



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

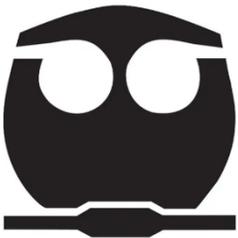
ANÁLISIS GENÉTICO Y BIOQUÍMICO DE LA MUTANTE AUTOCOMPATIBLE 4936  
DE *NICOTIANA ALATA*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CRUZ RODRÍGUEZ ABRAHAM EDUARDO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Martinez Barajas J. Eleazar

**VOCAL:** Dra. Sánchez Nieto Sobeida

**SECRETARIO:** Dr. Cruz García Felipe

**1er. SUPLENTE:** Dr. Plasencia de la Parra Francisco Javier

**2° SUPLENTE:** Dra. Dimitrova Dinkova Tzetanka

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio 104 de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

**Asesor del Tema:**

Dr. Felipe Cruz García

**Supervisora Técnica:**

Dra. Yuridia Cruz González Zamora

**Sustentante:**

Abraham Eduardo Cruz Rodríguez

## Reconocimientos

Quisiera reconocer a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, que han sido fundamentales en la realización de esta tesis de licenciatura y mi formación profesional.

Gracias al apoyo recibido por el Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN204622.

## Agradecimientos

Al Dr. Felipe Cruz García y a la Dra. Yuridia Cruz González Zamora, por su invaluable orientación en todo el proceso de investigación, paciencia, sus aportaciones y conocimientos para el desarrollo y culminación de este trabajo de investigación.

A mi hermano Aarón, por ser mi apoyo incondicional en todo momento quién me ayudo a mantenerme motivado y perseverar en este proceso. Gracias por elegirme hermano.

A mi mamá Rosalba y a mi papá Eduardo, por su amor, aliento, consejos, presencia y constante respaldo en todos los aspectos de mi vida.

Su apoyo ha sido clave en este logro académico y profesional. Quiero que sepan que este es un logro más de nosotros como familia.

Con cariño y agradecimiento.

Su alumno, hermano e hijo.

Abraham Eduardo

## Índice

Reconocimientos .....	3
Agradecimientos .....	3
Índice .....	4
Índice de figuras .....	6
Índice de tablas .....	7
Resumen .....	8
Introducción .....	10
Estructura de la flor .....	10
Estructuras no reproductivas de la flor .....	10
Órganos sexuales .....	11
Androceo .....	11
Polen .....	11
Gineceo .....	11
Angiospermas y hermafroditismo .....	12
Endogamia y mecanismos de prevención de la endogamia .....	12
Sistema de autoincompatibilidad .....	13
Locus S .....	13
Incompatibilidad gametofítica .....	14
Determinantes de especificidad S-RNasas y <i>SLF</i> .....	15
S-RNasas .....	15
<i>SLF (S-locus F-box protein)</i> .....	15
Genes que participan en la vía del rechazo del polen y son partes del control gametofítico. ....	15
Modelos actuales del rechazo del polen .....	17
Modelo citotóxico del rechazo del polen dependientes de S-RNasas .....	17
Modelo del rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasas .....	18
Degradación de las S-RNasas .....	18
Modelo de compartimentalización de las S-RNasas .....	18
Antecedentes inmediatos .....	20
Hipótesis .....	20

Objetivo general .....	20
Objetivos particulares .....	20
Materiales y Métodos .....	21
Material vegetal.....	21
Métodos .....	21
Purificación de DNA genómico y amplicones de las S-RNAsas.....	21
Diseño de oligonucleótidos. ....	22
Clonación de las S-RNAsas .....	23
Secuenciación y alineamiento.....	23
Genotipificación por reacciones de PCR .....	23
Expresión proteica de las S-RNAsas .....	24
Polinizaciones manuales en la mutante 4936 .....	24
Resultados.....	26
Determinando el genotipo S de la mutante 4936 de <i>Nicotiana alata</i> . ....	26
Evaluación de la expresión de las S-RNAsas a nivel protéico de la mutante 4936....	27
Mutaciones de pérdida de función en la región codificadora de las S-RNAsas.....	28
Búsqueda de mutaciones en las secuencias aminoacídicas de la <i>S<sub>A2</sub>-RNasa</i> y <i>S<sub>C10</sub>-RNasa</i> de la mutante 4936. ....	31
Acumulación de las proteínas <i>120K</i> , <i>HT-B</i> , <i>NaTrxh</i> y <i>NaStEP</i> en el pistilo maduro de la mutante 4936. ....	33
Análisis genético en la progenie de la mutante 4936 de <i>N. alata</i> .....	34
Genotipos S de la progenie F <sub>1</sub> proveniente de la autopolinización de la mutante 4936 de <i>Nicotiana alata</i> . ....	36
La temperatura como modificador en el fenotipo en la autoincompatibilidad de <i>Nicotiana alata</i> . ....	39
Discusión .....	46
Conclusiones .....	49
Perspectivas .....	50
Anexos .....	51
<b>Apéndice I: Experimentación <i>in silico</i></b> .....	51
<b>Apéndice II: Metodología</b> .....	55
Referencias .....	60

## Índice de figuras

Figura 1. La flor con sus diferentes órganos.....	10
Figura 2. Rechazo del polen en el sistema de AI esporófitica (AIE).....	14
Figura 3. Genotipo S de la mutante 4936 de <i>N. alata</i> .....	27
Figura 4. Inmunodetección de las proteínas $S_{C10}$ -RNasa y $S_{A2}$ -RNasa en extractos proteicos de pistilos maduros de la mutante 4936 con anticuerpos específicos. ....	28
Figura 5. Amplificación de los genes $S_{A2}$ -RNasa y $S_{C10}$ -RNasa.....	29
Figura 6. Análisis por PCR del plásmido purificado.....	30
Figura 7. Alineamiento de las secuencias de la $S_{C10}$ -RNasa obtenidas de la mutante 4936 y la S-RNasa silvestre. ....	31
Figura 8. Alineamiento de las secuencias de la $S_{A2}$ -RNasa obtenidas de la mutante 4936 y la S-RNasa silvestre. ....	32
Figura 9. Inmunodetección las proteínas a) <i>HT-B</i> , b) <i>NaStEP</i> , c) <i>120-K</i> y d) <i>NaTrxh</i> en el pistilo de la mutante 4936 de <i>N.alata</i> y e) Gel teñido con azul de coomassie.....	33
Figura 10. Escenarios posibles para determinar si la mutación está dentro o fuera del locus S en la mutante 4936 de <i>N. alata</i> .....	35
Figura 11. Crecimiento de plantas de <i>N.alata</i> en el Invernadero I-404 Facultad de Química.....	36
Figura 12. Genotipificación por PCR de algunas plantas de la progenie F <sub>1</sub> derivada de la autopolinización de la mutante 4936 de <i>N. alata</i> .....	37
Figura 13. Genotipos esperados de la progenie F <sub>1</sub> derivada de la autopolinización de la mutante 4936 de <i>N.alata</i> . ....	39
Figura 14. Rechazo de polen propio en mutante 4936 de <i>N. alata</i> .....	41
Figura 15. Registro de temperaturas durante el estudio en <i>N. alata</i> 4936 en temperaturas mayores a 30 °C.....	41
Figura 16. Planta 4936 <i>Nicotiana alata</i> y planta control con genotipo $S_{A2}S_{A2}$ durante polinizaciones a temperaturas mayores de 30 °C. A) Planta con genotipo $S_{A2}S_{A2}$ B) Línea 4936 con genotipo $S_{C10}S_{A2}$ .....	42
Figura 17. Autopolinización de <i>Nicotiana alata</i> 4936 $S_{C10}S_{A2} \times S_{C10}S_{A2}$ en temperatura alta. Se observa la formación de fruto.....	43
Figura 18. Formación de fruto y recolección de semillas de la mutante 4936 de <i>N. alata</i> . ....	44
Figura 19. Registro de temperaturas durante el estudio en <i>N. alata</i> 4936 a temperatura a temperaturas no mayores a 23 °C.....	45

Figura 20. Autopolinización de <i>N. alata</i> 4936 $S_{C10}S_{A2} \times S_{C10}S_{A2}$ en temperaturas de los 15 °C a 23 °C.....	45
Figura 21. Mapa del vector pJET 1.2/blunt. ....	52
Figura 22. Construcción del plásmido con la secuencia de las S-RNAsas .....	53

## Índice de tablas

Tabla 1. Genotipificación de la progenie proveniente de la autopolinización de la mutante (AC) 4936 de <i>N. alata</i> .....	38
Tabla 2. Registro de temperaturas a las cuales se realizaron los experimentos de autopolinización.....	54

## Resumen

La autoincompatibilidad sexual (AI) es un mecanismo que desarrollaron las angiospermas para evitar la autofecundación y favorecer la polinización cruzada, rechazando su propio polen, lo que evita la endogamia y sus problemas genéticos y a su vez promueve la variación genética en las generaciones futuras. En la familia *Solanaceae*, la AI se controla a nivel genético por el locus *S*,/i. el cual es multialélico y alberga a las determinantes de especificidad femenina (*S*-RNasa) expresada en el pistilo y a la masculina (*SFL*) expresada en el polen. La interacción *S* específica de estas determinantes en el tubo polínico conduce al rechazo del polen propio cuando un alelo *S* coincide con alguno de los alelos *S* del pistilo, si la planta es heterociga. Además de las *S*-RNasas y *SFL*, se requieren otras proteínas, codificadas por genes modificadores para que se lleve a cabo el rechazo del polen. Hasta ahora se han identificado cinco de estos genes: *120K*, *HTB*, *NaStEP*, *NaSIPP* y *NaTrxh*.

En el año 2020 se identificó una línea mutante autocompatible (AC) de *Nicotiana alata* (4936). El genotipo *S* de la mutante es  $S_{C10}S_{A2}$ , por lo que expresa en el estilo tanto la *S<sub>C10</sub>-RNasa* como la *S<sub>A2</sub>-RNasa*. Cuando la mutante 4936 es autopolinizada, forma frutos, ratificando su fenotipo AC. Notablemente, cuando la mutante se polinizó con polen de una planta AI de *N. alata* homociga  $S_{A2}S_{A2}$  se formaron frutos, mientras que cuando se polinizó con polen *S<sub>C10</sub>* la planta lo rechazó, sugiriendo que la *S<sub>C10</sub>-RNasa* era funcional, pero no la *S<sub>A2</sub>-RNasa*. Para probar esta hipótesis, se clonaron los genes de la *S<sub>A2</sub>-RNasa* y la *S<sub>C10</sub>-RNasa* a partir de DNA genómico de la mutante 4936, para determinar si existía mutaciones de pérdida de función en la *S<sub>A2</sub>-RNasa*. Ambos genes se secuenciaron y el análisis de las secuencias indicó que ninguna de las *S*-RNasas presentaba mutaciones. Sin embargo, aún quedaba la posibilidad de que el gen de la *S<sub>A2</sub>-RNasa* no se estuviera expresando, por lo que se procedió a determinar si la *S<sub>A2</sub>-RNasa* se expresaba nivel de proteína correctamente en el pistilo de la mutante 4936. Para esto se realizó un inmunoanálisis mediante ensayos de Western-blot utilizando anticuerpos anti *S<sub>A2</sub>*-y anti *S<sub>C10</sub>-RNasa*. Los resultados indicaron, que tanto la *S<sub>A2</sub>-RNasa* como la *S<sub>C10</sub>-RNasa*, acumulan niveles normales de ambas ribonucleasas en el pistilo maduro de la mutante 4936, por lo que se descartó que eso fuera el motivo del fenotipo de compatibilidad observado en la mutante 4936. Otra posibilidad que explicará el fenotipo de

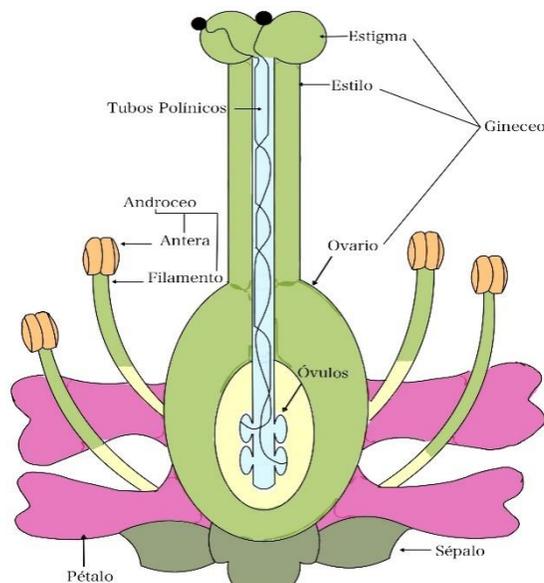
compatibilidad de la mutante 4936, es que genes modificadores conocidos (*120K*, *HT-B*, *NaStEP* y *NaTrxh*), no se expresaran correctamente, por lo que se realizó un inmunoanálisis, para estos genes modificadores, encontrándose niveles normales de las proteínas codificadas en estos genes en el pistilo de la mutante. Para determinar si la mutación que confiere compatibilidad se encuentra fuera del locus *S*, se realizó un análisis genético con la progenie derivada de la autopolinización de la mutante 4936. Los resultados indicaron que la mutación se encuentra en un gen modificador ubicado fuera del locus *S*. Finalmente se determinó que la temperatura podría estar modificando el fenotipo de compatibilidad/incompatibilidad, ya que solo a altas temperaturas (31-35 °C) la mutante 4936, acepta su propio polen, lo cual no ocurre a temperaturas de 15 °C a 20°C.

## Introducción

### Estructura de la flor.

Dentro del reino *Plantae* uno de los grupos genéticamente más diverso son las angiospermas. Su principal característica es la presencia de la flor como estructura reproductiva, que promueve la biodiversidad y es el puente para la reproducción sexual funcionando en los procesos de polinización y fecundación que llevan a la formación de semillas (Cruz *et al.*, 2013).

La flor (Figura 1) está constituida por cuatro verticilos florales (órganos): Cáliz, Corola, androceo y gineceo.



**Figura 1. La flor con sus diferentes órganos.** Las anteras conforman el androceo y el gineceo compuesto por el estigma, el estilo y el ovario. Tomado y modificado (García-Valencia *et al.*, 2013)

### Estructuras no reproductivas de la flor

El cáliz y corola son estructuras que no tienen funciones reproductivas, pero cumplen la función de protección para los órganos fértiles y conforman el perianto.

El cáliz está conformado por sépalos que es el verticilo más externo de la flor, su función es proteger a los órganos sexuales de agentes patógenos y de condiciones ambientales

adversas. Asimismo, mantienen las condiciones necesarias para la maduración y comúnmente tienen colores diversos.

La corola es el conjunto de pétalos que están adentro de los sépalos (cáliz) y puede reflejar colores, así como secretar compuestos que atraen a los polinizadores.

## Órganos sexuales.

En el caso de las angiospermas un número importante de especies tienen flores hermafroditas donde coexisten el androceo y el gineceo.

### Androceo

El androceo es la parte masculina y está compuesta por dos partes: la antera y el filamento. En la antera se produce el polen haploide que contiene la célula vegetativa y la reproductiva, las cuales están cubiertas por la intina y la exina (Mauseth, 1998).

### Polen

En las angiospermas el polen se desarrolla en el interior de las anteras, el proceso comienza con la producción de microsporas que se maduran dentro del microsporangio y por divisiones mitóticas de células diploides conllevan al origen de dos células. Dentro del grano de polen están dos células espermáticas y una célula vegetativa (Mauseth, 1998).

### Gineceo

El conjunto de estructuras femeninas se llama gineceo, normalmente están localizadas en la parte central de la flor. El estigma es la parte más externa donde el polen es depositado y es esencial para su germinación. Le sigue el estilo, que es un conducto que conecta al estigma con el ovario, a lo largo de este crecen los tubos polínicos hasta alcanzar algún óvulo. La unidad básica de la parte femenina es el carpelo, un órgano foliar modificado que incluye uno o más óvulos. La estructura más interna de la parte femenina es el ovario, donde se almacenan y maduran todos los óvulos. El gametofito femenino, el saco embrionario, se desarrolla dentro del óvulo contenido en el ovario de

la flor a partir de una célula madre que es diploide, y que por meiosis produce cuatro células haploides (Hodson y Bryant, 2012).

### Angiospermas y hermafroditismo

El proceso de fertilización del óvulo comienza cuando el grano de polen es liberado de la antera y dispersado por el viento o animales hasta llegar al estigma de la flor, en donde grano de polen se hidrata y germina causando la elongación del tubo polínico que crece por la matriz extracelular de las células del tejido de transmisión, que son las que forman la pared del estilo, hasta llegar al gametofito femenino, liberando así los núcleos espermáticos y fecundando la ovocélula en el saco embrionario causando la formación de un embrión (Lord, 2000).

Lo anterior es muy probable que ocurra en la misma flor debido al hermafroditismo. En muchos casos, la germinación del polen se da indistintamente entre los individuos; sin embargo, la fecundación del óvulo en las angiospermas es un evento que se cumple únicamente cuando los organismos son de la misma especie o de especies genéticamente muy relacionadas. Si la autofecundación sucediese de manera recurrente y sin ningún control habría depresión genética por endogamia en la especie, en consecuencia, la variación genética en generaciones futuras disminuiría. No obstante, las angiospermas han desarrollado mecanismos para poder reconocer y rechazar su propio polen.

### Endogamia y mecanismos de prevención de la endogamia

La endogamia se refiere al cruzamiento sexual entre individuos genéticamente muy relacionados dentro de una comunidad o población aislada genéticamente. En varias especies vegetales esto es un fenómeno común debido al hermafroditismo. La unión entre individuos estrechamente relacionados o consigo mismo no es favorable para la especie debido a que la diversidad genética disminuiría. Para evitar la endogamia, las plantas han evolucionado con diferentes estrategias como lo es la maduración a diferentes intervalos de tiempo de los órganos sexuales llamada dicogamia. La separación de los órganos sexuales de la planta dentro de la misma flor que se denomina

hercogamia, por ejemplo, un pistilo de mayor tamaño de las anteras evita la autopolinización. No obstante, la estrategia que ha tenido más relevancia y que evita de manera muy efectiva la autofecundación y por ende la endogamia, es un sistema genético conocido como AI sexual.

### Sistema de autoincompatibilidad

La autoincompatibilidad ha sido definida como “La incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización” (de Nettancourt 1977). El polen reconocido como ‘propio’ es rechazado por el pistilo. El proceso por el cual el crecimiento de los tubos polínicos es inhibido en el estigma o en el estilo (Cruz *et al.*, 2013).

La AI sexual es un mecanismo que desarrollaron las angiospermas para evitar la autofecundación y favorecer la polinización cruzada, lo que, en consecuencia, promueve un incremento en la variabilidad genética de la especie.

La AI está controlada genéticamente por el locus S y determina la especificidad de la reacción de las partes femenina y masculina, el número de alelos S es variable entre las especies (de Nettancourt, 2001).

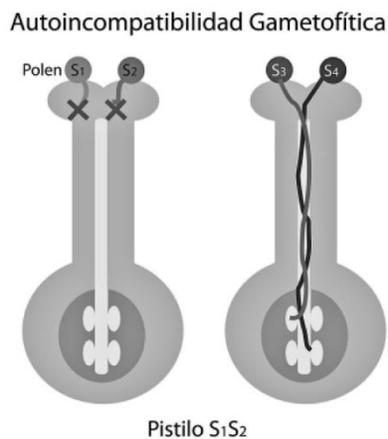
### Locus S

El locus S está conformado por dos genes fuertemente ligados que albergan a los genes responsables del rechazo del polen propio. Uno de ellos codifica la determinante masculina, expresada en el polen y el otro para la determinante femenina, expresada en el pistilo. El locus S es multialélico y muy polimórfico. El mecanismo de herencia de las dos determinantes sigue un mecanismo mendeliano porque no hay recombinación entre las determinantes debido a su cercanía en el locus.

El control genético de rechazo del polen puede ser esporofítico o gametofítico. Para fines de esta investigación profundizaremos en el sistema gametofítico del rechazo del polen.

## Incompatibilidad gametofítica

En el sistema de AI gametofítico (AIG) presente en las familias *Solanaceae*, los componentes que determinan la incompatibilidad provienen del propio grano de polen, descrito como un sistema de reconocimiento interespecífico. En este sistema de incompatibilidad, el rechazo del polen se presenta cuando el alelo *S*, que porta el polen, es igual a uno de los dos alelos presentes en el pistilo diploide de la planta receptora, provocando así que el crecimiento del tubo polínico se inhiba generalmente en el estilo (García-Valencia *et al.*, 2013, Cruz *et al.*, 2013).



**Figura 2. Rechazo del polen en el sistema de AI esporofítica (AIE).** Tomado y modificado (García-Valencia *et al.*, 2013). “El polen incompatible usualmente germina, pero su crecimiento es inhibido en el estilo, determinado por el haplotipo *S*”.

En el caso de *Nicotiana alata* (*Solanaceae*) presenta AIG y entre sus características se encuentran (Cruz *et al.*, 2013):

1. El fenotipo de reconocimiento del polen está determinado por su genotipo haploide.
2. Codominancia de la actividad del alelo *S* en el estilo y el polen.
3. El sitio donde se lleva a cabo la respuesta de AI es el tejido de transmisión del estilo.
4. La respuesta de AI se manifiesta con la inhibición del crecimiento del tubo polínico.
5. Característico de especies con polen bicelular y estigmas húmedos.

## Determinantes de especificidad S-RNasas y SLF

### S-RNasas

En la familia solanácea la determinante femenina es la S-RNasa. Esta ribonucleasa se sintetiza en las células del tejido de transmisión del estilo y se secreta a su matriz extracelular (ME) por donde el tubo polínico crece hacia el ovario.

Una vez que las S-RNasas entran al tubo polínico, si la cruza es incompatible (mismo haplotipo) degradan su RNA inhibiendo su crecimiento, su mecanismo se explicará adelante (Cornish *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1989; McClure *et al.*, 1989; McClure *et al.*, 2006).

### SLF (*S-locus F-box protein*)

SLF (*S-locus F-box protein*) es la determinante masculina en el rechazo del polen en Solanáceas como *N. alata*. En la actualidad se sabe que la determinante masculina es un conjunto de genes parálogos de SLF (Sijacic *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 2010). Los parálogos de SLF codifican para una proteína con una caja F hacia su extremo amino terminal, la cual pertenece a la familia de las enzimas ligasas tipo E3. Su función es ubiquitinar las proteínas para su degradación a través del proteasoma 26S (Goring *et al.*, (2022). Las enzimas E3 ligasas representan un paso crucial en el control de la ubiquitinación de la proteína blanco, E3 reconoce la señal de ubiquitinación en la proteína blanco y coordina la transferencia de la ubiquitina desde la enzima E2 ligasa a un residuo de lisina de la proteína blanco. El mecanismo del rechazo del polen involucra la interacción entre SLF y las S-RNasas en el tubo polínico, para inducir la degradación de las S-RNasas que no comparten el alelo S, vía el proteasoma 26S.

## Genes que participan en la vía del rechazo del polen y son partes del control gametofítico.

Además de la participación de las determinantes de especificidad SLF y la S-RNasa, las evidencias genéticas y bioquímicas indican que hay otros genes fuera del locus S, conocidos como genes modificadores (GM) que son esenciales en el mecanismo de la AI sexual en *Solanaceae*. A la fecha se han identificado en el pistilo los GMs 120K

(Hancock *et al.*, 2005), *HT-B* (McClure *et al.*, 1999), *NaTrxh* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006) y *NaStEP* (Busot *et al.*, 2008; Jimenez-Dúran *et al.*, 2013) y en el polen a *NaSIPP* (García-Valencia *et al.*, 2017).

*HT-B*: El gen (High-Top Band) codifica para la proteína *HT-B* en *N. alata*, *Petunia*, y *Solanum* (Sassa y Hirano *et al.*, 2006). Tiene una expresión específica en el estilo y alcanza su nivel máximo en la antesis. *HT-B* es crucial en la AI, ya que cuando esta suprimida la proteína las plantas ya no rechazan el polen propio. Lo anterior fue demostrado con plantas transgénicas de *Nicotiana* en donde se suprimió la expresión de *HT-B* y la capacidad de rechazar polen propio fue nula. Esto fue esencial para clasificar a *HT-B* como un GM en la AI.

La proteína *HT-B* se transporta de la ME del tejido de transmisión del estilo al interior del tubo polínico y si la cruz es compatible, *HT-B* es degradada en el tubo polínico, mientras que, si la cruz es incompatible, *HT-B* la proteína permanece estable en el interior del tubo polínico, por lo que se propone que *HT-B* es esencial en la vía del rechazo del polen propio (Goldraij *et al.*, 2006).

*120-K*: Es una glicoproteína abundante en la ME del tracto de transmisión del estilo de *N. alata*. *120K* también se transporta al citoplasma del tubo polínico (Goldraij *et al.*, 2006). En experimentos *in vitro* *120* forma complejos con las *S-RNasas* (Cruz-García *et al.*, 2005). Experimentos de pérdida defunción en híbridos transgénicos entre *N. plumbaginifolia* x AI *N. alata* demuestran que la supresión de *120K* provoca que estos híbridos pierdan la capacidad de rechazar el polen propio (Hancock *et al.*, 2005).

*NaStEP*: El gen (*N. alata Stigma Expressed Protein*) codifica para una proteína que es un inhibidor competitivo tipo Kunitz (Busot *et al.*, 2008). Se localiza abundantemente en estigmas de *N. alata* AI. *NaStEP* forma complejos con la proteína el polen *NaSIPP* (García-Valencia *et al.*, 2017); y con canales dependientes de voltaje (VDC) (Cruz-Zamora *et al.*, 2020). La supresión de *NaStEP* en plantas transgénicas de *Nicotiana* rompe la AI. En el tubo polínico, *NaStEP* protege la degradación de *HT-B* lo cual indica

que *NaStEP* tiene un papel esencial y coordinado con que *HT-B* pueda realizar su función (Busot *et al.*, 2008; Jiménez Duran *et al.*, 2013).

*NaTrxh*: El gen *NaTrxh* codifica para la tiorredoxina tipo h que se expresa preferencialmente en el pistilo de *N. alata*. *NaTrxh* se secreta a la ME del tejido de transmisión del estilo (Juárez-Díaz *et al.*, 2006) y forma complejos con las S-RNasas reduciendo de manera específica uno de los cuatro puentes disulfuro de la S-RNasa lo cual provoca un aumento de siete veces en su actividad de ribonucleasa. La coexpresión de una versión mutada en el sitio activo de *NaTrxh* en plantas transgénicas, provoca que se pierda la capacidad de rechazar su propio polen (Torres Rodríguez *et al.*, 2020).

## Modelos actuales del rechazo del polen

### Modelo citotóxico del rechazo del polen dependientes de S-RNasas

El modelo citotóxico del rechazo del polen que está distribuido en las familias *Solanaceae* y *Rosaceae*, entre otras, es llamado de esa forma debido a que se degrada el RNA de los tubos polínicos incompatibles que se reconoce como propio en una autopolinización incompatible, recordando que una polinización es incompatible porque los alelos polen-pistilo son idénticos. La determinante femenina del locus *S* codifica para una S-RNasa. La proteína que es traducida tiene características de glicoproteína la cual tiene cinco regiones conservadas y dos regiones hipervariables las cuales dan la especificidad a las S-RNasas (McClure and Franklin-Tong *et al.*, 2006).

Los productos alélicos de locus *S* que son las S-RNasas de la parte femenina y determinantes genéticas de rechazo del polen tienen interacción con las proteínas *SLF* que es la parte masculina dentro del tubo polínico. Una vez que ambas son secretadas por las células del tejido de transmisión hacia la matriz extracelular del estilo donde se desarrolla el tubo polínico que está en contacto constante y aleatorio con las S-RNasa. Una vez que se activa el mecanismo en el cual la proteína *SLF* ubiquitina a la S-RNasa propias de la planta se desencadena la degradación del RNA con el que tubo reconocimiento alelo S-específico inhibiendo que el RNA proveniente del polen logre

expresarse y el tubo polínico llegue al óvulo. Si las S-RNAsas no presentan actividad el rechazo del polen no se lleva a cabo (Huang *et al.*, 1994).

### Modelo del rechazo del polen en sistemas basados en S-RNAsas

En la actualidad existen dos modelos que proponen dos mecanismos bioquímicos de cómo ocurre la respuesta del rechazo del polen alelo S-específica. El modelo de la degradación y el de la compartimentalización de las S-RNAsas.

### Degradación de las S-RNAsas

Cuando las S-RNAsas entran al tubo polínico provenientes de la ME de estilo forman complejos en su citoplasma con alguna de las variantes de SLF (Hua *et al.*, 2006; Kubo *et al.*, 2010). Evidencias *in vitro* sugieren que SLF interactúa con mayor afinidad con la S-RNasa de un haplotipo S diferente al suyo. Por ejemplo, en una cruce incompatible en un pistilo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub> polinizado con el polen S, ambas S-RNAsas ingresan al tubo polínico donde se van a formar complejos SLF<sub>1</sub>:S<sub>1</sub>-RNasa y SLF<sub>1</sub>:S<sub>2</sub>-RNasa. El segundo complejo es de alta afinidad, por lo que será translocado al complejo SCF (SK1, Cullin, F-box) donde la S<sub>2</sub>-RNasa será ubiquitinada y degradada por el proteosoma 26 S. Por otra parte, debido a que el complejo SLF<sub>1</sub>:S<sub>1</sub>-RNasa es lábil, y el equilibrio se desplaza a la forma libre de la S<sub>1</sub>-RNasa que degradará el RNA del tubo polínico, lo que provocará la inhibición de su crecimiento (Sijacic *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 2010).

### Modelo de compartimentalización de las S-RNAsas

Este modelo fue planteado en primera instancia por Goldraij *et al.* (2006) y complementado por Goring *et al.* (2022). Aquí se plantea que las S-RNAsas entran al tubo polínico independientemente de su haplotipo S, así como los productos de los genes modificadores 120K, NaTrxh, NaStEP y HT-B. Una vez en el citoplasma del tubo polínico tanto las S-RNasa como 120-K y HT-B son translocados a una vacuola (Goldraij *et al.*, 2006), mientras que NaStEP una fracción de esta proteína permanece en el citoplasma, otra se relocaliza a la mitocondria donde interactúa con el transportador de fosfatos NaSIPP (García-Valencia *et al.*, 2017). Finalmente, NaTrxh al parecer permanece en el citoplasma, donde interactúa con la S-RNasa reduciendo uno de sus puentes disulfuro e incrementando su actividad de ribonucleasa alrededor de siete veces (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Tomando en cuenta la S-RNasa, a SLF y a los productos de los genes

modificadores, el modelo de la compartimentalización propone que en una cruce incompatible las S-RNasas que están almacenadas en una vacuola del tubo polínico, van a ser liberadas a su citoplasma debido a la ruptura de la vacuola, la cual dependerá de la interacción S-específica entre la S-RNasa y SLF. Esta interacción permitirá de alguna manera que la proteína NaStEP se estabilice y que con su actividad de inhibidor de proteasa inhiba a la proteasa que degrada a HT-B. Por otra parte, la fracción de NaStEP que se transloca a la mitocondria interactuará con el transportador de fosfatos interfiriendo con la síntesis de ATP, lo que desestabilizará a la mitocondria liberando factores de muerte. Los factores de muerte inducirán un programa de muerte celular programada que provocará la ruptura de la vacuola y liberación de las S-RNasas al citoplasma del tubo polínico. Ya en el citoplasma, las S-RNasas incrementarán su actividad de ribonucleasa potenciando la degradación masiva de RNA y la muerte del tubo polínico. Asimismo, se propone que la ruptura de la vacuola que contiene a las S-RNasas también podría estar mediada por HT-B o ser complementada por la desestabilización de la mitocondria.

El escenario en una cruce compatible postula que la inactivación de la proteína NaStEP sería crucial, ya que, de no estar presente en el citoplasma del tubo polínico, por su degradación o inactivación por algún mecanismo aún desconocido, la proteína HT-B se degradaría, la mitocondria permanecería estable y la vacuola que contienen a las S-RNasas contendría su actividad citotóxica, permitiendo la traducción del RNAm y el crecimiento del tubo polínico al ovario.

## Antecedentes inmediatos

En el periodo de abril a junio del año 2020 en el grupo del Dr. Felipe Cruz García, se identificó una línea mutante de *N. alata* (4936) que es AC, ya que no rechaza su propio polen. El genotipo S de la mutante es  $S_{C10}S_{A2}$ .

Debido a que esta mutante no ha sido estudiada a profundidad, el presente proyecto se enfocó en dilucidar la causa de la pérdida de la AI, es decir, si se debe al abatimiento de la expresión de la S-RNasa; a la pérdida de su actividad de ribonucleasa; a que algún gen modificador conocido no se exprese; o por último, a mutaciones en un gen modificador no descrito a la fecha.

## Hipótesis

La mutante autocompatible 4936 de *Nicotiana alata*, acepta su propio polen debido a mutaciones en el locus S o fuera de este.

## Objetivo general

Determinar si el locus S y/o genes modificadores están afectados en la mutante 4936 de *N. alata*.

## Objetivos particulares

- Evaluar si la  $S_{C10}$ -RNasa y/o la  $S_{A2}$ -RNasa presentan mutaciones de pérdida de función.
- Determinar si la  $S_{C10}$ -RNasa y la  $S_{A2}$ -RNasa se acumulan a niveles normales en el pistilo de la mutante 4936 de *N. alata*.
- Determinar mediante análisis genético si la mutación(es) que confieren compatibilidad en la mutante 4936, están fuera del locus S.
- Evaluar si las proteínas 120K, NaTrxh, NaStEP y HT-B se acumulan en niveles normales en el pistilo de la mutante 4936.
- Determinar si el ambiente afecta las relaciones de compatibilidad/incompatibilidad en la mutante 4936.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

Las plantas utilizadas en este trabajo de investigación fueron *Nicotiana alata* Al (genotipos  $S_{A2}S_{A2}$ ,  $S_{C10}S_{C10}$ ). *Nicotiana alata* AC con genotipo  $S_{C10}S_{A2}$ . Una población de *Nicotiana alata* (genotipos  $S_{A2}S_{A2}$ ,  $S_{C10}S_{C10}$  y  $S_{C10}S_{A2}$ ). Todas las plantas se mantuvieron en un invernadero de ambiente controlado a temperatura de 19 a 22 °C y el sustrato que se ocupó fue Berger BM6®. Los experimentos de polinización a temperaturas altas se realizaron en una cámara de crecimiento con temperatura controlada desde 31 hasta 38 °C. El riego en ambos casos fue con agua corriente cada dos días.

### Métodos

#### Purificación de DNA genómico y amplicones de las S-RNasas.

La purificación de DNA genómico de alto peso molecular de *N. alata* se hizo a partir de hojas jóvenes utilizando el protocolo de GC, Allen *et al.* (2007) véase Anexos. Para determinar el genotipo S de las plantas en este trabajo de investigación se utilizaron los *oligonucleotidos* que amplifican una región interna de la  $S_{C10}$ -RNasa y  $S_{A2}$ -RNasa. (García G., 2002) mencionados a continuación.

$S_{A2}$ -RNasa sentido Tm: 52. 5'- AAA GTA CCA TCG CGA CTT CG -3'

$S_{A2}$ -RNasa antisentido Tm: 50.2. 5'- TGT GAA GTT ATT CAT CGT CGG -3'

$S_{C10}$ -RNasa sentido Tm: 51.2. 5'- GAC CTA ACC ACC GCA GAA AC -3'

$S_{C10}$ -RNasa antisentido Tm: 52.2 5'- CAT CGA GTC GAA ACA TAT GCC -3'

5 µL 5x PCRBIO amortiguador HiFi

0.5 µL Oligonucleótido sentido (10µM)

0.5 µL Oligonucleótido antisentido (10µM)

1 µL DNA Temblado

3 µL H<sub>2</sub>O grado PCR

---

Reacción total de 10 µL

## Diseño de oligonucleótidos.

Para amplificar por PCR las S-RNAsas se diseñaron oligonucleótidos con la especificidad adecuada utilizando el programa *AmplifX* y *Primer3Plus*.

La amplificación de todo el marco de lectura abierto de cada una de las S-RNAsas es posible con los siguientes oligonucleótidos:

$S_{A2}$ -RNasa sentido Tm: 61. 5'- ATG CTT AAT TCA CAG ATT ACG TCA GCT GTT CTC -3'

$S_{A2}$ -RNasa antisentido Tm: 63. 5'- GAA CAA AAT CTT CGT AAT GCC CGT TTC -3'

$S_{C10}$ -RNasa sentido Tm: 64. 5'-ATG CTT AAC TCA CCG CTC ACA TCA GTC CTC-3'

$S_{C10}$ -RNasa antisentido Tm: 58. 5'-ATG GAA ACT TAA TCT CAT TAC TTC CCG-3'

Se utilizó la DNA polimerasa de alta fidelidad, *PCRBIO HiFi Polymerase* para evitar Se adicionó mutaciones durante la elongación de la reacción de PCR.

La reacción para PCR se realizó de la siguiente manera:

5  $\mu$ L 5x PCRBIO amortiguador HiFi  
2  $\mu$ L Oligonucleótido *Sentido* (10 $\mu$ M)  
2  $\mu$ L Oligonucleótido *Antisentido* (10 $\mu$ M)  
2.5  $\mu$ L DNA Temblado  
13.25  $\mu$ L H<sub>2</sub>O grado PCR

---

Reacción total de 25  $\mu$ L

Se utilizó la secuencia del vector *pJET 1.2/blunt* (*Thermo Scientific*®) y las secuencias modelo reportadas para hacer la construcción en el programa UGENE de forma *in silico*, donde se observa la inserción de la secuencia en el vector y que la enzima BglIII de restricción 20  $\frac{U}{\mu L}$  se puede utilizar para los experimentos siguientes (Anexos). Si bien el vector se encuentra abierto y no requiere hacer una digestión para insertar el fragmento de DNA, sirvió para saber cómo observar que estuviera el inserto. Por otro lado, ver las construcciones sirven de soporte para discernir que es posible utilizar los oligonucleótidos hechos en el laboratorio para realizar la secuenciación.

## Clonación de las S-RNasas

Se amplificaron las secuencias de la  $S_{C10}$ -RNasa y  $S_{A2}$ -RNasa de la mutante 4936 y se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa, las bandas fueron escindidas del gel y purificadas por separado utilizando el kit *Zymoclean Gel DNA Recovery kit*.

Ambas muestras fueron cuantificadas en el *biodrop*. Finalmente las muestras se clonaron en el vector pJET 1.2/blunt utilizando el kit *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific®) en células de *E.coli* XL-10gold quimiocompetentes por choque térmico.

Las células transformadas crecieron en placas con medio LB sólido, más ampicilina  $100 \frac{\mu g}{mL}$ . De las colonias que crecieron se seleccionaron dos, se picaron y crecieron en medio LB líquido por separado toda la noche, luego se purificó plásmido utilizando el kit *ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit* de cada una de ellas. El análisis de ambas colonias se hizo por PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican un fragmento de la región interna de las S-RNasas.

## Secuenciación y alineamiento

Se usaron 15  $\mu L$  de cada plásmido purificado más el *oligonucleótido sentido* para secuenciar, la secuenciación tipo Sanger se realizó en el Instituto de Biotecnología, UNAM, y la información se trató con el programa *Chromas* para obtener el formato *Fasta* de la secuenciación. Después, con el software *Translate tool* de *Expasy* se convirtió la secuencia de pares de bases a aminoácidos tanto de las secuencias experimentales como las que se usaron como modelo. De esta forma la alineación se realizó en el software de *Clustal Omega* y se determinó si había mutaciones en el sitio activo de las S-RNasas.

## Genotipificación por reacciones de PCR

Se estudió a la progenie de la mutante 4936 con análisis genético por PCR, para determinar la segregación de los haplotipos  $S_{A2}$  y  $S_{C10}$  mediante la amplificación del DNA de los genes de la  $S_{C10}$ -RNasa y  $S_{A2}$ -RNasa de los 26 individuos que comprendieron la progenie  $F_1$  derivada de esta autopolinización.

## Expresión proteica de las S-RNasas

Se hicieron extractos de proteína total del estilo de la mutante 4936 de *N. alata* para una primera electroforesis de SDS poliacrilamida tomando 15 µL de cada muestra, seguido de una tinción con azul de *Coomassie* para comprobar que la cantidad de proteína es equivalente en cada extracción.

En un segundo gel de poliacrilamida también se separaron a las proteínas en condiciones desnaturalizantes pero esta vez, se transfirieron a una membrana de PVDF para inmunodetectar mediante un análisis de Western-blot con anticuerpos específicos a las proteínas HT-B 8.6 kDa McClure *et al.*, 1999, 120-K 120 kDa Hancock *et al.*, 2005, NaStEP 25 kDa Busot *et al.*, 2008, NaTrxh 12-17 kDa Juárez-Díaz *et al.*, 2017, *SC10*-RNasa Zurek *et al.*, 1997 y *SA2*-RNasa McClure *et al.*, 1999.

## Polinizaciones manuales en la mutante 4936

Para corroborar los fenotipos de rechazo de polen y el efecto de la temperatura se hicieron dos acciones:

Primera, se hicieron autopolinizaciones y polinizaciones en *N. alata* AI con genotipos *SA2SA2*, *SC10SC10* y *N. alata* AC con genotipo *SC10SA2* con la siguiente metodología:

- a) Las flores con estilo receptivo y 15 cm de largo provenientes de las plantas arriba mencionadas se polinizaron con el polen de la línea 4936 siempre a las 10:00 a.m a una temperatura de 22 °C. También se realizaron pruebas control.
- b) Se recolectaron las flores y se separó el pistilo polinizado pasadas 48 horas, para observar los fenotipos de rechazo en las cruzas incompatibles y el cuajado del fruto en las cruzas compatibles a través de la visualización de los tubos polínicos con tinciones con azul de anilina 0.1% disuelta en una solución de  $K_3PO_4$  - KOH 0.1 M pH=11 y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia.

Segunda, para evaluar el fenotipo de la planta mutante 4936 de *N. alata* se hicieron polinizaciones manuales a diferentes temperaturas desde los 16 °C hasta los 38 °C registrada por un HOBO (colocado arriba de la mesa de experimentación donde estaban las plantas) y un termómetro a las 11:00 a.m. donde se hacían los ensayos en el invernadero de cactáceas de la Facultad de Ciencias, UNAM y en el invernadero de la Facultad de Química, UNAM.

Se utilizó a la homóciga *N. alata* AI  $S_{A2}S_{A2}$  como control negativo, ambas plantas se evaluaron en las mismas condiciones ambientales durante la etapa de polinización y floración observando si existe la formación de fruto recibiendo únicamente riego con agua corriente cada dos días.

Las polinizaciones se hicieron en tres rondas a alta temperatura y tres a temperatura ambiente, teniendo un mínimo de nueve flores al finalizar el experimento por cada categoría. También se tenían dos modalidades de autopolinización, geitonogamia (utilizando su propio polen) y polinizaciones cruzadas (utilizando el polen de la planta en la otra planta), a la planta *N. alata* AI  $S_{A2}S_{A2}$  no se polinizo con el polen de la 4936 porque tiene el alelo  $S_{C10}$ , el cual puede formar fruto.

## Resultados

Se conoce que *N. alata* presenta un mecanismo que le da la capacidad de reconocer y rechazar su propio polen. Este sistema está controlado por el locus S que es multialélico y codifica a las determinantes masculina, *SLF* y la femenina, la S-RNasa (Goring et al., (2022). Además, existen genes fuera del locus S que participan en la vía del rechazo del polen, denominados genes modificadores que se describieron anteriormente en la introducción; no obstante, existe evidencia genética que indica que estos no son los únicos que participan en la vía.

En la búsqueda de estos genes dentro del grupo del Dr. Felipe Cruz García se hicieron los siguientes hallazgos:

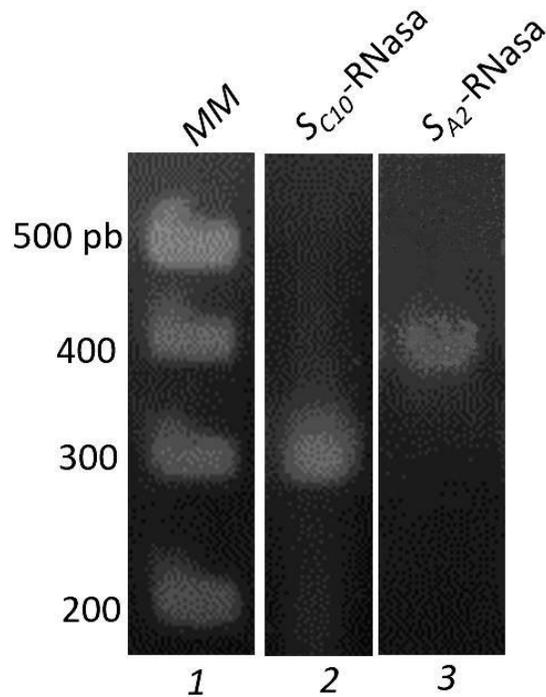
En la primavera del año 2020 se realizaron autopolinizaciones manuales en una población de *N. alata* que procedía de una planta con genotipo  $S_{C10}S_{A2}$ . Esta planta cuando se autopolinizaba formaba frutos, es decir, era una planta mutante que aceptaba su propio polen. No obstante, cuando la mutante se polinizó con el polen de dos diferentes plantas homocigas una  $S_{C10}S_{C10}$  y otra  $S_{A2}S_{A2}$ , se obtuvieron los siguientes casos.

En el primer caso en donde se utilizó polen de una planta homociga  $S_{C10}S_{C10}$  hubo rechazo del polen, por lo que no se formaron de semilla. Por el contrario, en el caso de las polinizaciones con el polen de la planta homociga  $S_{A2}S_{A2}$  no hubo rechazo del polen y debido a eso se formaron semillas. Estos resultados llevaron a la hipótesis de que la mutación podría afectar al alelo  $S_{A2}$  en el pistilo, lo que sugería que la  $S_{A2}$ -RNasa tenía mutaciones de pérdida de función, pero no en la  $S_{C10}$ -RNasa. La planta mutante de *N. alata*, fue nombrada 4936.

### Determinando el genotipo S de la mutante 4936 de *Nicotiana alata*.

Lo primero que se realizó fue confirmar el genotipo S de la mutante 4936 utilizando los *oligonucleotidos* que únicamente amplifican regiones internas de las  $S_{C10}$ -RNasa o la  $S_{A2}$ -RNasa.

En la Figura 3 se muestran los amplicones de las S-RNasas después de la reacción de PCR.

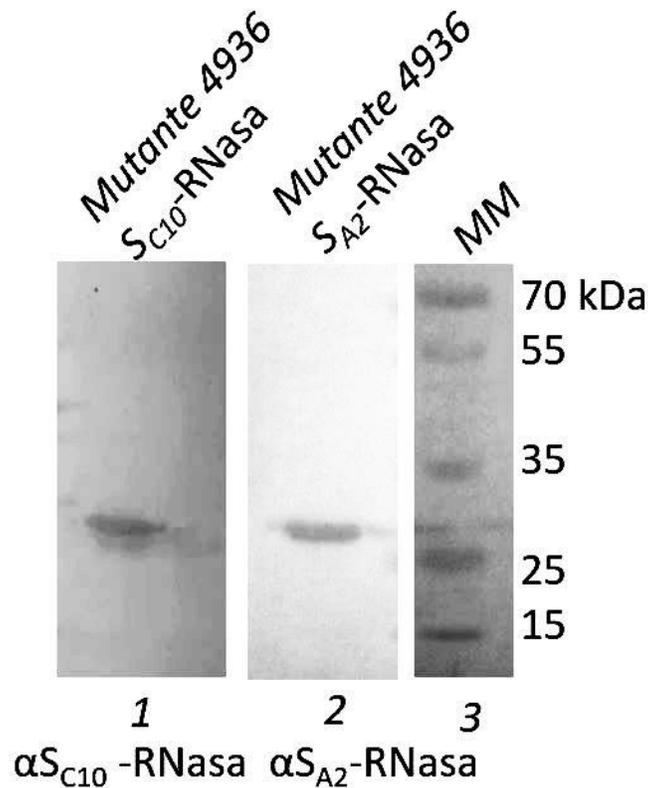


**Figura 3. Genotipo S de la mutante 4936 de *N. alata*.** Separación electroforética en un gel de agarosa de los amplicones de la  $S_{C10}$ -RNasa con 300 pb, de la  $S_{A2}$ -RNasa con 400 pb. MM corresponde al marcador de peso molecular.

De lo anterior se concluye que el genotipo S de la mutante 4936 es  $S_{A2}S_{C10}$ . Además, fue importante la amplificación de ambas S-RNasas porque indica que dentro del genoma de la línea mutante 4936 están codificadas ambas S-RNasas.

#### Evaluación de la expresión de las S-RNasas a nivel protéico de la mutante 4936.

Para determinar si la  $S_{A2}$ -RNasa se estaba expresando en el pistilo de la mutante 4936, se realizó un inmunoanálisis mediante un ensayo de Western blot. En la figura 4 se observa que tanto la  $S_{A2}$ -RNasa como la  $S_{C10}$ -RNasa se acumulan en niveles normales en los estilos maduros de la mutante 4936, estableciendo que el fenotipo de compatibilidad en la mutante no se debe a fallas en la expresión y traducción de los genes de estas ribonucleasas S.



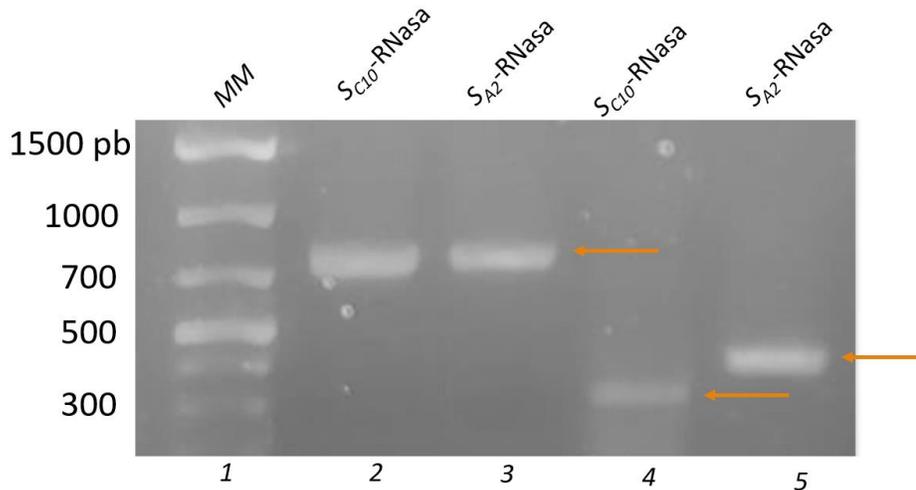
**Figura 4. Inmunodetección de las proteínas  $S_{C10}$ -RNasa y  $S_{A2}$ -RNasa en extractos proteicos de pistilos maduros de la mutante 4936 con anticuerpos específicos.** En el primer carril se inmunodetectó a la proteína  $S_{C10}$ -RNasa de la mutante 4936; en el segundo carril se inmunodetectó a la proteína  $S_{A2}$ -RNasa de la mutante 4936, por último, en el tercer carril el marcador de peso molecular.

El hecho de que la  $S_{A2}$ -RNasa se acumule en niveles normales en el pistilo de la mutante 4936 y a que esta planta acepta el polen  $S_{A2}$ , se podría pensar que esta S-RNasa no es funcional debido a mutaciones de pérdida de función que afectan su actividad de ribonucleasa.

#### Mutaciones de pérdida de función en la región codificadora de las S-RNasas.

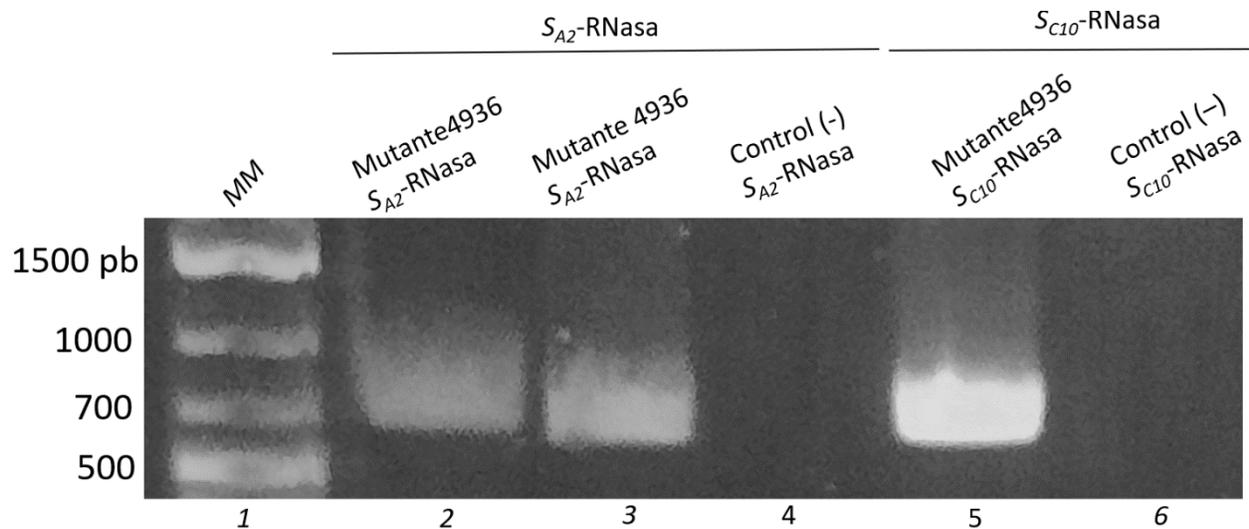
Para definir si hay mutaciones de pérdida de función en la región codificador de las  $S_{A2}$ -RNasa se diseñaron oligonucleótidos tomando de molde el gen completo de la  $S_{C10}$ -RNasa de 814 pb y en el caso de  $S_{A2}$ -RNasa de 933 pb; donde la especificidad abarcó

todo toda la región codificadora del gen de las S-RNasas, lo que incluyó un intrón (Apéndice I), estos productos fueron secuenciados. Los resultados en la Figura 5 indican que se pudieron amplificar dos amplicones, uno 783 pb para la  $S_{A2}$ -RNasa y otro de 756 pb para la  $S_{C10}$ -RNasa. Se utilizaron también oligonucleótidos para amplificar regiones internas de ambos genes como controles positivos de amplificación.



**Figura 5. Amplificación de los genes  $S_{A2}$ -RNasa y  $S_{C10}$ -RNasa.** Separación electroforética de amplicones en un gel de agarosa. El primer carril es el marcador de peso molecular (MM), el segundo y tercer carril corresponden a los amplicones de los genes completos para  $S_{A2}$ -RNasa (carril 2) y para  $S_{C10}$ -RNasa (carril 3). En los carriles 4 y 5 se muestran los amplicones derivados de las regiones internas de ambos genes. Cada amplicon es señalado con una flecha naranja con el fin de ubicar cada amplicon de las S-RNasas. Los amplicones para cada S-RNasa, se purificaron y clonaron para su posterior secuenciación.

Se clonaron los productos amplificados y de las colonias transformantes para los genes  $S_{A2}$ -RNasa y  $S_{C10}$ -RNasa se seleccionaron algunas clonas, se corroboró la presencia de los genes mediante PCR, como se observa en la Figura 6, donde se observan amplicones de DNA de 783 pb y 756 pb que corresponde a cada una de las S-RNasas.



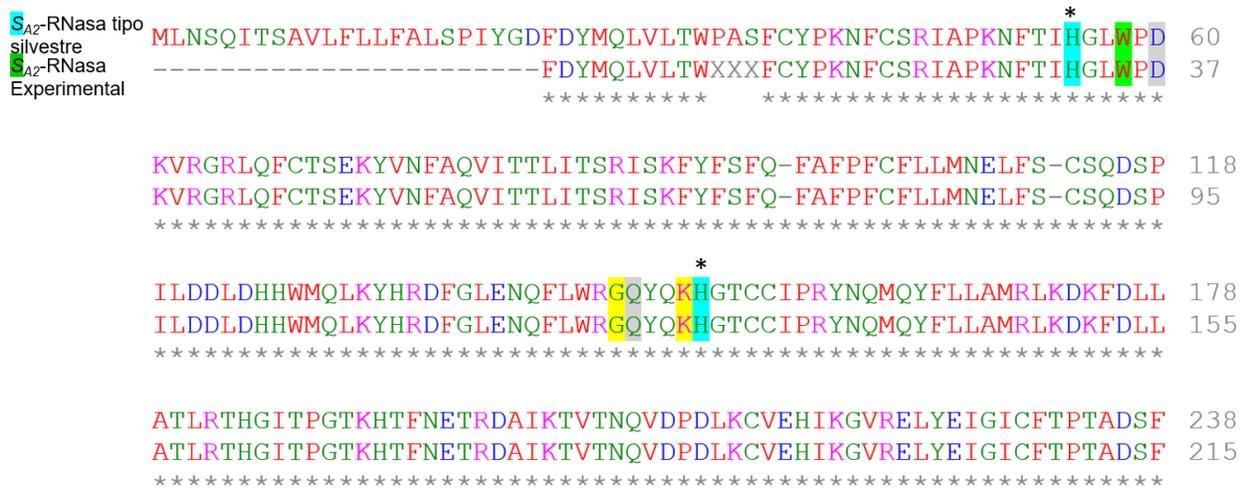
**Figura 6. Análisis por PCR del plásmido purificado.** Separación electroforética de amplicones en un gel de agarosa.

En el primer carril se observa en el marcador de peso molecular de 1 kb, en el segundo y tercer carril corresponde a la presencia de la  $S_{A2}$ -RNasa, y en el cuarto carril los oligonucleótidos para la  $S_{C10}$ -RNasa siendo el control negativo respectivo. En el quinto carril se observa la presencia de la  $S_{C10}$ -RNasa y en el sexto los oligonucleótidos para la  $S_{A2}$ -RNasa siendo el control negativo respectivo (Figura 6). Un hecho importante es que los controles habían sido genotipificados con antelación a nivel genético y de proteína para tener un control negativo confiable. En esta situación el control negativo sirvió para comprobar que efectivamente fueran amplificadas las secuencias de ambas *S-RNasas* y que los oligonucleotidos no amplificaran inespecificidades antes de la secuenciación. Con el resultado de la secuenciación, se realizaron los siguientes alineamientos con las secuencias reportadas para ambas *S-RNasas*.



Para la  $S_{A2}$ -RNasa los sitios relevantes son His(55), Trp(58), Asp(60), Ser(111), Gln(115), Asp(116) que constituyen a los aminoácidos catalíticos y son resaltados en la (Figura 8; MacIntosh 2011).

### S<sub>A2</sub>-RNasa



**Figura 8. Alineamiento de las secuencias de la  $S_{A2}$ -RNasa obtenidas de la mutante 4936 y la S-RNasa silvestre.**

En el caso de la  $S_{A2}$ -RNasa no hay mutaciones en los aminoácidos catalíticos, tampoco presenta ninguna mutación con respecto a la secuencia tipo silvestre.

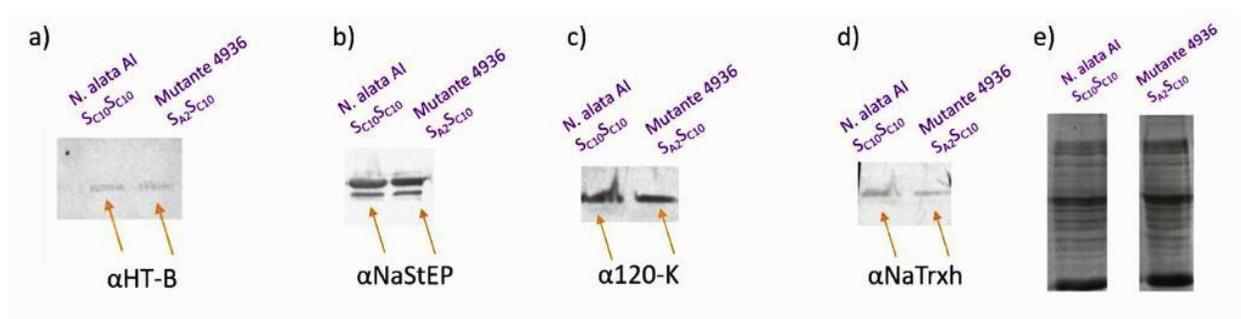
Esto indica que ni la  $S_{A2}$ -RNasa ni la  $S_{C10}$ -RNasa presentan mutaciones de pérdida de función en su región codificante, por lo que el fenotipo de compatibilidad de la mutante 4936 debe ser responsabilidad de la afectación de otros genes que participan en la respuesta del rechazo del polen en *Nicotiana*. A estos genes se les conoce como genes modificadores (GM) y algunos ejemplos de ellos son: *HT-B* (McClure *et al.*, 1999), *120-K* (Hancock *et al.*, 2005), *NaStEP* (Busot *et al.*, 2008) y *NaTrxh* (Juárez-Díaz *et al.*, 2017).

Por tal motivo el siguiente paso fue demostrar si GMs conocidos se expresan en la mutante 4936 de *N. alata*, si esto no fuera así el fenotipo de autocompatibilidad se atribuiría a la falta de uno o varios de éstos.

### Acumulación de las proteínas *120K*, *HT-B*, *NaTrxh* y *NaStEP* en el pistilo maduro de la mutante 4936.

Para evaluar los niveles de las proteínas *120K*, *HT-B*, *NaTrxh* y *NaStEP* en el pistilo de la mutante 4936, se realizó un inmunoanálisis mediante de Western-blot. Los niveles de estas proteínas en la mutante se compraron con los niveles en los estilos de la planta homociga  $S_{C10}S_{C10}$  de *N.alata* AI. En la Figura 9, se muestra que los niveles de todas las proteínas evaluadas en el pistilo de la mutante 4936, son equiparables en cantidad con estas mismas proteínas en la homociga AI  $S_{C10}S_{C10}$  de *N. alata*, por lo que al parecer esta no es la cusa del fenotipo de compatibilidad de la mutante 4936.

Los productos que provienen de los genes modificadores pistilares involucrados en el fenómeno de la autocompatibilidad fueron encontrados con inmunodetección y comparados en cantidad con respecto a plantas homocigas que demostraban invariablemente el mismo nivel de proteína.



**Figura 9. Inmunodetección las proteínas a) *HT-B*, b) *NaStEP*, c) *120-K* y d) *NaTrxh* en el pistilo de la mutante 4936 de *N.alata* y e) Gel teñido con azul de coomassie.** La muestra de extractos de proteína total de pistilo proveniente de la mutante 4936 de *N.alata* y de *N. alata* AI  $S_{C10}S_{C10}$ . Se prepararon extractos proteicos

totales los cuales se separaron electroforéticamente por SDS poliacrilamida. Las proteínas en los geles se transfirieron a una membrana PVDF para el inmunoanálisis utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas *HT-B*, *NaStEP*, *120-K* y *NaTrxh* y las cuales son señaladas con flechas naranjas tanto para la mutante 4936 como para el control positivo. e) Como control de carga se muestra un gel teñido con azul de Coomassie.

### Análisis genético en la progenie de la mutante 4936 de *N. alata*

Para determinar si la mutación que confiere compatibilidad en la mutante 4936 está en el locus *S* o fuera de él, se realizó un análisis genético, mediante la autopolinización de la mutante 4936, para determinar en la progenie la segregación de los haplotipos  $S_{A2}$  y  $S_{C10}$  mediante la amplificación de DNA genómico por PCR de los genes de la  $S_{C10}$ - y  $S_{A2}$ -RNasa de los 26 individuos que comprendieron la progenie  $F_1$  derivada de esta autopolinización.

Los resultados que se pueden esperar podrían ubicarse en cuatro escenarios posibles (Figura 10).

Escenario 1: Si la crucea es *AI* no habría progenie ya que toda la vía funciona correctamente, asimismo, el polen es rechazado. Este escenario es descartado debido a que sí hay progenie, dado que la mutante es *AC*.

Escenario 2: Si la  $S_{A2}$ -RNasa fuera funcional se generarían individuos homocigos  $S_{A2}S_{A2}$  (25%) y heterocigos (50%)  $S_{C10}S_{A2}$ , que representa el total de la progenie posible. No existirán individuos homocigos  $S_{C10}S_{C10}$ .

Escenario 3: Si la  $S_{C10}$ -RNasa es no funcional produciría homocigos (25%)  $S_{C10}S_{C10}$  y heterocigos (25%)  $S_{C10}S_{A2}$ . No existirán individuos homocigos  $S_{A2}S_{A2}$ .

Escenario 4: Si la mutación esta fuera del locus *S*, se tendrían 25 % de homocigos  $S_{C10}S_{C10}$  50 % de heterocigos  $S_{C10}S_{A2}$ . y 25 % de homocigos  $S_{A2}S_{A2}$ , lo que indicaría que la mutación que confiere compatibilidad en la mutante 4936 está fuera del locus *S*.

Escenario 1: Auto-incompatible.  $S_{A2}$ -RNasa y  $S_{C10}$ -RNasa funcionales

Estilo $S_{A2}S_{C10}$	$S_{A2}$	$S_{C10}$
$S_{A2}$	R	R
$S_{C10}$	R	R

No hay progenie

Escenario 2:  $S_{A2}^*$ -RNasa No funcional

Estilo $S_{A2}S_{C10}$	$S_{A2}$	$S_{C10}$
$S_{A2}^*$	$S_{A2}^*S_{A2}$	$S_{A2}^*S_{C10}$
$S_{C10}$	$S_{A2}S_{C10}$	R

Progenie

$$\frac{1}{4} \cdot S_{A2}^*S_{A2}$$

$$\frac{1}{4} \cdot S_{A2}^*S_{C10}$$

$$\frac{1}{4} \cdot S_{A2}S_{C10}$$

Escenario 3:  $S_{C10}^*$ -RNasa No funcional

Estilo $S_{A2}S_{C10}$	$S_{A2}$	$S_{C10}$
$S_{A2}$	R	$S_{C10}S_{A2}$
$S_{C10}^*$	$S_{C10}^*S_{A2}$	$S_{C10}^*S_{C10}$

Progenie

$$\frac{1}{4} \cdot S_{C10}^*S_{C10}$$

$$\frac{1}{4} \cdot S_{C10}^*S_{A2}$$

$$\frac{1}{4} \cdot S_{C10}S_{A2}$$

Escenario 4: Mutaciones en el pistilo en Genes Modificadores (M) y S-RNasas funcionales

Estilo $S_{A2}S_{C10}$	$S_{A2}$	$S_{C10}$
$S_{A2}$	$S_{A2}S_{A2}$	$S_{A2}S_{C10}$
$S_{C10}$	$S_{A2}S_{C10}$	$S_{C10}S_{C10}$

Progenie

$$\frac{1}{2} \cdot S_{A2}S_{C10}$$

$$\frac{1}{4} S_{A2}S_{A2}$$

$$\frac{1}{4} S_{C10}S_{C10}$$

**Figura 10. Escenarios posibles para determinar si la mutación está dentro o fuera del locus S en la mutante 4936 de *N. alata*.**

Las semillas provenientes de la autopolinización de la mutante 4923 fueron recolectadas y sembradas. El primer hecho notable durante las primeras semanas del estudio fue que la mayoría de los individuos tuvo baja adaptación al ambiente, ya que muy pocas de las

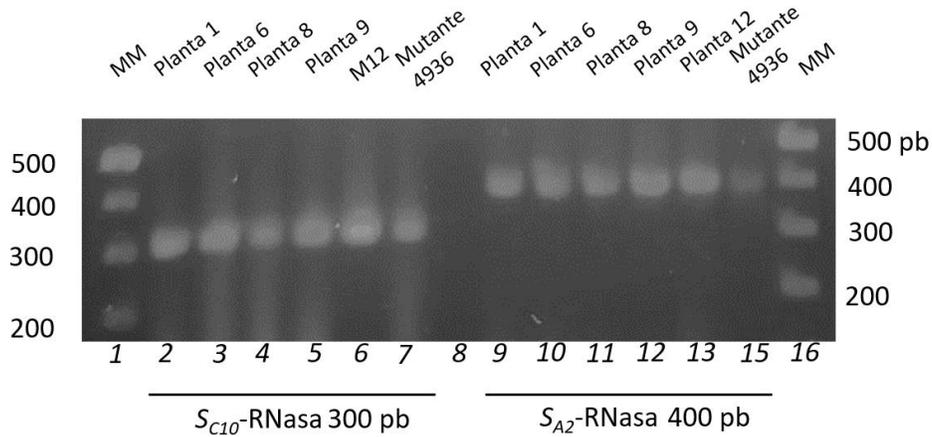
plántulas alcanzaron la madurez; sin embargo, fue posible purificar DNA, para determinar su genotipo S (Figura11).



**Figura 11. Crecimiento de plantas de *N.alata* en el Invernadero I-404 Facultad de Química.** Dentro de cámara del invernadero se tienen del lado izquierdo plantas de *N. alata* con genotipo  $S_{A2}S_{A2}$ , en el centro hay plantas con los genotipos  $S_{A2}S_{A2}$ ,  $S_{C10}S_{C10}$  y  $S_{C10}S_{A2}$  y, por último, del lado derecho plantas con genotipo  $S_{C10}S_{C10}$ .

Genotipos S de la progenie  $F_1$  proveniente de la autopolinización de la mutante 4936 de *Nicotiana alata*.

La genotipificación por PCR de las 26 plantas se realizó con oligonucleótidos específicos para la  $S_{C10}$ -RNasa o a la  $S_{A2}$ -RNasa, los cuales generaron amplicones de 300 pb y 400 pb, respectivamente (Figura 12).



**Figura 12. Genotipificación por PCR de algunas plantas de la progenie F<sub>1</sub> derivada de la autopolinización de la mutante 4936 de *N. alata*.**

En la figura 12 se observan los amplicones del estudio realizado con los oligonucleótidos para la amplificación de una región interna de la  $S_{C10}$ -RNasa utilizando DNA genómico dentro de los primeros seis carriles. En los carriles 7 a 15 los productos de PCR que se obtuvieron con los oligonucleótidos que amplifican para una región de la  $S_{A2}$ -RNasa utilizando la misma muestra de DNA genómico aislada de hojas jóvenes. Se tienen dos grupos representativos que dividen al tipo de la S-RNasa que se estudió separados por un carril.

En la Tabla 1 se presenta el resultado de la genotipificación de la progenie F<sub>1</sub> que consta de 26 individuos más la mutante 4936.

**Tabla 1. Genotipificación de la progenie proveniente de la autopolinización de la mutante (AC) 4936 de *N. alata*.** En amarillo están señalados las plantas con genotipo  $S_{A2}S_{A2}$ , en azul plantas con genotipo  $S_{C10}S_{C10}$  y sin color las plantas con genotipo S heterócigo.

# IDENTIFICADOR PLANTA	MÉTODO	GENOTIPO	# IDENTIFICADOR PLANTA	MÉTODO	GENOTIPO
4936	Inmunodetección / PCR	$S_{A2} X S_{C10}$	15	PCR	$S_{A2} X S_{A2}$
1.2	Inmunodetección / PCR	$S_{A2} X S_{C10}$	16	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
2.2	PCR	$S_{A2} X S_{A2}$	17	Inmunodetección	$S_{A2} X S_{C10}$
3.2	Inmunodetección / PCR	$S_{A2} X S_{A2}$	20	PCR	$S_{C10} X S_{C10}$
5.2	Inmunodetección / PCR	$S_{A2} X S_{A2}$	21	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
6.2	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$	24	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
7	PCR	$S_{C10} X S_{C10}$	25	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
8	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$	27	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
9	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$	1	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
11	Inmunodetección	$S_{A2} X S_{C10}$	2	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
12	PCR	$S_{C10} X S_{C10}$	3	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
13	Inmunodetección	$S_{A2} X S_{C10}$	4	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
14	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$	5	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$
			6	PCR	$S_{A2} X S_{C10}$

En los resultados de la Tabla 1 se aprecia que en la progenie segregan los tres genotipos posibles ( $S_{A2}S_{A2}$ ,  $S_{C10}S_{A2}$  y  $S_{C10}S_{C10}$ ) dentro de la población, siendo tres individuos  $S_{C10}S_{C10}$ , 19  $S_{C10}S_{A2}$  y cuatro  $S_{C10}S_{C10}$  (Figura 13). Para determinar si estos valores se ajustan a una distribución genotípico 1:2:1, se realizó una prueba de  $X^2$  (Ji cuadrada) con los valores esperados para una segregación genotípica 1:2:1 (Figura 14).

El resultado de la  $\chi^2 = 5.6$ , indican que los valores observados no se desvían de manera significativa a la segregación 1:2:1 a una probabilidad ( $\alpha$ ) de 0.05, lo que indica, que la mutación que confiere compatibilidad en la mutante 4936 no está ligada al locus S.

Por el contrario, se analiza que la mutación está en algún GM y esta idea se refuerza con el análisis estadístico, para conocer si los resultados pueden corresponder a este escenario se comparó lo siguiente.

Genotipos esperados:	Genotipos observados:
6.5 ind. $S_{A2} S_{A2}$	4 ind. $S_{A2} S_{A2}$
6.5 ind. $S_{C10} S_{C10}$	3 ind. $S_{C10} S_{C10}$
13 ind. $S_{A2} S_{C10}$	19 ind. $S_{A2} S_{C10}$

**Figura 13. Genotipos esperados de la progenie  $F_1$  derivada de la autopolinización de la mutante 4936 de *N.alata*.** Se obtuvo una población mayoritariamente heterociga de genotipo  $S_{C10}S_{A2}$  con diecinueve individuos, cuatro individuos homocigos  $S_{A2}S_{A2}$  y tres individuos  $S_{C10}S_{C10}$ .

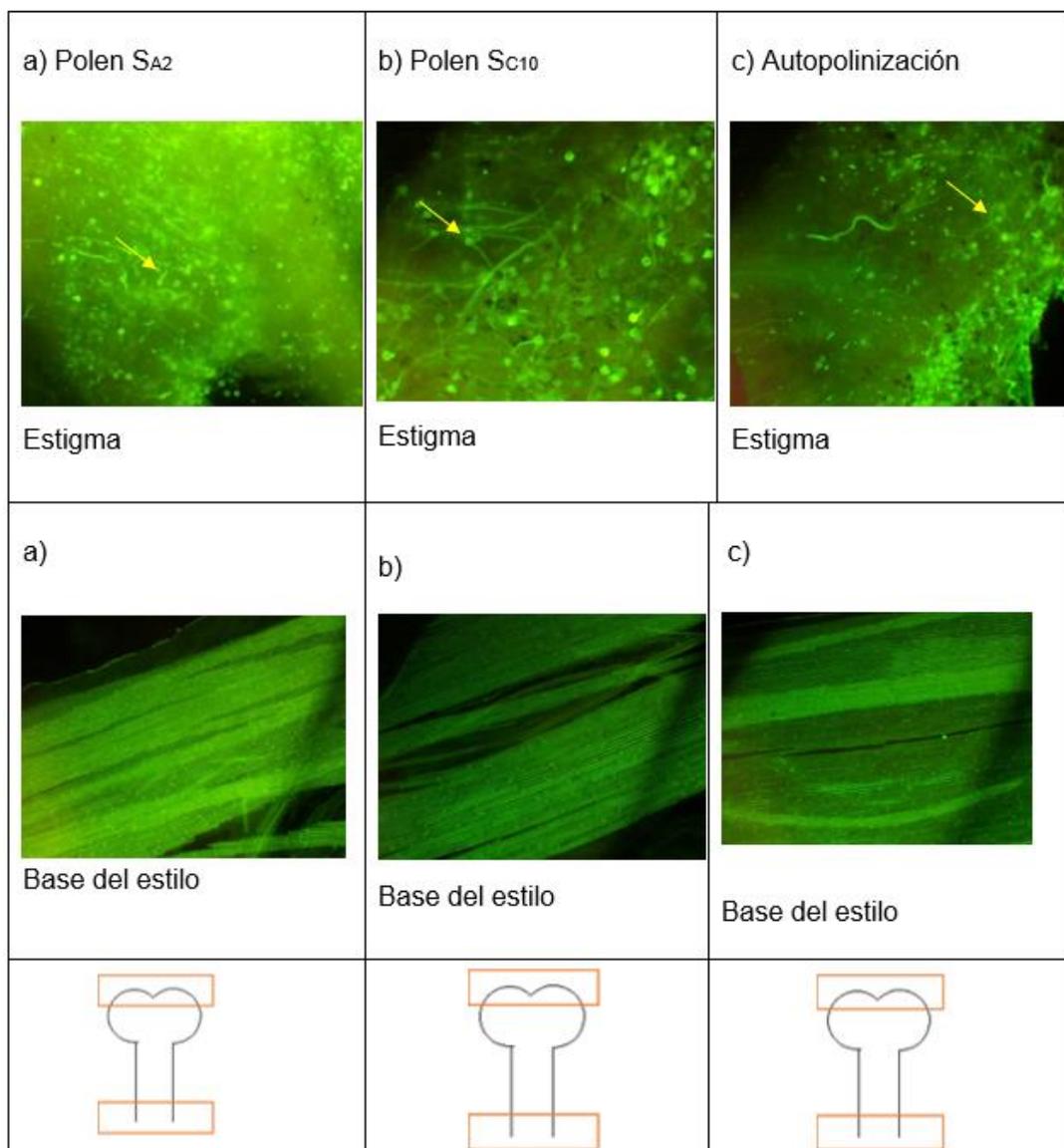
Estos resultados indican que estadísticamente no hay diferencia entre el escenario cuatro y los genotipos esperados.

### La temperatura como modificador en el fenotipo en la autoincompatibilidad de *Nicotiana alata*.

Los estudios de polinización para determinar el fenotipo de AI/AC de la mutante 4936 se realizaron en el invernadero durante la primavera, cuando la temperatura es cercana a 30 °C. Bajo estas temperaturas la mutante se comportó como (AC). Sin embargo, cuando se repitieron las autopolinizaciones en el otoño a temperaturas promedio de 20 °C, el fenotipo de la mutante 4936 fue de autoincompatibilidad, es decir, rechazó su propio polen. Esto fue un resultado inesperado y sorprendente en la investigación, ya que sugería que la mutación que confería compatibilidad podría ser temperatura dependiente o que la temperatura podría afectar la germinación de los granos de polen en el estigma

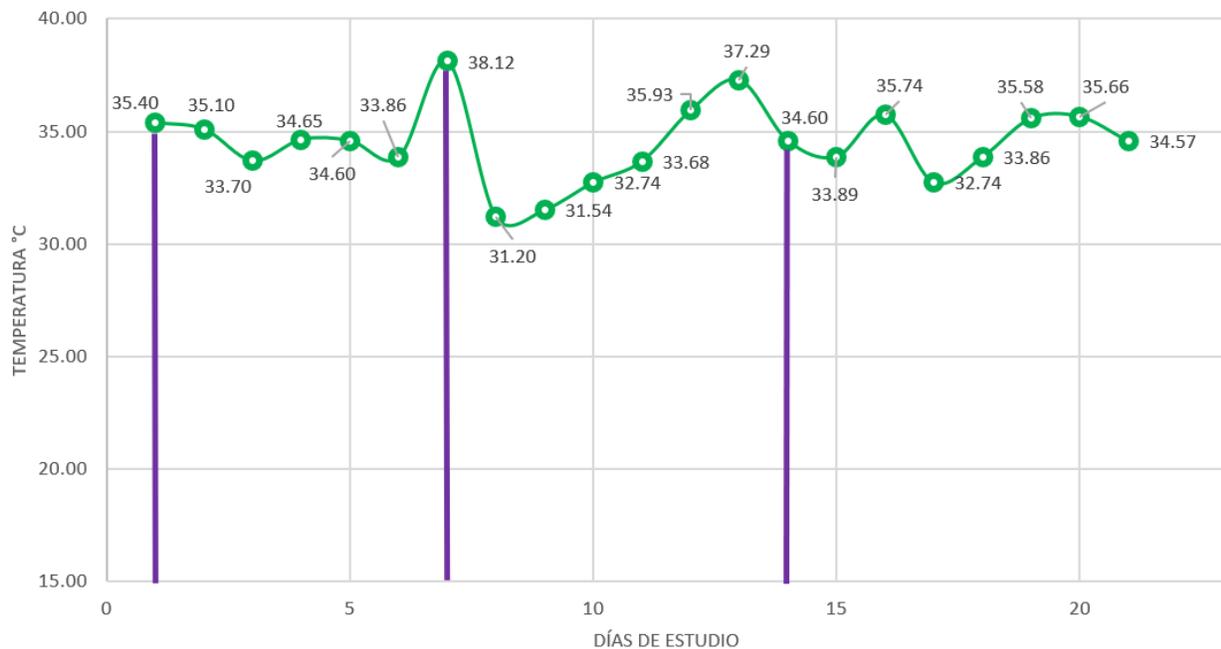
de la mutante. En congruencia con esto, se hicieron polinizaciones y se evaluó la germinación del polen en el estigma de la mutante.

La Figura 14 muestra los resultados de autopolinizaciones en la mutante 4936 realizadas a 22 °C, donde se aprecia que los granos de polen germinan, indicando que la temperatura no afecta su viabilidad. Sin embargo, cuando se determinó el crecimiento de los tubos polínicos en el estilo, se encontró que éstos detienen su crecimiento en el primer tercio del estilo, indicando claramente que son rechazados.



**Figura 14. Rechazo de polen propio en mutante 4936 de *N. alata*.** Después de 72 horas se recolectaron las flores y se separó el pistilo polinizado, se tiñieron los tubos polínicos con azul de anilina al 0.1% para ser observados en un microscopio de epifluorescencia. Con esto se examinaron las partes del estigma y estilo. a) Cruza polen SA<sub>2</sub>SA<sub>2</sub> x Planta SC<sub>10</sub>SA<sub>2</sub> b) Cruza polen SC<sub>10</sub>SC<sub>10</sub> x Planta SC<sub>10</sub>SA<sub>2</sub> c) Cruza polen SC<sub>10</sub>SA<sub>2</sub> x Planta SC<sub>10</sub>SA<sub>2</sub>. Las germinaciones de los granos de polen son señaladas con flechas amarillas y en la última fila se observan los cortes que se hicieron para la figura.

Por el contrario, cuando el experimento de autopolinización de la mutante 4936, se realizó en una cámara (Figura 15) a temperaturas que fluctuaban entre los 35°C y 38°C (Figura 16) se observó lo siguiente: En color morado están los días que se realizó cada ronda de polinizaciones durante los 21 días de estudio.



\*La línea morada indica fechas de polinizaciones

**Figura 15. Registro de temperaturas durante el estudio en *N. alata* 4936 en temperaturas mayores a 30 °C.**

A)



B)



**Figura 16. Planta 4936 *Nicotiana alata* y planta control con genotipo  $S_{A2}S_{A2}$  durante polinizaciones a temperaturas mayores de 30 °C. A) Planta con genotipo  $S_{A2}S_{A2}$  B) Línea 4936 con genotipo  $S_{C10}S_{A2}$ .**

De las 15 autopolinizaciones de la mutante 4936 de *N.alata* 14 formaron fruto, mientras que por polinización cruzada se realizaron tres polinizaciones utilizando polen de *N.alata* Al  $S_{A2}S_{A2}$ , una por ronda de polinizaciones y en todos los casos hubo formación de fruto (Figura 17). No obstante, cuando se autopolinizaron nueve flores de la planta *N.alata* Al ninguna formó fruto, indicando que el defecto está en la mutante 4936.



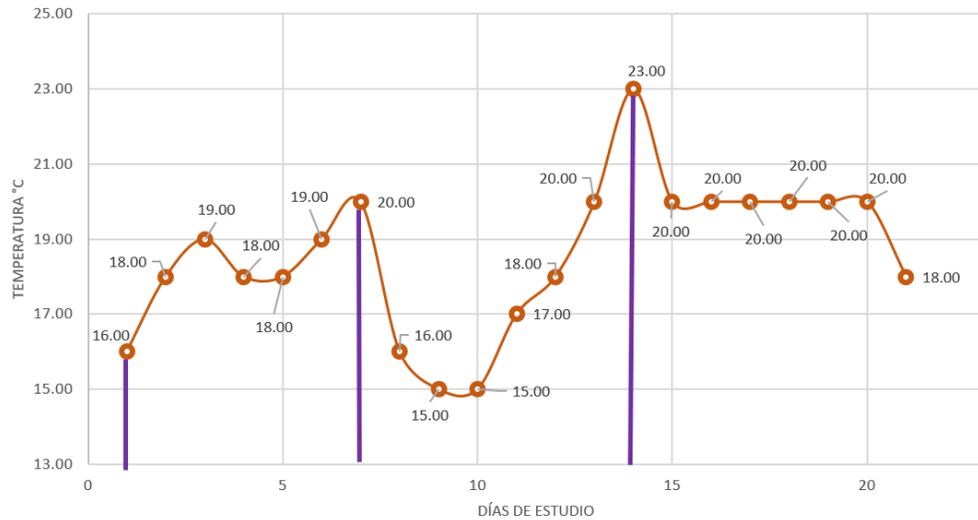
**Figura 17. Autopolinización de *Nicotiana glauca* 4936  $S_{C10}S_{A2} \times S_{C10}S_{A2}$  en temperatura alta. Se observa la formación de fruto.**

En resumen, el experimento fue concluyente, para la planta control AI con genotipo  $S_{A2}S_{A2}$  no hubo formación de fruto en ninguna ocasión. En cambio, para la planta mutante 4936 de *N. glauca* sí hubo formación de fruto en cada uno de los casos, importante mencionar que el fruto formado es de menor tamaño y, por lo tanto, se obtienen menos semillas (Figura 18).



**Figura 18. Formación de fruto y recolección de semillas de la mutante 4936 de *N. alata*.**

Por otra parte, cuando el experimento anterior concluyó, la planta mutante se transfirió a un cámara con temperatura fluctuando de 15 °C a 23 °C (Figura 19). Se autopolinizaron 12 y ninguna de ellas formó fruto (Figura 20), observándose el fenómeno de AI. Lo mismo se observó en *N. alata* AI, ya que de las nueve flores que se autopolinizaron ninguna formó fruto. En la siguiente figura se muestra el grafico de la temperatura durante el experimento registrado por personal de la Facultad de Química y complementado por la base de datos del meteorológico nacional de la Ciudad de México.



\*La línea morada indica fechas de polinizaciones

**Figura 19. Registro de temperaturas durante el estudio en *N. alata* 4936 a temperatura a temperaturas no mayores a 23 °C.**



**Figura 20. Autopolinización de *N. alata* 4936  $S_{C10}S_{A2} \times S_{C10}S_{A2}$  en temperaturas de los 15 °C a 23 °C. Se observa que no hay formación de fruto en donde señala la flecha roja.**

## Discusión

En esta investigación se estudió y caracterizó a la mutante natural 4936 de *N. alata*, la cual acepta su propio polen. Las plantas de *N. alata* silvestres son generalmente AI, ya que expresan niveles normales de las determinantes de especificidad masculina (SLF) en el polen y a la femenina (S-RNasa) en los pistilos maduros. Sin embargo, hay evidencias genéticas y bioquímicas que demuestran que otros genes no codificados en el locus S son esenciales en la vía genética y bioquímica del rechazo del polen en varias especies. Estos factores son conocidos como genes modificadores (GM) y a la fecha se han identificado en la parte estilar a *HT-B* (McClure *et al.*, 1999), *120K* (Hancock *et al.*, 2005), *NaStEP* (Busot *et al.*, 2008) y *NaTrxh* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Cuando se inició la caracterización de la mutante AC 4936 de *N. alata* con genotipo  $S_{A2}S_{C10}$ , esta planta fue polinizada independientemente con polen  $S_{C10}$  y con polen  $S_{A2}$ . De manera inesperada, la mutante aceptó el polen  $S_{A2}$  pero no el  $S_{C10}$ , lo que sugiere que podría haber un defecto en la  $S_{A2}$ -RNasa, debido a mutaciones de pérdida de función o a mutaciones que afectaran su expresión. Esta hipótesis se basó en el hecho de que en poblaciones naturales de *Lycopersicon peruvianum* se encontró que mutaciones que afectan el sitio catalítico de las S-RNasas confieren compatibilidad (Royo *et al.*, 1994). Las S-RNasas tiene en su sitio catalítico dos histidinas que son responsables en gran medida de la catálisis (MacIntosh *et al.*, 2011), pero que, en plantas de esta población AC, la mutación provoca el cambio de una de las dos histidinas del sitio activo por una arginina, lo que lleva a la pérdida de su actividad de ribonucleasa.

En congruencia con lo anterior, en el análisis se encontró que la región codificadora de la  $S_{A2}$ -RNasa no presenta mutaciones de pérdida de función en su sitio activo, es decir, los sitios importantes no estaban alterados, ni hay afectaciones en sus niveles de expresión en el pistilo, comparados con *N. alata*  $S_{A2}S_{A2}$  AI silvestre, por lo que estos resultados llevaron a descartar la hipótesis de la pérdida de función y la falta de expresión de la  $S_{A2}$ -RNasa en la mutante 4936. Derivado de estos resultados una hipótesis que pudiera explicar la pérdida de reconocimiento y rechazo del polen  $S_{A2}$ , es que la mutación que confiere compatibilidad en la mutante 4936 podría estar afectando un gen fuera del locus S.

Para determinar que la mutación que afecta a la mutante 4936 está fuera del locus *S*, se realizó un análisis genético, generando una progenie derivada de la autopolinización de la mutante 4936. La genotipificación de las 26 plantas de la progenie mostró que en la población segregaron los genotipos  $S_{A2}S_{A2}$  (25%)  $S_{A2}S_{C10}$  (50%) y  $S_{C10}S_{C10}$  (25%), lo cual es congruente con una mutación fuera del locus *S*, probablemente en un gen modificador, ya que si la mutación estuviera en el gen  $S_{A2}$ -RNasa o en el de la  $S_{C10}$ -RNasa, por ejemplo, no se hubieran recuperado homocigos  $S_{A2}S_{A2}$  ni  $S_{C10}S_{C10}$ .

Para probar si los niveles de proteína de alguno de los GMs como *HT-B*, *120K*, *NaSteP* y *NaTrxh* que son esenciales en la respuesta de AI, estaban afectados, se evaluaron sus niveles de proteína de cada uno de ellos, encontrándose que la cantidad de proteína en el pistilo maduro de la mutante 4936 es similar a la cantidad en estilos de *N. alata* AI  $S_{C10}S_{C10}$ , aunque en este trabajo no se evaluó si estos genes tenían mutaciones de pérdida de función, en el grupo del Dr. Cruz se está estudiando esta posibilidad. En consecuencia, es probable que el responsable de la AC en la mutante 4936 sea en un GM diferente a los estudiados.

Para corroborar los resultados del análisis genético se repitieron las autopolinizaciones en la mutante 4936; sin embargo, se obtuvo un resultado inesperado, la mutante se comportó como AI, es decir rechazó su propio polen.

El análisis genético que se describió en los resultados se realizó en el periodo de marzo-abril, cuando las temperaturas del invernadero estaban por arriba de los 30°C. No obstante, cuando se repitió el experimento fue en el mes de octubre, ya con temperaturas alrededor de los 25 °C. Por lo tanto, los datos indicaban que la mutación en la mutante 4936 podría ser sensible a la temperatura.

Para definir el efecto de la temperatura sobre el fenotipo de compatibilidad/incompatibilidad, la mutante 4936 fue trasladada a una cámara donde la temperatura osciló entre 31 °C y 38 °C. Bajo estas condiciones, el resultado de las autopolinizaciones fue la formación de frutos. Por el contrario, cuando las polinizaciones se realizaron a temperaturas entre 15 °C y 23 °C no hubo formación de frutos,

presentándose el fenotipo de incompatibilidad. Estos resultados confirman la hipótesis de la mutación que confiere compatibilidad en la mutante 4936 es termosensible a temperaturas superiores a los 31 °C.

Se ha estudiado en *Hordeum vulgare* que la exposición al aumento en la temperatura en su ambiente desencadena un mecanismo de defensa a las especies reactivas de oxígeno que se producen, a la desestabilización de la membrana celular y deshidratación para que la planta pueda resistir el choque térmico (Abou-Elwafa *et al.*, 2016).

Entre los elementos que componen al sistema de defensa esta la señalización de chaperonas y activación transcripcional de proteínas de choque térmico que ayudan al plegamiento de proteínas para mantener la homeostasis celular y prevenir la desnaturalización (Wahid *et al.*, 2007).

Sin embargo, si existiera una mutación de pérdida de función en estas proteínas protectoras o bien, no pudieran contener la situación, conlleva a que los sitios catalíticos de algunas proteínas que dirigen reacciones bioquímicas fundamentales sean alterados porque las moléculas que forman estructuras tridimensionales en las proteínas en condiciones de altas temperaturas aumentan su vibración haciendo que los enlaces se rompan. Por consiguiente, un mal plegamiento o la desnaturalización de la proteína, en ambos casos se pierde su función como puede ser el caso de algún GM en la mutante 4936.

El efecto de la temperatura en las relaciones de compatibilidad/incompatibilidad se han estudiado en otras especies *Prunus persica*, *Citrus clementina*, *Cicer arietinum* L., *Mangifera indica* L. y *Persea americana* L. (Distefano *et al.*, 2012; Distefano *et al.*, 2012; Caruso *et al.*, 2012; y Gentile *et al.*, 2012), la relación que se ha establecido con estas especies es que tienen un comportamiento como AI o AC dependiendo la temperatura. Al contrario de la mutante 4936, las cruas AI se comportan como AC a temperaturas de 15 °C que es diez grados debajo de la óptima de crecimiento y no por encima.

De acuerdo con análisis histológicos el rechazo del tubo polínico se lleva a cabo en la parte superior o media del estilo como en el sistema AIG de *Nicotiana*, sin embargo, no

se han descubierto el o los gene(s) que estén relacionados a este comportamiento, únicamente se tienen datos acerca del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  libre que ocasiona el aumento de transglutaminasas (TGa) y la unión de poliaminas (PA) como factor regulador de la AI como en *papaver* (Aloisi *et al.*, 2020).

Otro ejemplo interesante en el sistema de AI de *C. clementina* es que, a temperaturas de 15 °C durante el periodo de floración, afecta el desarrollo del polen, lo que causa una reducción en los niveles de polen, y que el sistema de AI no sea eficiente.

Esto quiere decir que el fenómeno de AC en cruzas no compatibles esta ampliamente diseminado por la naturaleza, asimismo, se lleva a cabo cuando la planta con AIG se encuentra fuera de la temperatura óptima de crecimiento, y que entre las especies debieran seguir mecanismos moleculares similares.

De corroborarse estos resultados en otro ciclo de experimentos que evalúen el efecto de la temperatura sobre las relaciones de compatibilidad/incompatibilidad en *N. alata*, y la identificación del gen afectado en la mutante 4936, sería un hallazgo muy relevante, ya que se estarían dando evidencias de como el ambiente modificaría un genotipo AI a AC, lo que evitaría que una población con limitación de cruzas compatibles se extinguiera por un bajo número de alelos S.

## Conclusiones

- La mutante 4936 presenta mutaciones en el locus *M* (modificador) que no es parte del locus *S*, las cuales confieren compatibilidad.
- Estas mutaciones son sensibles a temperaturas superiores a los 30°C, por lo que podrían afectar la estabilidad y funcionalidad de la proteína codificada en el locus *M*, o deberse a una regulación epigenética ya que, cuando las autopolinizaciones se realizan a una temperatura superior a 30 °C, la planta es incapaz de rechazar su propio polen. Sin embargo, cuando la mutante 4936 es autopolinizada a temperaturas cercanas a los 20 °C la planta presenta un fenotipo incompatible.

## Perspectivas

Únicamente se estudió a la población  $F_1$  de *N. alata* 4936 y a la planta principal; sin embargo, es necesario evaluar si esta población  $F_1$  es AI y si las semillas conseguidas a temperaturas mayores a 30 °C generan individuos que pueda alcanzar la madurez. Además, que sea complementado por un estudio en donde se busque determinar cuál es el umbral de temperatura en donde el fenotipo cambia de AI a AC.

Se requiere identificar el gen modificador afectado en la mutante 4936 de *N. alata* para determinar que aminoácidos son los afectados en la proteína y explicar su termosensibilidad. La identificación del factor 4936 podría hacerse por clonación posicional.

Las inmunodetecciones de  $S_{C10}$ -RNasa y  $S_{A2}$ -RNasa, así como, de las proteínas 120K, HTB, NaStEP, y NaTrxh, se realizaron en horas prepolinización, por lo que sería necesario evaluar su estabilidad de todo este entorno genético horas posteriores a las polinizaciones a temperaturas de 35 °C

Por otro lado, la población proveniente de la línea 4936 de *N.alata* no ha alcanzado la madurez adecuada para realizar autopolinizaciones y comprobar que el fenotipo es 100% compatible.

## Anexos

### Apéndice I: Experimentación *in silico*

Secuencias de la  $S_{C10}$ -RNasa y de la  $S_{A2}$ -RNasa

$S_{C10}$ -RNasa retomado de McClure *No publicado*:

> $S_{C10}$ -Rnase *Wild Type* 814 pb

ATGCTTAACTCACCGCTCACATCAGTCCTC TTCGTATTGCTTTTTGTTCTTTTCGCCCA  
TTTATGGGGCATTTCGAGTACATGCAACTGGTGTACAAATGGCCAACAGCTTTTTGCC  
ACACCACTCCCTGCAAAAGAATTCCAAACAACCTTTACAATCCATGGGCTTTGGCCGG  
ATAACGTGAGCACAACCTCTCAATTACTGCGCTGCCAAAGAAAACCTTTAAAAATATAGA  
AGTAAGTTTAGACACTATCTTCCTAAGGACCTGTATGTTTCCATGTTGATTTTAATTTAT  
TTTTTTTCAGTTCAGCTTATTACTTTTCCTATATCTACAGGATGACACGAAAAAAGATG  
ATCTATATAAACGCTGGCCAGACCTAACCACCGCAGAAACATATTGTAAGCAACATCA  
AAATTTCTGGAGACATGAATATAATAAGCACGGAAAGTGTTGTTTCAGAGAGCTACAAC  
CGAGAACAATATTTTGATTTAGCCATGGCCTTAAAAGACAAGTTTGATCTTTTGTCTATC  
TTTGAGAAATCACGGAATTATTCCTGGAAGGGGAATGAAATACACCGTTCAGAAAAT  
CAATAGCACCATCAAGAAAATAACTCAAGGGTATCCTAACCTGTCATGCACTAAAGGA  
ATAATGGAACCTTGTGGAGATAGGCATATGTTTCGACTCGATGGTTAAAAATGTAATTA  
TTGTCCTCATCCCAAGACATGCAAACCTACGGGAAGTAATGAGATTAAGTTTCCATG  
ACAATATGTTTTACTTTTTGTCTATTTATGCTATGTAATAAAAAATGTAATATCTAGA

Verde: Lugar de unión de los oligonucleótidos.

Rojo: Intrón.

$S_{A2}$ -RNasa retomado de McClure *No publicado*:

> $S_{A2}$ -RNase *Wild Type* 933 pb

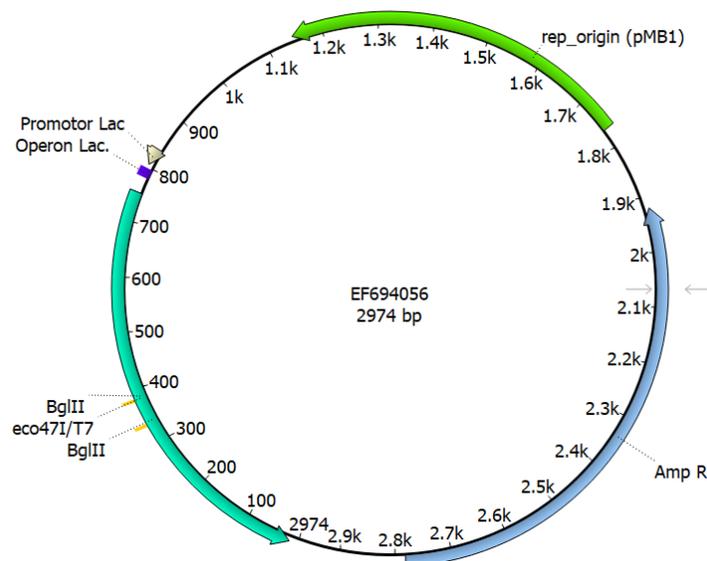
ATGCTTAATTCACAGATTACGTCAGCTGTTCTC TTCTTGCTTTTCGCTCTTTCTCCCAT  
TTATGGTGATTTTGATTACATGCAACTCGTTTTAACATGGCCGGCATCATTTTGTTACC  
CTAAAATTTTTGTAGCAGAATAGCTCCAAAAACCTTACGATTCATGGGCTTTGGCC  
GGACAAGGTGCGCGGACGTCTGCAGTTCTGCACTTCCGAAAAGTATGTAACTTTG

CACAGGTAATTACCACATTGATTACATCTAGAATTTCTAAATTTTATTTTTTCATTTCAATA  
 GTTTGCATTTCCATTTTGTTCCTTTAATGAACGAACTGTTTTCCTGATGTTACACAGG  
 ATAGTCCTATACTCGATGATCTGGACCACCACTGGATGCAATTAAGTACCATCGCGA  
 CTTCGGTTTAGAAAATCAATTTCTCTGGAGAGGTCAATACCAAAGCATGGAACGTG  
 TTGTATTCCGCGCTATAATCAGATGCAATATTTTTTACTAGCTATGAGACTAAAAGATAA  
 GTTTGATCTTTTGGCAACTCTCAGAACTCATGGAATTACTCCTGGAACAAAGCATACA  
 TTTAATGAAACCCGAGATGCCATCAAGACGGTACTAATCAAGTGGATCCGGACCTG  
 AAGTGCGTTCGAACATATCAAAGGGGTACGGGAACTATATGAGATAGGCATATGTTTTA  
 CCCCACGGCCGATAGTTTTTTTCCATGTCCTCACAGTAACACATGTGATGAAACGG  
 GCATTACGAAGATTTTGTTCGACGATGAATAACTTCACATTTCTTACTTTCAGTTGGT  
 TCATGCTAAGATTAATAAAATACATAACTACCAGAATATAGGAGATCATCTTCTGAAGG  
 ATTTTCGTTGTGAAACCAATTGAAGTAAATTTATTGTGAAAGAAAATCATTATTTACT

**Verde:** Lugar de unión de los oligonucleótidos.

**Rojo:** Intrón.

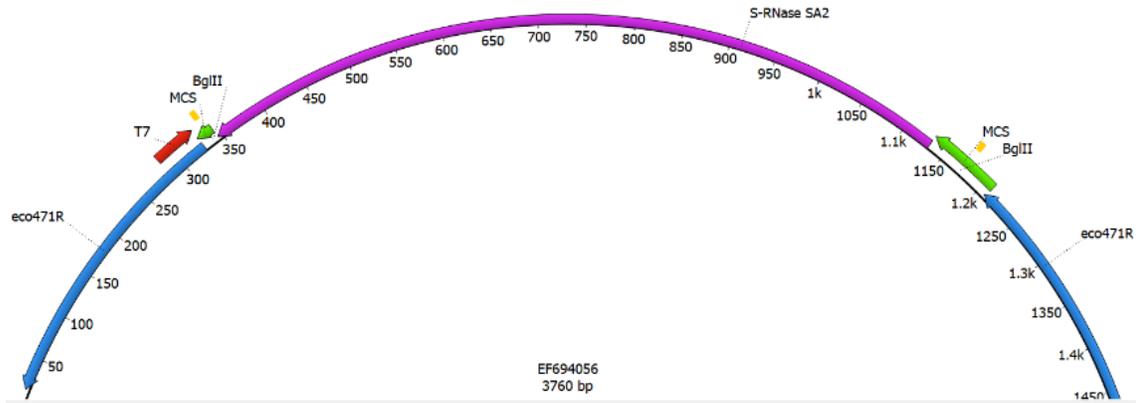
### Construcciones bioinformáticas del trabajo de investigación.



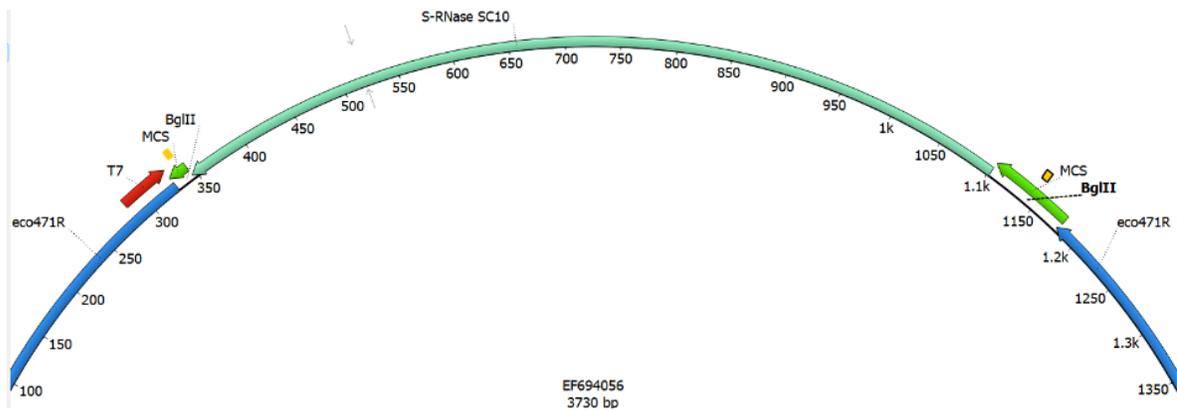
**Figura 21. Mapa del vector pJET 1.2/blunt.**

Representación en UGENE del vector de clonación, sin el inserto y en el cual se añadieron los sitios donde corta la enzima de restricción Bgl II.

A)



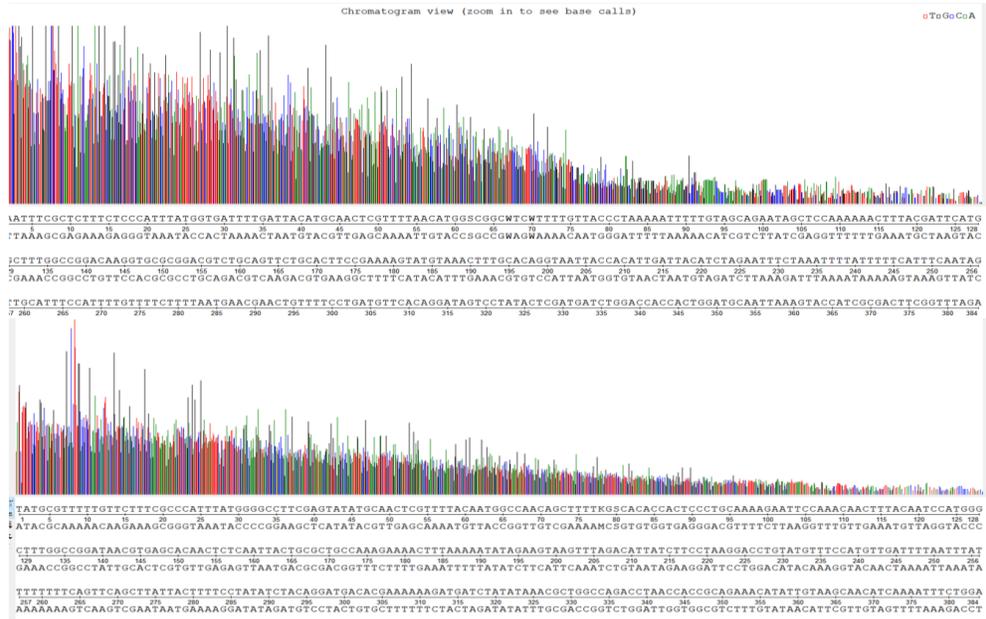
B)



**Figura 22. Construcción del plásmido con la secuencia de las S-RNasas.** realizada *in silico* con las secuencias de interés y enzima de restricción a utilizar, se observa cómo se interrumpe el gen letal *eco471R*.

A) Construcción de la S-RNasa SA<sub>2</sub> dentro del vector pJET 1.2/blunt

B) Construcción de la S-RNasa SC<sub>10</sub> dentro del vector pJET 1.2/blunt



S<sub>A2</sub>

S<sub>C10</sub>

Cromatogramas de la secuenciación de la S<sub>C10</sub>-RNasa y S<sub>A2</sub>-RNasa. Se utilizó *UGENE* como visualizador y fue el primer paso empezar a aclarar.

**Tabla 2. Registro de temperaturas a las cuales se realizaron los experimentos de autopolinización.**

a)		b)	
Día	Temp, °C	Día	Temp, °C
1	35.40	1	16.0
2	35.10	2	18.0
3	33.70	3	19.0
4	34.65	4	18.0
5	34.60	5	18.0
6	33.86	6	19.0
7	38.12	7	20.0
8	31.20	8	16.0
9	31.54	9	15.0
10	32.74	10	15.0
11	33.68	11	17.0
12	35.93	12	18.0
13	37.29	13	20.0
14	34.60	14	23.0
15	33.89	15	20.0
16	35.74	16	20.0
17	32.74	17	20.0
18	33.86	18	20.0
19	35.58	19	20.0
20	35.66	20	20.0
21	34.57	21	18.0

A) Registro de temperatura correspondiente al invernadero de cactáceas en la Facultad de Ciencias.

B) Registro de temperaturas correspondiente al invernadero I-404

## Apéndice II: Metodología

### Extracción de DNA genómico con CTAB

La extracción de DNA genómica a las plantas de *Nicotiana glauca* se realizó por el método de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) amortiguador al 3%

#### Procedimiento

1. Se trituró 0.2 g de hojas congeladas con nitrógeno líquido y se transfirió a un tubo de 2 mL congelado.
2. Al momento se prepararon 1.2 mL del amortiguador CTAB con 1% de  $\beta$ -mercapto etanol y mezclar.
3. Se adicionó amortiguador de extracción precalentado a 65 °C a los tubos de 2 mL por 30 minutos e invertir tubo cada 5 minutos.
4. Se centrifugo a 13,500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Se transfirió fase acuosa a un tubo nuevo
6. Se adicionó 800  $\mu$ L de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico, mezclar con el equipo vortex.
7. Cerrar y mezclar los tubos invirtiéndolos por 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Se separaron las fases por centrifugación a 13, 500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Se tomó fase acuosa superior a un tubo nuevo que contenga 800  $\mu$ L de isopropanol a -20 °C.
10. Mezclar invirtiendo los tubos e incubándolos a temperatura ambiente por 10 minutos.
11. Se centrifugó la mezcla por 10 minutos a 13, 500 rpm.
12. Remover sobrenadante y se resuspendió el botón en 250  $\mu$ L de TE a temperatura ambiente.
13. Se añadió 2.5  $\mu$ L de RNasa a 20  $\frac{mg}{mL}$  e incubar a 37 °C por 30 minutos.
14. Se adicionó 800  $\mu$ L de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico, mezclar con vortex.
15. Cerrar y mezclar los tubos invirtiéndolos por 20 minutos a temperatura ambiente.
16. Separar las fases por centrifugación a 13, 500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.

17. Tomar fase acuosa superior a un tubo nuevo.
18. Se adicionó 25  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3,  $\text{pH} = 5.5$  y 600  $\mu\text{L}$  de etanol a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .
19. Mezclar e incubar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos.
20. Se centrifugó a 13, 500 rpm.
21. Remover sobrenadante y añadir 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (v/v) a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , Se resuspendió el botón.
22. Se centrifugó a 13, 500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y remover el etanol sobrenadante.
23. Secar el botón de DNA dejando a temperatura ambiente toda la noche.
24. Se resuspendió el botón con 30  $\mu\text{L}$  agua grado PCR.
25. Cuantificar el DNA utilizando BioDrop.
26. Almacenar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$

#### Preparación del Amortiguador de extracción con CTAB

1. En un frasco con tapón que cuente con capacidad para contener 250 mL del amortiguador de extracción Se adicionó las siguientes disoluciones:
2. 25 mL de Tris 1 M,  $\text{pH} = 8.0$
3. 70 mL de NaCl 5 M
4. 20 mL de EDTA 0.5 M
5. 5 g CTAB de alta pureza
6. Llevar al punto de aforo de 250 mL
7. Añadir 1 %  $\beta\text{ME}$  al amortiguador de extracción minutos antes de ser utilizado, evitar a toda costa Se adicionó antes evitando la posibilidad de oxidación.

#### Purificación de plásmido de E. coli para la miniprep se utilizó *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research)

1. Se centrifugó 5 mL de cultivo de bacterias crecidas en medio LB fresco la noche anterior a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en un tubo nuevo a 13,00 rpm y desechar sobrenadante.
2. Se resuspendió botón celular en 600  $\mu\text{L}$  en agua desionizada.
3. Se adicionó 100  $\mu\text{L}$  del 7x amortiguador de lisis e invertir el tubo de 4 a 6 veces y dejar reposar 2 minutos.

4. Se adicionó 350 uL del amortiguador de neutralización frío y mezclar por inversión hasta que la coloración azul desaparezca.
5. Se centrifugó a 11, 000 rpm por 4 minutos
6. Se transfirió el sobrenadante a la columna Zymo-Soin™ IIN.
7. Colocar la columna sobre el tubo de colección y Se centrifugó por 15 segundos.
8. Descartar lo colectado y volver a colocar el tubo de colección abajo de la columna.
9. Añadir 200 uL del Endo-Wash Amortiguador a la columna y Se centrifugó por 30 segundos
10. Se adicionó 400 uL del Zyppy™ Wash Amortiguador a la columna y Se centrifugó 1 minuto.
11. Se transfirió la columna dentro de un tubo nuevo y añadir 30 uL del Zyppy™ Elution Amortiguador directamente a la matriz de la columna y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Se centrifugó 30 segundos para eluir el plásmido.
13. Cuantificar el DNA en BioDrop.

#### Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa utilizando NYZGelpure (nzytech)

1. Escindir la banda del gel de agarosa que tiene el DNA y pesar en un tubo limpio.
2. Se adicionó 300 uL del amortiguador de unión por cada 100 mg del peso del gel.
3. Incubar a 55 °C 5 minutos o hasta que se disuelva la agarosa completamente y agitar ocasionalmente. El medio tendrá una coloración amarilla.
4. Cargar a la NZYTech columna toda la mezcla y posteriormente, a un tubo colector.
5. Se centrifugó por 30 segundos y descargar lo colectado.
6. Añadir 600 uL del amortiguador de lavado y Se centrifugó por 1 minuto. Descartar lo colectado.
7. Se centrifugó 1 minuto para secar la membrana de la columna NZYTech del etanol.

8. Poner la columna en un tubo nuevo y añadir 50 uL del amortiguador de elución a la matriz de la columna.
9. Se centrifugó 1 minuto para eluir el DNA.
10. Cuantificar el DNA en BioDrop.
11. Almacenar el DNA purificado a -20 °C.

Reacción de ligado de DNA con el vector pJET 1.2/blunt utilizando CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific®)

1. Comprobar en una electroforesis en gel de agarosa al 1% que se tengan al menos 0.15 pmol del fragmento de DNA de interés. Se utiliza bromuro de Etidio para revelar
2. En hielo poner todos los componentes de la reacción.
  - A. 5 uL del amortiguador de reacción 2X
  - B. 0.5 uL de muestra de DNA
  - C. 0.5 uL de pJET 1.2/blunt Cloning Vector
  - D. 0.5 uL de T4 DNA ligasa
  - E. 3.5 uL de Agua libre de nucleasas.
3. Mezclar con el equipo vortex 3 segundos.
4. Incubar la mezcla de ligación 3-5 segundos a temperatura ambiente.

Transformación en células quimiocompetentes de *E.coli* XL10-Gold por choque térmico.

1. Sacar vial con células en hielo.
2. Se adicionó 1 uL del plásmido pJET 1.2/blunt Cloning Vector con el inserto de interés
3. Incubar en hielo 30 minutos.
4. Dar choque térmico 42 °C por 45 segundos.
5. Incubar en hielo 1 minuto.
6. Se adicionó 400 uL de medio SOC
7. Incubar en agitación a 37 °C por 2 horas.

8. Se centrifugó a 11, 000 rpm por 30 segundos.
9. Eliminar sobrenadante.
10. Se resuspendió el botón en 100 uL de LB
11. Plaquear e incubar a 37 °C en cajas de medio LB con Ampicilina 50 ug/mL

#### Observación de tubos polínicos por medio de fluorescencia

1. Extraer el pistilo de la flor y colocar en un tubo nuevo.
2. Se adicionó solución fijadora de ácido acético y etanol en relación 1:3 respectivamente.
3. Dejar reposar 24 horas a temperatura ambiente.
4. Realizar disolución de sulfito de sodio 10% y meter en autoclave 5 minutos a 121°C y 15 psi.
5. Desechar la solución fijadora y añadir la disolución de sulfito de sodio 10%
6. Conservar a temperatura ambiente 24 horas.
7. Colocar pistilos en una solución de anilina al 0.1% disuelta en  $K_3PO_4$  - KOH 0.1 M y dejar toda la noche.
8. Colocar tejido sobre un portaobjetos.
9. Colocar cubreobjetos y aplastar empezando por el estigma.
10. Sellar con barniz transparente para evitar desecación por las esquinas.
11. Observar en microscopio de epifluorescencia.

## Referencias

- Abou-Elwafa, S. F., & Amein, K. A. (2016). Genetic diversity and potential high temperature tolerance in barley (*Hordeum vulgare*). *World Journal of Agricultural Research*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.12691/wjar-4-1-1>
- Allen, G., Flores-Vergara, M., Krasynanski, S. *et al.* A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nat Protoc* 1, 2320–2325 (2006). <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/nprot.2006.384>
- Aloisi, I., Distefano, G., Antognoni, F., Potente, G., Parrotta, L., Faleri, C., Gentile, A., Bennici, S., Mareri, L., Cai, G., & Del Duca, S. (2020). Temperature-Dependent Compatible and Incompatible Pollen-Style Interactions in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. Show Different Transglutaminase Features and Polyamine Pattern. *Frontiers in Plant Science*, 11(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01018>
- Anderson, E., & de Winton, D. (1931). The Genetic Analysis of An Unusual Relationship between Self-Sterility and Self-Fertility in *Nicotiana*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 18(1), 97–116. <https://doi.org/10.2307/2394046>
- Busot, G. Y., McClure, B., Ibarra-Sánchez, C. P., 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern175>
- Caruso, M., Merelo, P., Distefano, G., La Malfa, S., Lo Piero, A. R., Tadeo, F. R., et al. (2012). Comparative transcriptome analysis of stylar canal cells identifies novel candidate genes implicated in the self-incompatibility response of *Citrus clementina*. *BMC Plant Biol.* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-20>
- Caruso, M., Lo Cicero, L., Distefano, G., La Malfa, S., Lo Piero, A. R., and Gentile, A. (2015). Towards the functional characterization of the clementine asp-rich protein encoding genes, candidates for regulating Gametophytic selfincompatibility. *Acta Hortic.* 599–604. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.75>

Cruz Durán, R., Rosas López, U. (2013). Tema III. Cap. 1. La flor. Biología de angiospermas (Primera Ed, pp. 44-59). México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Cruz-García, F., & Cruz González-Zamora, Y. (2013). Tema IV. Cap. 4. Interacción polen-pistilo. Biología de angiospermas (Primera Ed, pp. 110-117). México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Cruz-García, F., Hancock, C. N., Kim, D., & McClure, B. (2005). Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *Plant Journal*, 42(3), 295–304. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02375.x>

Cruz-Zamora, Y., Nájera-Torres, E., Noriega-Navarro, R., Torres-Rodríguez, M. D., Bernal-Gracida, L. A., García-Valdés, J., Juárez-Díaz, J. A., & Cruz-García, F. (2020). NaStEP, an essential protein for self-incompatibility in *Nicotiana*, performs a dual activity as a proteinase inhibitor and as a voltage-dependent channel blocker. *Plant Physiology and Biochemistry*, 151(March), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.052>

Cornish, E., Pettitt, J., Bonig, I. et al. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 326, 99–102 (1987). <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/326099a0>

de Nettancourt, D. (2001). Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. In *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04502-2>

Distefano, G., Hedhly, A., Las Casas, G., La Malfa, S., Herrero, M., and Gentile, A. (2012). Male–female interaction and temperature variation affect pollen performance in *Citrus*. *Sci. Hortic.* 140, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.03.011>

Distefano, G., Gentile, A., Hedhly, A., and La Malfa, S. (2018). Temperatures during flower bud development affect pollen germination, self-incompatibility reaction and early fruit development of clementine (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.). *Plant Biol.* 20, 191–198. doi: <https://doi.org/10.1111/plb.12656>

García-Valencia, L. E., Bravo-Alberto, C. E., & Cruz-García, F. (2013). Evitando el incesto en las plantas: control genético y bioquímico. *Tip*, 16(1), 57–65. [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72078-3](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72078-3)

García-Valencia LE, Bravo-Alberto CE, Wu HM, Rodríguez-Sotres R, Cheung AY, Cruz-García F. SIPP, a Novel Mitochondrial Phosphate Carrier, Mediates in Self-Incompatibility. *Plant Physiol.* 2017 Nov;175(3):1105-1120. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01884>

Gentile, A., Antognoni, F., Iorio, R. A., Distefano, G., Las Casas, G., La Malfa, S., et al. (2012). Polyamines and transglutaminase activity are involved in compatible and self-incompatible pollination of *Citrus grandis*. *Amino Acids* 42, 1025–1035. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1017-9>

Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T. E., Cruz-Garcia, F., & McClure, B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, 439(7078), 805–810. <https://doi.org/10.1038/nature04491>

Goring, Daphne; Cruz-Garcia, Felipe; and Franklin-Tong, Veronica. Self-incompatibility, eLS, Vol 3: 1–12, 2022. <https://doi.org/10.1002/9780470015902>.

Hua, Z., & Kao, T. H. (2006). Identification and characterization of components of a putative petunia S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*, 18(10), 2531–2553. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041061>

Ito, H., Kanayama, Y., Shibuya, T., Mohammed, S. A., Nishiyama, M., & Kato, K. (2022). Effect of short-term temperature stress on fruit set and the expression of an auxin reporter gene and auxin synthesis genes in tomato. *Scientia Horticulturae*, 300(August 2021), 111039. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111039>

Jiménez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, Cruz-García F. NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiol.* 2013 Jan;161(1):97-107. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198440>

Royo, J., Kunz, C., Kowyama, Y., Anderson, M., Clarke, A. E., & Newbigin, E. (1994). Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), 6511–6514. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6511>

Juárez-Díaz, J. A., McClure, B., Vázquez-Santana, S., Guevara-García, A., León-Mejía, P., Márquez-Guzmán, J., & Cruz-García, F. (2006). A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3418–3424. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511687200>

Juárez Díaz, et al., (2021). Self-Incompatibility in S-RNase-Based Systems: Are there Differences in the Pollen Rejection Mechanisms Among Species?, 8(2). MCDA. 000684. [10.31031/MCDA.2021.08.000684](https://doi.org/10.31031/MCDA.2021.08.000684)

Ida K, Norioka S, Yamamoto M, Kumasaka T, Yamashita E, Newbigin E, Clarke AE, Sakiyama F, Sato M. The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* S(F11)-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J Mol Biol*. 2001 Nov 16;314(1):103-12. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5127>

MacIntosh, G. (2011). Cap. 4 RNase T2 Family: Enzymatic Properties, Functional Diversity, and Evolution of Ancient Ribonucleases. En *Ribonucleases* (pp. 90-107). Filadelfia, Estados Unidos de Norte América: Ediciones Springer.

McClure, B. A., Cruz-García, F., Beecher, B., & Sulaman, W. (2000). Factors affecting later- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Annals of Botany*, 85(SUPPL. A), 113–123. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1061>

McClure, B., Cruz-García, F., & Romero, C. (2011). Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. In *Annals of Botany* (Vol. 108, Issue 4, pp. 647–658). <https://doi.org/10.1093/aob/mcr179>

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. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13548>

McClure, Bruce A., & Franklin-Tong, V. (2006). Gametophytic self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta*, 224(2), 233–245.

McClure, Bruce A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., & Clarke, A. E. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* ribonucleases. *Nature*, 342(6252), 955–957. <https://doi.org/10.1038/342955a0>

Murfett, J., Strabala, T. J., Zurek, D. M., Mou, B., Beecher, B., & McClure, B. A. (1996). S RNase and Interspecific Pollen Rejection in the Genus *Nicotiana*: Multiple Pollen-Rejection Pathways Contribute to Unilateral Incompatibility between Self-Incompatible and Self-Compatible Species. *The Plant Cell*, 8(6), 943. <https://doi.org/10.2307/387020>

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

Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. et al. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429, 302–305 (2004). <https://doi.org/pbidi.unam.mx:2443/10.1038/nature02523>

Torres-Rodríguez, M. D., Cruz-Zamora, Y., Juárez-Díaz, J. A., Mooney, B., McClure, B. A., & Cruz-García, F. (2020). NaTrxh is an essential protein for pollen rejection in *Nicotiana* by increasing S-RNase activity. *Plant Journal*, 1–14. <https://doi.org/10.1111/tpj.14802>

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>

Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure B. Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana glauca* disrupts pollen recognition. *Plant J*. 1997 Apr;11(4):797-808. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11040797.x>.