E, Rustgi S, Reinbothe S, Reinbothe C. (2015). A Kunitz-type protease inhibitor regulates programmed cell during flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 66 (20): 6119-6135.
- 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. *Journal of Experimental Botany* 59 (11): 3187-3201.
- Cheung AY, Wu HM, Di Stilio V, Glaven R, Chen C, Wong E, Ogdahl J, Estavillo A. (2000). Pollen-pistil interactions in *Nicotiana glauca*. *Annals of Botany* 85 (Supplement A): 29-37.
- Cruz-García F, Hancock CN, McClure B. (2003). S-RNase complexes and pollen rejection. *Journal of Experimental Botany*, 54 (380):123-130.
- Cruz-García F, Juárez-Díaz JA, Cruz González-Zamora, Busot-González GY, Hernández-Navarro A. (2007). Sistemas de reconocimiento célula-célula basados en S-RNasa que promueven la diversidad genética en las plantas. *Mensaje Bioquímico*, 31: 158-171.
- Cordero de Mesa M, Santiago-Doménech N, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA. (2004). The *CaMV* 35S promoter is highly active on floral organs and pollen of transgenic strawberry plants. *Plant Cell Reports* 23: 32-38.
- de Groot P, Weterings K, de Been M, Wittink F, Hulzink R, Custers J, van Herpen M, Wullems G. (2004). Silencing of the pollen-specific gene *NTP303* and its family members in tobacco affects in vivo pollen tube growth and results in male sterile plants. *Plant Molecular Biology*, 55 (5): 715-726.
- de Nettancourt D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants, (HeidelbergSpringer, New York, 2001).
- Eason JR, Ryan DJ, Watson LM, Hedderley D, Christey MC, Braun RH, Coupe SA. (2005). Suppression of the cysteine protease, aleurain, delays floret senescence in *Brassica oleracea*. *Plant Molecular Biology* 57: 645-657.

- García-Valencia LE, Bravo-Alberto CE, Cruz-García F. (2013). Evitando el incesto en las plantas: Control genético y bioquímico. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*. 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 Physiology*, DOI:10.1104.
- Giranton JL, Ariza MJ, Dumas C, Cock JM, Gaude T. (1995).The S-locus receptor kinase gene encodes a soluble glycoprotein corresponding to the SKR extracelular domain in *Brassica oleracea*. *Plant Journal*. 8 (6) 827-834.
- Goldraij A, Kondo K, Lee C B, Hancock C N, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips T E, Cruz-García F, McClure B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*. 439 (16): 805-810.
- Goldraij A. (2014). Control molecular de la polinización. *Investigación y ciencia*, 451: 31-39.
- Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lankiewicz L, Wiczek W, Wieczerek E, Ciarkowski J, Drabik P, Janowski R, Kozak M, Jaskólski M, Grubb A. (2001) Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*, 48 (1): 1-20.
- Gu C, Shabab M, Strasser R, Wolters PJ, Shindo T, Niemer M, et al. (2012) Post-Translational Regulation and Trafficking of the Granulin-Containing Protease RD21 of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7(3): e32422
- Halls CE, Rogers SW, Rogers JC. (2005). Purification of a proaleurain maturation protease. *Plant Science* 168, 1267-1279.
- Hancock CN, Kent L, McClure B. (2005). The 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant Journal* 43:716-723.
- Hao L, Hsiang T, Goodwin PH. (2006). Role of two cysteine proteinases in the susceptible response of *Nicotiana benthamiana* to *Colletotrichum destructivum* and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Science* 170, 1001-1009.
- Holwerda BC, Rogers JC. (1992). Purification and characterization of aleurain: A plant thiol protease functionally homologous to mammalian cathepsin H. *Plant Physiology* 99 (3): 848-855.
- Holwerda BC, Pagdett HS, Rogers JC. (1992). Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *The Plant Cell* 4: 307-318.

- Huang J, Zhao L, Yang Q, Xue Y. (2005). AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *The Plant Journal* 46(5): 780-793.
- Hulzink, RJM, de Groot PFM, Croes AF, Quaadvlieg W, Twell D, Wullems GJ, van Herpen MM. (2002). The 5' Untranslated region of the *ntp303* gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation. *Plant Physiology* 129, 342-353.
- Jang IC, Yang SW, Yang JY, Chua NH. (2007). Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochrome A signaling. *Genes Development* 21(16): 2100-2111.
- Jiménez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, Cruz-García F. (2013). NaStEP: A proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiology*, 161:97-107.
- Lee C, Swatek KN, McClure B. (2008). Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana alata* pistil arabinogalactan proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (40): 26965-26973.
- Luo F, Fong YH, Zeng Y, Shen J, Jiang L, Wong KB. (2014). How vacuolar sorting receptor proteins interact with their cargo proteins: crystal structures of apo and cargo-bound forms of the protease associated domain from *Arabidopsis* vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* 26 (9) 3693-708.
- McClure B, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke A. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature*, 342 (21): 955-957.
- McClure B, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R. (1999). A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23): 13548-13553.
- McClure B (2004). S-RNase and SLF determine S-haplotype-specific pollen recognition and rejection. *Plant Cell*. 16: 2840-2847.
- McClure B, Cruz-García F, Romero C (2011). Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals of Botany* doi:10.1093/aob/mcr179.
- McCubbin A, Kao T. (2000). Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16:333-364.

- Poulter N, Wheeler MJ, Bosch M, Frankin-Tong VE. (2010). Self-incompatibility in *Papaver*: identification of the pollen S-determinant PrpS. *Biochemical Society Transactions*, 38: 588-592.
- Pružinská A, Shindo T, Niessen S, Kaschani F, Tóth R, Millar AH, Van der Hoorn RAL. (2017). Major Cys protease activities are not essential for senescence in individually darkened *Arabidopsis* leaves. *BMC Plant Biology* 17 (4).
- Qin P, Ting D, Shieh A, McCormick S (2012). Callose plug deposition patterns vary in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana* ecotypes and tomato species. *BioMed Central Plant Biology*, 12:178.
- Radlowski M. (2005). Proteolytic enzymes from generative organs of flowering plants (Angiospermae). *Journal of Applied Genetics* 46 (3): 247-257.
- Rogers JC, Dean D, Heck GR. (1985). Aleurain: A barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 6512-6516.
- Rogers SW, Burks M, Rogers JC. (1997). Monoclonal antibodies to barley aleurain and homologs from other plants. *The Plant Journal* 11 (6): 1359-1368.
- Scheffers BP, Joppa LN, Pimm SL, Laurance WF. (2012). What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 27: 501-510.
- Sijacic P, Wang X, Skirpan A, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao T. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, 429: 302-305.
- Soudry E, Ulitzur S, Gepstein S. (2005). Accumulation and remobilization of amino acids during senescence of detached and attached leaves in planta analysis of tryptophan levels by recombinant luminescent bacteria. *Journal of Experimental Botany* 56 (412): 695-702.
- Swidzinski JA, Sweetlove LJ, Leaver CJ. (2002). A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 35: 545-555.
- Takayama S, Isogai, A. (2005). Self-Incompatibility in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 56:467-89.
- Ünal M, Vardar F, Aytürk Ö. (2013). Callose in plant sexual reproduction. *Current Progress in Biological Research*: 319-345.

- Wang H, Jiang L. (2011). Transient expression and analysis of fluorescent reporter proteins in plant pollen tubes. *Nature Protocols* 6 (4): 419-426.
- Zhang X, Wang Y, Lv X, Li H, Sun P, Lu H, Li F. (2009). NtCP56, a new cysteine protease in *Nicotiana tabacum* involved in pollen grain development. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/erp022.

- Zhang D, Liu D, Lv X, Wang Y, Xun Z, Liu Z, Li F, Lu H. (2014). The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 26: 2939-2961.

ANEXO

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
D45403.1 CTCTTACTCCCTCACAGAACCAGTAAAAATATCGCCAGTCCCGCGTTCGAGATGGTCCCA
D90408.1 -----CTCACACAAAACCAGTAAAAAATATCGTCACCTTCGCGCGCAGATGGCCAC
U31094.1 -----GTTGCTGTCGTTACAATG
AF233883.1 -----GAGAAAGCCATG
*

D45403.1 CGCCGCTGTTTCGTC-----TCGCCGTCGTCCTCTCGCGGACACCGCCGCGT
D90408.1 CGCCGCTGTCCTCTCTCTCGCCGTCGCCGCGTCGCCGCGACCTCCGCGTCGCCGCG
U31094.1 TCTCGTCTGTCACCTCTATGGTTCTAGTCGCCGCTTTTCGCCGTCGCATTCGCCGA
AF233883.1 TCTGCCAAAACAATCCTATCATCAGTAGTTTGGTGTCTCTCGTCGCCGACATCAGCAGC
*** * * * *

D45403.1 GTCAACTCCGGCTTCGCGGACTCCAACCCGATCCGCCCGTCACCGACCGCGCGGCTCC
D90408.1 GCGTCTCCGGCTTCGAGACTCCAACCCGATCCGCTCCGTCACGGACACCGCGCTCC
U31094.1 ACGGCGAATTCGCCGATGAGAATCCGATCAGGCAAGTT--GTTTCGGACAGTTCCAT
AF233883.1 GCTAATATCGGATTCGATGAGTCAAACCCGATCCGAATG--GTCTCCGATGGTCTCCGG
* * * * *

D45403.1 CGCTCGAGTCCACGGTCTTCGCCGCGCTCGCCGACCCCGGAGCGCTCCGCTTCGCA
D90408.1 GCGCTCGAGTCAACCGTCTCGCCGCGCTCGCCGACCCCGCGCGCTCCGCTTCGCG
U31094.1 GAACTGGAAAGCGGAATTCCTCATGTGTGCGGAGACTCGCTCATGCTCTCTCTTCGCT
AF233883.1 GAGGTAGAAGAATCTGTTCCAGATCTTAGTCAATCTCGTACGTTCTCTCTTCGCT
* * * * *

D45403.1 CGCTTCGCCGTCAGGTACGGCAAGAGTACGAGAGCGCGGAGGTCACAAGCGGTT
D90408.1 CGCTTCGCCGTCAGGCATGGGAAGAGTACGGCAGCGCGGAGGTCAGCGCGGTT
U31094.1 CGCTTTGCTCGAGGTATGGGAAGAGTACGATTCAGTTGAGGAGATCAAGCAAGGTT
AF233883.1 CGCTTCACTCACCATATGGTAAAAAGTATCAGAACGTGGAGGAGATGAAGTTCGATT
***** * * * *

D45403.1 AGGATCTTCTCCGAGACCTCCAGCTGGTCCGCTCCACCAACCGCAAAGCCTCTCTAC
D90408.1 CGGATCTTCTCCGAGACCTCCAGCTCGTCCGCTCCACCAACCGGAGGGCTCCCTTAC
U31094.1 GACATATTTTGGACAATTTGGAGATGATTAATTCGATAATGACAAAGGACTGTCTATC
AF233883.1 TCGATTTTCAAGGAGAATCTTGATTTGATCAGATCCACCAACAAGAAAGGCTTATCTTAC
* * * * *

D45403.1 CGCCTCGGCATCAACCGCTTCGCCGACATGAGCTGGGAGGAGTCCGTCGACCCGGT
D90408.1 CGCCTCGGCATCAACCGTTTCGCCGACATGAGCTGGGAGGAGTCCAGGCGAGCCGGT
U31094.1 AAACCTCGGTCAATGAGTTTGTGACCTAACATGGGATGAATTCGGAGAGATAGGCTG
AF233883.1 AAACCTCGGTGTAATCAATTTGTGATTTGACATGGCAAGAGTTCAAAGGACCAAGCT
***** * * * *

D45403.1 GGGCAGCCAGAACTGCTCCGCCAGCTTACCGGCAACCCGATGCGCGCCGCGCC
D90408.1 GGGCAGCCAGAACTGCTCCGCCAGCTTACCGGCAACCCGATGCGCGACCGCGCC
U31094.1 GGGCAGCTCAAACTGTTCTGTACAACAAGGGCAATCTCAAGTCCGT-----GAC
AF233883.1 GGTGCTGCTCAGAACTGCTTCCACTTTAAAGGGCAGCCACAAGGTCACA-----GAA
* * * * *

D45403.1 GTTCCGTTGCCGAGACGAAAGACTGGAGGGAGGATCGGATGTCAGCCAGTGAAGAAC
D90408.1 ---GCTTCCCGGAGACAAAGACTGGAGGGAGGATCGGATGTCAGCCAGTGAAGAAC
U31094.1 GCTGTTTGGCAGAGACGAAAGACTGGAGGGAGGATCGGATGTCAGCCAGTGAAGAAC
AF233883.1 GCAGCTTTCCTGAAACAAAGACTGGAGAGAGATGATATCGTTAGTCCGGTCAAAGAT
* * * * *

D45403.1 CAGGGCACTGTGGATCATGCTGGACCTCAGCACTACTGGTGCATTTGAGGTCATAT
D90408.1 CAGGGTCACTGTGGCTCTGTTGCCCTCAGCACCCTGCTCTTTGAGGCAGATAT
U31094.1 CAGGGCAAGTCCGGTCTTCTGCTGGACATTCAGCACCCTGCTCTTTGAGGTCAGATAT
AF233883.1 CAGGGAGTTGTGGATCTGCTGGACATTCAGCACAACCTGAGGCTTTGAGGTCAGCTTAC
***** * * * *
```

```

D45403.1 ACCCAGGCAACTGGCAAGCCATCTCTCTCTGAGCAACAGCTTGTGACTGTGGTTTT
D90408.1 ACTCAGGCCACTGGCCGCCTGCTCTCTTTCTGAGCAGCAGCTGGCTGATTGTGCTACT
U31094.1 ACCCAAAAATTTGGGAAGGAATCTCGCTATCTGAGCAGCAGCTGTAGACTGTGCTGGA
AF233883.1 CATCAGGCATTTGAAAAGGAATATCTCTCTGAGCAACAGCTTGTGGATTGTGCTGGA
** * * * * *
D45403.1 GCATTCAACAATTCGGATGCAACGGAGCCCTCCATCCAGGCCTTGAATACATCAA
D90408.1 CGATACAATAATTCGGATGCAAGGGCCCTACCATCTCAGGCCTTGTAGTACATCAA
U31094.1 GCTTTAATAACTTTGGCTGCAACGGTGGACTCCCATCAGCCTTTGAGTACATAAA
AF233883.1 GCTTTCAATAACTATGGTTGCAATGGTGGCCCTCTCTCAAGCCTTGAATACATAAAA
* * * * *
D45403.1 TACAATGGTGCCTTGACACTGAGGAATCTTACCCTTACCAAGGTGTCATGGAATCTGC
D90408.1 TACAATGGTGCCTTGACACTGAAGAGGCTTACCCTTACACGGGTGTCATGGCATCTGT
U31094.1 TCCAATGGTGTCTTGAACCTGAAGAAGCATATCCATACCCGGCAAGAAGCGCTTATGT
AF233883.1 TCCAACGGTGCCTGCACACAGAAAGCTTATCCTTATACCGGTAAGATGAAACCTGC
* * * * *
D45403.1 AAGTTTAAGAATGAGAATGTTGGAGTCAAGGTTTTGGACTCGTTAACATCACCCCTGGT
D90408.1 CATTACAAGCCTGAAAACGCTGGAGTCAAGGTTTTGGACTCCGTTAACATCACCCCTGGT
U31094.1 AAATTTTCATCACAATAATGTTGGTGTCAAAGTCACTGATCTGCTCAATATTACCTGGGT
AF233883.1 AAATTTTCAGCTGAAAACGTTGGTGTACAAGTCTCAACTCAGTCAACATTACTCTGGGT
* * * * *
D45403.1 GCTGAGATGAACTGAAGGATGCTGTTGGTCTGGTTCGCCAGTTAGTGTGCTTCCGAG
D90408.1 GCTGAGGATGAGCTGAAGAATGCTGTTGGACTGTTGCTCCAGTGTAGTGTGCTTCCGAG
U31094.1 GCTGAAGATGAAATAAATACGCTGTGCTGCTGGTTCAGCCCTGTTAGTGTGCTTTCGAG
AF233883.1 GCTGAAGATGAACTGAAGCATGCGGTTGGATTGCTACGGCCAGTAAAGCATGCAATTCGAG
*****
D45403.1 GTGATCACTGGTTTCAGGCTGTACAAGAGCGGAGTTTACACTAGCGACCATTGTGGAAC
D90408.1 GTGATCAACGGTTTCAGGATGTACAAGAGTGGAGTTTACACAAGTGACCATTGTGGAAC
U31094.1 GTAGTTAAAGTTTCAACAGTACAAGAGCGGAGTTTATACCCAGCAGGATGCGGAAC
AF233883.1 GTTATCACTCGTTCGGCTTTACAAGAGTGGAGTTTACACTGATAGTCACTGTGGAAGT
** * * * * *
D45403.1 ACACCGATGGATGTAACCACGCTGTTCTGGCTGTTGGCTACGGTGTCAAGATGGTGA
D90408.1 TCTCCAATGGATGTAACCACGCTGTTCTGGCCGTTGGCTATGGTGTGAAAATGGCGTT
U31094.1 ACTCCATGGATGTAACCACGCTGTTCTGGCTGTTGGCTACGGTGTGAAATATGGTGT
AF233883.1 ACTCCAATGGATGTAACCACGCGGTTTGGCCGTTGGTTAGGAGTGAAGACGGTGA
* * * * *
D45403.1 CCCTACTGGCTCATCAAGAACTCATGGGCGCTGACTGGGGTATGAGGGTTACTTCAAG
D90408.1 CCCTACTGGCTCATCAAGAACTCATGGGTCGAGACTGGGGTGACAATGGTTACTTCAAG
U31094.1 CCCTTTTGGCTCATCAAGAACTCATGGGAGCAGATGGGGTGACAATGCATATTTCAAA
AF233883.1 CCATATTGGCTTATTAAAGAACTCATGGGAGCGGATGGGGTGACAAGGTTACTTCAAG
** * * * * *
D45403.1 ATGGAATGGGCAAGAACATGTGCGGTGTTGCTACGTGTGATCCTACCCATTTGTCGCA
D90408.1 ATGGAATGGGCAAGAACATGTGCGGTATTTGCTACTTGGGCATCCTACCCATTTGTCGCA
U31094.1 ATGGAGATGGGTAACGACATGTGCGGTATTTGCAACTTGGGCATCCTACCCATTTGTCGCT
AF233883.1 ATGGAGATGGGCAAGAACATGTGCGGTATTTGCTACATGTGATCCTACCCATTTGTCGCT
*****
D45403.1 TGAGGCCCTTACGAAATGTTACATGGTCTGTTT-----GGCATCAATAATGCATG
D90408.1 TGAGGCTGCCACGGATAGTCTCATTTGTTGCAATTTAGTTTGAACCCCAATAATATAT
U31094.1 TGAGGTTCCGAGTATGTAATAATTTTTCACCAAGGGAAGTACACATAAAC-CCCAGTA
AF233883.1 TGAGATGATCAGCGAATGTTGTTGCTCAATTTACAAATACGAAATGTTCA-CGTATTTA
**** *
D45403.1 TTT-AACCTGAGCTTGGCGATGGGTTATACAGAACGGAAACTCTGTTTGTGAATAGAAAA
D90408.1 TTGCTGTCCAAGGATGAAGTATGGGTATACAGAACTGAAACTTCTTGTGAATATAAGA
U31094.1 GTCTAGTTGATGATGCGGAAAAC-----ATCCAAGCTCCATCTCAGATACTT
AF233883.1 TTGGATTAAGACATTACGTAAG-----TTGGGACTTGGGAATGCAT-----
* * * * *
D45403.1 TCATGA---AGGAAGGAGTTGACCGGATTC-CTGCTGTACGCTCTCCCGACTGTGTAG
D90408.1 TCATAA---GGCATTGAATTAGCCAGTGC-ATGTAATCTCTCCTGTATGGTTGTGTAG
U31094.1 GTATTAATTGGAGATCTCTATGCACCGAAGATGTTTAGGCTACTTAGTGAAGAATAA
AF233883.1 ---ATGGTTTATGCTTGTGTAACATAAAAAGTCTGTTAAT-----ATGTACAA---AA
**
D45403.1 GTAGATTGTAGTGGGTTCCGAAGTACTTACTCATACGTTGTATGACAGTTTATT-
D90408.1 GTAATCCAGCATTTGGGTTT-CAGAGTACTTCCATTACATGGTGTAAATTCCTATTATC
U31094.1 GAGACAGGAAGCTGAATTCACAGAC-----ATAAATATGAGAATAATCCCTATGT-
AF233883.1 TAAAGCCAAAATATAGACGCAAAAT-----TTATAATATTTTATGTTAAATTTAT-
* * * * *
D45403.1 -TATGAAACCAAAATACGCATTGATCGTA-----
D90408.1 GACAGAAATGGCTATTCATATTCATAGTGCAGTTACGAAAATTCGGGTCTATGTGATCATT
U31094.1 -----AACTATACTTGTGTAAGTCAATGGGTTTAAAAAAGGA-----
AF233883.1 -----GAACATAAATGATTTAAG-----
* * *
D45403.1 -----
D90408.1 TTATTTCGAGTGATTTTACAGCCATCTATTATAGTTTCTGGT
U31094.1 -----
AF233883.1 -----

```

Anexo 1. Alineamiento de las secuencias de cDNA completo de las proteínas del tipo aleuraina en diferentes géneros. Se observan los oligonucleótidos (rectángulos) diseñados con base en la secuencia de *Petunia* con el fin de amplificar parte de secuencia del cDNA de la aleuraina en *Nicotiana*. (U31094.1-*Petunia*, D45403.1-*Zea*, AF233883.1-*Arabidopsis*, D90408.1-*Oryza*).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Zea      MVPRRLFVL-AV--VVLADTAAVVNSGFADSNPVPTDRAASALESTVFAALGRTRDAL
Oryza    MAHRRRIILLLAVAAVAATSAAAASSGFDDSNPIRSVTDHAASALESTVIAALGRTRGAL
Arabidopsis  MSAKTI-LSS-VVLVVLVAASAAANIGFDESNPVIR-MVSDGLREVEESVSQILGQSRHVL
Petunia  MSRLSL-LL--VLVAGLFAVAFARTANFADENPIRQVVSDSFHELESGILHVVGQTRHAL
Nicotiana MSRFSL-LLALVVAGGLFAAALAGPATFADENPIRQIVSDGLHELENGILQVVGKTRHAL
*      :  :  *      .      .      *  :.****  :..  .      :*.  :      :*::*  .*

Zea      RFARFAVRYGKSYESAEEVHKRFRIIFSESLQLVLRSTNRKGLSYRLGINRFADMSWEEFRA
Oryza    RFARFAVRHKGKRYGDAAEVQRRFRIIFSESELELVRSTNRRGLPYRLGINRFADMSWEEFQA
Arabidopsis  SFARFTHRYGKKYQNVEEMKLRFSIFKENLDLIRSTNKKGLSYKLGVNQFADLTWQEFQR
Petunia  SFARFARRYGKRYDSVEEIKQRFDIFLDNLEMINSHNDKGLSYKLGVNEFSDLTWDEFRR
Nicotiana LFARFARHYGKRYETVEEIKQRFEVFLDNLKMIRSHNKKGLSYKLGVNEFTDITWDEFRR
****: *::*  *  .  *:: **  :*  :.*::.*  *  :**  *::*:*:*:*::*::*

Zea      TRLGAAQNCSATLTGNHRMRAAAVALPETKDWREDDGIVSPVKNQGHCGSCWTFSTTGALE
Oryza    SRLGAAQNCSATLAGNHRMRDA-PALPETKDWREDDGIVSPVKDQGHCGSCWPFSTTGSLE
Arabidopsis  TKLGAAQNCSATLKGSVKVTE--AALPETKDWREDDGIVSPVKDQGGCGSCWTFSTTGALE
Petunia  DRLGAAQNCSATTKGNLKLRD--AVLPETKDWREAGIVSPVKNQKCGSCWTFSTTGALE
Nicotiana DRLGAAQNCSATTKGNLKLTD--VVLPETKDWREAGIVSPVKNQKCGSCWTFSTTGALE
:*****  *  .  :  .*****  *****:*  *****  *****:*

Zea      AAYTQATGKPIISLSEQQQLVDCGAFNFGCNGGLPSQAFEYIKYNGGLDTEESYPYQGVN
Oryza    ARYTQATGPPVLSLSEQQQLADCATRYNFGCSGGLPSQAFEYIKYNGGLDTEEAYPYTGVN
Arabidopsis  AAYHQAFGKGISLSEQQQLVDCAGAFNFGCNGGLPSQAFEYIKSNGGLDTEKAYPYTGKD
Petunia  AAYTQKFGKGISLSEQQQLVDCAGAFNFGCNGGLPSQAFEYIKSNGGLDTEEAYPYTGKN
Nicotiana AAYGQAFGKGISLSEQQQLVDCAGAFNFGCNGGLPSQAFEYIKSNGGLDTEEAYPYTGKN
*  *  *  *  :*****.*.  :*:*.******  *****:*:*  *  :

Zea      GICKFKNENVGVKVLDSVNIITLGAEDELKDAVGLVLRPVSVAFEVITGFRLYKSGVYTSDH
Oryza    GICHYKPENAGVKVLDSVNIITLVAEDELKNAVGLVLRPVSVAFQVINGFRMYKSGVYTSDH
Arabidopsis  ETCKFSAENVGVQLNSVNIITLGAEDELKHAVGLVLRPVSIAFEVIHSFRLYKSGVYTDH
Petunia  GLCKFSSQNVGVKVTDSVNIITLGAEDELKYAVALVLRPVSVAFEVVKGFQKSGVYTSDE
Nicotiana GLCKFSSENVGVKVIDSVNIITLGAEDELKYAVALVLRPVSIAFEVIKGFQKSGVYTSDE
*::..  :*.*:*  :*****  *****  *.******:*:*  :.*  :*****  .

Zea      CGTTPMDVNHAVLAVGYGVEDGVPPYWLKNSWGADWDGEGYFKMEMGKNMCGVATCASYP
Oryza    CGTSPMDVNHAVLAVGYGVENGVPYWLKNSWGADWDGNGYFTMEMGKNMCGIATCASYP
Arabidopsis  CGSTPMDVNHAVLAVGYGVEDGVPPYWLKNSWGADWDGKGYFKMEMGKNMCGIATCASYP
Petunia  CGTTPMDVNHAVLAVGYGVEYVPPFWLKNSWGADWDGNAYFKMEMGNDMCGIATCASYP
Nicotiana CGNTPMDVNHAVLAVGYGVENGVPYWLKNSWGADWDGNGYFKMEMGKNMCGIATCASYP
**.:*****  *****  :*.******  *****

Zea      IVA
Oryza    IVA
Arabidopsis  VVA
Petunia  VVA
Nicotiana  VVA
: **

```

Anexo 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la aleuraina de diferentes géneros. Se observa que la secuencia de aminoácidos de la aleuraina se encuentra altamente conservada entre diferentes especies de plantas.