



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

UNAM
POSGRADO 
Ciencias Bioquímicas

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**GENES MODIFICADORES REQUERIDOS
EN EL RECHAZO DEL POLEN EN
*NICOTIANA***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

GRETHEL YANET BUSOT GONZÁLEZ

TUTOR: DR. FELIPE CRUZ GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A MI ESPOSO SIN CUYO APOYO, AMOR Y DEDICACIÓN
NO HUBIERA SIDO POSIBLE LLEGAR AL FINAL DE
ESTE VIAJE

Agradecimientos

A mi asesor el Dr. Felipe Cruz García por su contribución a mi formación académica, por la confianza y el apoyo brindado durante estos años. Muchas gracias por acompañarme en la recta final.

A los integrantes del Comité Tutorial de Maestría y Doctorado por las sugerencias brindadas: Dr. Javier Plasencia, Dra. Imelda López, Dr. Jesús Aguirre y Dr. Roberto Coria.

A la Dra. Marina Gavilanes, Dr. Jorge Vázquez, Dr. Jesús Aguirre, Dr. Francisco Javier Plasencia y Dr. Roberto Coria por formar parte del jurado evaluador de esta tesis y por la revisión exhaustiva del manuscrito.

A los doctores Rocío Cruz, Marina Gavilanes, Javier Plasencia y María Eugenia Torres por haber impartido el que considero fue el mejor curso tomado durante el doctorado: “Curso de Interacción Planta-Patógeno”.

A los que fueron mis profesores y transmitieron sus conocimientos a través de los cursos optativos y obligatorios del posgrado en especial al Dr. Rafael Moreno y Dr. Jorge Vázquez.

Al Dr. Bruce McClure por hacerme parte de su laboratorio durante los años 2001 y 2003.

Al Dr. William B. Gurley y Dr. Kevin O’Grady por la revisión exhaustiva del artículo y sus recomendaciones. Mil gracias por abrirme las puertas y dejarme formar parte de su equipo de trabajo durante mi primera estancia posdoctoral.

A quienes fueron mis compañeros de laboratorio por aproximadamente 7 años y con quienes compartí alegrías y tristezas (la mayoría de ellas relacionadas con los resultados experimentales). Dentro de ellos y con especial cariño a: Yuridia, Gregorio, Javier Andrés, Andrea, Claudia Patricia y Gabriela. Muchas gracias Yu por tu amistad incondicional.

A Leticia García y Adelina González por la ayuda y orientación brindada a lo largo de estos años.

Al Sr. Enrique por tenernos todo el material de laboratorio listo para ser usado; por su eterna sonrisa.

De forma general, a todos aquellos (doctores y estudiantes) del Departamento de Bioquímica de la FQ con los que en algún momento (o en varios) compartí el diseño de un experimento, análisis de un resultado...A los que me brindaron su ayuda con protocolos, reactivos y el mejor de los deseos de que la historia tuviera un final feliz. En especial (además de mi asesor y compañeros de laboratorio y olvidándome de los títulos) a Manuelita, Pilo, Selene, Martin, Mayte, Paty, Eleazar, Carlos, Valeria, Cristal y Mary.

A la DGEP por el financiamiento recibido.

A la UNAM por permitirme hacer Ciencia.

A mis amigos, Roldys, Katerine, Marilú, Zeyda, Javier, Tony y Odalys por su compañía.

A mi familia, en especial a mis padres por todo su amor, dedicación y tiempo invertido en educarnos y hacernos personas de bien. Por todavía estar conmigo en las buenas y en las malas.

A quien no me dejó tirar los guantes cuando sentí que todo estaba perdido, mi esposo.

A México, por la oportunidad ofrecida, hospitalidad y cariño con que aun me recibe.

Índice

Resumen.....	3
Resumen (en inglés).....	5
Abreviaturas.....	7
Capítulo I	Introducción general.....9
	Introducción.....10
I.	Interacciones polen-estigma.....11
	I.I La superficie estigmática y el grano de polen.....11
	I.II La superficie estigmática y el crecimiento del tubo polínico.....12
II.	Determinantes de los sistemas de autoincompatibilidad.....14
	II.I Genética del sistema de autoincompatibilidad.....14
	II.II El sistema de AIE en Brassicaceae.....17
	II.III El sistema de AIG en Papaveraceae.....18
	II.IV El sistema de AIG en Solanaceae.....22
	II.V Modelos de inhibición alelo <i>S</i> específica del polen.....25
III.	Genes modificadores y la respuesta de autoincompatibilidad.....31
	III.I Los genes modificadores y el sistema de AI en <i>Brassica</i>32
	III.II Los genes modificadores en las Solanáceas.....36
	III.III Población recombinante 11613 de <i>Nicotiana alata</i>41
Capítulo II	Clonación de genes modificadores en <i>Nicotiana alata</i>45
	Materiales y Métodos.....47
	Resultados.....55
	Discusión.....61

Capítulo III	Análisis segregacional y caracterización molecular de <i>NaPEP IIB</i> en <i>Nicotiana</i>	65
	Materiales y Métodos.....	66
	Resultados.....	74
	Discusión.....	92
Capítulo IV	Caracterización espacio-temporal de los genes <i>NaStEP</i> y <i>NaSoEP</i> en algunas especies del género <i>Nicotiana</i>	97
	Materiales y Métodos.....	98
	Resultados.....	106
	Discusión.....	132
Capítulo V	Obtención de plantas transgénicas de <i>N. alata</i> que suprimen los niveles de <i>NaStEP</i> y <i>NaPEPII</i>	138
	Materiales y Métodos.....	139
	Resultados.....	145
	Discusión.....	157
Capítulo VI	Discusión general y Conclusiones.....	160
	Referencias.....	165
	Apéndices.....	181
	Publicación.....	191

Resumen

El éxito reproductivo en las angiospermas se debe en gran parte a la evolución de varios mecanismos que limitan y previenen la autofecundación. Uno de ellos es la autoincompatibilidad (AI), la cual permite al pistilo reconocer y rechazar el polen propio o aquel genéticamente muy cercano. En muchas especies la AI está controlada por un solo locus multialélico (locus *S*), que en el caso de las Solanáceas codifica para una S-RNasa que se expresa en la parte estilar y para la proteína SLF, que se expresa en el grano de polen. Aunque se sabe que la especificidad del rechazo del polen depende de la interacción específica del haplotipo, entre la S-RNasa y SLF, también se requiere de los productos de otros genes (genes modificadores) no codificados en el locus *S*, los cuales se expresan tanto en el polen como en el pistilo.

En *Nicotiana glauca*, se han identificado hasta la fecha solo dos genes modificadores que se requieren específicamente para la reacción de rechazo del polen (*HT-B* y *120K*). Sin embargo, evidencia genética proveniente del análisis de una población recombinante sugieren la presencia de genes modificadores desconocidos.

El objetivo principal de este trabajo consistió en la identificación de genes modificadores requeridos en el rechazo del polen en *N. glauca*. Para ello, se construyeron y analizaron por sustracción bibliotecas de cDNA de estilos y estigmas maduros de *N. glauca* autocompatibles (AC) y AI. Los análisis realizados permitieron la identificación y caracterización de genes potencialmente importantes para la interacción polen-pistilo, los cuales en un inicio se catalogaron como *NaPEP I* y *NaPEP II* (*N. glauca* Pistil Expressed Protein).

NaPEP II define una familia de tres miembros o clases diferentes: *NaPEP IIA*, *NaPEP IIB* y *NaPEP IIC*. Las proteínas de las tres clases contienen una región rica en asparagina hacia el extremo carboxilo y muestran semejanza con inhibidores de metilesterasas de pectina. *NaPEP II* se expresa solamente en los estilos y estigmas maduros de especies AC y AI y su expresión se incrementa durante la maduración del pistilo. Dado que comparte características de solubilidad con proteínas que se secretan a la matriz extracelular del estilo, *NaPEP II* podría secretarse a la matriz extracelular del tejido de transmisión. Como los tubos polínicos se elongan en esta matriz secretora en su camino hacia el ovario, los

factores secretados pueden ser necesarios para las interacciones polen-pistilo. La similitud de NaPEP II con inhibidores de metilesterasas de pectina sugiere que esta proteína podría interferir con la adhesión de los tubos polínicos incompatibles a las paredes estilares durante su crecimiento por el pistilo de *N. alata*.

El grupo NaPEP I incluye a los genes *NaStEP* (*N. alata* Stigma Expressed Protein) y a *NaSoEP* (*N. alata* Sexual organ Expressed Protein), los cuales son genes expresados en órganos reproductivos. Las proteínas predichas por estos genes presentan una señal de localización vacuolar (NPIVL) que podría determinar su localización final. Tanto NaSoEP como NaStEP muestran similitud con inhibidores de proteasas tipo Kunitz. La expresión de *NaSoEP* en etapas tempranas del desarrollo del estigma y de la antera sugiere que podría participar en los eventos de desarrollo del pistilo y de la antera. *NaStEP* se expresa exclusivamente en los estigmas maduros de las especies AI del género *Nicotiana* analizadas. A pesar de su homología con inhibidores de proteasas tipo Kunitz, NaStEP no parece ser un inhibidor funcional de proteasas de serina. Los estudios inmunocitoquímicos indican que NaStEP se almacena en las vacuolas de las células estigmáticas. No obstante, cuando los estigmas se polinizan con el polen propio y con aquel proveniente de *N. tabacum*, *N. alata* y *N. plumbaginifolia*, NaStEP se detecta en el exudado estigmático. La síntesis y presencia de esta proteína en el exudado se induce fuertemente después de polinizaciones incompatibles con polen de *N. tabacum*. El incremento de la síntesis de NaStEP con las polinizaciones, su presencia en especies AI y en el exudado de las células papilares sugiere que podría estar involucrada en interacciones tempranas polen-estigma que regulen el crecimiento del tubo polínico.

Abstract

After landing on a wet stigma, pollen grains hydrate and germination generally occurs. However, there is no certainty of the pollen tube growth through the style to reach the ovary. The pistil is a gatekeeper that evolved in many species to recognize and reject the self-pollen, avoiding endogamy and encouraging cross-pollination. Recognition is a complex process, and specific factors are needed. Here, we report the characterization of two families of pistil expressed proteins (NaPEP I and PEP II) that could be involved in pollen-pistil interactions. Stigma/style cDNA libraries were constructed and differentially screened, resulting in the isolation of cDNA clones corresponding to genes preferentially or specifically expressed in the mature self-incompatible pistil of *Nicotiana alata*. PEP II is a family of three distinct classes which are identified as NaPEP II class A, B and C. Class A, B and C clones were recovered from the libraries 25-, 12- and 6- fold respectively. NaPEP IIB was the only member in the family recovered from the SI library. The proteins encoded by all three classes contain a small asparagine rich region toward the N terminal end. NaPEP II was only expressed in mature styles and stigmas and the amount of its expression increased at the maturity stage of the styles. NaPEP II mRNAs were detected in both self-compatible and self-incompatible species. Results from immunodetection showed that NaPEP II proteins were secreted to the extracellular matrix of the style in a soluble form or cross-linked to the extracellular matrix of the transmitting tissue. Pollen tubes elongate in this secretory matrix on their way to the ovary, then, the stilar factors secreted to this matrix may be necessary for pollen-pistil interactions. We recovered nine clones of NaPEP I from the libraries. Eight clones were identical and named NaStEP (*N. alata* Stigma Expressed Protein) and the other one was slightly different (NaSoEP, *N. alata* Sexual Organs Expressed Protein). NaStEP and NaSoEP are homologous to Kunitz-type proteinase inhibitors. Activity gel assays showed that NaStEP is not a functional trypsin proteinase inhibitor.

NaSoEP is expressed in both male and female reproductive tissues at early stages of development of both organs. NaStEP transcript as NaSoEP is specifically expressed in sexual organs but only in female tissues. RNA blot, immunohistochemical and protein blot analyses revealed that NaStEP is detectable in stigmas of self-incompatible (SI) species *N.*

alata, *N. forgetiana*, and *N. bonariensis*, but not in self-compatible (SC) species *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *N. benthamiana*, *N. longiflora*, and *N. glauca*.

NaStEP contains the vacuolar targeting sequence NPVIL, and immunocytochemistry experiments showed vacuolar localization in unpollinated stigmas. When stigmas were pollinated with either self-pollen or those coming from *N. tabacum* or *N. plumbaginifolia*, NaStEP was also found in the stigmatic exudate. The synthesis and presence in the stigmatic exudate of this protein was strongly induced in *N. alata* following incompatible pollination with *N. tabacum* pollen. The transfer of NaStEP to the stigmatic exudate was accompanied by perforation of the stigmatic cell wall, which appeared to release the vacuolar contents to the apoplastic space. The increase in NaStEP synthesis after pollination and its presence in the stigmatic exudates suggest that this protein may play a role in the early pollen–stigma interactions that regulate pollen tube growth in *Nicotiana*.

Abreviaturas

<i>β-expansina</i> :	Gen de la β-expansina
[Ca ²⁺] _i :	Concentración intracelular de Ca ²⁺
aa:	Aminoácidos
ABP:	Proteína de unión a actina
AC:	Autocompatible o autocompatibilidad
AI:	Autoincompatible o autoincompatibilidad
AIE:	Autoincompatibilidad esporofítica
AIG:	Autoincompatibilidad gametofítica
ARC1:	Segmento 1 que contiene la repetición Armadillo
BSA:	Albúmina sérica bovina
cDNA [³² P]:	cDNA marcado radiactivamente con ³² P
cDNA:	DNA complementario
cDNA-AFLP:	Amplificación de fragmentos polimórficos usando como templado cDNA
CDPK:	Proteínas cinasas dependientes de Ca ²⁺
cyt c:	Citocromo c
DNA:	Ácido desoxiribonucleico
gDNA:	DNA genómico
<i>HT-B</i> :	Gen HT-B
<i>HT-N</i> :	Semejante a HT-B pero sin la región rica en asparagina
IM:	Matriz intercelular
IU:	Incompatibilidad unilateral
LB:	Luria Broth
LePRK:	Cinasa de proteína tipo receptor de <i>Lycopersicon esculentum</i>
LeSTIG:	Proteína estigma específica STIG1 de <i>Lycopersicum esculentum</i>
LTP:	Proteína de transferencia de lípidos
MEC:	Matriz extracelular
MET:	Microscopía electrónica de transmisión
mRNA:	RNA mensajero
NaPEP II:	Proteína II expresada en el pistilo de <i>N. alata</i>
Na-PI:	Inhibidor de proteasas del <i>N. alata</i>
NaSoEP:	Proteína expresada en los órganos sexuales de <i>N. alata</i>
NaStEP:	Proteína expresada en el estigma de <i>N. alata</i>
NaTTS:	Proteínas específicas del tejido de transmisión del estilo de <i>N. alata</i>
NgPI:	Inhibidor de proteinasa de <i>Nicotiana glutinosa</i>
p56-MAPK:	Proteína de cinasas activada por mitógenos
PCD:	Muerte celular programada
PELP III:	Proteínas clase III específicas del pistilo semejantes a extensinas
PrABP80:	Gelsolina
Pr-p26 a/b:	Pirofosfatasa p26
RNA poli A+:	RNA mensajero
RNA:	Ácido ribonucleico

RNA _T :	RNA total (mensajero, ribosomal, transferencia)
rRNA:	RNA ribosomal
RT:	Temperatura ambiente
SBP:	Proteína de unión a proteínas S
SCA:	Proteína estilar-estigmática adhesina, rica en cisteína
SCF:	Skp1-Culina-caja-F
SCR:	Proteína rica en cisteínas del locus <i>S</i>
SLF/SBP:	Locus <i>S</i> con caja F
SLG:	Glicoproteína del locus <i>S</i>
SOC:	Medio LB suplementado con glucosa
SP11:	Proteína 11 del locus <i>S</i> (sinónimo SCR)
SRK:	Receptor de cinasa del locus <i>S</i>
SRK:	Receptor de cinasas del locus <i>S</i>
S-RNasa:	Ribonucleasas del locus <i>S</i>
THL:	Proteína semejante a tioredoxina h
TT:	Tejido de transmisión
NTPP:	Propéptido amino terminal
CTPP:	Propéptido carboxilo terminal
RNAi:	RNA de interferencia
GUS:	β-glucuronidasa
tnos:	Terminador de la nopalina sintetasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
tOCS:	Terminador de la octopina sintetasa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
CaMV 35S:	Promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor
PME:	Metilesterasas de pectina
PMEI:	Inhibidores de metilesterasas de pectina
IEF:	Isoelectroenfoque
GST:	Glutación S transferasa
<i>npt II</i> :	Gen de la neomicina fosfotransferasa

CAPÍTULO I

Introducción general

Introducción

El establecimiento exitoso de las angiospermas sobre la tierra está en parte determinado por la anatomía de sus flores. Debido a que las plantas no pueden moverse en busca de una pareja para el apareamiento, han desarrollado una amplia variedad de flores que proveen diferentes mecanismos para la liberación, transferencia y deposición del polen desde el órgano sexual masculino (la antera) hasta el femenino (pistilo). Los eventos principales que controlan la polinización en las plantas durante las interacciones polen-pistilo son el reconocimiento y la aceptación del gametofito masculino (polen) por el pistilo. Aunque muchos tipos de pólenes pueden aterrizar sobre la superficie estigmática, solo el polen de la misma o de especies estrechamente relacionadas será aceptado. Una vez en el estigma, el polen germina y los tubos polínicos crecen a través de la matriz extracelular (ME) del tejido de transmisión (TT) del estilo hacia el ovario.

Los órganos reproductivos femenino y masculino en una flor bisexual se encuentran muy próximos. La cercanía entre los órganos sexuales favorece que el polen llegue al estigma de la misma flor que lo produjo provocando que la variabilidad genética de la especie se reduzca, en caso de que la autopolinización fuese exitosa. Es por ello que las plantas con flores han desarrollado varios mecanismos genéticos para reducir la frecuencia de la autofecundación.

Uno de los primeros eventos durante el reconocimiento del polen se encuentra determinado por la capacidad que tiene la planta receptora a nivel del pistilo, para reconocer y discriminar su propio polen de aquel que debe germinar, elongarse y descargar sus núcleos espermáticos al saco embrionario para que se lleve a cabo la fecundación. Son muchas las especies que tienen control sobre el tipo de polen que llega a su estigma y son capaces de excluir el polen no deseado.

El mecanismo más usado por las plantas con flores para evitar la endogamia y promover la generación y mantenimiento de la diversidad genética entre las especies y con ello el potencial para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales es la autoincompatibilidad (AI). Este proceso se encuentra controlado genéticamente y resulta en el reconocimiento y rechazo del polen propio o del polen genéticamente relacionado (de Nettancourt, 1977, 1997, 2001).

Los sistemas de AI se encuentran ampliamente distribuidos en las angiospermas y se han descrito en 91 de 271 familias.

Una característica exclusiva de los sistemas de AI en plantas es que se basan en el reconocimiento de lo propio, a diferencia de lo que sucede en el resto de los sistemas conocidos, donde lo reconocido es lo no propio (Nasrallah, 2002).

I. INTERACCIONES POLEN-ESTIGMA

I.1 La superficie estigmática y el grano de polen

Hacia la madurez de la flor, cuando ocurre la polinización, el pistilo está totalmente desarrollado y está compuesto por estilo, estigma y ovario. El estigma de las angiospermas está considerado como una estructura glandular cuya secreción es importante en la interacción polen-estigma (Williams *et al.*, 1981; Linskens, 1981). Esta estructura tiene una superficie receptora de polen y varias capas de células secretoras. Los estigmas de muchas plantas con flores se clasifican de acuerdo a su morfología (Heslop-Harrison and Shivanna, 1977). En las familias que tienen un estigma seco existe una película cubriendo la superficie papilar (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1980). En plantas con estigmas húmedos, en el estado de receptividad, la superficie está cubierta con una secreción pegajosa (Dumas *et al.*, 1978; Cresti, 1982) formada por muchos compuestos de naturaleza química diversa como proteínas, lípidos y azúcares (Knox, 1984). Estos mismos compuestos están presentes en plantas con estigmas secos. La fracción lipídica correspondiente a los exudados secretados por especies con estigmas húmedos son esenciales y suficientes para el crecimiento direccional del tubo polínico (Wolters-Arts *et al.*, 1998).

La receptividad del estigma para el polen puede persistir desde una hora hasta varios días en diferentes especies (Heslop-Harrison, 2000) y es influenciada por varios factores. La receptividad se define como la capacidad para capturar el polen a través de la adhesión, permitir su hidratación y consecuentemente, la germinación del tubo polínico. El estado adecuado del desarrollo del estigma es crucial para la receptividad. Por ejemplo, en estigmas inmaduros de flores de pera, el polen maduro puede adherirse pero no se hidrata ni germina. En estigmas

degenerados, el polen puede adherirse, hidratarse y germinar pero el crecimiento del tubo polínico se detiene abruptamente (Sanzol *et al.*, 2003).

Sobre la mayoría de los estigmas se deposita por encima de la epidermis una cutícula de grosor variado. En caso de ser muy gruesa, la cutícula puede impedir la germinación del polen compatible que se deposite sobre ésta (Heslop-Harrison, 2000). En el estado receptivo, la cutícula se puede romper en algunos sitios ayudada 1) por los insectos visitantes o 2) por el incremento de la turgencia del estigma y por la actividad de algunas enzimas tales como las esterases las cuales se incrementan en este estado, en los estigmas de diferentes especies (Dafni and Maues, 1998). Por ejemplo, el polen de *Brassica napus* contiene cutinasas que rompen la cutícula de la papila (Hiscock *et al.*, 1994; Edlund *et al.*, 2004).

La epidermis del estigma se diferencia para formar las células especializadas papilares. La adhesión del polen sobre los estigmas húmedos es facilitada por la presencia del exudado, el cual puede ser acuoso como en la azucena (*Lilium longiflorum* Thunb.) o lipídico como en tabaco (*N. tabacum*) y petunia.

En tabaco y en otras especies de solanáceas, el exudado lipídico se produce en las células de la zona secretora del estigma y es secretado hacia la etapa de madurez del pistilo. Por debajo del exudado, una capa fina de agua (en forma de cristales) rodea a las células de la zona secretora. En tabaco, si la zona secretora del estigma es eliminada, las interacciones polen-pistilo no ocurren resultando en esterilidad femenina (Goldman *et al.*, 1994).

I.II La superficie estigmática y el crecimiento del tubo polínico

Una vez que el polen, transportado por factores bióticos o abióticos, se deposita en el estigma, se hidrata y germina comenzando así el crecimiento del tubo polínico. Este tubo penetra el tejido especializado del estilo y crece para alcanzar los óvulos en el ovario. La mayoría de las dicotiledóneas como las especies de Solanáceas, tienen un estilo sólido en el cual los tubos polínicos crecen a través de su tejido de transmisión. Las células de éste están conectadas transversalmente por plasmodesmos, mientras que sus paredes longitudinales están separadas por matriz intercelular (IM) secretada por ellas mismas.

En *N. tabacum* y en las especies con estigmas húmedos y estilos sólidos, los tubos polínicos crecen dentro del exudado producido por las células de la zona secretora a través de los espacios entre éstas. El crecimiento del tubo polínico puede ser favorecido por proteínas que hacen más laxa la pared celular de las células del pistilo. En especies de pasto, especies que poseen un estigma seco y el polen que producen se caracteriza por tener una cubierta (necesaria para la polinización) compuesta de lípidos y proteínas que rodean la exina (Dickinson *et al.*, 1993), se ha propuesto que las β -expansinas aisladas del polen pueden estar implicadas en el ablandamiento de la pared celular de los tejidos femeninos (Crosgrave *et al.*, 1997).

En plantas con estigmas húmedos, el exudado estigmático tiene una función análoga a la cubierta del polen en plantas con estigmas secos (Sánchez *et al.*, 2004). En el exudado de *N. tabacum*, se detecta actividad de ablandamiento de la pared celular, pero ésta no está mediada por homólogos a β -expansinas, PPAL (proteínas del pistilo semejantes a alérgenos del polen) [Pezzotti *et al.*, 2002; Nieuwland *et al.*, 2005], sino por la proteína de transferencia de lípidos, LTP (Nieuwland *et al.*, 2005). No obstante, el crecimiento del tubo polínico en esta especie no requiere de la actividad de ablandamiento de la pared de las proteínas presentes en el exudado (Nieuwland *et al.*, 2005). En *Lilium longiflorum* a diferencia de *N. tabacum*, la proteína semejante a LTP denominada SCA (proteína estilar-estigmática adhesina, rica en cisteína) induce quimotropismo sosteniendo y guiando el crecimiento *in vitro* de los tubos polínicos (Park *et al.*, 2000b; Park and Lord, 2003). Otra función atribuida a las LTPs no específicas y a otras proteínas secretadas en el exudado ha sido la de defensa contra patógenos (García-Olmedo *et al.*, 1995). Se ha demostrado que inhibidores de proteasas (Miller *et al.*, 2000), proteínas semejantes a taumatinas y otras proteínas relacionada a la defensa (Kuboyama, 1998) se expresan y acumulan en los estigmas de especies de Solanáceas, posiblemente para evitar el ataque de depredadores o patógenos. Los lípidos se requieren tanto en las solanáceas como en las Crucíferáceas para la hidratación del polen y la penetración del tubo polínico al estilo. Se sugiere que proteínas como las expansinas (que se acumulan en el exudado de especies con estigmas húmedos) ayudan al crecimiento del tubo polínico en ambas familias.

Los tejidos del pistilo proveen soporte químico, físico y guía direccional (orientación) para el proceso de crecimiento del tubo polínico (Lord and Sanders, 1992). La ME está enriquecida en materiales secretorios tales como lípidos, carbohidratos, aminoácidos libres, glicoproteínas y

polisacáridos (Cresti *et al.*, 1986). Éstas moléculas se cree que sirven de reconocimiento, nutrientes, adhesivos y atrayentes para la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico (Clarke *et al.*, 1979; Gleson and Clarke, 1979; Gell *et al.*, 1986; Herrero and Dickinson, 1979; Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995). En los pistilos de *Nicotiana alata* se caracterizaron componentes de la ME del TT. Dentro de ellos se incluye la 1,3- β -glucanasa (Mau, 1990) y proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) (Sommer-Knudsen *et al.*, 1996; Lind *et al.*, 1994). El término genérico HRGPS se usa para abarcar todas las moléculas ricas en hidroxiprolinas (extensinas, arabinogalactanos y glicoproteínas ricas en prolina/hidroxiprolina) (generalmente $\geq 5\%$) (Sommer-Knudsen *et al.*, 1997).

II. DETERMINANTES DE LOS SISTEMAS DE AUTOINCOMPATIBILIDAD

II.I Genética del sistema de autoincompatibilidad

En muchos casos la incompatibilidad está controlada por un solo locus multialélico, conocido como el locus *S*, el cual determina la especificidad del reconocimiento o rechazo del polen. Esto implica que los productos del locus *S* expresados en el polen y en el pistilo interactúan para determinar si un polen dado es autocompatible (AC) o autoincompatible (AI). El número de alelos *S* presentes en una población puede ser muy grande y variar de especie a especie. Por ejemplo, se conoce que en algunas especies de *Brassica* existen más de 60 alelos, en *Papaver* de 60 a 80 y en *Trifolium* de 150 a 250 (Dickinson, 1990).

La AI se clasifica en dos tipos: homomórfica y heteromórfica. En el tipo homomórfico las flores de la misma especie tienen el mismo tipo morfológico mientras que en el tipo heteromórfico, las flores presentan dos o tres diferentes tipos morfológicos. En la AI heteromórfica, la polinización es compatible solamente entre flores con diferentes tipos morfológicos (de Nettancourt, 1977). El tipo homomórfico ha sido clasificado en gametofítico y esporofítico, en dependencia del genotipo que determine el comportamiento del polen en la reacción de AI: gametofítico si está determinado por el genotipo del polen (determinado por su propio genoma haploide) y esporofítico si está determinado por el genotipo de la planta de la cual provenga el polen (determinado por el genoma diploide de la planta). El tipo gametofítico es más común (presente

en más de 60 familias de plantas con flores) que el esporofítico (encontrado en 6 familias). Los dos tipos aparentemente evolucionaron de forma independiente. El sistema de AI gametofítico (AIG) es característico de especies con polen bicelular y estigmas húmedos, mientras que el sistema de AI esporofítico (AIE), de especies con polen tricelular y estigmas secos (Sims *et al.*, 1993). Hasta la fecha solamente han sido estudiadas a nivel molecular cinco familias con AIG (Papaveraceae, Poaceae, Rosaceae, Plantaginaceae [antiguamente Scrophulariaceae] y Solanaceae) y una sola familia con AIE (Brassicaceae) [Frankling, *et al.*, 1996]. No obstante ya han sido iniciados estudios en los sistemas de AIE en las familias Convolvulaceae, Asteraceae y Betulaceae (Hiscock and McInnis, 2003).

En el sistema de AIG los productos del alelo S son expresados por el gametofito (grano de polen) una vez que ha finalizado la meiosis de las células madre del polen. En este sistema, el rechazo del polen se presenta cuando el alelo S que porta el polen es igual a uno de los dos alelos S presentes en el pistilo diploide de la planta receptora, provocando que el crecimiento del tubo polínico se detenga generalmente en el estilo. A menudo, la punta del tubo polínico se engrosa y se rompe, siendo así incapaz de liberar sus células espermáticas en el ovario para la fecundación. Por ejemplo, una planta diploide con el genotipo S_1S_2 , producirá granos de polen con los alelos S_1 o S_2 mientras que el genotipo del pistilo diploide será S_1S_2 . Cuando los granos de polen con el alelo S_1 o S_2 lleguen al estigma, éstos podrán germinar pero el crecimiento del tubo polínico será inhibido a nivel del estilo. Sin embargo, si el polen lleva un alelo S diferente a los que porta el pistilo diploide (S_3 o S_4), el polen será aceptado y el tubo polínico alcanzará el saco embrionario para fecundar a la ovocélula (Figura 1A).

En el sistema de AIE los factores involucrados en la respuesta del rechazo del polen son de origen femenino, es decir, son sintetizados en los tejidos maternos de la pared de la antera como el *tapetum* antes de que finalice la meiosis de las células madres del polen (Raghavan, 1997) y secretados a la cubierta del grano de polen. Al igual que los sistemas de AIG, el rechazo del polen se presenta cuando coinciden los alelos S portados por el polen con uno de los dos alelos S presentes en el pistilo diploide de la planta receptora. La respuesta de AI se lleva a cabo por la inhibición de la germinación del grano de polen a nivel de la superficie del estigma o si éste germina, no hay penetración en la cutícula del estigma (Figura 1B).

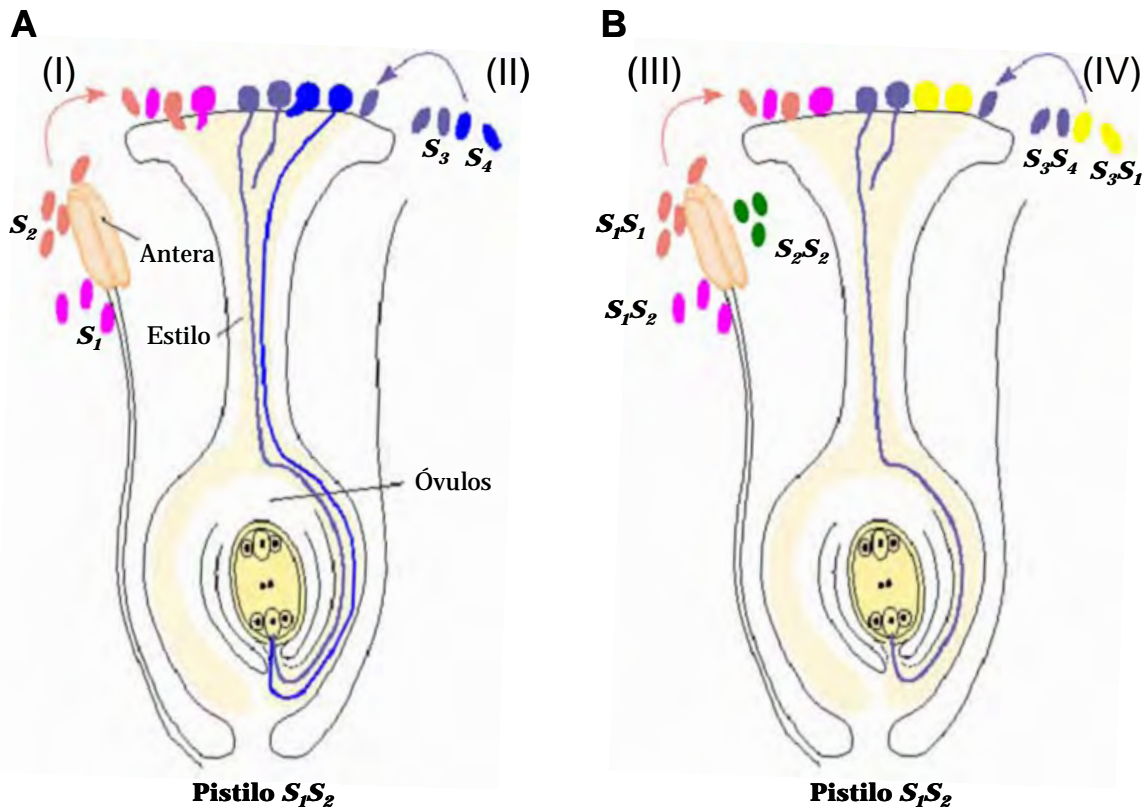


Figura 1. Mecanismo de acción de los sistemas de AIG (A) y AIE (B). Las plantas representadas llevan dos alelos S : S_1 y S_2 , por lo que tienen un genotipo S_1S_2 . (A) Si el sistema está gametofíticamente determinado (como en *Papaver* y *Nicotiana*), el polen haploide producido por esta flor llevará los alelos S_1 o S_2 y por tanto su fenotipo será S_1 o S_2 . I) Un escenario incompatible (morado y naranja). Si el polen de las plantas S_1S_2 aterriza sobre el estigma de la misma flor que lo produjo, o sobre otra planta que porte los mismos alelos S (S_1 o S_2), la cruce será incompatible. El polen incompatible es inhibido normalmente a nivel del primer tercio del estilo, excepto en *Papaver* donde la respuesta de rechazo del polen se desarrolla en el estigma. II) Una situación compatible (azul claro y oscuro). El polen proveniente de plantas con alelos S diferentes (S_3 o S_4) que aterricen sobre el estigma de la planta S_1S_2 no serán reconocidas ya que los alelos S no coinciden. El polen puede entonces hidratarse, germinar y crecer sobre el estigma y el estilo, y fertilizar a los óvulos para formar las semillas. (B) Si el sistema de AI está determinado esporofíticamente (como en *Brassica*), el polen proveniente de esta planta tendrá el fenotipo S_1S_2 , S_1S_1 y S_2S_2 . III) Escenario incompatible (morado y naranja). Semejante a lo que ocurre para los sistemas de AIG. Si el polen de las plantas S_1S_2 se deposita sobre el estigma de la misma flor que lo produjo, o sobre otra planta que porte los mismos alelos S (S_1 o S_2), la cruce será incompatible. En este caso, el rechazo del polen incompatible ocurre rápidamente a nivel de la superficie estigmática. Como consecuencia, no se desarrollan semillas. IV) Situación compatible (azul). El polen proveniente de plantas con alelos S diferentes (S_3S_4) que aterricen sobre el estigma de la planta S_1S_2 no serán reconocidas ya que los alelos S no coinciden. El polen puede entonces hidratarse, germinar y crecer sobre el estigma y el estilo, y fertilizar a los óvulos para formar las semillas. En el caso de *Brassica* y en general para aquellas especies con sistemas de AIE, si sólo uno de los dos alelos S portados por el polen es diferente a los presentes en la planta receptora, el polen será rechazado (polen amarillo). El polen será aceptado sólo si sus dos alelos S son diferentes a los portados por el pistilo diploide de la planta receptora (polen azul). La figura ha sido modificada a partir de la publicada en Frankling-Tong (2002).

Estas diferencias de expresión en tiempo y espacio son una explicación de por qué las proteínas de reconocimiento en el sistema de AIE son de origen materno ($2n$), mientras que en el gametofítico son producidas por su genotipo haploide (Newbiggin *et al.*, 1993). La reacción de AI está determinada por los alelos S de la planta madre antes que por el polen mismo. Por ejemplo, una planta diploide con el genotipo S_1S_2 , producirá granos de polen con los alelos S_1S_2 , S_1S_1 y S_2S_2 . Cuando los granos de polen con estos alelos lleguen al estigma de la misma flor que los produjo, no podrán germinar [Figura 1B, III]. No obstante, si el grano de polen proviene de otra planta y porta los alelos S_3S_4 , como se muestra en la Figura 1B, IV, el polen germinará y el tubo polínico alcanzará el saco embrionario (Newbiggin *et al.*, 1993).

El sistema de AIE presenta un control genético más estricto, ya que independientemente de que el polen porte un alelo S diferente al presente en el pistilo diploide de la planta receptora, basta con que el otro alelo portado por el mismo grano de polen coincida con uno de los alelos presentes en el estigma para que se lleve a cabo la reacción de rechazo del polen. Por ejemplo, si a una planta con el genotipo S_1S_2 llegan granos de polen con el fenotipo S_1S_3 , los granos serán rechazados [Figura 1B, IV], una situación que no se presentaría en los sistemas de AIG, donde la planta S_1S_2 aceptaría el polen que segrega con el alelo S_3 .

II.II El sistema de AIE en Brassicaceae

En *Brassicaceae*, el sistema de AI es esporofítico y el locus S es extremadamente complejo, abarca aproximadamente desde 80 a 100 kb y contiene hasta 17 genes (Watanabe *et al.*, 2000). Sin embargo, solo dos genes fuertemente ligados y altamente polimórficos se requieren para el reconocimiento alelo S específico del polen (Nasrallah, 2002). Hasta la fecha han sido identificados más de 30 haplotipos S en *B. rapa* y 50 en *B. oleracea* (Nou *et al.*, 1993; Ockendon, 2000). En esta familia, los tubos polínicos no se desarrollan correctamente sobre el estigma que expresa el mismo haplotipo S que el del polen parental.

El rechazo del polen propio resulta en la anulación de la hidratación del grano de polen o a una rápida detención del crecimiento del tubo polínico en la superficie estigmática.

Determinante femenina

En el caso de *Brassica*, el producto del locus *S* en el pistilo es conocido como SRK (receptor de cinasa del locus *S*) (Stein *et al.*, 1991). SRK es una proteína con un dominio extracelular denominado dominio-*S* (extendido en la pared celular), un dominio transmembranal y uno intracelular de cinasa de serina treonina. El dominio-*S* o dominio de receptor de SRK comparte un 98 % de identidad de secuencia nucleotídica con SLG (glicoproteína del locus *S*) (Watanabe *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 1991), otro gen codificado por el locus *S* que segrega con el fenotipo de AI. Tanto SRK como SLG se producen predominantemente en las células papilares del estigma, las cuales están en contacto directo con el polen (Nasrallah and Nasrallah, 1993; Nasrallah, 1997). Aunque ambas proteínas son codificadas por el locus *S*, solo la expresión del haplotipo *S*₂₈ de SRK y no de SLG en *B. rapa* permite la adquisición de la capacidad de rechazar el polen *S*₂₈ (Takasaki *et al.*, 2000). No obstante se ha reportado que en algunos haplotipos, SLG potencia la respuesta de AI.

Determinante masculina

En el polen, la especificidad de la AI está determinada por un gen que codifica para una proteína rica en cisteínas del locus *S* (SCR) (Schopfer *et al.*, 1999), también designado como SP11 (proteína 11 del locus *S*) (Shiba *et al.*, 2001; Takayama *et al.* 2001). El gen *SCR/SP11* codifica para una proteína de secreción básica de bajo peso molecular (6kDa) con ocho residuos de cisteína que forman cuatro puentes disulfuro (Schopfer *et al.*, 1999; Shiba *et al.*, 2001). Su expresión se detecta específicamente en las células del *tapetum* de la antera y en menor grado en las microsporas. La proteína SCR/SP11 se secreta desde las células tapetales hacia la superficie del polen, localizándose en la exina de éstos (Iwano *et al.*, 2003).

II.III Sistema de AIG en Papaveraceae

Papaver rhoeas es la especie más estudiada de este género y el control genético al que está sometida es gametofítico. El número total de haplotipos *S* estimados en esta especie es de 66 (Lane and Lawrence, 1993) y la reacción de rechazo del polen ocurre en la superficie estigmática del pistilo y no en el estilo (Franklin-Tong *et al.*, 1992). A diferencia de los sistemas de AIG

dependientes de S-RNasas, en esta familia no se requiere ningún componente pistilar adicional no ligado al locus *S* (McClure and Franklin-Tong, 2006).

Determinante femenina

Los productos del alelo *S* del pistilo en *Papaver rhoeas* son secretados por el estigma. Debido a que estas proteínas son pequeñas (aproximadamente 15 kDa) y no tienen ninguna homología con proteínas de función conocida (Foote *et al.*, 1994), se denominaron proteínas S. Algunas de estas proteínas se encuentran modificadas por *N*-glicosilación (Franklin-Tong and Franklin, 2003; McCubbin and Kao, 2000). Las proteínas S son altamente polimórficas y comparten entre un 51.3 % y un 63.7 % de identidad de secuencia aminoacídica. Tienen cuatro residuos de cisteínas conservados y una estructura secundaria formada por seis hojas β y dos hélices α conectadas por siete asas hidrofílicas (Takayama and Isogai, 2005). Se ha reportado que bajo condiciones *in vitro*, proteínas S recombinantes producidas en *E. coli* inhiben la germinación del polen de una manera alelo *S* específica, concluyéndose que las proteínas S son las únicas determinantes femeninas y por tanto las determinantes de la especificidad en esta especie (Foote *et al.*, 1994; Franklin *et al.*, 1995).

Determinante masculina

Aunque el gen de la determinante masculina en esta especie aún no se ha identificado, se propone que sea un receptor que tenga como ligando a la determinante femenina (McClure and Franklin-Tong, 2006) y que de alguna forma se encuentre asociado con canales que conduzcan Ca^{2+} (Takayama and Isogai, 2005). Los primeros estudios bioquímicos indicaron que SBP (proteína de unión a proteínas S) podría ser el candidato a receptor S. SBP es una proteína integral específica de la membrana plasmática del polen de 70-120 kD aproximadamente (diferencia debida a diferentes grados de glicosilación), encontrada en todos los genotipos *S* probados (Hearn *et al.*, 1996). Como esta proteína se une inespecíficamente a todos los haplotipos *S*, ha quedado descartado que pueda ser el producto del alelo *S* del polen. No obstante, se piensa que estas proteínas están involucradas en la vía de rechazo del polen en *Papaver rhoeas* ya que la actividad de unión a SBP se ve disminuida en proteínas S mutantes que reducen su capacidad de inhibir los tubos polínicos incompatibles (Jordan *et al.*, 1999). SBP

parece funcionar como un receptor accesorio facilitando la unión de las proteínas S a un receptor S específico (Silva and Göring, 2001).

Transducción de señales asociadas con la inhibición del polen incompatible

En este sistema, el reconocimiento alelo S específico, entre la proteína S estigmática y el receptor S específico del polen, activa una vía de señalización intracelular (Figura 2). Esta interacción causa un rápido incremento en el calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, y un influjo de Ca^{2+} extracelular en el tubo polínico que provoca 1) la disipación del gradiente apical de $[Ca^{2+}]_i$ y 2) la inhibición del crecimiento del tubo polínico en pocos minutos (McClure and Franklin-Tong, 2006). Los niveles altos y oscilantes de $[Ca^{2+}]_i$ en la zona apical son típicos de células con crecimiento apical como los tubos polínicos y las neuronas, aunque su significado biológico no está claro. Es por ésto que la pérdida del gradiente oscilante de la $[Ca^{2+}]_i$ es la responsable en parte de la inhibición inicial del crecimiento del tubo polínico (Takayama and Isogai, 2005). La señal de AI traducida mediante cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ dispara varios eventos entre los que se encuentra la despolimerización del citoesqueleto de actina. La actina se despolimeriza probablemente a través de la acción cooperativa de varias proteínas de unión a actina (ABPs) reguladas por Ca^{2+} (profilina y gelsolina). La profilina parece estar involucrada en la vía de regulación del crecimiento del tubo polínico, al regular el ensamblaje entre proteínas del citoesqueleto con cinasas de proteínas o con proteínas con actividad de fosfatasa (Clarke *et al.*, 1998). Se piensa que la gelsolina (PrABP80) actúa sinérgicamente con la profilina para mediar la despolimerización de la actina F dependiente de Ca^{2+} (Huang *et al.*, 2004). Al parecer, el mecanismo fundamental utilizado por *Papaver* para inhibir los tubos polínicos incompatibles es la alteración de la actividad de las ABPs. Esto directamente afectaría el transporte del material hacia y desde la punta del tubo polínico y por tanto repercutiría en su crecimiento.

Otro de los eventos tempranos durante la reacción de AI y provocado por el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ es la activación de una proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} (CDPK) y la fosforilación de p26, proteína que comparte similaridad con pirofosfatasa inorgánicas solubles (Rudd *et al.*, 1996). p26 comprende dos proteínas, Pr-p26a y Pr-p26b (Graaf *et al.*, 2006). La fosforilación reduce la actividad de las pirofosfatasa Pr-p26a/b (McClure and Franklin-Tong, 2006; Franklin-Tong and Franklin, 2003; Rudd and Franklin-Tong, 2003).

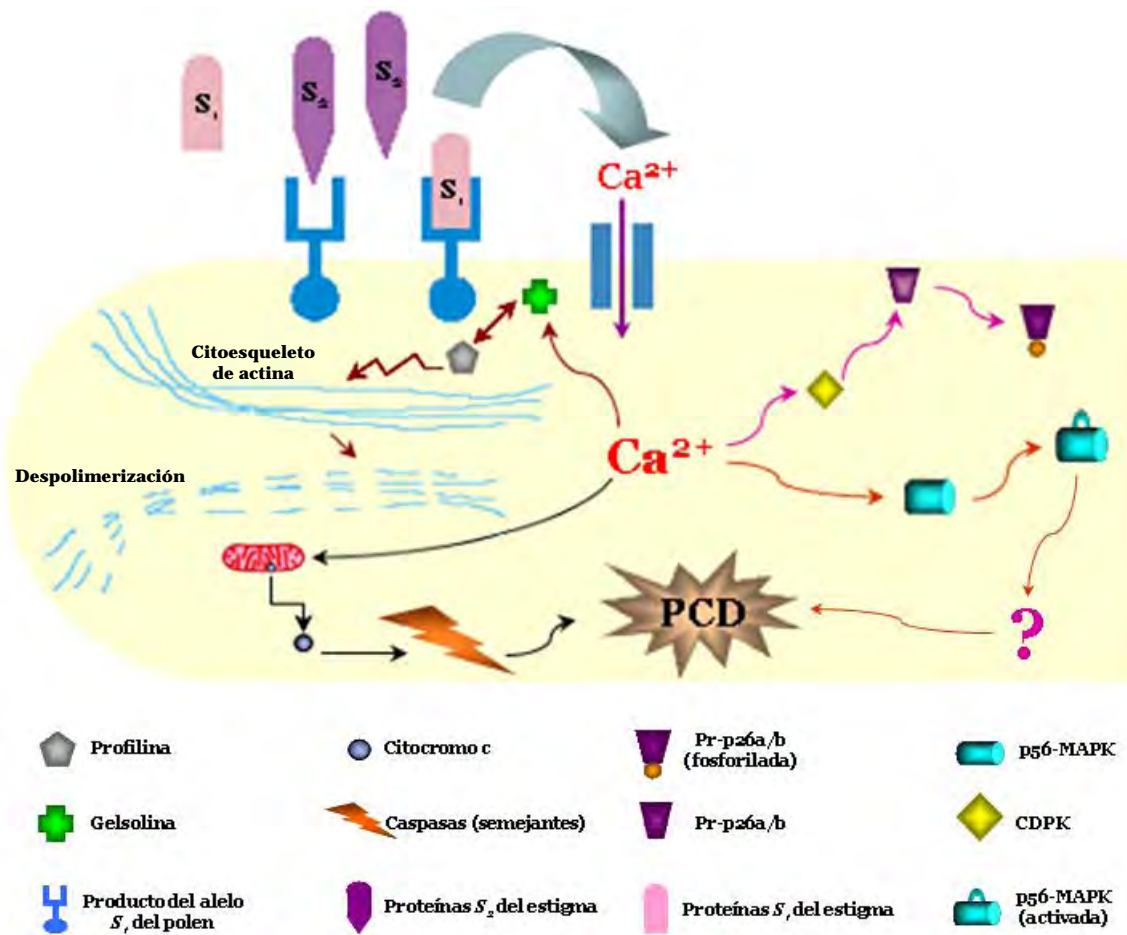


Figura 2. Modelo propuesto para la inhibición del tubos polínicos incompatible en el sistema de AIG de *Papaver rhoeas*. La interacción específica entre las proteínas S y el producto del alelo S del polen dispara una cascada de señalización mediada por Ca²⁺ que conduce a un rápido incremento de las [Ca²⁺]_i y a la pérdida del gradiente apical de este catión. Dentro de los blancos de esta cascada se encuentran 1) las ABPs (profilina y gelsolina), cuya afectación conduce a la despolimerización del citoesqueleto de actina y 2) las pirofosfatasas Pr-p26a/b, cuya fosforilación mediante CDPK, causa una reducción de su actividad. Ambas vías (flechas cafés y moradas) conducen a una rápida detención del crecimiento apical del polen. Las vías restantes se encuentran relacionadas con la PCD (flechas naranjas y negras), de forma indirecta a través de la activación de p56-MAPK y mediante la despolarización de la membrana mitocondrial, liberación del citocromo c al citosol y activación de caspasas. Esto asegura que el tubo polínico incompatible no comience a crecer nuevamente. La figura fue adaptada a partir de la publicada por Franklin-Tong and Franklin (2003).

Las pirofosfatasa son proteínas que hidrolizan el pirofosfato inorgánico en una reacción exergónica que puede acoplarse a la generación de ATP y esta actividad es esencial para hacer termodinámicamente favorables una amplia gama de procesos biosintéticos (Kornberg, 1962). Es por esto que la actividad de Pr-p26a/b podría estar implicada en la síntesis de biopolímeros requerida para la extensión de la punta del tubo polínico, causando la inactivación de estas proteínas y la inhibición del crecimiento del tubo polínico (McClure and Franklin-Tong, 2006). Una vez que se detiene el crecimiento del tubo polínico, se incrementa la actividad de p56-MAPK, una cinasa de proteína activada por mitógeno (Rudd *et al.*, 2003). Esta proteína podría estar implicada en eventos que hagan irreversible la inhibición inicial del crecimiento del tubo polínico. Aunque no existen datos que indiquen los blancos de la cascada de señalización de p56-MAPK, una hipótesis es que esta proteína podría disparar la cascada de señales asociada con la muerte celular programada (PCD) (McClure and Franklin-Tong, 2006), evento con el que culmina la respuesta de AI en *Papaver rhoeas* (Thomas and Franklin-Tong, 2004). Los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ también inician la PCD. Ésta se encuentra acompañada de la despolarización de la membrana mitocondrial conduciendo a la liberación del citocromo c (cyt c) de la mitocondria al citosol. La liberación del cyt c activa a proteínas semejantes a caspasas que son proteasas que cuando se activan rompen numerosos sustratos dentro de los que se encuentran inhibidores endógenos de nucleasas. La eliminación de los inhibidores de nucleasas provoca fragmentación del DNA nuclear. Finalmente todos estos eventos conducen a la muerte del tubo polínico incompatible en *Papaver rhoeas* (Thomas and Franklin-Tong, 2004).

II.IV El sistema de AIG en las Solanáceas

En las familias Solanaceae (*Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum*), Rosaceae (*Prunus*) y Scrophulariaceae (*Antirrhinum*) los productos génicos del locus *S* en el estilo son proteínas con actividad de ribonucleasa, conocidas como S-RNasas (McClure *et al.*, 1989; McCubbin and Kao, 1996; Kao and Tsukamoto, 2004; de Nettancourt, 2001; McClure, 2004; McClure and Franklin-Tong, 2006).

Las S-RNasas, proteínas básicas del estilo, son glicoproteínas de alrededor de 30 kDa que se secretan hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, sitio por el cual crece y

se dirige el tubo polínico al ovario (Anderson *et al.*, 1986; Cornish *et al.*, 1987; McClure *et al.*, 1993; Broocthaerts *et al.*, 1995; Sassa *et al.*, 1996; Xue *et al.*, 1996). En este sitio, las S-RNasas acceden al citoplasma del tubo polínico donde causan degradación del RNA de los tubos polínicos incompatibles (McClure *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1991). Se piensa que esta actividad citotóxica afecta el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles interfiriendo con el programa de expresión genética del polen (McClure and Franklin-Tong, 2006). Cuando las S-RNasas pierden su actividad, no se observa degradación del RNA y las plantas no presentan el fenotipo de rechazo del polen (Huang *et al.*, 1994). Los resultados anteriores dan una fuerte evidencia de que las S-RNasas son las determinantes genéticas de rechazo del polen alelo *S* específico.

Características primarias de las S-RNasas

Hasta la fecha, más de 30 proteínas S de siete especies de solanáceas han sido reportadas. Todas las secuencias de cDNA predicen la presencia de un péptido señal, el cual está ausente en la proteína madura. Ésto es consistente con la localización de las S-RNasas en el espacio extracelular del tejido de transmisión del estilo (Cornish *et al.*, 1987). Las secuencias de las S-RNasas son inusualmente divergentes, con variaciones de identidad de secuencias aminoacídicas entre un 38 % y un 98 %. Sin embargo, esta identidad es la esperada para los productos del alelo *S* (Clark and Kao, 1991) ya que cada vez que un alelo surge en una población es favorecido sobre los alelos *S* existentes. La baja frecuencia de este alelo en la población asegura que haya una menor probabilidad de que el polen que lleve el nuevo alelo llegue a un estigma que porte su mismo alelo. La presión de selección sobre la diversidad de secuencias genera nuevos alelos *S*.

Las S-RNasas poseen dos regiones, designadas HVa y HVb, que exhiben un alto grado de diversidad de secuencias (Iorger *et al.*, 1991). Las dos regiones hipervariables son las más hidrofílicas de estas proteínas, incrementando la posibilidad de que éstas puedan estar involucradas en interacciones con los productos del alelo *S* del polen determinando así la especificidad alélica.

A pesar de toda la diversidad de secuencias de las S-RNasas, cinco regiones se encuentran altamente conservadas y se designan C1-C5 (Iorger *et al.*, 1991). Las regiones conservadas C1, C4

y C5 contienen la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos lo que hace pensar que están involucradas en la estructura principal de las S-RNasas. Las regiones conservadas C2 y C3 comparten un alto grado de similitud de secuencias con las correspondientes regiones de la RNasa T2 y de otras RNasas (McClure *et al.*, 1989; Green, 1994). Entre los aminoácidos conservados entre las S-RNasas y otras RNasas se encuentran dos histidinas, una en la región C3 y otra en la región C2. Para la RNasa T2, estas dos histidinas son requeridas para la actividad de ribonucleasa (Woodward *et al.*, 1989).

Todas las proteínas S estudiadas son glicoproteínas con *N*-glicanos asociados. El número de sitios potenciales de *N*-glicosilación varía de 1 a 5 (con la secuencia consenso asparagina-x-treonina/serina; siendo x cualquier aminoácido excepto prolina). Una sola proteína S no tiene el sitio de *N*-glicosilación próximo a la región C2 (Kao and McCubbin, 1996). Se ha demostrado que los glicanos no son requeridos para la función de las S-RNasas, por lo que la determinante de la especificidad para el alelo *S* está en la secuencia aminoacídica.

Características del alelo *S* del polen

En comparación con el pistilo, los productos del alelo *S* en el polen deben estar ligados a los genes *S* del pistilo, deben tener un grado similar de polimorfismo alélico, sus productos deben interactuar con las proteínas S y deben ser tan divergentes en secuencia como éstas para poder distinguir unas de otras (Kao and McCubbin, 1996). El producto del alelo *S* del polen en *Petunia*, *Prunus* y *Antirrhinum* es SLF/SBP (locus *S* con caja F). Los genes *SLF/SBP* pertenecen a una familia amplia de proteínas con caja F que a menudo funcionan como adaptadores que unen a proteínas específicas (sustratos) al complejo SCF (Skp1-Culina-caja-F) ligasa E3 de ubiquitina. Los sustratos poliubiquitinados son degradados por el proteasoma 26S. SLF/SFB tiene el motivo de caja F en su extremo amino y en las especies de *Prunus* hasta ahora estudiadas, presenta dos regiones hipervariables hacia el extremo carboxilo. De hecho, haplotipos de SLF/SFB que carecen de estas dos regiones son AC (Ushijima *et al.*, 2004).

II.V Modelo de inhibición alelo *S* específica del polen mediado por S-RNasas

Aunque no se sabe con certeza cuál es el mecanismo por el cual las S-RNasas inhiben el crecimiento de los tubos polínicos autoincompatibles, se han propuesto varios modelos para explicar las bases moleculares del rechazo del polen.

MODELOS INICIALES

Modelo del receptor

El hecho de que la actividad de RNasa de la S-RNasa sea esencial para el rechazo de los tubos polínicos propios (aquellos con el mismo haplotipo que el pistilo de la planta receptora) [Huang *et al.*, 1994] y que la degradación de los RNAs en los tubos polínicos este correlacionada con la polinización incompatible (McClure *et al.*, 1990), sugiere que las S-RNasas deben pasar a través de la membrana plasmática y de la pared celular de la célula de transmisión donde se sintetiza, dentro del tejido de transmisión del estilo y entrar al citoplasma de los tubos polínicos propios para ejercer su actividad citotóxica. Como las S-RNasas no afectan el crecimiento de los tubos polínicos no propios, un modelo inicial propuesto antes de la identificación del producto del alelo *S* del polen proponía que la toma de la S-RNasa era alelo *S* específica (Kao and McCubbin, 1996; Thompson and Kirch, 1992).

En el modelo del receptor se dice que el producto *S* del polen es un receptor de superficie localizado en la pared celular o membrana plasmática del tubo polínico. Este receptor es capaz de reconocer y translocar a las S-RNasas estilares específicas dentro del tubo polínico. Por ejemplo, si un tubo polínico S_1 está creciendo en un pistilo que porta los alelos S_1 y S_2 , solo la S_1 -RNasa entraría al tubo polínico S_1 donde degradaría al RNA del mismo y detendría así el crecimiento del tubo polínico. En cambio, la S_2 -RNasa, también producida por el pistilo S_1S_2 no sería reconocida por el receptor S_1 y no ganaría acceso al interior del tubo polínico. En el caso de que un grano de polen S_3 aterrice sobre un pistilo S_1S_2 , ni la S_1 -RNasa ni la S_2 -RNasa producidas por las células del tejido de transmisión del estilo entrarían al citoplasma del tubo polínico ya que no serían reconocidas por el receptor S_3 . El crecimiento del mismo no se detendría y la cruce sería compatible.

Modelo del inhibidor

Este modelo propone que el producto del alelo S del polen funciona como un inhibidor general de S-RNasas. Este inhibidor se encuentra localizado en el citoplasma del tubo polínico e interfiere con la actividad de ribonucleasa de todas las S-RNasas excepto con la de su RNasa alelo específica (Kao y McCubbin, 1996; Thompson y Kirch, 1992). De acuerdo con este modelo, las S-RNasas contienen dos dominios funcionales separados: un dominio de especificidad alélica S , que es único para cada S-RNasa y un dominio catalítico, que es común a todas las S-RNasas. De forma similar, los inhibidores de las RNasas producidos por los alelos S del polen también podrían tener dos dominios separados, un dominio de inhibidor de RNasa y un dominio de especificidad alélica S (Kao and Tsukamoto, 2004). La toma de las S-RNasas no es alelo S específica (Luu *et al.*, 2000) y por lo tanto todas las S-RNasas presentes en el pistilo diploide entran al citoplasma del tubo polínico. Una vez dentro, solamente la S-RNasa con el mismo haplotipo S estaría activa ya que el inhibidor S_1 inhibiría la actividad del resto de las S-RNasas. Por ejemplo, cuando un tubo polínico S_l está creciendo en un pistilo S_1 y S_2 , el producto del alelo S_l del polen interacciona de forma diferente con las S_1 y S_2 -RNasas. En el caso de la interacción específica del haplotipo (con la S_1 -RNasa), el dominio de especificidad alélica del producto del polen S_l interaccionaría con el dominio de especificidad alélica S de la S_1 -RNasa, en virtud de la complementariedad entre estos dos dominios y el dominio de actividad de RNasa no se afectaría en esta interacción. Sin embargo, en el caso de una interacción que no fuera propia el dominio de inhibidor de RNasa del producto del alelo S_l del polen interactuaría con el dominio catalítico de la S_2 -RNasa, en ausencia de la complementariedad entre sus dominios de especificidad alélica. Tal tipo de interacción inhibiría la actividad de la S_2 -RNasa. Este modelo se basa en asumir que la interacción entre los dominios de especificidad alélica del producto del alelo S del polen y la RNasa de igual naturaleza, es termodinámicamente más favorable que la interacción entre el dominio de inhibidor de RNasa del producto del alelo S del polen y el dominio catalítico de la S-RNasa genéricamente igual. Además, la unión a un dominio de las S-RNasa imposibilita la unión al otro dominio. Es por ésto que la unión del producto del alelo S del polen al dominio de especificidad alélica permite que la S-RNasa mantenga su forma activa (Kao and Tsukamoto, 2004). En el caso del tubo polínico S_3 , éste podría seguir creciendo ya que el inhibidor S_3 inhibiría a las únicas S-RNasas presentes (S_1 y S_2 -RNasas) [Figura 3A].

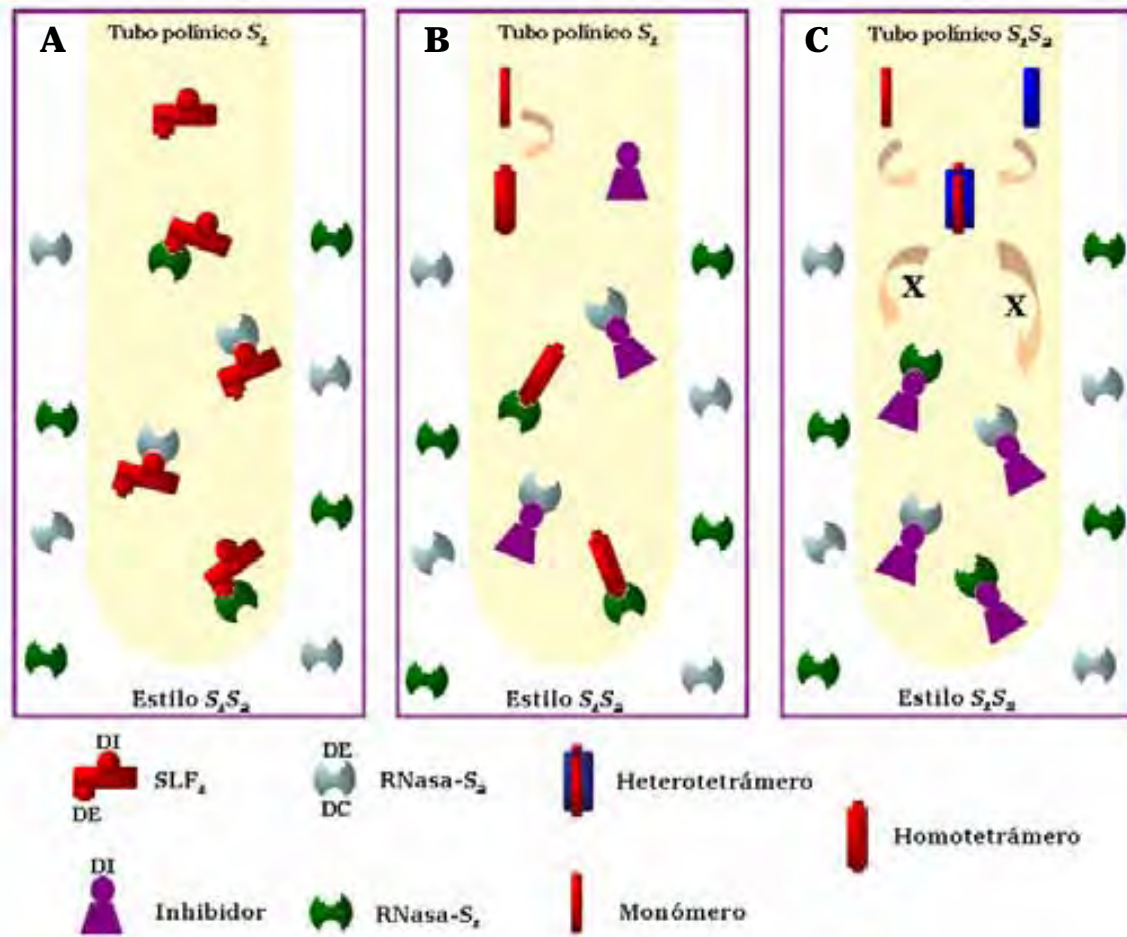


Figura 3. Modelos para la inhibición haplotipo *S* específica del crecimiento del tubo polínico y la interacción competitiva. (A) Modelo sencillo del inhibidor. Ambas *S*-RNasas, *S*₁- y *S*₂-, son tomadas por el tubo polínico *S*₁ pero solo la *S*₁-RNasa es capaz de degradar el RNA del polen porque el producto del alelo *S*₁ inhibe específicamente la actividad de RNasa de la *S*₂-RNasa. La unión de la *S*₁-RNasa a SLF1 a través de sus dominios complementarios de especificidad alélica (DE) bloquea la unión del dominio inhibidor (DI) de SLF1 al dominio catalítico (DC) de la *S*₁-RNasa. La interacción entre la *S*₂-RNasa y SLF1 es a través del DC de ésta y el DI de SLF1, conduciendo a la inactivación de la *S*₂-RNasa. (B) Modelo del inhibidor modificado. Este modelo difiere del modelo sencillo del inhibidor en varios aspectos: el producto del alelo *S* del polen es un homotetrámero que solo contiene el dominio de especificidad alélica y el responsable de la inhibición de la actividad de *S*-RNasas es un inhibidor general de RNasas. La inhibición haplotipo *S* específica de la actividad de RNasa se alcanza de una manera similar a la descrita para (A). SLF1 y la *S*₁-RNasa se unen a través de sus DE quedando activa esta *S*-RNasa y por tanto el crecimiento del tubo polínico *S*₁ se detendrá. (C) Interacción competitiva basada en el modelo modificado del inhibidor. Los productos del alelo *S*₁ y *S*₂ en el mismo grano de polen forman fundamentalmente heterotetrámeros, los cuales no pueden unirse al DE de las *S*₁-o *S*₂-RNasas. Como resultado, las actividades de RNasa de ambas *S*-RNasas son inhibidas por un inhibidor general de RNasa y los tubos polínicos crecerán hasta alcanzar el ovario. En estos modelos las proteínas pistilares adicionales que se requieren para la respuesta de AI no fueron descritas. La figura ha sido adaptada a partir de la publicada por Kao and Tsukamoto, 2004.

Modelo modificado del inhibidor

El modelo del inhibidor se propuso con el objetivo de explicar un fenómeno conocido como interacción competitiva, el cual se refiere a la ruptura de la función del polen en la AI causada por la presencia de dos loci-*S* de diferentes haplotipos en el polen. Esto ocurre cuando todo el locus *S* o una gran parte de él se duplica en plantas diploides que llevan dos haplotipos *S* diferentes o cuando plantas diploides AI (portando dos diferentes haplotipos *S*) se convierten en tetraploides (de Nettancourt, 2001). Entre los granos de polen producidos por estas mutantes compatibles en la parte del polen, solo aquellos que porten el alelo *S* residente de diferente haplotipo al del locus *S* extra fallarán en la respuesta de AI. Por ejemplo, si una planta S_1S_2 lleva un locus S_1 extra, los únicos granos de polen que no serán rechazados por el pistilo después de la polinización son los granos de polen S_2 que lleven duplicado el locus S_1 . El polen que porta dos alelos *S* se denomina polen heteroalélico (Luu *et al.*, 2001). El modelo del inhibidor predice que cuando dos diferentes alelos *S* del polen son expresados en el mismo grano de polen, sus productos juntos inhibirán la actividad de RNasa de todas las S-RNasas, provocando la ruptura de la AI (Kao and Tsukamoto, 2004).

El modelo del inhibidor fue propuesto para explicar el comportamiento de una S-RNasa quimérica con especificidad dual (Matton *et al.*, 1999). Este modelo (Luu *et al.*, 2001) predice que 1) la forma activa de los productos del alelo *S* del polen es un homotetrámero; 2) los productos del alelo *S* del polen tienen solo un dominio de especificidad para el alelo *S* y 3) es un inhibidor general de RNasa el responsable de la inhibición de las S-RNasas. De acuerdo a este modelo (Figura 3B), el inhibidor general se uniría e inactivaría a todas las S-RNasas, a menos que las S-RNasas estuvieran unidas a su correspondiente producto del alelo *S* del polen a través de sus dominios de especificidad para el alelo *S*. Cuando un grano de polen expresa dos alelos diferentes del gen *S* del polen, los productos formarían heterotetrámeros, los cuales no se unirían eficientemente a las S-RNasas correspondientes y como resultado, el inhibidor general inhibiría la actividad de RNasa de las dos S-RNasas haplotipo específicas (Figura 3C). De hecho, este modelo también predice que los heterotetrámeros no se unirían a ninguna otra S-RNasa. Es por esto que los tubos polínicos que portan dos alelos *S* diferentes serían compatibles con pistilos con cualquier genotipo (Kao and Tsukamoto, 2004).

MODELOS RECIENTES

Modelo de la degradación de proteínas

Este modelo propone que cada variante alélica de SLF media específicamente la ubiquitinación y degradación de las S-RNAsas no haplotipo específicas y no la inhibición de la actividad de RNasa, permitiendo así que la S-RNasa haplotipo específica funcione dentro del tubo polínico (Qiao *et al.*, 2004; Sijacic *et al.*, 2004). Una de las formas en que esto puede lograrse es la siguiente:

SLF interacciona con su propia S-RNasa a través de los dominios de especificidad alélica y esta interacción enmascararía los sitios de ubiquitinación de la S-RNasa, permitiéndole evadir la degradación. En ausencia de la interacción entre los dominios de especificidad alélica entre SLF y la S-RNasa, SLF interaccionaría con las S-RNAsas no propias a través de un dominio común a todos los SLF y un dominio común a todas las S-RNAsas que resultaría en la ubiquitinación y finalmente degradación de todas las S-RNAsas no propias. Este modelo predice que la interacción entre SLF y la S-RNasa a través de los dominios alelo *S* específicos es más fuerte que la que ocurre a través de los dominios comunes y es por esto que las interacciones propias están termodinámicamente favorecidas sobre las interacciones no propias.

Modelo modificado de la degradación de proteínas

La propuesta de este modelo surge como respuesta al hallazgo inesperado de que PiSLF interactúa preferencialmente y más fuertemente con la S-RNasa no propia que con la propia (Hua and Kao, 2006). Basado en los resultados de experimentos *in vitro*, PiSLF contiene tres dominios funcionales. Uno de ellos funciona como el dominio de unión a S-RNAsas (SBD), el cual por sí mismo interacciona fuertemente con un dominio común a todas las S RNAsas. Los otros dos dominios, juntos, determinan la especificidad alélica de PiSLF y funcionan como dominios de regulación de la unión a las S-RNAsas (SBRD). Estos dominios debilitan la interacción fuerte entre el SBP de PiSLF y la S-RNasa durante las interacciones alelo *S* específicas, funcionando como reguladores negativos.

En el caso de una cruce incompatible, la interacción entre el SBD de PiSLF₁ y su RNasa propia, S₁-RNasa, en un tubo polínico *S_i* serían debilitadas debido a la interacción desfavorable entre el

SBRD de PiSLF1 y el dominio alelo *S*-específico de la S_1 -RNasa. El complejo PiSLF1- S_1 -RNasa no sería estable. Consecuentemente, la mayoría de las moléculas de la S_1 -RNasa existirían en su forma libre y degradarían el RNA del polen para resultar en la inhibición del crecimiento del tubo polínico S_1 . En el caso de una cruce compatible, PiSLF1, en un tubo polínico S_1 interaccionaría fuertemente con la S_2 -RNasa, una *S*-RNasa no propia, porque el SBRD de PiSLF1 y el dominio alelo *S* específico de la S_2 -RNasa no afectaría la fuerte interacción entre el SBD de PiSLF1 y el dominio común a todas las *S*-RNasas. Esta interacción fuerte resultaría en la formación de un complejo estable PiSLF1- S_2 -RNasa y permitiría el ensamblaje de PiSLF- conteniendo el complejo E3, el cual podría ubiquitinar a la S_2 -RNasa y marcarla para su degradación. El crecimiento del tubo polínico no se inhibiría. En el caso de la interacción competitiva, como la polinización de un pistilo S_1S_2 por un polen heteroalélico S_1S_2 , dos PiSLFs diferentes, PiSLF1 and PiSLF2, y sus respectivas *S*-RNasas, están presentes en el citoplasma del mismo tubo polínico. PiSLF1 and PiSLF2 preferencialmente interaccionarían con sus *S*-RNasas no propias a través de sus SBDs para formar complejos estables PiSLF1- S_2 -RNasa y PiSLF2- S_1 -RNasa, como en el caso de una polinización cruzada. PiSLF1 o PiSLF2 podrían también interactuar con sus respectivas *S*-RNasas propias, sin embargo, como se discutió en el caso de la polinización incompatible, estas interacciones no resultarían en complejos estables. La disociación de la S_1 -RNasa y S_2 -RNasa de estos complejos las dejaría disponibles para interaccionar nuevamente de forma preferencial con sus PiSLFs no propios debido a las interacciones fuertes entre el SBD de PiSLF y las *S*-RNasas no propias. En última instancia, todas las S_1 y S_2 -RNasas estarían en complejos estables con PiSLF2 y PiSLF1, respectivamente. Así, en el caso de una polinización compatible, todas las S_1 -RNasas and S_2 -RNasas serían ubiquitinadas y degradadas (Hua *et al.*, 2008).

Modelo de compartimentalización

Este modelo surge al demostrarse en *Nicotiana* que las *S*-RNasas al entrar a los tubos polínicos, son retenidas en una vacuola (Goldraij *et al.*, 2006).

El modelo de compartimentalización predice que en un tubo polínico compatible (no propio), la polinización se lleva a cabo debido al secuestro de todas las moléculas de *S*-RNasas (las propias y no propias), y no a la degradación de las *S*-RNasas no propias. En un tubo polínico

incompatible (polen propio), la ruptura del compartimento que contienen a las S-RNasas libera a ambas S-RNasas al citoplasma para resultar en la inhibición del crecimiento del tubo polínico propio (Goldraij *et al.*, 2006; McClure, 2006). Una explicación más detallada de este modelo se encuentra en la sección III-II de este capítulo.

III. GENES MODIFICADORES Y LA RESPUESTA DE AUTOINCOMPATIBILIDAD.

Varios mecanismos han sido implicados en la ruptura de la AI: 1) presencia de mutaciones en el locus *S* que afectan la parte estilar o la del polen (Sassa *et al.*, 1997); 2) duplicaciones en la región cromosomal que contiene al alelo *S* del polen conduciendo a que se afecte el comportamiento del polen (de Nettancourt, 1977) y 3) afectación de la acción de genes no ligados al locus *S* que modulan la actividad de los productos de los alelos *S*. Aunque por definición los productos del locus *S* determinan la especificidad de la respuesta de AI, sólo en el caso de *Papaver* la especificidad del pistilo es suficiente para iniciar la respuesta de AI (Foote *et al.*, 1994; Franklin-Tong *et al.*, 1995; Franklin-Tong *et al.*, 1997). En el sistema de AI en *Brassica* y en aquellos dependientes de las S-RNasas se ha reportado que se requiere de otros genes o factores diferentes a las determinantes genéticas de la AI para que se desencadene el rechazo del polen alelo *S* específico (Anderson and de Winton, 1931; Mather, 1943; Martin, 1968). Estos factores genéticos son conocidos como genes modificadores y se han clasificado en tres grupos dependiendo de su interacción con las determinantes genéticas de la AI en el pistilo (McClure *et al.*, 2000, Cruz-Garcia *et al.*, 2003).

El grupo I está integrado por factores que afectan directamente la expresión de los genes del locus *S*. Estos factores podrían ser factores de transcripción, o factores que afecten la modificación postranscripcional de las determinantes de la especificidad de la reacción.

El grupo II está compuesto por factores que interaccionan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad y por lo tanto son factores que se requieren específicamente para el rechazo del polen. Estos factores no tienen un papel general en la polinización y no afectan la acumulación o estructura de las determinantes de la especificidad.

El grupo III incluye genes requeridos en el rechazo del polen que están involucrados en otros eventos de la interacción polen-pistilo.

III.I Los genes modificadores y el sistema de AI en *Brassica*

Aunque los genes SRK determinan la especificidad de la respuesta en las células papilares del estigma (Goring y Rothstein, 1992; Goring *et al.*, 1993; Kusaba y Nishio, 1999), existen otros genes involucrados. En *Brassica*, se han reportado hasta la fecha cinco genes modificadores: SCF, MLPK (proteína de cinasa del locus M), THL1, THL2 (tioredoxinas) y ARC1 (proteína del estigma que contiene un motivo específico repetitivo Armadillo). Las tioredoxinas THL1 y THL2 son consideradas reguladores negativos de la AI ya que evitan la activación constitutiva de esta vía. Los mediadores positivos de la respuesta de AI son MLPK y ARC1.

MLPK es un ejemplo de genes modificadores del grupo II. *MLPK* pertenece a un grupo de cinasas de proteínas denominadas cinasas citoplasmáticas semejantes a receptor (RLCKs). Estas proteínas tienen un origen monofilético común con las cinasas tipo receptor pero no tienen ninguna secuencia señal aparente ni ningún dominio transmembranal (Shiu and Bleecker, 2001). *MLPK* se encuentra localizada en la membrana plasmática anclada posiblemente a través de un sitio de miristoilación. La expresión del gen silvestre *MLPK* en plantas AC *m/m* (gen modificador recesivo) restaura el fenotipo normal de rechazo del polen (Murase *et al.*, 2004). La ruptura completa de la AI en las plantas *m/m* de *Brassica* indica que *MLPK* se requiere en todas las vías de señalización mediadas por SRK que conduzcan al rechazo del polen. Esto da lugar a la posibilidad de que *MLPK* forme un complejo de señalización con SRK el cual medie la respuesta de rechazo (Goring and Walter, 2004). Típicamente, la fosforilación de estos complejos puede conducir a la activación de cinasas y al establecimiento de sitios de unión para componentes que se encuentren por debajo de la vía de señalización. *ARC1* podría operar por debajo del complejo SRK-*MPLK* (Goring and Walter, 2004).

Los genes *THL1* y *THL2* codifican para dos proteínas semejantes a tioredoxinas h que actúan como reguladores negativos de SRK en ausencia del producto del alelo *S* del polen, SCR/SP11. *THL1* interacciona con la región citoplasmática de SRK (Bower *et al.*, 1996). La interacción de *THL1* y *THL2* con el dominio de cinasa de SRK *in vitro* es independiente de la fosforilación y la interacción entre SRK y *THL1* inhibe la autofosforilación de los oligómeros de SRK (Cabrillac *et al.*, 2001). Al parecer, SRK existe como oligómero o dímero en asociación con *THL1* y *THL2* [Giranton *et al.*, 2000; Cabrillac *et al.*, 2001]. Es por ésto que se predice que *in vivo* la

interacción de THL1 (y probablemente THL2) mantenga a SRK en un estado inactivo. La transición de SRK hacia un estado activo *in vivo* ocurre en presencia de los granos de polen o de aislados de cubierta del polen del mismo haplotipo *S* (Cabrillac *et al.*, 2001; Iwano *et al.*, 2003), a través de una interacción entre SP11/SCR y el dominio *S* de SRK (Takayama *et al.*, 2001). Esta interacción resulta en una rápida autofosforilación de los residuos de serina y treonina en el dominio de cinasa de SRK (Takayama *et al.*, 2001) y, como consecuencia inmediata de esto, se piensa que THL1 y THL2 se disocian del dominio de cinasa (Cabrillac *et al.*, 2001). La forma activada de SRK inicia una cascada de señalización dentro de las células papilares a través de la interacción de su dominio de cinasa con proteínas citosólicas específicas que disparan el rechazo del polen incompatible.

Un buen candidato para la iniciación de la cascada de señalización citosólica que dirige el rechazo del polen propio es ARC1 (Stone *et al.*, 1999). El producto de *ARC1* interacciona fuertemente con el dominio de cinasa de SRK, dependiendo de su estado de fosforilación (Gu *et al.*, 1998). La generación de plantas transgénicas que expresan este gen en antisentido reducen su capacidad para rechazar de forma efectiva el polen incompatible (Stone *et al.*, 1999). Esta proteína es un miembro importante en la cascada de transducción de señales de la vía del rechazo del polen. ARC1 tiene un motivo de caja U el cual tiene asociado actividad de ligasa de ubiquitina E3 y capacidad para promover ubiquitinación de proteínas del estigma durante la respuesta de AI (Stone *et al.*, 2003). Los sustratos ubiquitinados junto con ARC1 son dirigidos al proteasoma-COP9 señalosoma (CSN) posiblemente para su degradación. ARC1 solo se dirige al proteasoma si está presente la forma activada de SRK. La inhibición de la actividad proteolítica del proteasoma detiene significativamente la respuesta de AI, sugiriendo que la vía de ubiquitina está directamente involucrada en el rechazo del polen incompatible (Stone *et al.*, 2003). Se propone que ARC1 es activado por SRK para promover la ubiquitinación y degradación proteosomal de proteínas estigmáticas que soportan la germinación del polen y/o el crecimiento del tubo polínico. Como la ubiquitinación tiene funciones que no se encuentran relacionadas con la degradación de proteínas, tales como el marcado de proteínas subcelulares, es necesario determinar los posibles blancos de ARC1 para analizar e interpretar detalladamente el proceso de rechazo del polen (Takayama and Isogai, 2005).

Otro posible regulador negativo es la fosfatasa de proteína KAPP (fosfatasa de proteína asociada a cinasa). Esta proteína interactúa con el dominio de cinasa de SRK *in vitro* y es fosforilada por éste. KAPP entonces desfosforila a SRK (Vanoosthuyse *et al.*, 2003). Otras proteínas que interactúan con SRK son las calmodulinas 1 y 2. Estas tres proteínas, KAPP y las calmodulinas 1 y 2, pueden tener un papel general en vías de señalización mediadas por receptores-cinasas (Takayama and Isogai, 2005).

Cuando SCR/SP11 se aplica solo directamente a los estigmas no puede iniciar la respuesta de AI, aparentemente porque es incapaz de difundir a través de la cutícula estigmática (Iwano *et al.*, 2003). Esto indica que factores adicionales en el polen son requeridos para garantizar que haya contacto entre SRK y SCR, tal vez una cutinasa del polen o una de varias esterasas de serina del polen necesarias para el correcto desarrollo del tubo polínico y la penetración del estigma de *Brassica* (Hiscock *et al.*, 1994; 2002). El gen *SCF* afecta la expresión de genes relacionados a los SGL, aunque se desconoce su mecanismo de acción (Gaude *et al.*, 1995; Kusaba and Nishio, 1999). *SCF* es un ejemplo de genes modificadores del grupo I.

Mecanismo de inhibición del polen incompatible

La maduración de la flor en las crucíferas AI está acompañada de la inserción de SRK/SP11 dentro de la membrana plasmática de las células epidérmicas del estigma y de SCR dentro de la cubierta del polen durante su desarrollo en la antera (Shiba *et al.*, 2001; Kachroo *et al.*, 2001). Cuando la antera libera su polen y la flor se abre para recibir a sus polinizadores, las células epidérmicas del estigma tienen listos al sistema de vigilancia de AI y a SRK para hacer un escrutinio de los granos de polen. Por su parte, los granos de polen maduros, portan variantes específicas de SCR que los identifica como propio y no propio, marcándolos así para el rechazo o la aceptación. Una vez que el polen se deposita sobre las células papilares del estigma, estas células reciben una señal de la cubierta del polen y responden permitiéndole al grano de polen germinar o no (Dickinson, 1994; 1995). En una polinización con el polen propio (Figura 4), cuando se establece el primer contacto entre el polen y las células papilares del estigma, las proteínas SCR son liberadas a la matriz extracelular. Los detalles de la cascada de señalización intracelular dentro de la célula papilar aún se desconocen.

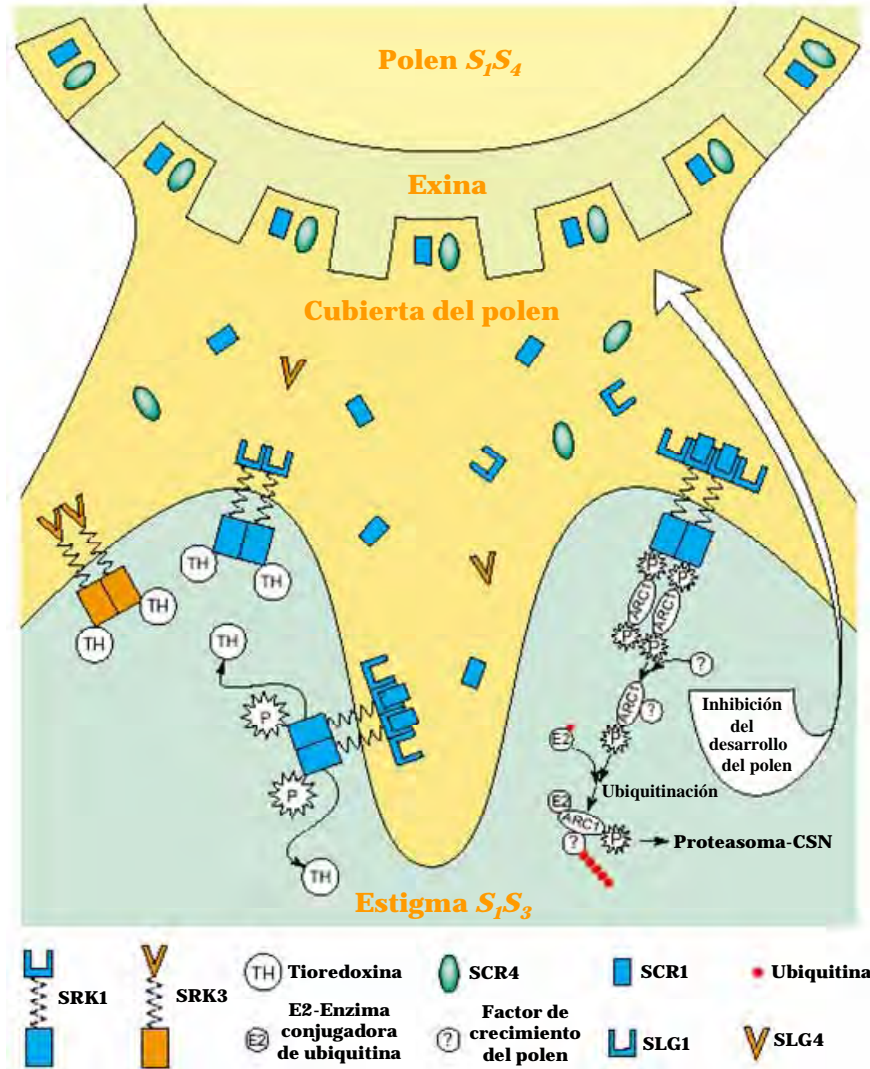


Figura 4. Modelo para el mecanismo de AIE en *Brassica*. El polen y el estigma mostrados comparten productos génicos del mismo haplotipo S_1 y por esto, la reacción es incompatible. El reconocimiento del polen involucra una interacción específica entre SCR1 y el dominio de receptor de SRK1, lo cual activa su dominio de cinasa. Aunque SLG no es esencial para la AIE, se ha demostrado que forma parte del complejo de interacción SCR–SRK. Los productos génicos del mismo haplotipo S tienen el mismo color. La unión de SCR a SRK provoca la activación de SRK, la disociación de las tioeredoxinas del dominio de cinasa de SRK y la autofosforilación de los residuos de serina y treonina en el dominio de cinasa. Una vez que ocurre la fosforilación de SRK, ARC1 interacciona con el dominio de cinasa de SRK y actúa como una ligasa de ubiquitina E3. Se cree que ARC1 sea responsable de la inhibición directa del desarrollo del polen que porte el mismo haplotipo S que el pistilo iniciando la degradación del crecimiento del polen a través de factores que participen en la vía de ubiquitina. Las proteínas ubiquitinadas son llevadas al proteasoma–señalosome COP9 (CSN) para su degradación. En un estado inactivo, es decir, en ausencia de polen o en presencia de un grano de polen compatible, las moléculas de SRK se asocian como dímeros u oligómeros con las tioeredoxinas a través de sus dominios de cinasa. La asociación con las tioeredoxinas se piensa que evita la autofosforilación de SRK y que la vía de rechazo del polen se mantenga siempre activa. Figura adaptada a partir de la publicada en Hiscock and McInnis, 2003.

MLPK podría formar un complejo de señalización con SRK. El complejo SLG-SCR/SP11 interacciona con el dominio *S* (externo) de SRK (Takayama *et al.*, 2001; Kachroo *et al.*, 2001) y esta interacción ocurre solamente entre variantes de receptor y ligando codificadas por el mismo haplotipo *S* (Kachroo *et al.*, 2001). La interacción activa el dominio intracelular de cinasa de SRK y por tanto, su autofosforilación (Goring *et al.*, 1993). El dominio de cinasa de la forma fosforilada de SRK interaccionará con la proteína ARC1 la cual contactará a un intermediario desconocido, quedando de esta manera instalada la respuesta de AI, que culminará con la inhibición de la germinación del grano de polen (Franklin-Tong, 2002). ARC1 podría marcar a sustratos desconocidos para su ubiquitinación y la degradación de estos sustratos podría resultar en el rechazo del polen (Takayama and Isogai, 2005). En una polinización cruzada, el SCR/SP11 no propio no se uniría a SRK, la vía de señalización no se activaría y el crecimiento de tubo polínico se mantendría.

III.II Los genes modificadores en las solanáceas

La familia Solanaceae ha sido usada como modelo para estudiar las bases moleculares y bioquímicas del reconocimiento y rechazo del polen. En esta familia, la participación de genes modificadores en la respuesta de AI ha sido reportada en los géneros *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum* y *Lycopersicon*.

En *Petunia*, estudios de poblaciones silvestres de *P. axilaris* que segregaban con plantas AI y AC mostraron que la AC fue originada por un efecto alelo *S* específico que inhibía la expresión de la S-RNasa, colocando al factor afectado en el grupo I de los genes modificadores (Tsukamoto *et al.*, 1999).

Asimismo, Ai *et al.* (1991) trabajando con plantas AC de *P. inflata*, cultivar Strawberry Daddy que expresan niveles normales de S-RNasas, encontraron que cuando estas plantas fueron cruzadas con aquellas AI de *P. hybrida*, todas las plantas en la generación F1 restauraron su capacidad de rechazar su propio polen. Por lo tanto, se puede decir que el cultivar Strawberry tiene una mutación recesiva que cae en el grupo II de genes modificadores, el cual no se requiere para la expresión de la S-RNasa, pero que es necesario para la respuesta de AI.

En el caso de *Nicotiana* también se sabe que se requieren genes modificadores del grupo II. Por ejemplo, *N. plumbaginifolia* es una especie AC que no expresa ninguna S-RNasa y por lo tanto, siguiendo el modelo de que las S-RNasas son las determinantes genéticas del rechazo del polen alelo *S* específico, es de esperarse que si se clonara y expresara alguna S-RNasa en esta especie, ésto sería suficiente para que estas plantas desarrollaran la respuesta de AI. Sin embargo, cuando plantas transgénicas de *N. plumbaginifolia* expresando niveles normales del transgen de la S_{A2} - o S_{C10} - RNasa se generaron, éstas fueron incapaces de rechazar el polen con el alelo S_{A2} o S_{C10} . No obstante, cuando las plantas transgénicas fueron cruzadas con plantas AC de *N. alata* cultivar BT (plantas que normalmente no expresan ninguna S-RNasa, pero que contienen factores diferentes a las S-RNasas importantes para el rechazo del polen), los híbridos producto de esta cruce adquirieron la capacidad de rechazar el polen S_{A2} o S_{C10} (Murfett *et al.*, 1996), indicando que la respuesta de AI desarrollada por los híbridos fue dependiente de factores genéticos diferentes a las S-RNasas que fueron heredados por *N. alata* BT.

En *Nicotiana* se han identificado hasta la fecha cuatro genes modificadores, dos pertenecientes al grupo II: HT-B y 120K (McClure *et al.*, 1999, Hancock *et al.*, 2005) y tres proteínas pertenecientes al grupo III: NaTTS (proteínas específicas del tejido de transmisión del estilo) [Cheung *et al.*, 1995], PELPIII (proteínas clase III específicas del pistilo semejantes a extensinas) [Graaf, 1999] y Nap11 (Cruz-García, *et al.*, 2005, McClure *et al.*, 2000).

HT-B codifica para una proteína de 101 aminoácidos con una región rica en residuos de asparagina y ácido aspártico en el extremo carboxilo. La expresión de este gen en antisentido en plantas transgénicas produjo cambios en el fenotipo de polinización siendo los híbridos incapaces de rechazar su propio polen. De esta forma quedó demostrada su implicación en el rechazo alelo *S* específico del polen (McClure *et al.*, 1999).

El transcrito de este gen se expresa fuertemente en estilos de plantas AI de *N. alata*, pero no se detecta en estilos de *N. plumbaginifolia* (AC natural).

Otra evidencia reciente del papel del producto de *HT-B* fue reportada por Kondo *et al.* (2002a) en *Lycopersicon esculentum*, una especie autocompatible (AC) que no expresa ninguna S-RNasa. Estos investigadores reportaron dos copias del gen *HT*, *LeHT-A* y *LeHT-B*, las cuales presentan mutaciones puntuales. Una mutación en la región codificante del gen *LeHT-A* provoca un corrimiento del marco de lectura, mientras que en el gen *LeHT-B* la mutación genera un codón de

término prematuro. Estos hallazgos llevaron a la conclusión de que la pérdida de la AI en *L. esculentum* se asocia con las mutaciones en los genes *HT*. Sin embargo, hasta ahora no se sabe cómo participa HT-B en la vía bioquímica del rechazo del polen. En *N. alata*, la proteína codificada por este gen ingresa a los tubos polínicos en crecimiento y sus niveles de expresión disminuyen notablemente en los tubos polínicos AC (Goldraij *et al.*, 2006).

La proteína 120K está glicosilada y se localiza en la MI del tejido de transmisión de *N. alata*, y después de la polinización se detecta en el citoplasma y en las paredes de los tubos polínicos (Lind *et al.*, 1996). Esta proteína se une *in vitro* a las S-RNasas y cuando se silencia, las plantas AI cambian su fenotipo de polinización (Cruz-García *et al.*, 2005; Hancock *et al.*, 2005). Recientemente se demostró que 120K ingresa al tubo polínico por endocitosis y se transporta a una vacuola (Goldraij *et al.*, 2006).

Nap11 es una metaloproteína de 10.6 kDa, que contiene en su extremo amino una señal que es procesada para originar una proteína madura de 9 kDa. Esta proteína tiene un dominio de unión a cobre y se localiza específicamente en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo (Cruz-García and McClure, 2000).

NaPELPIII es el homólogo en *N. alata* de la PELPIII de *N. tabacum* (Graaf, 1999). En tabaco, esta proteína de 110-140 kDa se acumula desde estados tempranos de la madurez del pistilo en la MI del TT del estilo y se trasloca completamente desde esta matriz hacia la pared celular del tubo polínico durante su crecimiento por el estilo (Pierson *et al.*, 1999; Graaf *et al.*, 2003). NaPELPIII se localiza tanto en la membrana como en los tapones de calosa de las partes más viejas del tubo polínico, de lo cual se infiere que esta proteína representa una nueva clase de proteínas estructurales (Graaf *et al.*, 2004).

NaTTS es el homólogo en *N. alata* de la proteína estilar TTS de *N. tabacum* (Wu *et al.*, 2000). En *N. alata* se demostró que al igual que NaPELPIII, Nap11 y 120K, NaTTS se une *in vitro* a las S-RNasas (Cruz-García *et al.*, 2005).

NaTTS se trasloca a las paredes de los tubos polínicos y es desglicosilada por una hidrolasa ubicada en la membrana del tubo polínico para que éste se nutra de sus azúcares (Wu *et al.*, 1995). En *Nicotiana*, esta proteína promueve la elongación de los tubos polínicos y los atrae en sistemas de cultivo de tubos polínicos semi-*in vivo* (Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2000). Aunque NaTTS no se encuentra en gradiente de concentración dentro de los estilos, sí parece

existir un gradiente de glicosilación de esta proteína en el pistilo. Las formas altamente glicosiladas de NaTTS tienen puntos isoeléctricos más ácidos, por eso además de un gradiente ascendente de glicosilación, también existe uno ascendente de acidez desde el estigma hasta la base del estilo, coincidiendo con la dirección de crecimiento del tubo polínico. Como TTS interacciona íntimamente con los tubos polínicos uniéndose a ellos y siendo desglicosilada por enzimas unidas a éstos, el incremento del contenido de azúcares de esta proteína a lo largo del estilo puede guiarlos hacia el ovario (Cheung, 1995). Cuando los niveles de TTS se suprimen en plantas transgénicas de tabaco, la velocidad de crecimiento del tubo polínico se reduce conduciendo a una disminución en la fertilidad femenina. Las proteínas NaTTS, NaPELPIII y Nap11 podrían ser productos de genes modificadores del grupo III, es decir, genes que funcionan en el rechazo del polen y en otros eventos de la interacción polen-pistilo.

Mecanismo de rechazo del polen

Cuando un grano de polen aterriza sobre la superficie estigmática y germina, las proteínas presentes en la MEC requeridas para la respuesta de AI ingresan por endocitosis a los tubos polínicos en desarrollo. Las S-RNasas, 120K y HT-B son enviadas a una vacuola del polen quedando los tubos polínicos protegidos del efecto citotóxico de las S-RNasas, (Goldraij *et al.*, 2006).

Si el tubo polínico en crecimiento es compatible (Figura 5, panel superior), HT-B se degrada posiblemente por la acción de una proteína hipotética del polen (PP), las S-RNasas se mantienen compartamentalizadas en la vacuola y por ende no se degrada el RNA del tubo polínico. En caso de que el tubo polínico en crecimiento sea incompatible (Figura 5, panel inferior), SLF interacciona con la S-RNasa correspondiente. HT-B se mantiene estable y la vacuola se rompe liberándose las S-RNasas al citoplasma del tubo polínico. El RNA se degrada y como consecuencia se detiene el crecimiento del tubo polínico al inhibirse la síntesis proteica.

Aún no queda claro cómo la S-RNasa se pone en contacto con SLF pero debe ser de una forma indirecta ya que ésta se encuentra secuestrada dentro de una vacuola. Tal vez existe un mecanismo que recluta a SLF en la membrana ó pequeñas cantidades de S-RNasas escapan hacia el citoplasma (McClure and Franklin-Tong, 2006).

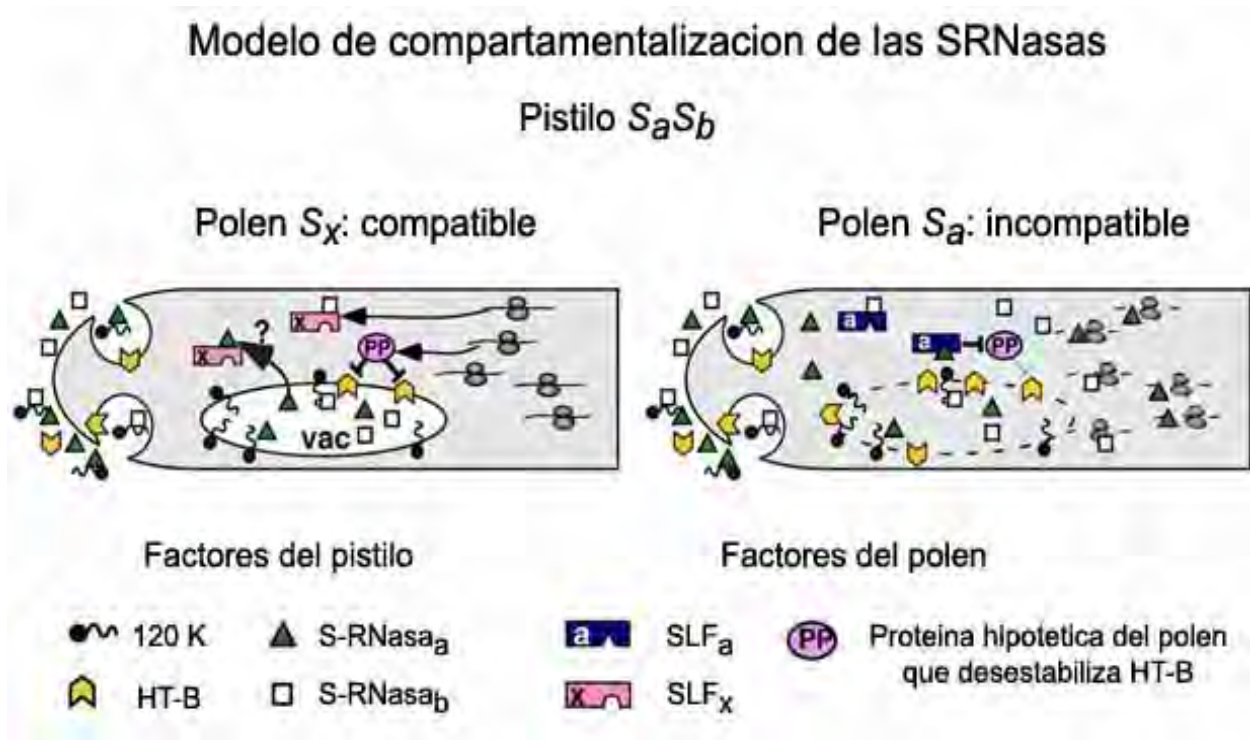


Figura 5. Modelo para el rechazo del polen alelo *S* específico en *Nicotiana*. Las S-RNasas, 120 K y HT-B ingresan al tubo polínico por endocitosis y son enviadas a una vacuola. En una interacción compatible (izquierda), las S-RNasas mantienen su estabilidad y permanecen compartimentalizadas. Al estar secuestradas, no son capaces de mostrar su efecto citotóxico sobre el RNA del tubo polínico. Un factor hipotético del polen (PP), causa degradación de HT-B en los tubos polínicos compatibles. No se sabe cómo las S-RNasas se ponen en contacto con SLF. En una interacción incompatible (derecha), la acción de PP se inhibe, la vacuola se rompe y la S-RNasa se libera al citoplasma del tubo polínico, el RNA se degrada y el crecimiento del tubo polínico se inhibe. La figura fue adaptada a partir de la publicada por McClure and Franklin-Tong, 2006.

III.III Población 11613 de *Nicotiana alata*

Otra fuerte evidencia de la importancia de los genes modificadores en la respuesta de AI se presenta en una población recombinante de plantas de *N. alata* que segrega con subpoblaciones que aceptan o rechazan el polen propio. Esta población (11613) se generó a partir de la cruce de una planta mutante de *N. alata* (acepta su propio polen a pesar de sintetizar niveles normales de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa, de HT-B y 120K) con una planta AI de *N. alata* $S_{105}S_{105}$ (Figura 6). El análisis del fenotipo de polinización de la progenie (Generación 2, Figura 6) indicó que todas las plantas fueron capaces de rechazar su propio polen, sugiriendo que el defecto en la mutante era recesivo.

Para obtener una población segregante, una planta heterocíga de la segunda generación (5279-1, con los alelos $S_{A2}S_{105}$) fue retrocruzada con la mutante original y la población obtenida fue designada 4936 (tercera generación). El fenotipo de reconocimiento del polen en esta población se evaluó probando su capacidad para producir semillas obteniéndose 22 plantas AC y 58 AI. La proporción fenotípica segregante de 3:1 indicó que dos factores recesivos con funciones redundantes estaban controlando el fenotipo de las plantas AC.

Como la AI requiere tanto de la función de la parte estilar como de la función del polen, una fracción de la población 4936 fue probada en su capacidad para aceptar polen de las plantas homocígas para los alelos S_{A2} , S_{C10} y S_{105} de *N. alata*.

Los homocígos *S* fueron elegidos por representar los tres alelos segregantes en la población y para determinar defectos en la parte estilar de las plantas AC. En plantas normales, se esperaría un fenotipo normal de rechazo de polen cuando se emplease polen de dos de los tres homocígos *S*. Los resultados obtenidos indicaron que las plantas son defectuosas en la parte estilar ya que aceptaron los tres tipos de polen.

Las autopolinizaciones realizadas con las plantas AC de la población 4936 y las cruces recíprocas entre ellas, produjeron descendientes AC lo que sugiere que todas las plantas AC tienen el mismo genotipo y que la mutación en las plantas defectuosas además de ser recesiva, fue heredada de manera estable.

Con el objetivo de hacer más homogéneos los entornos genéticos de población recombinante, una planta AC de la tercera generación (4936-177) fue cruzada con el homocígo AI $S_{105}S_{105}$.

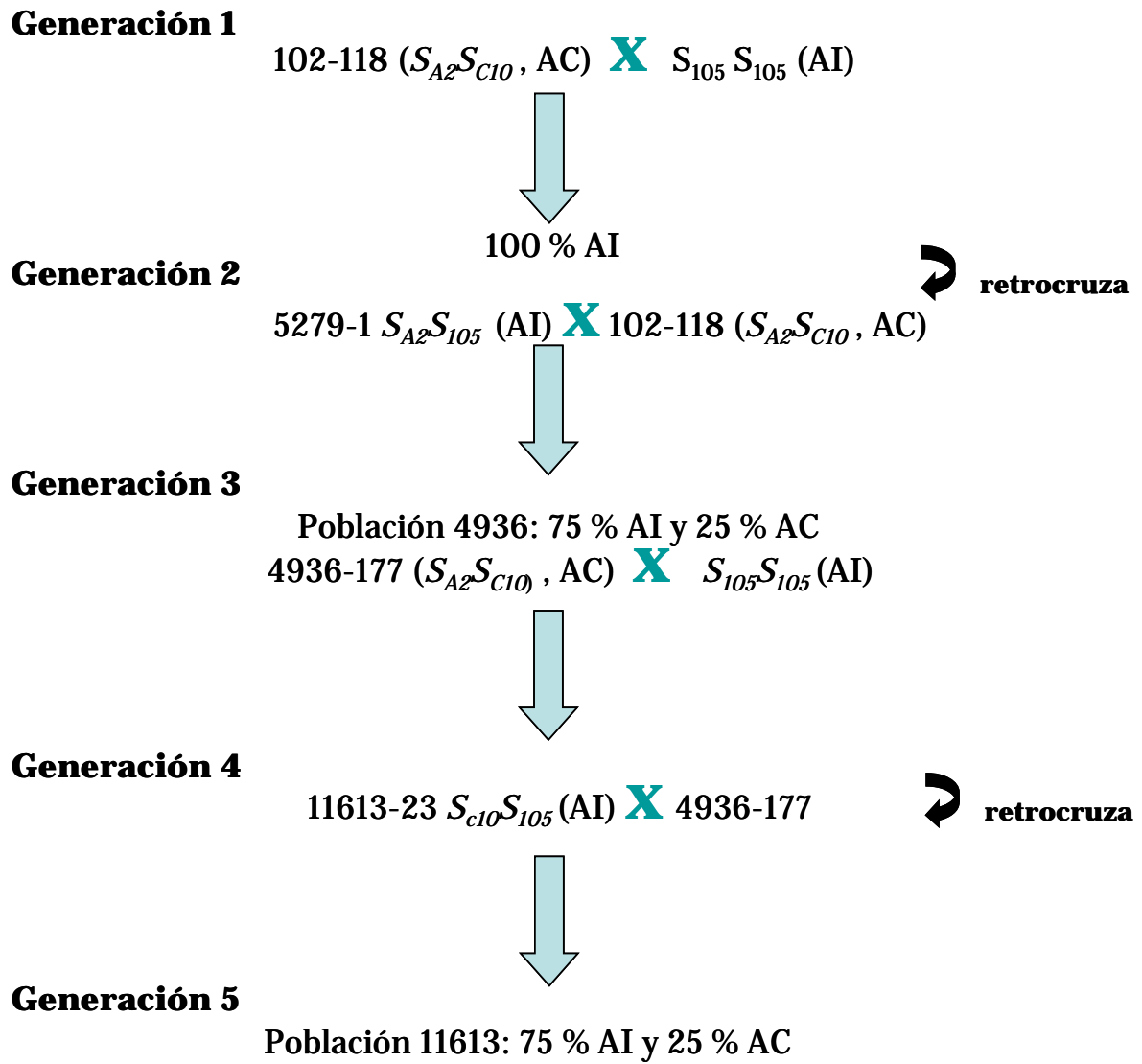


Figura 6. Pedigree de la población 11613 de *N. alata*.

La población obtenida producto de la cruce fue denominada 11611 (cuarta generación). Todos los individuos de esta generación recuperaron la capacidad de rechazar el polen propio confirmándose de esta forma la naturaleza recesiva del fenotipo AC.

La cruce entre una planta AI de la cuarta generación (11611-23) con una AC de la población 4936 (4936-177) permitió obtener otro estimado del número de loci involucrados en el fenotipo AC y homogenizar aun más los genomas de los individuos que la conforman. Esta quinta generación de cruces genéticas cuyas principales diferencias genéticas están relacionadas con la AI, segregó tanto con plantas AC como AI. La proporción fenotípica segregante de esta población denominada 11613 fue de 3:1, es decir 3 plantas AI por cada una AC. Este tipo de segregación podría confundirse con la hipótesis de que un solo gen fuera el responsable de la AI, siempre y cuando la progenie fuese una F2 producto de la autopolinización de una planta F1 heterociga. En nuestro caso, debido a que la cruce fue con la mutante se propone que dos genes con funciones redundantes controlan el rechazo del polen alelo *S* específico en las plantas AI.

En la población 11613 tanto las plantas AC como las AI expresan niveles normales de las S-RNAsas. Sin embargo, estas enzimas no inhiben el crecimiento de los tubos polínicos producto de la autopolinización en las plantas AC. En un principio se pensó que la incapacidad de las plantas AC de rechazar su propio polen, se debía a que las S-RNAsas no se transportaban del estilo al citoplasma del tubo polínico después de ser polinizadas. Sin embargo, experimentos de inmunolocalización mostraron que independientemente del genotipo del polen, tanto la *S*_{A2}-RNasa como la *S*₁₀₅-RNasa se transportan al interior del tubo polínico (Goldraij et al., 2006). Estos resultados corroboraron lo observado por Luu y colaboradores (2000) en *Solanum chacoense*, donde quedó demostrado por primera vez que las S-RNAsas se transportaban de manera haplotipo independiente al citoplasma del tubo polínico.

La población 11613 nos ha permitido plantear la hipótesis de que las plantas AI expresan genes modificadores que están ausentes o no son funcionales en las plantas AC. Esta evidencia genética sugiere que la vía bioquímica de rechazo del polen en *N. alata* involucra a dos genes modificadores desconocidos. La identificación de estos genes resulta muy importante ya que esto tendrá un considerable impacto en el entendimiento del mecanismo bioquímico del sistema de AI en la familia Solanaceae. Aunque se sabe que las S-RNAsas son las determinantes específicas de la función de la parte estilar y que SLF es la determinante masculina, poco se

conoce acerca de la contribución de otros componentes a la vía genética involucrada en el rechazo del polen. Además, los conocimientos derivados de esta investigación se podrían aplicar en programas de mejoramiento genético, donde se desee dirigir la polinización entre los genotipos o especies de interés por lo que resulta muy importante identificar los genes que codifican para estos factores, y definir su función.

HIPÓTESIS

En las plantas AI de la población 11613 de *N. alata*, los genes involucrados en el rechazo del polen deben estar siendo modulados por los productos de nuevos genes modificadores que no se expresan o no son funcionales en las plantas autocompatibles y cuyo patrón de expresión debe coincidir con el de los genes que hasta la fecha participan en la respuesta de rechazo del polen en *N. alata*: 1) exclusivos de órganos reproductivos, 2) bajos niveles de expresión en pistilos inmaduros que se incrementan alcanzando su máximo hacia la antesis y 3) ser secretados a la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar y caracterizar genes modificadores requeridos en el rechazo del polen dependiente de S-RNasas en *Nicotiana alata*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar los genes modificadores que pudiesen estar involucrados en el rechazo del polen en plantas AI de *Nicotiana alata* y por tanto, estar asociados con el defecto en las plantas AC.
- Estudiar la expresión espacio-temporal de los posibles genes modificadores.
- Determinar la participación de los genes modificadores en la respuesta de rechazo del polen en esta especie.

CAPÍTULO II

Clonación de genes modificadores en

Nicotiana alata

Introducción

Las estrategias experimentales usadas para la clonación de los genes modificadores estuvieron encaminadas inicialmente hacia la detección de cambios en la expresión de genes a nivel de mRNA entre estilos de las plantas AI y AC de la población 11613. Las técnicas empleadas para abordar este objetivo fueron las del cDNA-AFLP (amplificación de fragmentos polimórficos) [Liscum, 1999] y la de SSH (hibridación supresiva sustractiva) [Diatchenko *et al.*, 1996; 1999]. En los experimentos de cDNA-AFLP, el cDNA de plantas AC y AI fue utilizado para realizar un mapeo exhaustivo empleando 400 combinaciones de iniciadores que permitieron visualizar alrededor de 45000 cDNAs. De éstos se aislaron y clonaron 37 cDNAs que parecían ser candidatos a genes de expresión diferencial entre plantas AC y AI. Sin embargo, cuando estos cDNAs fueron utilizados como sondas en ensayos tipo réplica en Northern para corroborar su expresión, no se encontró ninguno de ellos ligado al fenotipo de AI. De forma similar y mediante el uso de la SSH, la generación de dos bibliotecas sustraídas de cDNA donde se suponía estuvieran enriquecidos los transcritos expresados diferencialmente en las plantas AI, permitió la recuperación de 543 clonas recombinantes. Después de un riguroso escrutinio para eliminar clonas redundantes y que no portaran transcritos de interés, el empleo de 10 cDNAs como sondas para corroborar su expresión diferencial mediante ensayos tipo réplica en Northern no arrojó ningún resultado que permitiera vincular la expresión de estos genes con el fenotipo de rechazo del polen.

Teniendo en cuenta estos resultados, y asumiendo que tal vez el defecto de la población 11613 se debía a una mutación puntual en los genes modificadores que permitía que éstos se expresaran tanto en plantas AC como en plantas AI, la tercera estrategia consistió en secuenciar todos los cDNAs provenientes de bibliotecas de plantas AC y AI una vez que éstas quedaran enriquecidas con genes modificadores.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Las plantas AC y AI de *N. alata* y *N. tabacum* cv. Praecox han sido descritas previamente (Beecher and McClure, 2001; Murfett *et al.*, 1994; 1996). *N. plumbaginifolia* (número de inventario TW107, acceso 43B) y *N. longiflora* (número de inventario TW79, acceso 30A) se obtuvieron de la colección de germoplasma de tabaco de EU (Laboratorio de investigación de cultivos, USDA-ARS, Oxford, NC, EU). Todo el material vegetal creció en invernaderos bajo condiciones estándares controladas.

Construcción de las bibliotecas de cDNA de estilos y estigmas de N. alata

Las bibliotecas de cDNAs de estigma y estilo se prepararon a partir de RNA poli A⁺ de plantas AI y AC de la población 11613 de *N. alata* usando el kit SMART cDNA library (Clontech) (BD Biosciencias, Palo Alto, CA, USA). El RNA poli A⁺ fue purificado a partir de RNA total siguiendo las instrucciones del proveedor. A partir de 1 µg de RNA poli A⁺ se sintetizó cDNA de doble cadena. Las bibliotecas de cDNA completos fueron direccionalmente clonadas en el vector λTriplEx2™ de acuerdo a las instrucciones del proveedor. De esta manera se obtuvieron dos bibliotecas de cDNA, una proveniente de plantas AC y otra de plantas AI. Pequeñas alícuotas de las bibliotecas de cDNA fueron tomadas antes de su amplificación y almacenadas a – 80 °C.

Purificación de RNA total

El RNA total de estilos/estigmas de plantas de *N. plumbaginifolia*, *N. longiflora* 30A, *N. tabacum* y plantas AC y AI de la población 11613 de *N. alata* se purificó usando el siguiente protocolo. El tejido colectado (1g-2g) fue pulverizado usando N₂ líquido y se adicionaron 15 ml de buffer de extracción (7 M urea, 100 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0 y 1 % SDS), 15 ml de PCI (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico) [25:24:1] y 1 % de β-mercaptoetanol. Al tubo se le aplicó vortex riguroso por 3 min, la muestra se centrifugó por 15 min a 1990 g y la fase acuosa fue

recuperada y depositada en un segundo tubo con 15 ml de PCI. Nuevamente se aplicó vortex por 3 min, la muestra fue centrifugada por 20 min a 2990 *g* y la fase acuosa fue recuperada y transferida a un tercer tubo que contenía 15 ml de cloroformo. Luego de mezclar las fases con vortex por 3 min, la solución fue centrifugada por 15 min a 2990 *g*. Todas las centrifugaciones anteriores se realizaron a temperatura ambiente (RT). La fase soluble del tercer tubo fue colectada y adicionada a un tubo con 5 ml de CH₃COONH₄ 10M. Se añadió a éste igual volumen de isopropanol y la muestra fue incubada a -20 °C por 1h 30 min como mínimo. Terminada la incubación, la muestra se centrifugó a 2990 *g* por 30 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado fue resuspendido en 3 ml de H₂O. Para la precipitación diferencial del RNA_T, 3 ml de LiCl se adicionaron al tubo, mezclados por inversión y la muestra fue incubada a -20 °C toda la noche. La precipitación del RNA se realizó a 7678 *g* por 30 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se secó a RT. El botón finalmente fue resuspendido en H₂O.

Una vez purificado el ácido ribonucleico se determinó su concentración leyendo su absorbencia a una longitud de onda de 260 nm. La concentración final de la muestra se estimó usando la relación de un valor de absorbencia igual a 1, equivalente a una concentración de RNA_T es de 40µg/ml.

Las muestras de RNA ocupadas para los ensayos tipo réplica en Northern se ajustaron a una concentración de 5 µg/µl en un volumen de 10 µl y se les agregaron 5 µl de buffer de carga de formamida (0.4 ml de glicerol 80 %, 2.2 ml de formamida 100 %, 0.8 ml de formaldehído al 37 % y 0.5 ml de MOPS 1 X). Las muestras se desnaturalizaron por 2-3 min a 80-90 °C y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Amplificación de las bibliotecas de cDNA

Para la recuperación de los cDNAs expresados en los estilos/estigmas de las plantas AC y AI de *N. alata* portados por los fagos lambda (λ), se procedió a infectar células de *E. coli* capaces de convertir a los fagos en vectores plasmídicos. Las células de *E. coli* de la cepa Bm 25.8 fueron crecidas en 10 ml de medio LB líquido (Apéndice I, Tabla 1) toda la noche a 30 °C y a 150 rpm. De este cultivo se tomó 1 ml y se diluyó en 10 ml de LB suplementado con 10 mM de MgSO₄ y 0.2 % de maltosa. Las células se incubaron en este medio por 25 min bajo las condiciones

descritas. Para la infección, los fagos presentes en las bibliotecas sin amplificar (500 fagos/ μ l) fueron diluidos con este cultivo de forma tal que por cada 175 μ l de esta dilución se obtuvieran 250 unidades formadoras de colonias (ufc) por placa rectangular. Es decir, en el caso de prepararse una sola placa bastaría disolver 0.5 μ l de fagos de las bibliotecas en 175 μ l de medio de cultivo de células de *E. coli* suplementado con maltosa y $MgSO_4$ siguiendo los pasos mencionados. Las bacterias infectadas con los fagos λ se pusieron a crecer por 10 h a 30 °C en placas rectangulares con medio de cultivo LB sólido (Apéndice I, Tabla 1) suplementado con carbenicilina a 100 mg/l. Las colonias fueron seleccionadas automáticamente (robot) y ordenadas en cajas de 384 pozos.

Crecimiento y transferencia de colonias a membranas

Una vez que las colonias estaban en el formato de 384 pozos en las placas rectangulares, se tomaron alícuotas de éstas con un estampador y se realizaron 6 réplicas de cada placa sobre las membranas las cuales fueron previamente colocadas sobre bandejas para hornear con medio LB sólido suplementado con 300 mg/l de ampicilina para evitar contaminación microbiana. La preparación de los antibióticos se encuentra descrita en el Apéndice I, Tabla 2. Las colonias se dejaron crecer sobre las membranas por 20 h a 30 °C. Transcurrido este tiempo y corroborado el crecimiento bacteriano, las membranas se colocaron dos veces sobre una solución desnaturalizante (1.5 M NaCl y 0.5 M NaOH) por 3 min y fueron agitadas para remover el exceso de crecimiento. Los filtros fueron posteriormente sumergidos por 3 min en solución de neutralización (HCl 1 M pH 8) y solución de bloqueo (4 mg/ml DNA de esperma de salmón, 1 % leche, 1 % SDS y 1.5 X SSPE) [dilución 1:2]. Las membranas se secaron a RT toda la noche y posteriormente los ácidos nucleicos fueron fijados por medio de un ciclo de entrecruzamiento óptimo (1400 X 100 μ J/cm²).

Escrutinio de las bibliotecas de cDNA

Las clonas que portaban los cDNA correspondientes a los mRNAs abundantes en los estigmas y estilos fueron identificadas a través del escrutinio de cinco réplicas de las bibliotecas por

separado con: 1) cDNA de estigmas/estilos maduros de *N. alata* AI; 2) cDNA de botones inmaduros del mismo cultivar; 3) cDNA de estigmas/estilos maduros de *N. alata* AC; 4) cDNA de *N. plumbaginifolia* y 5) cDNA de las S-RNAsas, HT-B (McClure *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002b) y 120K (Lind *et al.*, 1994) marcado con fósforo 32 (cDNAs [³²P]).

Síntesis de cDNA total de doble cadena

La síntesis de cDNA total se realizó a partir de 1 µg de RNA poli A⁺ proveniente de estilos y estigmas maduros de plantas AC, de estilos y estigmas maduros de plantas AI y de estilos y estigmas inmaduros de plantas AI de la población 11613. Para la síntesis de la primera cadena, 10 µl de RNA poli A⁺ (1 µg) se incubaron con 1 µl de oligo dT (10 ng) y 1 µl de H₂O a 70 °C por 5 min. A continuación, se adicionaron 4 µl de amortiguador para la primera cadena 5x, 2 µl de DTT 0.1M, 1 µl de dNTPs 10mM y 1 µl de Superscript II (200 units/ul, Gibco). La reacción se incubó a 37 °C por 1 h.

Marcaje radioactivo

Para el marcaje radioactivo del resto de los cDNAs empleados como sonda, se utilizó el kit de marcaje radioactivo por Random Primer (Invitrogen) siguiendo las instrucciones indicadas en el manual.

Después de la incorporación de la marca, las sondas fueron purificadas utilizando columnas de Sephadex G-25 y pelo de ángel (una por sonda). La columna se realizó colocando la fibra sintética en un tubo eppendorf de 0.5 ml y adicionando una solución de TE (10 mM Tris-HCl pH-8, 0.1 mM EDTA) y Sephadex G-25. El tubo se centrifugó a 1136 *g* por 5 min y se le siguió adicionando TE y Sephadex G-25 hasta obtener una columna compacta. Una vez empacadas las columnas, las sondas marcadas fueron aplicadas de forma independiente y centrifugadas usando las mismas condiciones; los flujos colectados constituyeron las sondas purificadas.

Hibridación de las colonias transferidas a membranas con las sondas radiactivas

Los filtros portando las colonias provenientes de las bibliotecas fueron bloqueados con la solución de hibridación (4 mg/ml DNA de esperma de salmón, 1 % leche, 1 % SDS y 1.5 X SSPE) por 6 horas como tiempo mínimo a 68 °C y con agitación suave. La solución se desechó y se adicionó a las membranas más solución de hibridación con las sondas de cDNAs [³²P] previamente desnaturalizadas a 95 °C por 3 min. Los filtros se hibridaron toda la noche a 68 °C con agitación. Una vez terminada la hibridación y con el objetivo de eliminar el exceso de marca radiactiva no asociada con las membranas, éstas últimas fueron lavadas tres veces con la solución de hibridación por 30 min (cada lavado). Para eliminar las hibridaciones inespecíficas, las membranas fueron astringentemente lavadas dos veces con la solución de lavado (0.4 mg/ml de DNA de esperma de salmón, 0.1 % leche, 0.1 % SDS y 0.15 X SSPE) por 30 min. Todos los lavados anteriores se realizaron a 68 °C. Un lavado adicional fue realizado con la solución de lavado para reducir al mínimo el acarreamiento de líquido radiactivo. El exceso de líquido fue eliminado de los filtros colocándolos sobre toallas de papel. Las membranas se secaron a RT durante toda la noche y fueron colocadas en cassettes y expuestas con películas de rayos X (Amersham) por 72 h a -80 °C o a RT (sólo aquellos filtros que se hibridaron con las sondas de las S-RNAsas, HT-B y 120 kDa). Las señales se obtuvieron mediante el revelado de las películas.

Análisis de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos fueron alineadas por el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). La identidad entre éstas fue calculada con el programa ALIGN (<http://workbench.sdsc.edu>) (Myers and Miller, 1988).

Ensayos tipo réplica en Northern

El RNA total de estigmas/estilos de plantas de *N. alata* AC y AI, *N. plumbaginifolia*, *N. longiflora* 30A y *N. tabacum* fue preparado como se ha descrito y separado en un gel de formaldehído agarosa al 2%. El RNA fue transferido y fijado covalentemente a membranas

Hybond N⁺ (Amersham). La separación del RNA en geles de formaldehído agarosa y su respectiva transferencia a filtros se describen en las secciones siguientes. Las membranas se tiñeron con azul de metileno para corroborar iguales cantidades de cargado como se indica en la siguiente sección. Los cDNAs [³²P] de: *NaStEP*, *β-expansina*, *NaPEP II* y *HT-N* fueron usados como sonda en estos ensayos. Los filtros fueron bloqueados, hibridados, lavados y revelados como fue descrito en la sección previa con algunas modificaciones. El lavado adicional realizado para reducir al mínimo el acarreamiento de líquido radiactivo no se realizó y las membranas fueron colocadas inmediatamente en cassettes y expuestas con películas por 72 h a -80 °C.

Electroforesis de RNA en geles con formaldehído

Previamente a la preparación de los geles, las cámaras de electroforesis de RNA fueron lavadas con SDS 1% y posteriormente enjuagadas con agua tratada con 0.043 % DEPC (dietilpirocarbonato) para asegurar que estuviesen libres de RNAsas. Los geles de RNA empleados se realizaron al 2 % de agarosa, 1.11 % de formaldehído y 1 X de MOPS. Para hacer 30 ml de gel, se mezclaron 26.1 ml de H₂O con DEPC y 0.6 g de agarosa. Una vez disuelta la agarosa en un horno de microondas, se esperó a que alcanzara los 45 °C aproximadamente y se adicionaron 0.9 ml de formaldehído y 3 ml de MOPS 20 X (0.4 M MOPS, pH 7.0 ajustado con NaOH). La mezcla fue agitada y vertida en el molde dentro de la cámara de electroforesis donde fueron colocados previamente los peines. Tras la solidificación, los peines fueron retirados y el amortiguador de corrida (MOPS 1 X) adicionado a la cámara. Las muestras de RNA fueron aplicadas en los pozos adicionando previamente el buffer de carga de formamida. El gel se corrió a 80 volts por 30-40 min.

Purificación de cDNAs para su uso como sonda en los ensayos tipo Northern blot

Los cDNAs de *NaStEP*, *β-expansina*, *NaPEP II* y *HT-N* fueron recuperados de las clonas presentes en las bibliotecas mediante la purificación de DNA plasmídico. Las colonias de *E. coli* portando los cDNAs de interés fueron crecidas en medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 mg/l) por 16 h a 37 °C a 150 rpm. Los plásmidos correspondientes a cada una

de las clonas anteriores (pTriplEx2) fueron purificados por kit mediante el método de lisis alcalina siguiendo las instrucciones del proveedor (Qiagen). El mapa del pTriplEx2 se muestra en el Apéndice II. Los plásmidos purificados fueron digeridos con la enzima de restricción *SfiI* para liberar los cDNAs de interés del vector. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo partiendo de 60 μ l de cada uno de los plásmidos y digiriéndolos con 10 u de *SfiI* (New England Biolabs) en presencia del buffer NE 2 1X (New England Biolabs) y de BSA 1X (New England Biolabs). El volumen total de la reacción (70 μ l) fue completado con H₂O. De forma general, las reacciones de digestión se realizaron usando 0.5 u de enzima por cada 100 ng de plásmido a digerir (en el caso de digestiones simples y dobles donde las enzimas usadas fueron suministradas por el mismo proveedor). Las reacciones de digestión con *SfiI* se realizaron por 8 h a 37 °C y una vez finalizadas, éstas se aplicaron y visualizaron en geles de agarosa al 2 %. Los productos de digestión esperados fueron escindidos del gel y purificados por kit de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Qiagen). Los productos de digestión purificados correspondientes a los cDNAs de *NaStEP*, *β -expansina*, *NaPEP II* y *HT-N* fueron radioactivamente marcados con ³²P y usados como sondas en los ensayos tipo Northern blots.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los geles para el corrimiento de DNA fueron preparados al 2 % de agarosa. Para 30 ml de gel, se pesaron 0.6 mg de agarosa y se disolvieron en 30 ml de TBE. La agarosa se fundió en el horno de microondas, se adicionó a la solución bromuro de etidio (2.5 μ g/ml) y ésta fue vertida en el molde. La cámara de electroforesis se llenó con una dilución 1:10 del buffer de corrida TBE 10X (Tris-HCl 0.9 M, ácido bórico 0.9 M y EDTA pH 8.0 0.02 M). A las muestras de DNA se les adicionó una sexta parte del buffer de carga 6 X (0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xilene cyanol FF y 30 % glicerol) y fueron aplicadas en los pozos. El gel se corrió a 120 volts por 20-30 min y el resultado fue visualizado en un transiluminador (Macro Vue Uvis-20, Hoefer) bajo luz ultravioleta.

Transferencia de RNA a membranas

El RNA usado en los ensayos tipo Northern blot fue transferido a membranas de nylon usando una transferencia tradicional por capilaridad. El gel con las muestras de RNA se colocó invertido sobre dos papeles filtro Whatman 3MM humedecidos que descansaban sobre un soporte de acrílico dentro de un contenedor. El objetivo de humedecer los papeles filtro es evitar la presencia de burbujas que impidieran la transferencia del ácido nucleico. Al contenedor se le adicionó una dilución 1:2 del líquido de transferencia SSC 20X (NaCl 3 M y citrato de sodio 0.3 M) de forma tal que los papeles de filtro estuviesen en contacto por sus extremos con el líquido de transferencia. Las burbujas atrapadas entre el gel y el papel Whatman fueron eliminadas rodando un tubo de vidrio sobre la superficie del gel. Posteriormente, con las mismas dimensiones del gel y sobre éste, fue colocada una membrana de nylon previamente humedecida con la solución de transferencia. Las burbujas fueron eliminadas y dos papeles filtro con las mismas dimensiones de la membrana (el primero húmedo y el segundo seco) fueron puestos sobre la misma. Encima, se pusieron 6 cm de papel periódico de iguales dimensiones. Todo fue envuelto con plástico creando una cámara de humedad que impidiese la evaporación de la solución y se colocó encima un peso de aproximadamente 0.5 kg. El RNA se dejó transfiriendo de 12 a 18 h. La membrana se secó en una estufa a 37 °C por 1h. Terminado el secado, el filtro fue colocado con los ácidos nucleicos expuestos y el RNA se fijó covalentemente al mismo con dos ciclos de entrecruzamiento óptimo en el UVC 500 Ultraviolet Crosslinker HS1 (1400 X 100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ totales).

Para corroborar la transferencia de los ácidos nucleicos a las membranas, éstas fueron teñidas con azul de metileno (0.03 % azul de metileno y 0.3 M CH_3COONa). Para la tinción de las membranas, éstas se humedecieron, y se les adicionó azul de metileno por unos minutos. Se realizaron lavados con agua para eliminar el exceso de colorante y resaltar la incorporación específica del azul en la zona de la membrana ocupada fundamentalmente por el rRNA. El filtro así teñido fue usado como control de cantidad de cada muestra presente.

Resultados

Amplificación de las bibliotecas de cDNA

Después de infectar células Bm 25.8 de *E coli* con fagos λ TriplEx2, se recuperaron 13824 y 16896 colonias de las bibliotecas de cDNA de estilos/estigmas de plantas AC y AI respectivamente para hacer un total de 30720 colonias. Las colonias fueron transferidas por quintuplicado a membranas para su posterior escrutinio. En la Figura 7A se muestran 6 réplicas (una extra) de 384 colonias provenientes de la biblioteca de plantas AI crecidas sobre las membranas. Los filtros seleccionados para las hibridaciones con las sondas de interés fueron aquellos donde el crecimiento bacteriano no presentaba contaminación cruzada entre las colonias (Figura 7B).

Enriquecimiento de las bibliotecas de cDNA con genes modificadores

Con el fin de obtener bibliotecas altamente enriquecidas con genes modificadores que participen en la respuesta de rechazo del polen, incluidos los genes responsables del defecto en las plantas AC de la población 11613, las bibliotecas fueron sustraídas usando varias sondas. La eliminación de secuencias conocidas y abundantes, se realizó con sondas de cDNA de S-RNasas, de HT-B y de 120 K.

Paralelamente y tratando de recuperar los cDNAs cuyo patrón de expresión coincidiera con el de los genes requeridos para la reacción de AI, las bibliotecas fueron también sustraídas con mRNA de estilos de *N. plumbaginifolia*, una especie AC, con mRNA de botones florales inmaduros de plantas AI de *N. alata* y mRNA de estilos maduros de *N. alata* AI y AC esperando que los genes modificadores se expresasen preferencialmente en estilos maduros de *N. Alata* (AI) con poca o ninguna expresión en especies AC como *N. plumbaginifolia*.

Algunos de los patrones de hibridación obtenidos con cada una de las sondas empleadas se muestran en las Figuras 8 y 9. Como se puede apreciar, las diferencias en expresión entre plantas AC y AI de la población en estudio son mínimas.

A



B



Figura 7. Crecimiento de 384 colonias provenientes de la biblioteca de plantas AI sobre los filtros. A) Muestra de 6 réplicas de las mismas 384 colonias crecidas sobre medio de cultivo a 30 °C por 20 h. B) Ampliación de una de las réplicas. Las colonias crecieron como unidades independientes suficientemente separadas sin indicios de contaminación.

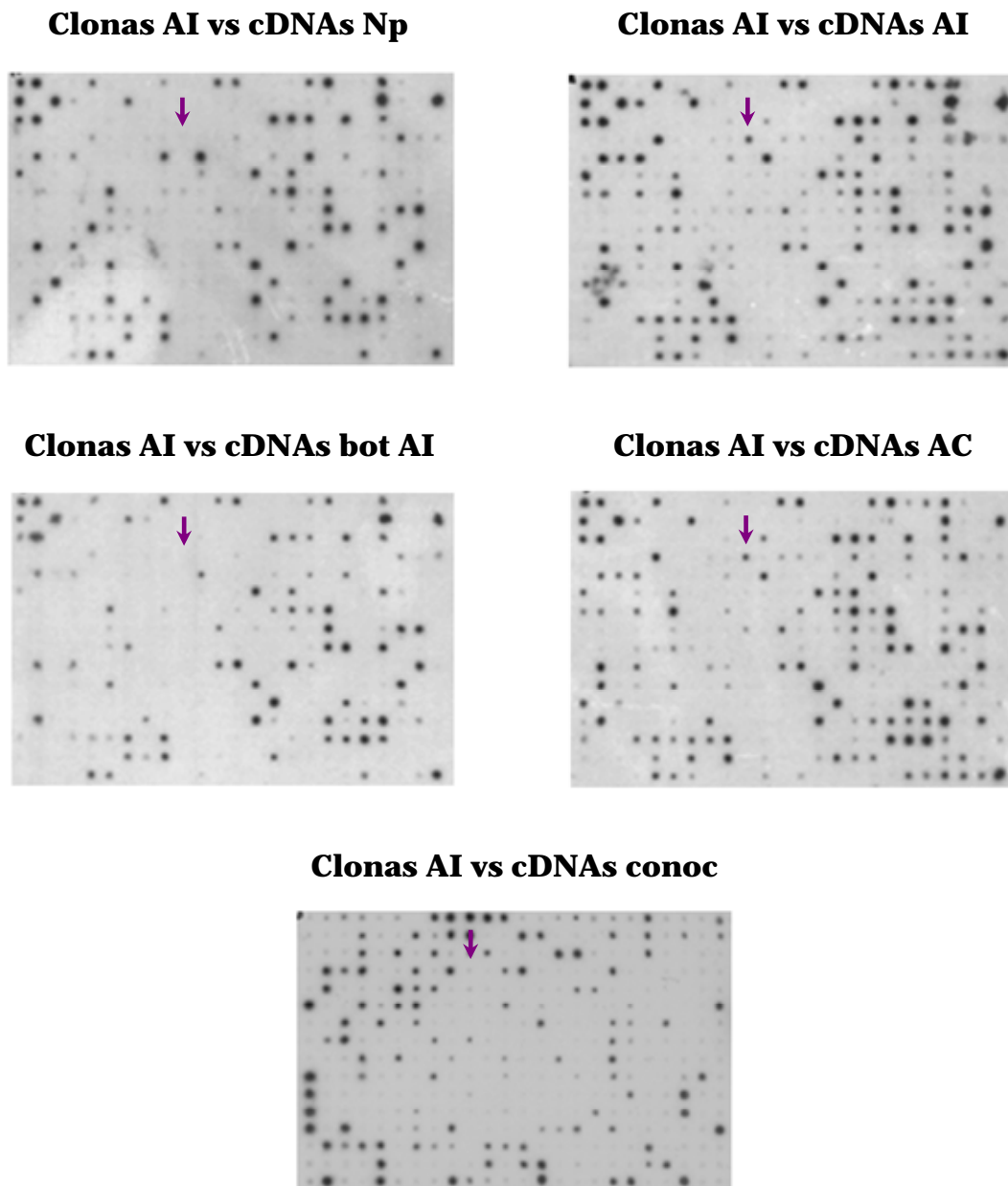


Figura 8. Patrones de expresión mostrados por los genes representados en las bibliotecas de cDNAs de estilos/estigmas de *N. alata*. Las 5 membranas son réplicas de las mismas 384 colonias de las bibliotecas de plantas AI hibridadas con el cDNA [^{32}P] proveniente de, estilos/estigmas maduros de *N. plumbaginifolia* (cDNAs Np), estilos/estigmas maduros de *N. alata* AI (cDNAs AI), estilos/estigmas maduros de *N. alata* AC (cDNAs AC), estilos/estigmas inmaduros de *N. alata* AI (cDNAs bot AI) y cDNAs de las S-RNAs, 12o K y HT-B (cDNAs conoc). La flecha indica un patrón de expresión característico de los genes que hasta la fecha están implicados en la respuesta de AI.

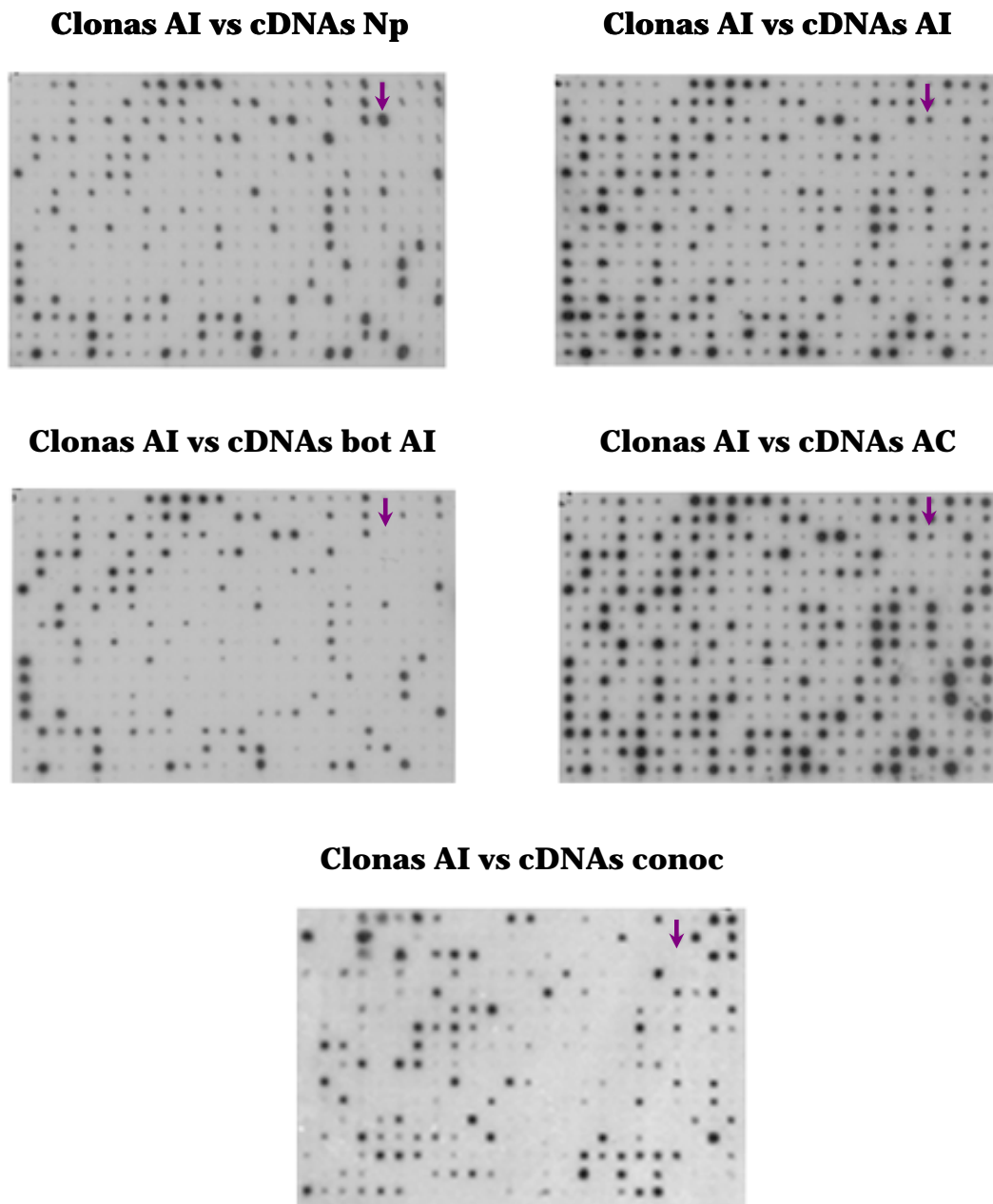


Figura 9. Patrones de expresión mostrados por los genes representados en las bibliotecas de cDNAs de estilos/estigmas de *N. alata*. Las 5 membranas son réplicas de las mismas 384 colonias de las bibliotecas de plantas AI hibridadas con el cDNA [³²P] proveniente de, estilos/estigmas maduros de *N. plumbaginifolia* (cDNAs Np), estilos/estigmas maduros de *N. alata* AI (cDNAs AI), estilos/estigmas maduros de *N. alata* AC (cDNAs AC), estilos/estigmas inmaduros de *N. alata* AI (cDNAs bot AI) y cDNAs de las S-RNAsas, 12o K y HT-B (cDNAs conoc). La flecha indica un patrón de expresión que puede ser característico de un gen implicado en interacciones polen-pistilo.

Las clonas seleccionadas para hacer un estudio de secuencia fueron aquellas que hibridaron solamente con los cDNAs [³²P] de estilos/estigmas de plantas AC o AI y cuya señal no fue detectada con el uso de cDNAs [³²P] de 1) genes conocidos, 2) estilos/estigmas de botones florales inmaduros y 3) estilos/estigmas de *N. plumbaginifolia* (Figura 8). También fueron secuenciadas las clonas que además de presentar estos patrones de expresión, hibridaron con el cDNA de *N. plumbaginifolia* (Figura 9).

Identificación de candidatos a genes modificadores

Un total de 1152 cDNAs contenidos en ambas bibliotecas fueron seleccionados como candidatos a genes modificadores y secuenciados. La estrategia seguida durante el análisis de las secuencias fue buscar genes que estuviesen excluidos de la biblioteca de plantas AC y que fuesen recuperados exclusivamente de la biblioteca de plantas AI.

Se encontró una sola familia génica con estas características y sus miembros se denominaron en principio *NaPEP II* (proteína II expresada en el pistilo de *N. alata*). *NaPEP II* fue recuperado 45 veces de las bibliotecas de cDNA. Esta familia está representada por 3 miembros o clases diferentes. Las clases A, B y C de *NaPEP II* fueron recuperadas de las bibliotecas 25, 12 y 6 veces respectivamente, distribuyéndose las secuencias de la siguiente forma: Clase A: 12 secuencias provenientes de la biblioteca AC y 13 de la biblioteca AI; Clase B: 12 secuencias provenientes de la biblioteca AI y Clase C: 3 secuencias provenientes de la biblioteca AC y 3 provenientes de la biblioteca AI (Figura 10A). Tres de los 45 cDNAs recuperados no fueron incluidos en la distribución por clases ya que estaban truncados y pueden pertenecer tanto a la clase A como a la B. La homología entre los cDNAs completos de cada clase a nivel de secuencia de nucleótidos se muestra en la Figura 10B. Como se puede observar, en la región codificante de estos genes, los de clase A y B tienen 6 inserciones hacia el extremo 5'. De forma general hay 33 cambios de nucleótidos, 23 de los cuales conducen a un cambio en la secuencia aminoacídica. La identidad de secuencia nucleotídica entre las clases A y B, A y C y B y C de *NaPEP II* es de 98.2 %, 94.3 % y 94.2 % respectivamente.

Otra de las estrategias usadas para la detección de posibles genes modificadores fue usar éstos como sondas en ensayos tipo réplica en Northern y determinar si su expresión no se encontraba asociada a especies AC dentro del género *Nicotiana*. Para ello fue purificado y transferido a membranas RNA total de estilos/estigmas de *N. alata* AI y otras tres especies AC (*N. plumbaginifolia*, *N. longiflora* y *N. tabacum*) y algunos cDNAs provenientes de las bibliotecas fueron usados como sonda para ensayos tipo réplica en Northern. La Figura 11 muestra el patrón de expresión de algunos de los genes recuperados de las bibliotecas. Los patrones de expresión de interés están representados en este caso por los genes *HT-N* y *NaStEP*.

Los nombres fueron asignados para *HT-N*, por homologías de secuencia aminoacídica con el gen *HT-B* de *N. alata* y para *NaStEP*, debido a una caracterización posterior del gen (capítulo IV). Como se puede apreciar, estos dos genes se expresan de forma abundante en estigmas/estilos de *N. alata* AI no alcanzándose a detectar transcritos de éstos en las especies AC de *Nicotiana* probadas. A diferencia de *HT-N* y *NaStEP*, la β -*expansina* y *NaPEP II* se expresan en los dos tipos de especies.

Discusión

Análisis y selección de los mejores candidatos a genes modificadores

Una muestra representativa de los mRNAs expresados en estilos/estigmas maduros de plantas AC y AI de *N. alata* fue recuperada a través de las bibliotecas de cDNAs. Estas bibliotecas permitieron comparar las secuencias de cDNAs provenientes de ambas con el fin de identificar los genes responsables del fenotipo de polinización mutante de las plantas AC de la población 11613.

Las hibridaciones de los cDNAs [³²P] de: estigmas/estilos maduros de *N. alata* AI; botones inmaduros del mismo cultivar; estigmas/estilos maduros de *N. alata* AC; *N. plumbaginifolia* y secuencias conocidas y abundantes con las bibliotecas, permitió determinar las clonas de éstas que portaban cDNAs con patrones de expresión similar al patrón de expresión de genes necesarios para la respuesta de AI.

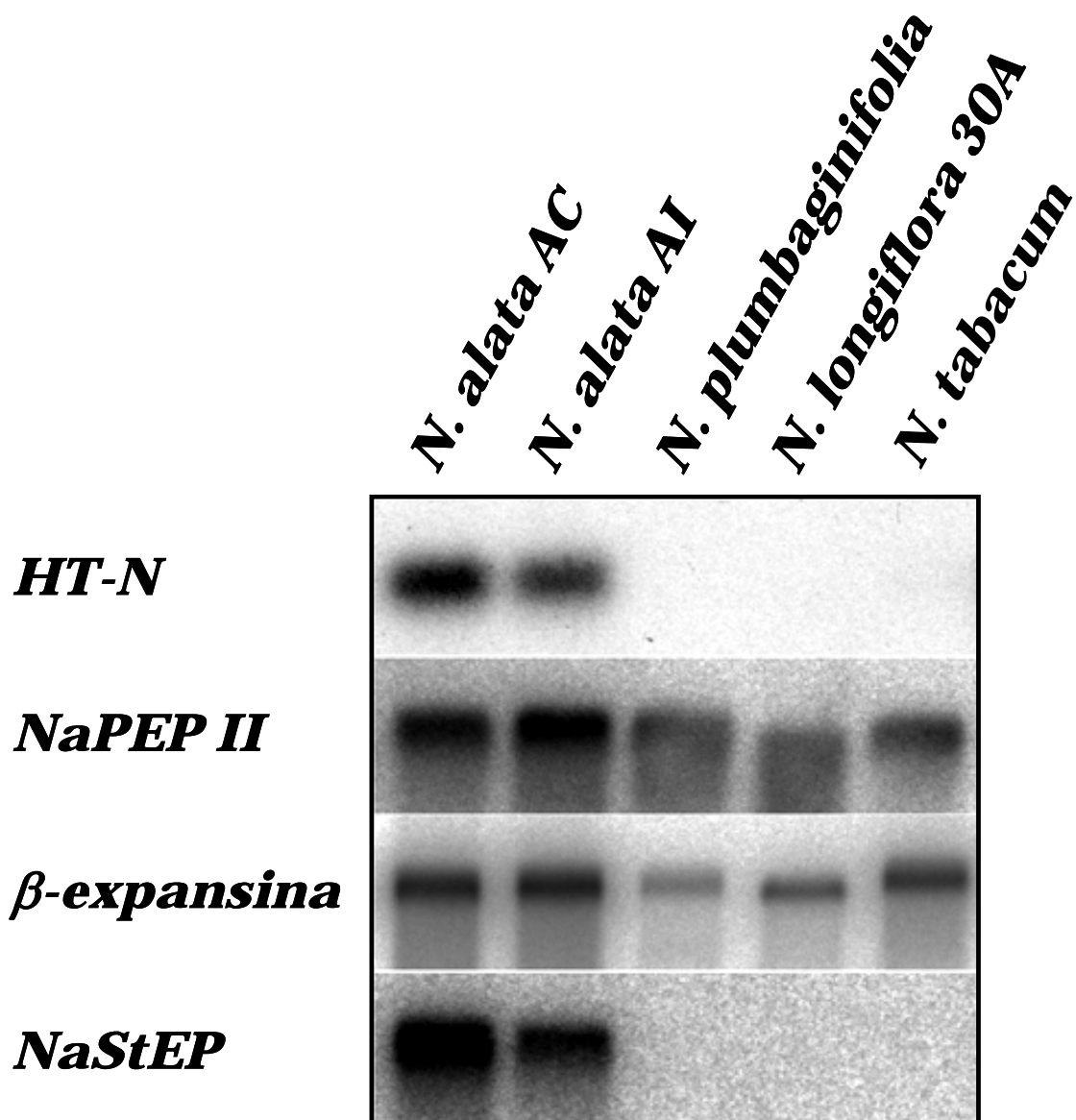


Figura 11. Patrones de expresión mostrados por algunos genes representados en las bibliotecas de cDNAs de estilos/estigmas de *N. alata*. Fueron cargados en el gel 5 μ g de RNA_T de cada especie y transferidos a membranas. Las sondas usadas en el ensayo tipo réplica en Northern se muestran a la izquierda.

El establecimiento de 5 categorías en cuanto a patrones de hibridación permitió: 1) enriquecer las bibliotecas con genes modificadores, 2) recuperar cDNAs exclusivos y desconocidos (en cuanto a función en respuesta de AI se refiere) de estilos/estigmas maduros de *N. alata* AC/AI y 3) recuperar cDNAs abundantes en estilos/estigmas maduros de *N. alata* AC/AI y *N. plumbaginifolia*. Aunque se hubiese esperado que los candidatos a genes modificadores se expresaran sólo en estilos maduros de *N. alata* AI, especies AC podrían deber su fenotipo de polinización a la ausencia de alguno de los genes requeridos en la vía de rechazo del polen, lo cual no excluye que puedan presentar genes involucrados en esta reacción. De esta forma, 1152 genes provenientes de bibliotecas de cDNAs de plantas AC y AI fueron seleccionados y secuenciados, recuperándose mayoritariamente sólo aquellos cDNAs cuyo patrón de expresión coincidiera con el patrón de expresión característico de los genes que hasta la fecha se conoce están involucrados en el rechazo del polen.

NaPEP IIB se recupera exclusivamente de las bibliotecas AI

Durante el análisis de los 1152 cDNAs recuperados de las bibliotecas, el objetivo primario fue buscar genes que estuviesen excluidos de la biblioteca de plantas AC y que solo fuesen recuperados de la biblioteca de plantas AI. La comparación entre las secuencias de las bibliotecas AC y AI mostró que solo un gen perteneciente a una familia génica de tres miembros fue recuperado exclusivamente de la biblioteca AI. Dos de los tres miembros de esta familia (*NaPEP IIA* y *NaPEP IIC*) se encuentran representados 31 veces en ambas bibliotecas mientras que *NaPEP IIB* está representado de forma única 12 veces en la biblioteca AI. La presencia de *NaPEP IIB* en la biblioteca AI y su ausencia en la AC lo convirtieron en el candidato ideal a gen modificador responsable del fenotipo de polinización mutante en las plantas AC de la población 11613 de *N. alata*.

NaStEP y HT-N se expresan solo en especies AI

En busca de otros posibles genes modificadores cuya expresión fuera exclusiva de especies AI, algunos de los cDNAs recuperados de las bibliotecas fueron usados como sondas en ensayos tipo

Northern blot utilizando RNA total de estilos de especies AC dentro del género *Nicotiana* (*N. plumbaginifolia*, *N. longiflora 30 A*, *Nicotiana tabacum*). Los patrones de hibridación mostrados en la Figura 11 coinciden con los escrutinios realizados durante el enriquecimiento de las bibliotecas e indican que los genes *HT-B* y *NaStEP*, además de estar ausentes en *N. plumbaginifolia*, no se expresan en el resto de las especies AC probadas. La detección de los mRNAs correspondientes a *HT-B* y *NaStEP* en *N. alata* AI y su ausencia en especies AC como *N. plumbaginifolia*, *N. longiflora 30 A* y *Nicotiana tabacum*, indican que estos genes podrían desempeñar algún papel durante la respuesta de rechazo del polen.

Acorde con los patrones observados durante el escrutinio de las bibliotecas, *NaPEP II* hibridó con el mRNA de *N. plumbaginifolia* y con los mRNAs proveniente de estilos maduros de *N. longiflora 30 A* y de *N. tabacum*. La presencia de *NaPEP II* en todas las especies probadas, independientemente de la capacidad de éstas para rechazar o no su propio polen (Figura 11), no descarta la posibilidad de que este gen pudiese estar involucrado en la respuesta de AI ya que si tenemos en cuenta que las plantas AC evolucionaron a partir de las plantas AI, en teoría los entornos genéticos serían muy similares y las diferencias en el control genético de la AI estarían dadas por la pérdida de algunos y no de todos los elementos involucrados en el vía bioquímica del rechazo del polen. Es decir, en estas especies podrían existir genes que en las especies AI estuvieran controlando la respuesta de rechazo del propio polen. Además, la sonda de *NaPEP II* usada en los ensayos tipo Northern blot, no permite discernir entre las tres clases existentes de este gen.

El patrón de hibridación de los genes en las membranas de RNA y las secuencias recuperadas exclusivamente de la biblioteca de plantas AI, revelaron la existencia de dos posibles genes modificadores, *NaPEP IIB* y *NaStEP* cuyos estudios detallados se encuentran en los capítulos III y IV, respectivamente.

CAPÍTULO III

Análisis segregacional y caracterización molecular de *NaPEP IIB* en *Nicotiana*

Introducción

La recuperación exclusiva de *NaPEP IIB* de la biblioteca de cDNAs de estilos/estigmas de plantas AI, hizo pensar que este gen podía ser uno de los dos factores defectuosos en las plantas mutantes (AC). Para probar esta hipótesis, se llevaron a cabo estudios segregacionales y así determinar si el gen correspondiente a este cDNA cosegregaba con el fenotipo de incompatibilidad en la población 11613. Esto permitiría relacionarlo con la respuesta de rechazo del polen. De forma adicional, se estudió el patrón de expresión espacio-temporal de *NaPEP II* teniendo en cuenta que los genes que hasta la fecha se conocen que participan en la respuesta de rechazo del polen en *N. alata*, son: 1) exclusivos de órganos reproductivos y 2) presentan bajos niveles de expresión en pistilos inmaduros que se incrementan alcanzando su máximo hacia la antesis.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Las plantas de AI de *N. alata* (genotipo *S₁₀₅S₁₀₅*), *N. glauca* y *N. tabacum* cv. Praecox fueron descritas previamente (Beecher and McClure, 2001; Murfett *et al.*, 1994, 1996). *N. plumbaginifolia* (número de inventario TW107, acceso 43B), *N. longiflora* (número de inventario TW79, acceso 30A), *N. forgetiana* (número de inventario TW50, 21A) y *N. bonariensis* (número de inventario TW28, acceso 11) se obtuvieron de la colección de germoplasma de tabaco de EU (Laboratorio de investigación de cultivos, USDA-ARS, Oxford, NC, EU). *N. alata* cv Breakthrough (BT) se obtuvo de Thompson y Morgan, Jackson, NJ, EU. Todo el material vegetal creció en invernadero bajo condiciones controladas estándares.

Diseño de oligos y reacciones de PCRs

Los primers empleados durante las reacciones de PCR para determinar la segregación de los miembros de la familia de NaPEP II en las plantas de la población 11613 se muestran a continuación. P18_2set_all_L: 5´ TCACATTCCAATTTCCCTTGCTCTTCTGTTTCCTC 3´, P18_2SET_III_R: 5´ CTGCACCCATTACGGCCAGTGACACCTTTA 3´ (para amplificar a *NaPEP IIC*), P18_2set_I_R: 5´ ACAATGTTCCACAGCTGGCTGCTTTGTCAAGATG 3´ (para amplificar a *NaPEP IIA*) y P18_2set_II_R: 5´ TCTTGACACTCCATTCCAATCCACTAGCCAACCTCAC 3´ (para amplificar a *NaPEP IIB*). El diseño de los oligos fue manual y sus características se verificaron con el programa Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.com>). Las reacciones de PCR (300 ng de DNA genómico, amortiguador de PCR 1X, dNTPs 0.25 mM, mezcla de primers 0.5 µM cada uno, polimerasa JumpStart (Sigma) y H₂O hasta completar un volumen de 20 µl) se desarrollaron en un equipo de PCR (Gene Amp, PCR System 9700, PE Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C por 2 min (desnaturalización); 30 ciclos a 94 °C por 30 s (desnaturalización), 69 °C por 1 min (alineamiento) y 72 °C por 1 min (extensión); un ciclo a 72 °C por 4 min (extensión final). Los productos de PCR obtenidos fueron aplicados a geles de agarosa al 2 % y corridos como se describe en el Capítulo II (Materiales y Métodos). Las fotos de los geles de agarosa se tomaron usando el equipo Fluor S.

Purificación de DNA genómico

Hojas de plantas AC y AI de la población 11613 fueron colectadas, maceradas en nitrógeno líquido y su DNA extraído usando el kit de purificación de DNA genómico (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Extracción de RNA_T y ensayos tipo réplica en Northern

El RNA total de hojas, tallos, sépalos, pétalos y diferentes etapas del desarrollo de las anteras, estilos y estigmas fueron preparados y separados en geles de agarosa formaldehído al 2% como se ha descrito en el Capítulo II (Materiales y Métodos). El RNA_T fue transferido a membranas Hybond N⁺ (Amersham) y teñido con azul de metileno para corroborar iguales cantidades de cargado. Los filtros fueron bloqueados con la solución de hibridación (0.3 M amortiguador de fosfato de sodio pH 7.2, 7 % SDS y 1mM EDTA pH 8) por una hora al menos a 68 °C y con agitación suave. La solución se desechó y se adicionaron a las membranas 7.0 – 10.0 ml de la solución de hibridación con las sondas de cDNA [³²P]. Los filtros fueron incubados toda la noche a 68°C con agitación suave. Con el objetivo de eliminar hibridaciones inespecíficas, los filtros hibridados fueron lavados con una solución de 0.4 X SSC y 0.1 % SDS por 15 min dos veces. Posteriormente, se realizaron dos lavados de mayor astringencia usando una solución de 0.1 X SSC y 0.1 % SDS por 15 min. Todos los lavados se desarrollaron a 68°C. Las señales fueron detectadas usando películas autoradiográficas. Los filtros se colocaron en un cassette y fueron expuestos con una película de rayos X por 72 h a -80°C.

Análisis de secuencias

Para la búsqueda de homologías, se usó el servidor 2.2.12 del NCBI GenBank BLAST (Altschul *et al.*, 1997) a través del BLASTX suministrado por el Centro de Supercómputo de San Diego (<http://workbench.sdsc.edu>). Las secuencias de nucleótidos fueron alineadas por el programa ClustalW (Capítulo II, Materiales y Métodos) y las secuencias de proteínas por el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). La identidad entre éstas fue calculada con el programa ALIGN (<http://workbench.sdsc.edu>) (Myers and Miller, 1988). El perfil de hidropatía se obtuvo usando el programa GREASE (Kyte and Doolittle, 1982), administrado por el Centro de Supercómputo de San Diego. Los sitios de *N*-glicosilación fueron predichos usando el servidor 1.0 del NetNGlyc para proteínas humanas ([http:// us.expasy.org/](http://us.expasy.org/)). El programa SignalP disponible en la Red en

la página [http:// us.expasy.org/](http://us.expasy.org/) fue usado para las predicciones del péptido señal y los sitios de ruptura, usando el modelo de redes neuronales (Bendtsen *et al.*, 2004) y el de hidden Markov (Nielsen and Krogh, 1998) en eucariotes. La localización subcelular de las proteínas fue determinada con el servidor 1.3 del LOCSVMPSI (<http://bioinformatics.ustc.edu.cn>) (Xie *et al.*, 2005). La búsqueda por dominios se realizó con el Pfam (Bateman *et al.*, 2002).

Clonación de los productos de PCR de NaPEP IIA, B y C en el pGEM-T Easy

Los productos de PCR de *NaPEP IIA, B y C* obtenidos a partir de la amplificación de DNA genómico (gDNA) de las plantas AC y AI con los primers correspondientes fueron clonados en el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega) [Apéndice III] como se indica a continuación. Los productos de PCR aplicados y visualizados en geles de agarosa al 2 % fueron escindidos del gel y purificados por kit de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Marligen). Los fragmentos purificados fueron ligados al vector de clonación siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega). La mitad de la reacción de ligado fue empleada para transformar células competentes de *E. coli* cepa DH5 α . Algunas colonias blancas recuperadas fueron crecidas en medio LB líquido y sus plásmidos respectivos purificados como se ha descrito previamente (Materiales y Métodos, Capítulo II).

Transformación de células competentes de E. coli por choque térmico

Para la transformación por choque térmico de *E. coli*, se utilizó una alícuota de 100 μ l de células competentes de la cepa de interés. En el caso de usar reacciones de digestión entre fragmentos de DNA, la mitad de la reacción fue adicionada a las células. Si para la transformación fue empleado directamente DNA plasmídico, se agregó aproximadamente 1 μ g del mismo. Las células se mantuvieron en hielo por 30 min, se sometieron a un choque térmico de 42 °C por 45 s y se incubaron nuevamente en hielo por 2 min más. Posteriormente, se adicionaron 950 μ l de medio SOC (LB líquido, 0.02 M glucosa) a las células y se incubaron 2 h aproximadamente a 37 °C a 150 rpm. Las células se centrifugaron 3 min a 5000 g y el sobrenadante se descartó. El

precipitado fue resuspendido en 200 μ l de LB y una alícuota de estas células transformadas (90-200 μ l) se esparció en placas de cultivo LB sólido suplementado con los antibióticos y reactivos que les permiten crecer a las bacterias solo si han adquirido los plásmidos de interés. Las células transformadas con el pGEM-T Easy fueron crecidas en medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 mg/l), IPTG (0.5 mM) y XGAL (80 μ g/ml). La preparación de los suplementos de los medios de cultivo se encuentra en el Apéndice I, Tabla 3. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.

Clonación del cDNA de NaPEP IIB en el vector de expresión

El cDNA de *NaPEP IIB* con los sitios *Sal* I y *Bam*H I se obtuvo por PCR usando los oligonucleótidos siguientes: PEP II_BamH I_L, 5' CGCGGGATCCATGGCTCCAATTTCAA 3' y PEP II_Sal I_R, 5' TTCAGTCGACCTAGTCCAGCTTTTTAGGAGG 3'. Los productos de PCR fueron digeridos con ambas enzimas y ligados en marco con el gen de la glutation *S*-transferasa (GST) contenido en el vector de expresión pGEX-4T-2 (Amersham Pharmacia Biotech Piscataway, NJ) [Apéndice IV]. Las construcciones del plásmido recombinante fueron transformadas en *E. coli* cepa BL21-CodonPlus (RIL) (Stratagene) por choque térmico como se ha descrito en la sección anterior y se crecieron en medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 mg/l) [Ibarra, 2005].

Sobreexpresión y purificación de la proteína de fusión recombinante GST:NaPEP IIB

Las células de *E. coli* transformadas fueron inducidas para sobreexpresar NaPEP IIB por adición de 1- β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) [Ibarra, 2005]. Los extractos crudos de las proteínas se obtuvieron por ruptura celular con lisozima (Gamage *et al.*, 2000). Las proteínas de fusión fueron purificadas en baño por cromatografía de afinidad con glutation sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech) como lo recomiendan los proveedores, con ligeras

modificaciones. Los dos primeros eluatos desarrollados para recuperar la fracción unida se colectaron juntos (B) y el tercero se mantuvo separado (Bu).

Aislamiento de proteínas

Los tejidos vegetales de raíces, tallos, hojas, flores, sépalos, pétalos, pistilos, estilos, estigmas, ovarios y anteras congelados fueron macerados hasta un polvo fino y extraídos con 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 con 1 % β -mercaptoetanol. El extracto crudo obtenido fue fuertemente agitado usando un vortex y clarificado por centrifugación por 10 min a 9271 *g* para precipitar los restos celulares. Los sobrenadantes fueron recuperados y conservados a -80°C hasta su uso. La concentración de proteína fue estimada por el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Las extracciones secuenciales se desarrollaron como describe Wu *et al.*, 2000 con ligeras modificaciones. Después del segundo lavado, el tejido estilar residual fue macerado usando nitrógeno líquido y extraído en 400 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 8 con 1% Triton X-100.

Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes

Antes de realizar los geles, las placas de vidrio fueron lavadas con etanol al 96 % para eliminar restos de grasa. Para preparar el gel separador, fueron mezclados en un tubo de vidrio o polipropileno el amortiguador separador, el H_2O , la mezcla acrilamida-bisacrilamida, el persulfato de amonio y el TEMED de acuerdo a la Tabla 1, Apéndice V. La mezcla se vertió en los moldes, fue cubierta con isopropanol para obtener una superficie plana y se dejó polimerizar por 20 min a RT. El isopropanol fue retirado del molde y el gel concentrador fue añadido sobre el gel separador. Los peines se colocaron inmediatamente sin dejar burbujas de aire que pudieran inhibir la polimerización del gel. Para la preparación del gel concentrador se mezclaron el amortiguador concentrador, agua, TEMED acrilamida-bisacrilamida y el persulfato de amonio para realizar geles de las dimensiones indicadas (Apéndice V, Tabla 2). La composición de los

amortiguadores separador y concentrador se muestra en el Apéndice V, Tabla 3. Al término de la polimerización, el gel fue colocado en la cámara de electroforesis (Biorad) y se agregó una dilución 1:10 del amortiguador de electrodos Tris-glicina 10 X [Tris base 0.25 M, glicina 1.92 M y SDS 1% (w/v)]. Las muestras proteicas fueron preparadas adicionando una sexta parte del volumen de las mismas de tampón de muestra 6X [Tris HCl 0.35 M, pH 6.8, SDS 10.28% (w/v), glicerol 36% (v/v), DTT 0.6 M, azul de bromofenol 0.012 % (w/v)] y se calentaron a 95 – 100 °C por 5 min. El calentamiento desnaturaliza las posibles proteasas de la muestra que suelen ser resistentes al SDS e incluso activarse por este detergente a bajas temperaturas. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) en geles de poliacrilamida al 12% o 15%. Todos los experimentos con proteínas requirieron la realización de geles por duplicado. Uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie y/o nitrato de plata y utilizado como control positivo de carga y de corrida; el otro fue empleado para experimentos de inmunodetección.

Tinción de los geles de poliacrilamida

Para la tinción de los geles y corroborar que se aplicaron iguales cantidades de proteínas en los pozos, se empleó azul brillante de Coomassie (etanol 20%, ácido fosfórico 1.6%, sulfato de amonio 8% y azul brillante de Coomassie G-250 0.08%) el cual se dejó en contacto con el gel durante toda la noche. Para desteñir el gel y observar las bandas de interés, se eliminó el Coomassie y se realizaron lavados con agua hasta que las bandas fueron visualizadas.

La tinción con nitrato de plata se realizó usando el kit de tinción con nitrato de plata siguiendo las instrucciones del proveedor.

Preparación de los anticuerpos anti NaPEP II

Para la inmunodetección de NaPEP II se sintetizó un péptido diseñado a partir de una región conservada en las tres clases. El péptido sintético fue inyectado en conejos para producir suero anti NaPEP II que fue purificado por afinidad.

Transferencia de proteínas a membranas

Las proteínas fueron transferidas a membrana usando un sistema semi-seco proporcionado por el equipo de transferencia TRANS-BLOT SD Semi-dry transfer cell (BIO-RAD). La electrotransferencia de proteínas en geles de 8.5 X 6.5 cm se llevó a cabo por 1h a 75 mA y 4 – 6V. Terminada la transferencia, la membrana fue teñida con Rojo de Ponceau S (Ponceau 0.1%, ácido acético 5%) para corroborar la presencia de proteínas en la misma. Esta tinción es reversible pues el Ponceau se une a las proteínas a un pH ácido y es liberado cuando se neutraliza.

Inmunodetección de las proteínas

Las membranas fueron bloqueadas toda la noche con solución bloqueadora (BB= PBS: Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5; leche 5% y Tween 1 %) a 4°C con agitación suave. La solución bloqueadora fue reemplazada por el anticuerpo primario diluido en BB y la incubación continuó por al menos 3 h a RT. Las diluciones de los anticuerpos primarios usados fueron: anti-GST 1:2500, anti-120 K 1:3000, anti-NATTS 1:5000 y anti-NaPEP II 1:20000, 1:25000 y 1:30000 según se indique. Después de la incubación, los filtros fueron lavados tres veces con PBS, dos veces por 5 min y una, por 10 min e incubados por una hora al menos con el anticuerpo secundario (anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina [Sigma-Aldrich] o anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano [Amersham] según se indique). Las diluciones usadas para los anticuerpos secundarios fueron: anti-peroxidasa 1:20000 y anti-fosfatasa 1: 10000. Las membranas fueron entonces lavadas tres veces con PBS por 10 min. Para la identificación de las proteínas fue utilizado el sistema de quimioluminiscencia (Amersham) si el anticuerpo secundario usado fue el anti-peroxidasa o el sistema de la fosfatasa alcalina si el anticuerpo secundario usado para la inmunodetección fue anti-fosfatasa. En el sistema de quimioluminiscencia, los filtros lavados fueron embebidos por tres minutos en la solución de quimioluminiscencia (Apéndice VI, Tabla 1 y 2), colocados entre dos acetatos en un cassette y expuestos en la oscuridad con una película de rayos X. Las señales fueron detectadas por

autoradiografía. El segundo anticuerpo hidroliza el sustrato (el luminol) y produce luminiscencia provocando que la película de rayos X se vea en el lugar donde hay reconocimiento una vez que se revele la misma. Para la detección de señales empleando el sistema de la fosfatasa alcalina, los filtros se incubaron por 10 min con el amortiguador de la fosfatasa alcalina (APB= NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9.5). Las membranas fueron embebidas en la solución de sustrato fresco (10 ml de amortiguador de la fosfatasa alcalina, 100 µl del stock de nitro blue tetrazolium (NBT) [33 mg/ml] y 100 µl del stock de fosfato de bromocloroindolil (BCIP) [17 mg/ml]). La preparación de los sustratos se encuentra en el Apéndice VI, Tabla 3. Los filtros se incubaron con agitación suave a RT hasta que se hiciera visible la señal púrpura. El desarrollo del color se detuvo mediante lavados de la membrana con H₂O destilada y una alícuota de EDTA 50 mM, pH 8.

Resultados

Selección de condiciones óptimas para la realización del multiplex PCR

Antes de proceder al análisis segregacional, fue necesario determinar las condiciones de amplificación adecuadas para el PCR múltiple. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada una de las clases de *NaPEP II* (Figura 12). Se utilizó un primer común hacia el extremo 5' y la amplificación diferencial estuvo dada por el diseño de tres oligos específicos para cada clase hacia el extremo 3'. La única modificación de estos tres oligos se realizó en el último nucleótido del extremo 3' OH. Los oligonucleótidos fueron diseñados dentro de la región codificante. El empleo de los oligos específicos para la amplificación de *NaPEP IIA*, *NaPEP IIB* y *NaPEP IIC*, genera fragmentos de 471 pb, 381 pb y 540 pb, respectivamente. Como se puede apreciar en la Figura 13A, el empleo de los oligos específicos para amplificar cada uno de los miembros de *NaPEP II* generó productos solo en los casos donde se usó como plásmido molde aquel que contenía el DNA justo para el cual había sido diseñado el primer.

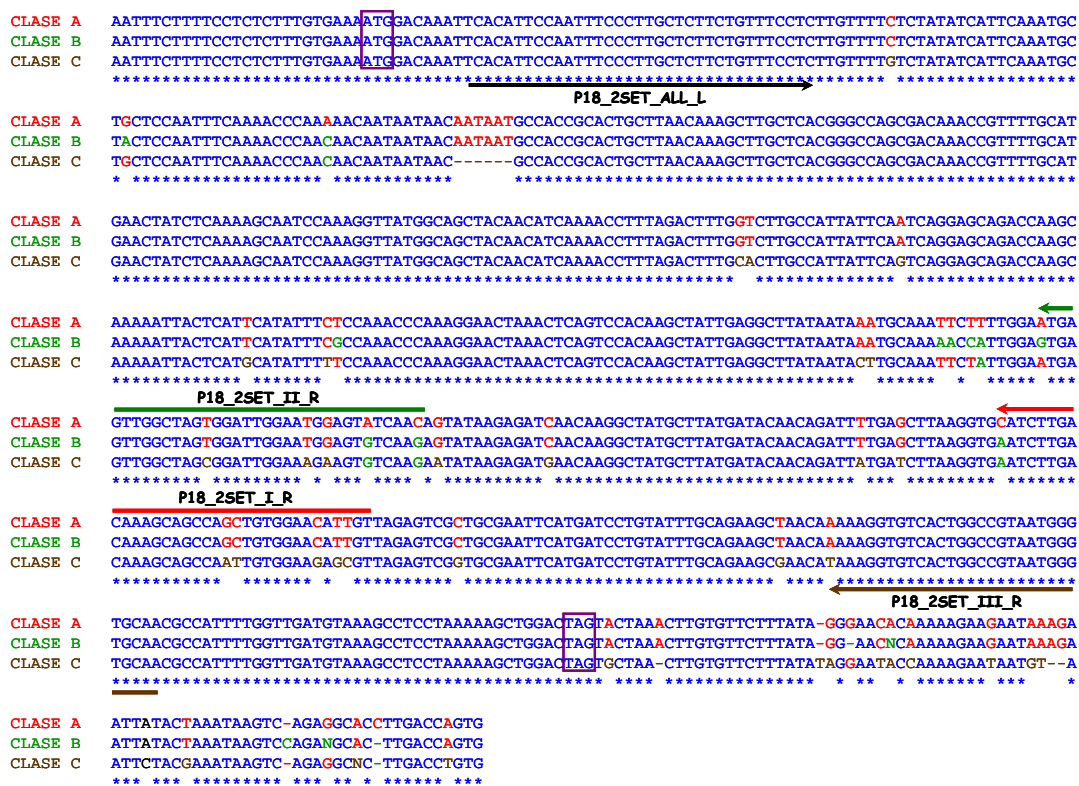
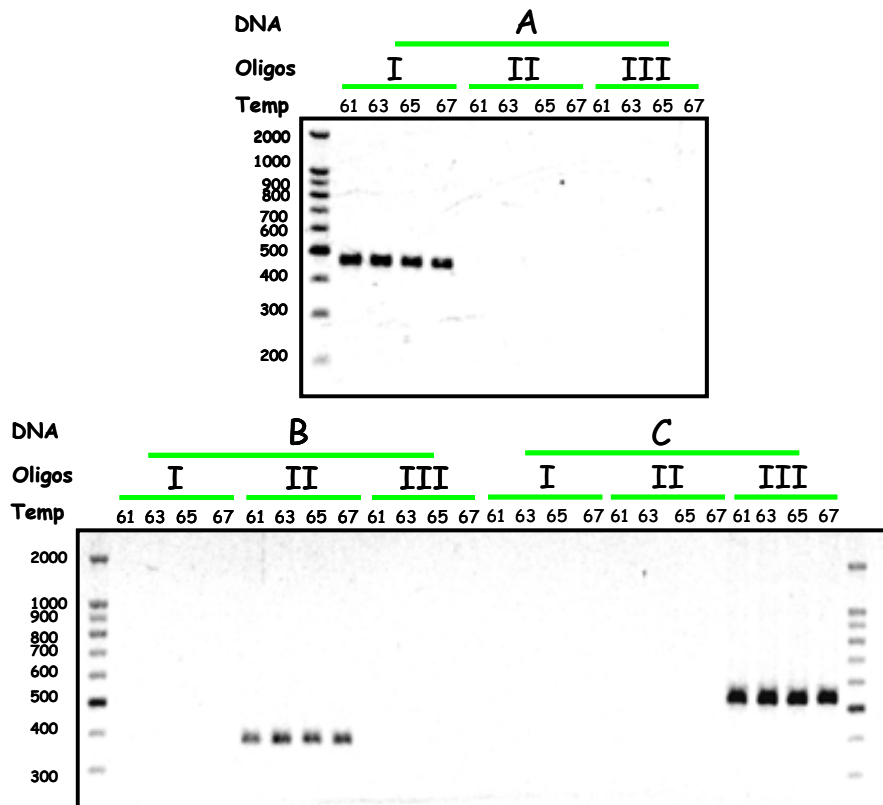


Figura 12. Diseño de oligos específicos para amplificar los genes *NaPEP IIA*, *NaPEP IIB* y *NaPEP IIC* en las plantas de población 11613 de *N. alata*. El alineamiento entre las tres clases se realizó usando el ClustalW. Los sitios de anclaje de los primers están indicados por las flechas. Los colores designan las amplificaciones específicas para cada clase: rojo, clase A, verde clase B y café, clase C. El alineamiento de las secuencias de nucleótidos muestra que las variaciones en el diseño de los primers estuvieron dirigidas hacia el extremo 3´ OH de los primers P18_2SET_III_R, P18_2SET_II_R y P18_2SET_I_R. El primer diseñado a partir del extremo 5´ de las secuencias (P18_2SET_all_L) es común a todas y está representado por una flecha negra. Los codones de término e inicio de la traducción se encuentran enmarcados. Los nucleótidos conservados están representados por *. Los guiones en la secuencia se introdujeron para mantener un buen alineamiento.

A



B

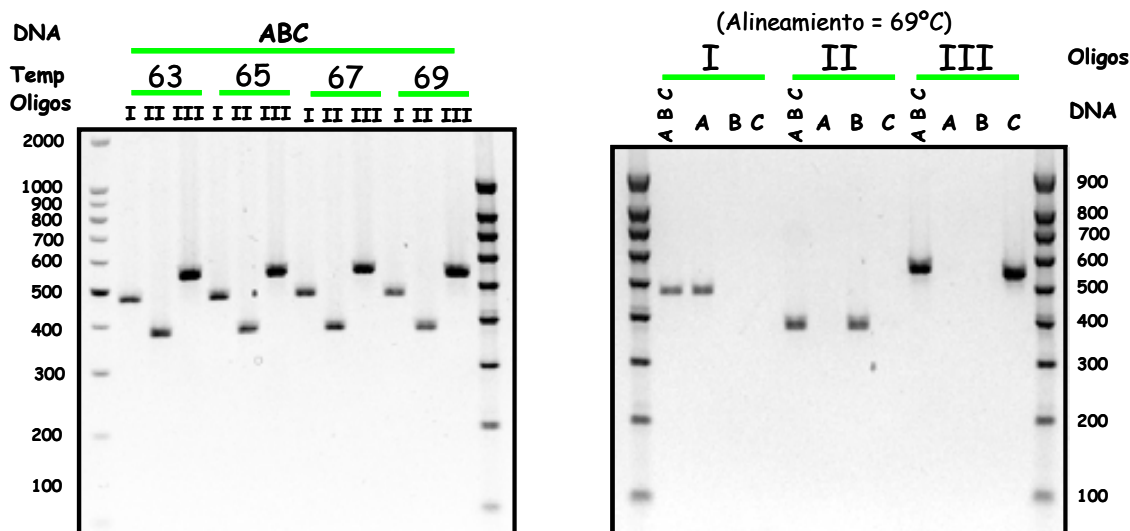


Figura 13. PCRs desarrollados con los primers diseñados para amplificar los genes *NaPEP IIA*, *NaPEP IIB* y *NaPEP IIC* en las plantas de población 11613 de *N alata*. A) Reacciones realizadas para corroborar el funcionamiento y especificidad de los primers. B) PCR múltiple. Los DNAs plasmídicos portando los cDNAs de *NaPEP IIA*, *B* y *C* usados como molde en las reacciones de amplificación se muestran con letras mayúsculas. Los números romanos representan los oligos empleados: para amplificar la clase A (I), la clase B (II) y la clase C (III). Los números arábigos señalan las temperaturas de alineamiento usadas en los PCRs. Los productos de PCR se cargaron y corrieron en geles de agarosa al 2 %.

Es decir, la reacción de PCR donde se usaron los cebadores específicos para *NaPEP IIA* solo amplificó un fragmento único de 471 pb cuando se adicionó como DNA molde el cDNA de *NaPEP IIA*, no detectándose amplificación alguna cuando los mismos oligonucleótidos fueron usados en reacciones de PCR empleando como DNA molde el cDNA de *NaPEP IIB* y *NaPEP IIC*. Los mismos resultados se obtuvieron con el resto de los oligos, una banda de 381 pb cuando se usaron los cebadores específicos para *NaPEP IIB* y como DNA molde el cDNA de *NaPEP IIB* y una banda de 540 pb durante las reacciones de PCR empleando los oligos específicos para *NaPEP IIC* y como DNA templado el de *NaPEP IIC*. Lo anterior demuestra que aunque los cDNAs de las tres clases estuviesen mezclados, los fragmentos de PCR obtenidos solo se deberían a amplificaciones específicas entre los oligonucleótidos y el cDNA molde para el cual éstos fueron diseñados (Figura 13B). El uso de intervalos de temperatura de alineamiento entre 61-69 °C en la reacción de PCR resultó en idénticas amplificaciones (Figura 13).

Análisis segregacional de NaPEP II en la población 11613

Para determinar si *NaPEP IIB* segregaba con el fenotipo de AI en la población 11613, se realizaron ensayos de PCR mediante la técnica de PCR múltiple a partir de DNA genómico de plantas AC y AI de esta población. Las condiciones para la realización de la reacción de PCR están descritas en la sección de Materiales y Métodos y la temperatura de alineamiento empleada fue de 69 °C. Trece plantas AC y 46 AI de la población 11613 fueron analizadas. Los PCR correspondientes se muestran en la Figura 14. Como se puede apreciar, *NaPEP IIB* (381 pb) fue detectado tanto en las plantas AC como AI. Las frecuencias de aparición de *NaPEP IIA*, *B* y *C* fueron: 1) en las plantas AC: 69.23 %, 53.85 % y 92.31 % y 2) en las plantas AI: 71.74 %, 60.87 % y 63.39 %, respectivamente (Figura 15, panel superior). Los datos de segregación no muestran la existencia de alguna combinación particular de los miembros de esta familia génica característica de los fenotipos de polinización (Figura 15, Panel inferior).

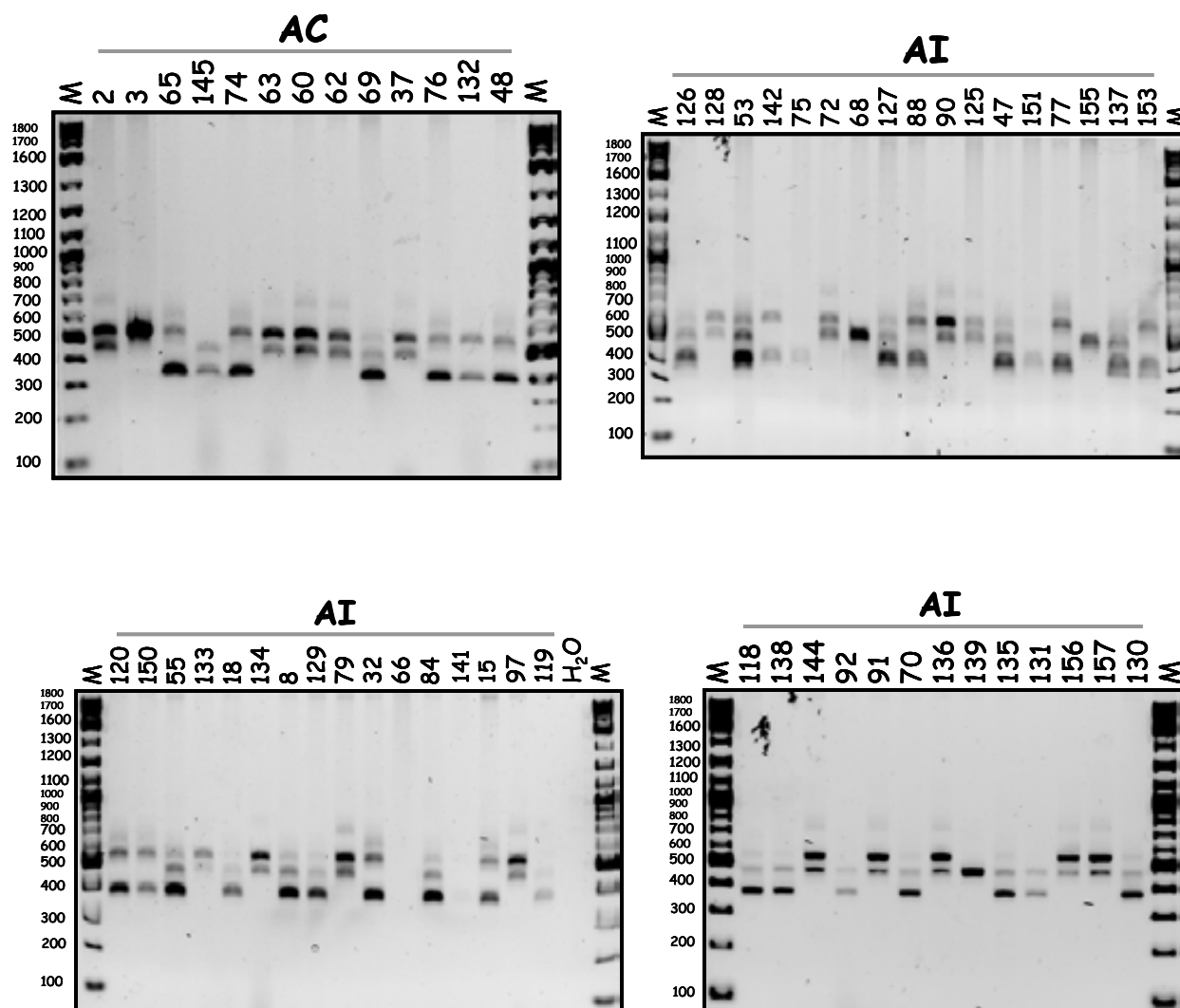


Figura 14. Segregación de *NaPEP IIA*, *B* y *C* en la población 11613 de *N. alata*. Las reacciones de PCR se realizaron a partir de 300 ng de DNA genómico. Veinte μ l de las reacciones de PCR se cargaron en geles de agarosa al 2 %. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en pb. El fenotipo de polinización de las plantas está indicado encima de cada gel al igual que los números asignados a cada una de los individuos en la población. Los tamaños esperados para los productos de PCR de *NaPEP IIA*, *NaPEP IIB* y *NaPEP IIC* son: 471 pb, 381 pb y 540 pb respectivamente.

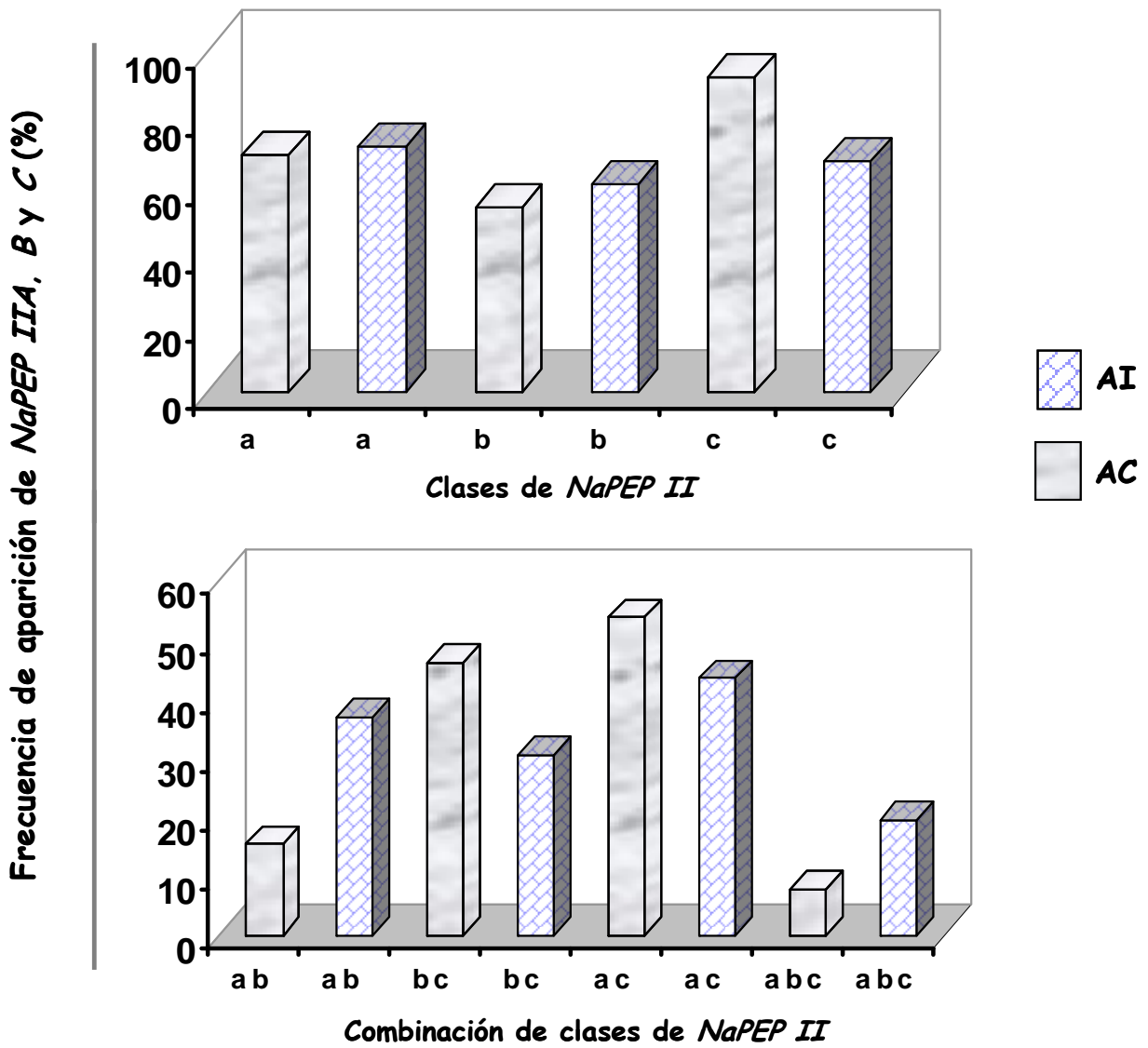


Figura 15. Frecuencias de aparición y combinaciones de NaPEP IIA, NaPEP IIB y NaPEP IIC en la población 11613 de *N. alata*. Los miembros génicos (panel superior) y sus combinaciones (panel inferior) se graficaron contra su frecuencia de aparición (%) en la población de acuerdo a la leyenda mostrada a la derecha.

Corroboración de la especificidad del PCR múltiple

A pesar de obtener amplificaciones en el rango de tamaño esperado para cada una de las clases durante la realización del PCR múltiple, algunos de los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM-T-Easy y secuenciados para corroborar la especificidad de la reacción. Dos genes de la clase C (procedentes: uno de la planta AC 2 de la población 11613 y el otro de la especie AC, *N. alata* cv BT) y uno de la clase B (procedente de la planta AI 55) fueron secuenciados. Los resultados muestran que al menos para estas clases, el producto de PCR obtenido y secuenciado se corresponde con la secuencia nucleotídica esperada (Figura 16).

Patrón de expresión de NaPEP II a nivel de mRNA

Para determinar el patrón de expresión de estos genes, se realizaron ensayos tipo Northern blot usando RNA total de diferentes órganos de *N. alata* (hoja, tallo, sépalo, pétalo, estigma, estilo y diferentes etapas de desarrollo del estilo y de la antera) y como sonda, cDNAs [³²P] de *NaPEP IIB* (Figura 17). Al analizar el comportamiento del mRNA de *NaPEP II* en diferentes etapas de desarrollo del pistilo (excluyendo el ovario), se observó que *NaPEP II* se expresa solamente en estilos y estigmas maduros y su expresión se incrementa dramáticamente en el estilo maduro (Figura 17B). La expresión de este gen comenzó a ser detectable en botones de 2.0 a 3.5 cm de longitud. No se detectaron transcritos de este gen en ningún órgano vegetativo probado (Figura 17A) ni en ningún estado de desarrollo de la antera (Figura 17B). El patrón de expresión mostrado por *NaPEP II* es similar, al igual que el de otros genes presentes en las bibliotecas como *HT-N* y β -*expansina*, al patrón de expresión mostrado por genes requeridos en la respuesta de rechazo del polen (*HT-B* y *Sc10-RNasa*) [Figura 18A]. En diferentes etapas de desarrollo del estilo, la expresión de *NaPEP II* es menor (al igual que la de la β -*expansina*) que la expresión de la *Sc10-RNasa* y está rezagada si se compara con la expresión de *HT-N*, *HT-B* y *Sc10-RNasa* (Figura 18B). No obstante, de forma general, estos 5 genes comienzan a detectarse en estadios inmaduros del desarrollo de la flor y alcanzan un máximo de expresión hacia la madurez que es cuando el estigma se encuentra receptivo para recibir los granos de polen.

```

2_AC/C      TCACATTCCAATTTCCCTTGCTCTTCTGTTTCCTCTGTTTTGTCATATATCATTCAAATGCTGCTCCAATTTCAAACCCAACAACAATAATAACGCCA
CLASE C     TCACATTCCAATTTCCCTTGCTCTTCTGTTTCCTCTGTTTTGTCATATATCATTCAAATGCTGCTCCAATTTCAAACCCAACAACAATAATAACGCCA
BT_AC/C     TCACATTCCAATTTCCCTTGCTCTTCTGTTTCCTCTGTTTTGTCATATATCATTCAAATGCTGCTCCAATTTCAAACCCAACAACAATAATAACGCCA
*****

2_AC/C      CCGCACTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAACCGTTTTGCATGAACATATCTCAAAGCAATCCAAGGTTATGGCAGCTACAACATCAA
CLASE C     CCGCACTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAACCGTTTTGCATGAACATATCTCAAAGCAATCCAAGGTTATGGCAGCTACAACATCAA
BT_AC/C     CCGCACTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAACCGTTTTGCATGAACATATCTCAAAGCAATCCAAGGTTATGGCAGCTACAACATCAA
*****

2_AC/C      AACCTTTAGACTTTGCACCTTGCCATTATTCACTCAGGAGCAGACCAAGCAAAAATTACTCATGCATATTTTTCCAAACCCAAGGAACATAAAGTCAAGT
CLASE C     AACCTTTAGACTTTGCACCTTGCCATTATTCACTCAGGAGCAGACCAAGCAAAAATTACTCATGCATATTTTTCCAAACCCAAGGAACATAAAGTCAAGT
BT_AC/C     AACCTTTAGACTTTGCACCTTGCCATTATTCACTCAGGAGCAGACCAAGCAAAAATTACTCATGCATATTTTTCCAAACCCAAGGAACATAAAGTCAAGT
*****

2_AC/C      CACAAGCTATTGAGGCTTATAAATACTTGCAAAATCTATTGGAATGAGTTGGCTAGCGGATTGGAAAGAAGTGTCAAGAATATAAGAGATGAACAAGGCT
CLASE C     CACAAGCTATTGAGGCTTATAAATACTTGCAAAATCTATTGGAATGAGTTGGCTAGCGGATTGGAAAGAAGTGTCAAGAATATAAGAGATGAACAAGGCT
BT_AC/C     CACAAGCTATTGAGGCTTATAAATACTTGCAAAATCTATTGGAATGAGTTGGCTAGCGGATTGGAAAGAAGTGTCAAGAATATAAGAGATGAACAAGGCT
*****

2_AC/C      ATGCTTATGATACACAGATTATGATCTTAAGGTGAATCTTGACAAAGCAGCCAATTGTGGAAGAGCGTTAGAGTCGGTGCGAATTCATGATCCTGTAT
CLASE C     ATGCTTATGATACACAGATTATGATCTTAAGGTGAATCTTGACAAAGCAGCCAATTGTGGAAGAGCGTTAGAGTCGGTGCGAATTCATGATCCTGTAT
BT_AC/C     ATGCTTATGATACACAGATTATGATCTTAAGGTGAATCTTGACAAAGCAGCCAATTGTGGAAGAGCGTTAGAGTCGGTGCGAATTCATGATCCTGTAT
*****

2_AC/C      TTGCAGAAGCGAACATAAAGGTGTCACCTGGCCGTAATGGGTGCAG
CLASE C     TTGCAGAAGCGAACATAAAGGTGTCACCTGGCCGTAATGGGTGCAG
BT_AC/C     TTGCAGAAGCGAACATAAAGGTGTCACCTGGCCGTAATGGGTGCAG
*****

CLASE B     TCACATTCCAATTTCCCTTGCTCTTCTGTTTCCTCTGTTTTCTCTATATCATTCAAATGCTACTCCAATTTCAAACCCAACAACAATAATAACAATA
55_AI/B     TCACATTCCAATTTCCCTTGCTCTTCTGTTTCCTCTGTTTTCTCTATATCATTCAAATGCTACTCCAATTTCAAACCCAACAACAATAATAACAATA
*****

CLASE B     ATGCCACCAGCTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAACCGTTTTGCATGAACATATCTCAAAGCAATCCAAGGTTATGGCAGCTACAA
55_AI/B     ATGCCACCAGCTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAACCGTTTTGCATGAACATATCTCAAAGCAATCCAAGGTTATGGCAGCTACAA
*****

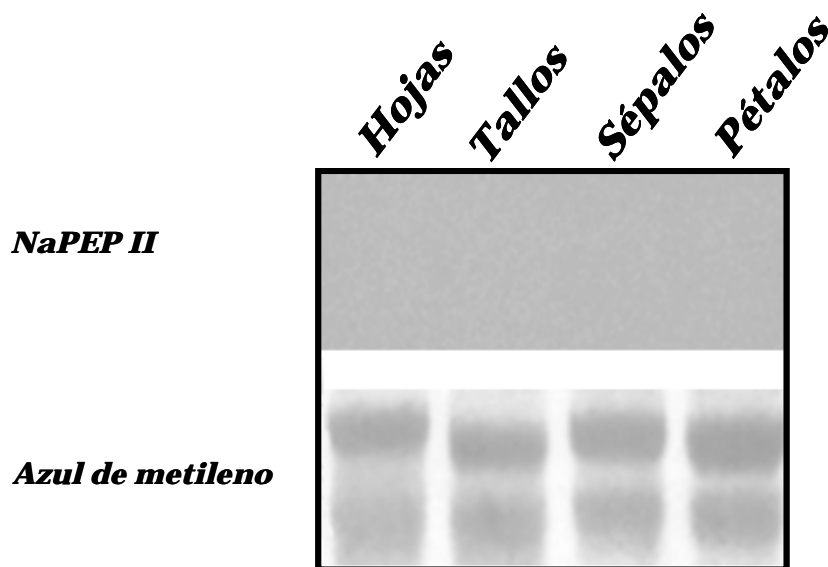
CLASE B     CATCAAAACCTTTAGACTTTGGTCTTGCCATTATTCAATCAGGAGCAGACCAAGCAAAAATTACTCATTATATTTCCGCAAAACCCAAGGAACATAAC
55_AI/B     CATCAAAACCTTTAGACTTTGGTCTTGCCATTATTCAATCAGGAGCAGACCAAGCAAAAATTACTCATTATATTTCCGCAAAACCCAAGGAACATAAC
*****

CLASE B     TCA GTCCACAAGCTATTGAGGCTTATAATAAATGCAAAAACCATTTGGAGTGAGTTGGCTAGTGGATTGGAATGGAGTGTCAAGA
55_AI/B     TCA GTCCACAAGCTATTGAGGCTTATAATAAATGCAAAAACCATTTGGAGTGAGTTGGCTAGTGGATTGGAATGGAGTGTCAAGA
*****

```

Figura 16. Alineamiento a nivel de nucleótidos de las secuencias obtenidas de las bibliotecas con los productos de PCR obtenidos a partir de gDNA de las plantas AC y AI de la población 11613. Las secuencias originales obtenidas de las bibliotecas (CLASE A, B y C) se alinearon usando el ClustalW con los productos de PCR provenientes de la población (55_AI/B, BT_AC/C y 2_AC/C). Los asteriscos debajo del alineamiento muestran los nucleótidos conservados.

A



B

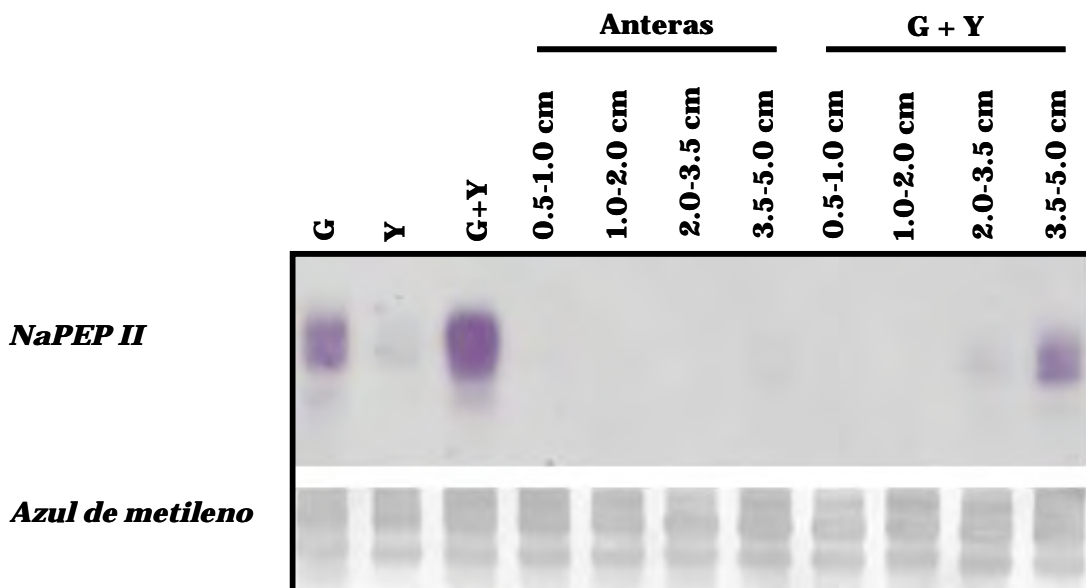
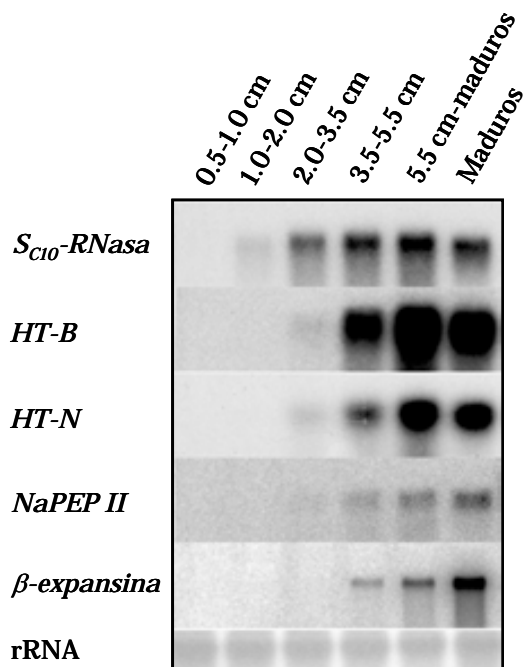


Figura 17. Análisis de la expresión de los transcritos de *NaPEP II* en estilos de *N. alata*. (A) Análisis por Northern blot de la expresión de *NaPEP II* en órganos vegetativos de *N. alata* cv Breakthrough AC. (B) Patrón de expresión de *NaPEP II* durante el desarrollo de estilos y anteras de *N. alata* SC10SC10 AI. El RNA total de las etapas u órganos indicados (5µg por carril) fue cargado en cada pozo, transferido e hibridado con cDNA [³²P] de *NaPEP II*. G, estigmas aislados en la antesis; Y, estilos aislados en la antesis; G+Y, estilos más estigmas en la antesis; carriles 4-7, anteras en desarrollo de las etapas indicadas; carriles 8-11, pistilos en desarrollo (estigmas más estilos) de los tamaños indicados. Para asegurar condiciones equivalentes de cargado, los filtros de RNA fueron teñidos con azul de metileno.

A



B

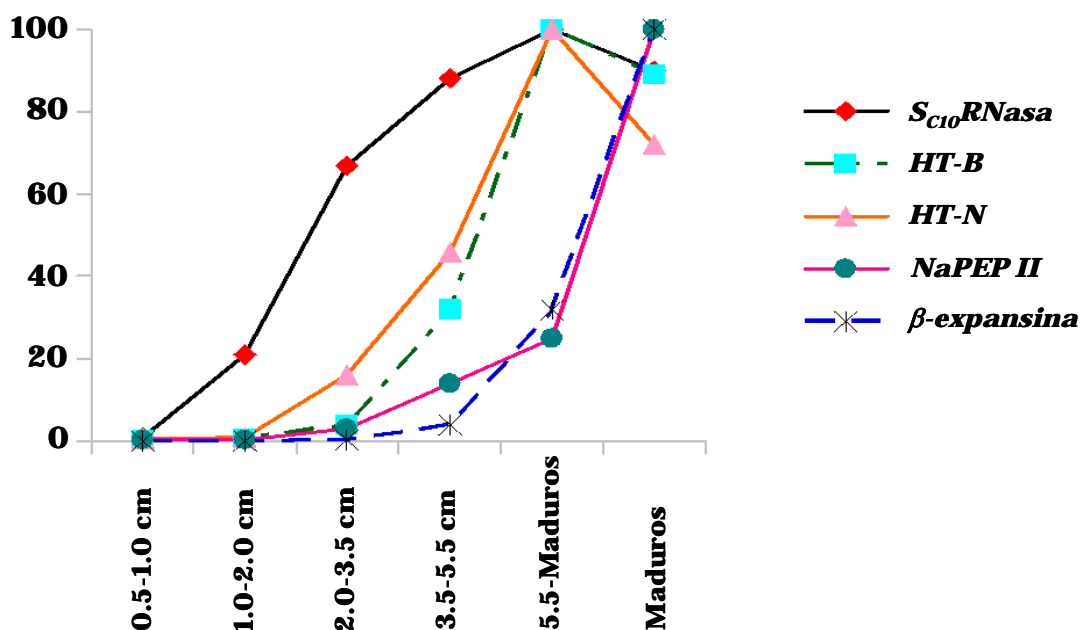


Figura 18. Patrón de expresión de los transcritos de la *Sc10-RNasa*, *HT-B*, *HT-N*, *NaPEP II* y la *β-expansina* en diferentes etapas del desarrollo de estilos de *N. alata* Sc10Sc10 AI. (A) Análisis por Northern blot. El RNA total de estilos de las etapas indicadas (5µg) fue transferido e hibridado con el cDNA [³²P] de las sondas nombradas a la izquierda. Para asegurar condiciones equivalentes de cargado, los filtros de RNA fueron teñidos con azul de metileno (tinción del rRNA). (B) Patrón de expresión de los genes. Las señales fueron cuantificadas con el Phosphorimager y normalizadas con la señal más alta.

Estos resultados indican que *NaPEP II* es un gen que únicamente se expresa en el pistilo y se encuentra regulado durante el desarrollo de este órgano.

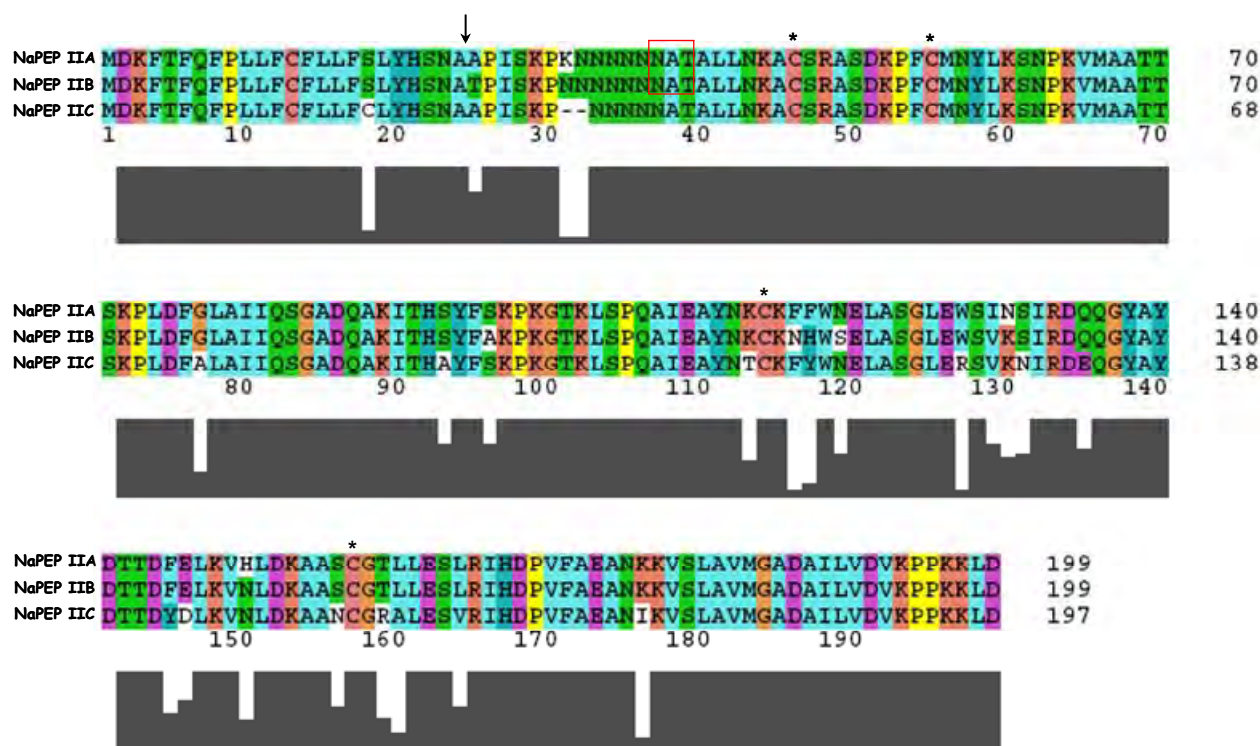
Análisis de secuencias

Las proteínas codificadas por las tres clases de *NaPEP II* contienen una región pequeña rica en asparaginas hacia el extremo N terminal (Figura 19). Los polipéptidos predichos contienen 199 residuos de aminoácidos para la clase A y B y 197 para la clase C (Figura 19A). Las identidades entre estas proteínas son de 95.5 % (NaPEP IIA y B), 89.9 % (NaPEP IIA y C) y 89.4 % (NaPEP IIB y C). NaPEP IIA, B y C son ricas en aminoácidos como alanina, lisina y leucina. Existe también un sitio potencial de N- glicosilación para NaPEP IIA y B basado en el programa NetNGlyc. Las proteínas maduras de NaPEP IIA, B y C tienen puntos isoeléctricos (pIs) altos (9.31, 9.31 y 9.07, respectivamente). Todas estas proteínas maduras tienen cuatro cisteínas que podrían formar dos puentes disulfuro relacionados con la estabilización de la estructura tridimensional de las proteínas.

El gráfico de hidropatía (Kyte and Doolittle, 1982) de la secuencia deducida de aminoácidos de NaPEP IIA, B y C (Figura 19B) muestra un extremo amino terminal hidrofóbico característico de un péptido señal (Von Heijne, 1986). Un análisis *in silico* con el LOCSVMpsi, predice que estas proteínas son secretadas al espacio extracelular con probabilidades del 79%, 77% y 85% para las clases A, B y C, respectivamente. Otros dos algoritmos diferentes predicen un péptido señal con una probabilidad de 0.994 (Bendtsen *et al.*, 2004; Nielsen and Krogh, 1998). El sitio potencial de ruptura se predice entre los aminoácidos consecutivos alanina-24 y alanina-25 para NaPEP IIA y C y entre alanina-24 y treonina-25 para NaPEP IIB produciendo proteínas maduras de 19.15-, 18.88- y 19.05 kDa, respectivamente. La presencia de un péptido señal indica que las proteínas codificadas por *NaPEP IIA*, *B* y *C* podrían entrar a la vía de secreción retículo endoplasmático-Golgi y localizarse extracelularmente.

Dada la similitud de secuencia entre las diferentes clases de NaPEP II, NaPEP IIB se utilizó para la comparación con las bases de datos de proteínas. NaPEP II muestra homología con la proteína P18, exhibiendo alrededor de un 31.9 % de identidad de secuencia (Figura 20).

A



B

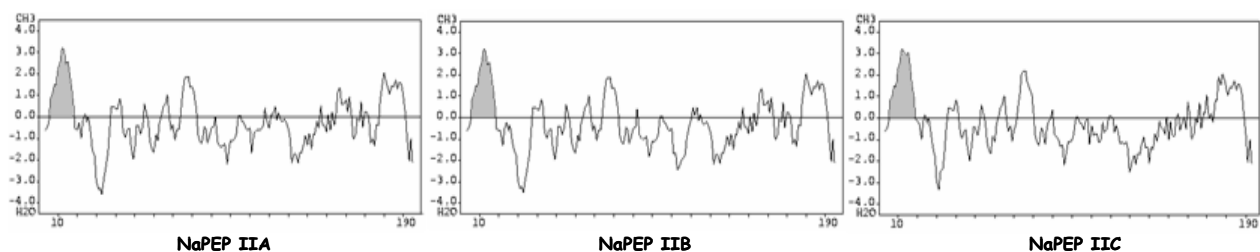


Figura 19. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los cDNAs codificados por *NaPEP II* y sus perfiles de hidrofobicidad. (A) Alineamiento de las secuencias de NaPEP IIA, NaPEP IIB y NaPEP IIC. Las secuencias están coloreadas asignándoles colores a residuos específicos. Las cajas negras debajo del alineamiento indican el grado de consenso de las secuencias. La flecha indica el sitio potencial de ruptura del péptido señal. Los residuos de cisteínas conservados están marcados con un asterisco. Los sitios potenciales de N-glicosilación están enmarcados. Los guiones en la secuencia indican huecos introducidos con el fin de mantener un buen alineamiento. (B) Índices de hidropatía de los 199 residuos de aminoácidos de NaPEP IIA (izquierda), 199 aminoácidos de NaPEP IIB (centro) y 197 aminoácidos de NaPEP IIC (derecha). El significado del ploteo de una ventana de 7 aminoácidos consecutivos se graficó contra el número de aminoácidos. La región sombreada se corresponde con el péptido señal.

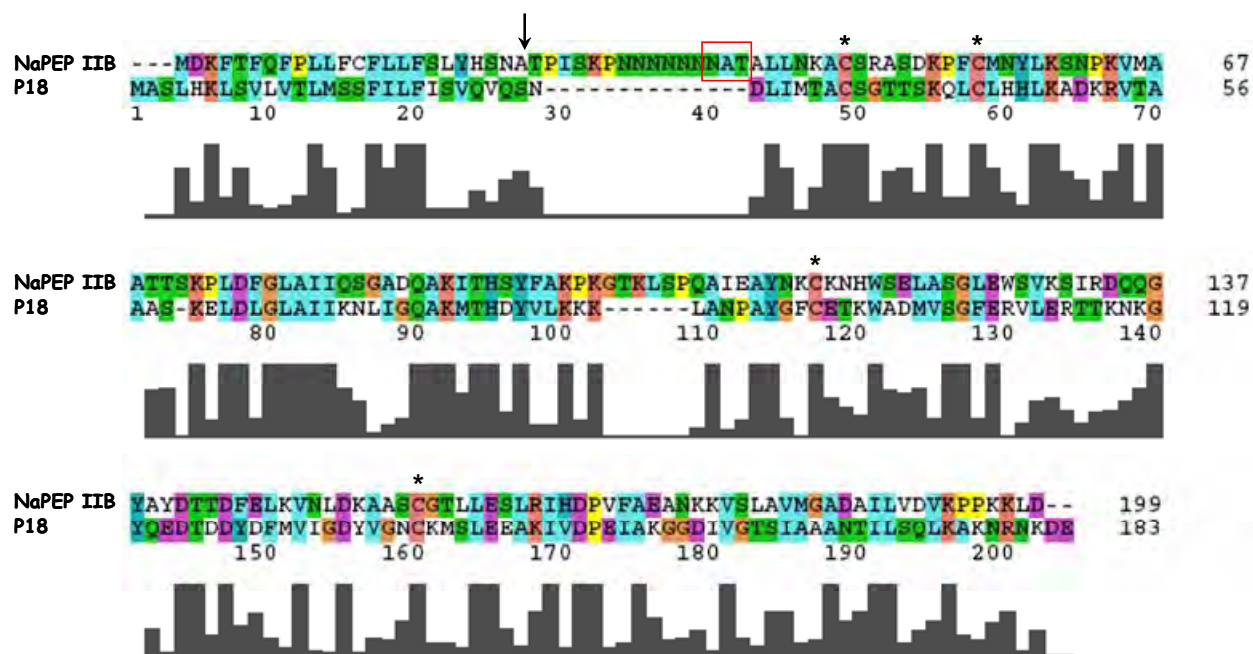


Figura 20. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de NaPEP IIB y P18. Las secuencias están representadas asignándoles colores a residuos específicos. Las cajas negras debajo del alineamiento indican el grado de consenso de las secuencias. La flecha indica el sitio potencial de ruptura del péptido señal. Los residuos de cisteínas conservados están representados por un asterisco. El sitio potencial de *N*-glicosilación está enmarcado. Los guiones en la secuencia indican huecos introducidos con el fin de mantener un buen alineamiento.

Desafortunadamente, no existen reportes relacionados a P18 en la base de datos. Para encontrar homólogos distantes, se realizaron búsquedas por dominios con el programa Pfam (Bateman *et al.*, 2002), encontrándose que NaPEP II (aminoácidos 36 al 182) es similar a inhibidores de metilesterasas de pectina (PMEI) [score 27.3 y E = 5.1e-05].

Anticuerpos específicos para la inmunodetección de NaPEP II

El diseño de péptidos sintéticos se realizó para obtener anticuerpos y saber si los patrones de expresión de *NaPEP II* a nivel de proteínas eran similares a aquellos observados para sus mRNAs. Paralelamente, el cDNA de este gen fue sobreexpresado en *E. coli* (Ibarra, 2005) como una proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (GST) para corroborar si los anticuerpos purificados inmunoreaccionaban específicamente con la proteína de fusión GST: NaPEP IIB. La Figura 21 muestra que los anticuerpos anti NaPEP IIB reaccionan con una proteína de 45 kDa la cual se corresponde con la masa molecular predicha para la proteína de fusión GST::PEP IIB (19.1 kDa de NaPEP IIB + 26kDa de la GST) [Figura 21A]. Además, no se observó ninguna reacción cruzada con proteínas bacterianas. La misma proteína de fusión recombinante de 45 kDa fue detectada cuando se usaron anticuerpos contra la proteína GST (datos no mostrados).

NaPEP II es específica de órganos sexuales y se expresa fundamentalmente en especies AI de Nicotiana

Con el objetivo de determinar si los patrones de expresión de *NaPEP II* a nivel de mRNA y de proteína se correlacionaban, se realizaron inmunoréplicas tipo Western blots utilizando anticuerpos anti-NaPEP II partiendo de:1) extractos crudos de diferentes órganos de *N. alata* AC y 2) extractos crudos de estilos de especies AC y AI. NaPEP II fue detectada solamente en órganos sexuales (Figura 21B), específicamente en estilos y estigmas. En estas estructuras se visualizan dos bandas de alrededor de 25 kDa correspondientes a NaPEP II.

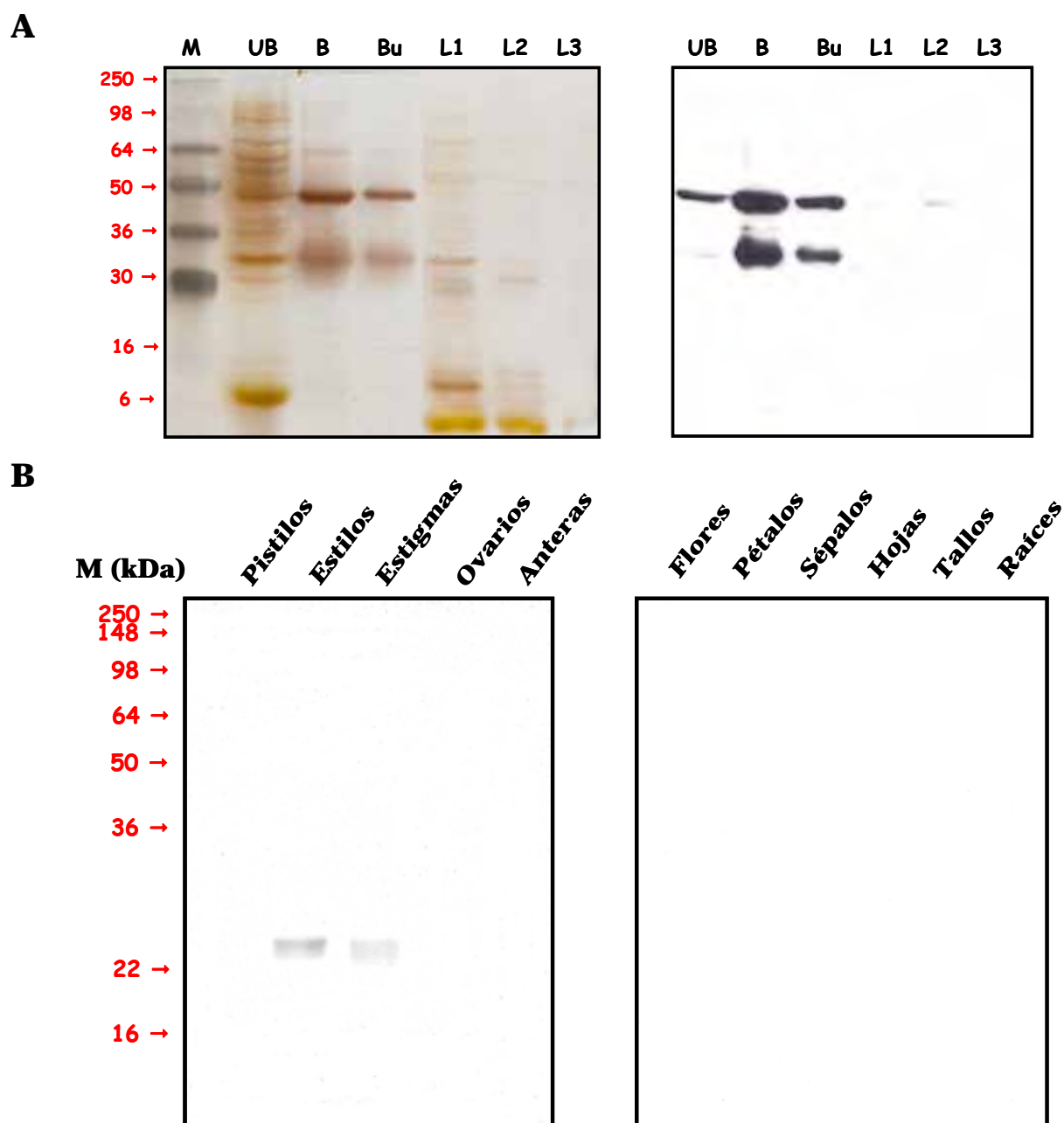


Figura 21. Detección de la proteína recombinante y nativa NaPEP II en *E. coli* y *N. alata* AC. A) La proteína recombinante GST::NaPEP II fue purificada por cromatografía de afinidad con glutation sefarosa 4B. La fracción soluble a partir de la inducción de células de *E. coli* transformadas con el pGEX-4T::NaStEP, fue incubada con la resina. Después de recuperar la fracción no unida (UB) se realizaron tres lavados (L1, L2 y L3) y las proteínas fuertemente unidas a la resina fueron eluidas dos veces (B y Bu). La tinción del gel con nitrato de plata se muestra a la izquierda y la inmunodetección de GST::NaPEP II a la derecha. La inmunodetección se realizó con los anticuerpos anti-NaPEP II. B) Iguales cantidades de proteínas estilares y estigmáticas de los órganos reproductivos y sexuales de *N. alata* AC (17 μ g) indicados fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12.5 %, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo anti-NaPEP II. Los números indican los pesos moleculares aparentes en kilodaltons.

Como se puede apreciar, las formas de NaPEP II detectadas en los estigmas tienen una migración ligeramente mayor. Aunque se hubiese esperado señal en la flor, NaPEP II se encuentra tan diluida que no puede ser detectada.

Como los transcritos de *NaPEP II* están presentes tanto en *N. alata* AI como en especies AC del mismo género, se incluyeron otras especies AC y AI de *Nicotiana* para analizar la presencia de NaPEP II mediante ensayos inmunohistoquímicos.

Los niveles de esta proteína en estilos y estigmas de diferentes especies se muestran en la Figura 22. NaPEP II se detectó tanto en las especies AI como AC del género *Nicotiana* independientemente de la dilución del anticuerpo empleada (1:20000, 1:25000 y 1:30000). Aunque en algunas especies AI más de una proteína reacciona con el anticuerpo, esto puede deberse a diferentes grados de glicosilación de NaPEP IIA y B. En *N. alata* AI y en *N. tabacum* tres proteínas inmunoreaccionan con anti-NaPEP II y dos en *N. alata* BT. En el resto de las especies alcanza a detectarse una sola banda. En *N. glauca* fue detectada una sola banda que no coincide en tamaño con las visualizadas en las otras especies.

Localización celular de NaPEP II

De acuerdo a la predicción del péptido señal hacia el extremo amino y al patrón de expresión específico mostrado por el mRNA y la proteína de *NaPEP II* (específica del pistilo), estas proteínas podrían ser secretadas desde las células del tejido de transmisión del estilo hacia el espacio extracelular. En este experimento (Figura 23), los estilos de *N. alata* se bisectaron manualmente y se recuperaron las proteínas obtenidas de extracciones secuenciales de tejido estilar en tres amortiguadores diferentes. La elución suave de las proteínas se promueve por el amortiguador bajo en sales y las proteínas fuertemente asociadas con la ECM, se recuperan usando la máxima concentración de sales.

El inmunoblot mostró que se recuperaron cantidades equivalentes de NaPEP II tanto en la fracción soluble como en la fracción correspondiente a proteínas asociadas a la ECM.

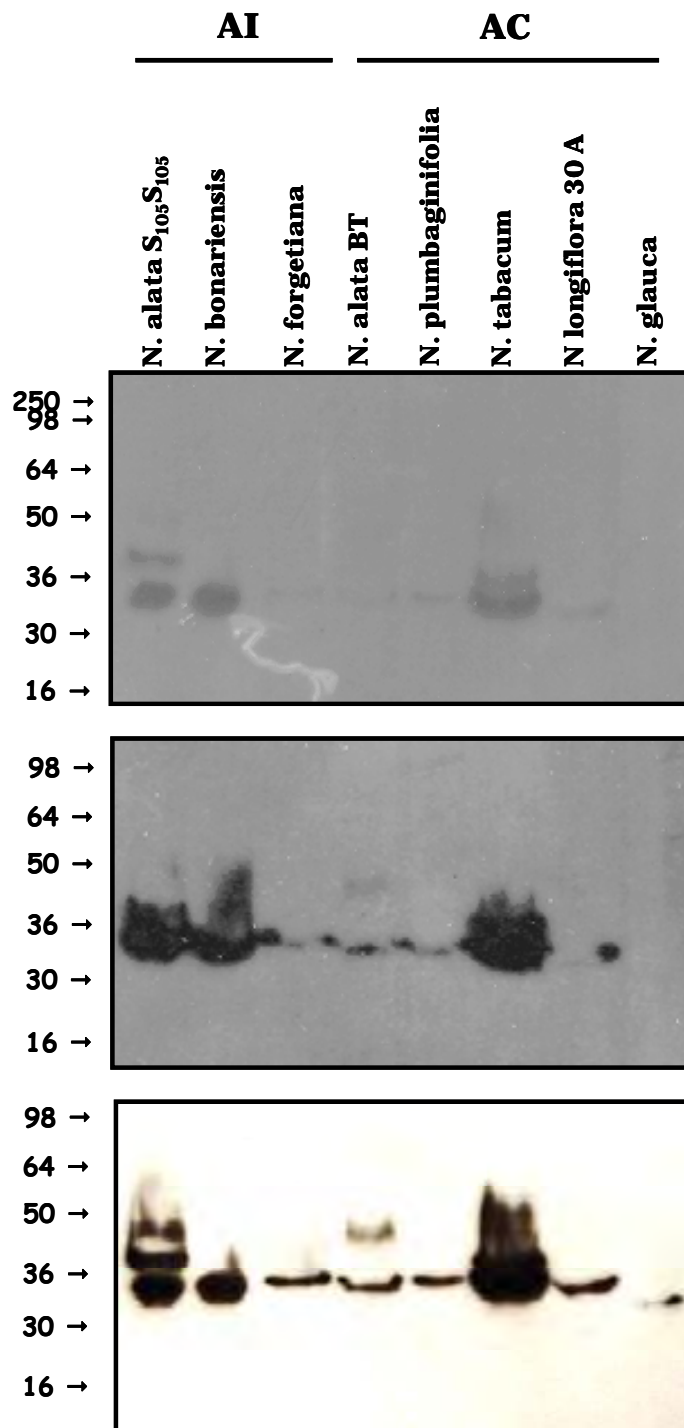


Figura 22. Análisis de *NaPEP II* en diferentes especies del género *Nicotiana*. En cada carril se cargaron 17 μ g de proteína total de estilos + estigmas de cada especie. La detección de *NaPEP II* se realizó utilizando diferentes diluciones del anticuerpo anti-*NaPEP II*: 1:30000 (Panel superior), 1:25000 (Panel intermedio) y 1:20000 (Panel inferior). Las especies probadas así como su fenotipo de polinización se encuentran indicadas en la parte superior. Los marcadores de peso molecular (kDa) se muestran a la izquierda.

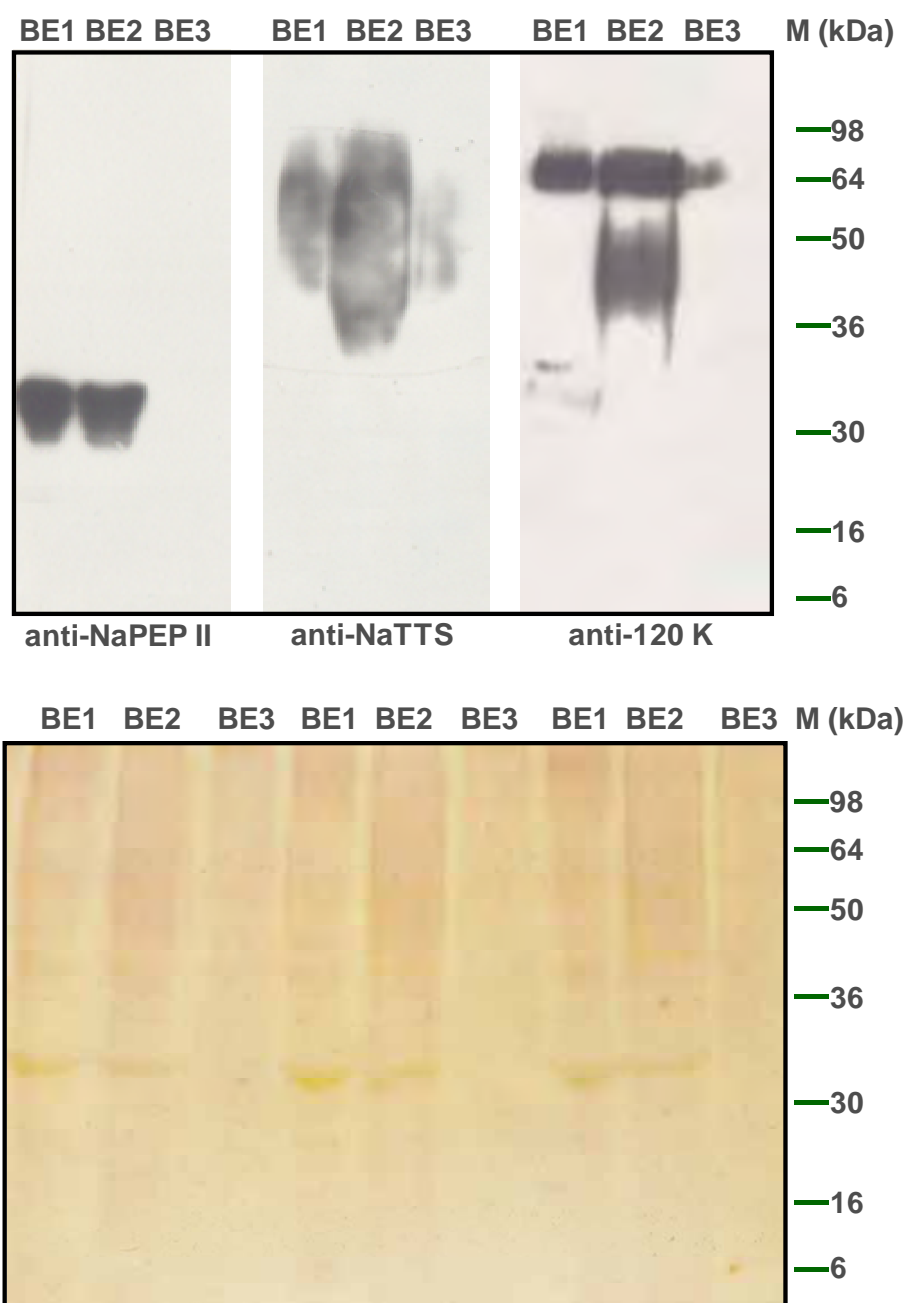


Figura 23. Análisis de tres proteínas extracelulares recuperadas a partir de extracciones secuenciales de proteínas estilares y estigmáticas de *N. alata*. Iguales cantidades de proteínas estilares (5 μ g) se separaron en dos geles de poliacrilamida al 12.5 %. Uno de ellos fue teñido con nitrato de plata como control de carga (Panel inferior) y el otro fue sometido a transferencia semi-seca para transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa y detectar a las proteínas de interés mediante ensayos tipo réplica en Western. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos anti-NaPEP II, anti-NaTTS y anti-120K. Las proteínas extraídas con altas y bajas concentraciones de sales se cargaron en los carriles BE1 y BE2, respectivamente. El resto de las proteínas residuales presentes en el TT del estilo fueron maceradas con nitrógeno líquido y cargadas en el BE3. Los números a la derecha indican las masas de los marcadores de peso molecular estándares en kDa.

Un patrón similar se observó cuando fueron detectadas las proteínas NaTTS y 120K mediante el uso de anticuerpos específicos contra éstas.

Discusión

Con el objetivo de determinar si *NaPEP IIB* podía ser uno de los factores defectuosos de las plantas mutantes de la población 11613 de *N. alata*, se realizó un análisis segregacional y un estudio molecular detallado de esta familia génica.

Análisis segregacional de NaPEP II en la población 11613 de N. alata.

Los resultados del análisis segregacional realizado en esta población para determinar si *NaPEP IIB* estaba segregando con el fenotipo de AI, demostraron que este gen fue detectado tanto en las plantas AC como AI (Figura 15, Panel superior). Esto unido a la ausencia de combinaciones específicas de los miembros de esta familia en los fenotipos de polinización de las plantas de la población en estudio (Figura 15, Panel inferior) y al idéntico patrón obtenido cuando se empleó cDNA como molde en reacciones de PCR (datos no mostrados), hace descartar a *NaPEP IIB* como uno de los dos factores mutantes responsables del fenotipo de AC en las plantas que aceptan su propio polen.

NaPEP II se encuentra diferencial y temporalmente regulado

Los patrones de expresiones temporales y espaciales de *NaPEP II* fueron estudiados con el fin de asignarle alguna función en el pistilo. Debido a que el sistema de AI se activa un día antes de la antesis, el patrón de expresión de este gen permitiría determinar la existencia de alguna correlación entre *NaPEP II* y el tiempo de activación de la respuesta de rechazo del polen. Para ello fue analizada la expresión de este gen en diferentes etapas de desarrollo del pistilo en

plantas incompatibles. Aunque en estadios tempranos del desarrollo de la flor los pistilos ya han completado su diferenciación morfológica, muchos de los procesos fisiológicos relacionados con la reproducción (por ejemplo, receptividad, maduración, respuesta AC) ocurren durante el desarrollo posterior del pistilo (Goldman *et al.*, 1992). El patrón de expresión de los transcritos de *NaPEP II* en el pistilo muestra que estos genes podrían ser requeridos para las interacciones polen-pistilo ya que se expresa solamente en estilos maduros y estigmas y su expresión se incrementa dramáticamente en el estilo maduro. En órganos no sexuales no se detectaron transcritos de *NaPEP II* (Figura 17A). En el pistilo (excluyendo el ovario), los primeros niveles de *NaPEP II* se detectaron aunque a bajos niveles, en botones de 2.0 a 3.5 cm y su nivel de expresión se fue incrementando gradualmente durante el desarrollo de la flor hacia la anthesis (Figura 17B). En este cultivar AI, las tétradas se hacen visibles en las anteras desde los 0.8 cm de longitud de los botones florales y la flor abre cuando el botón alcanza una longitud de 6.0 a 7.0 cm. El estado más crítico se presenta cuando los botones florales tienen de 2.0 a 3.5 cm porque es cuando el estilo puede soportar el crecimiento del tubo polínico y rechazar pobremente el polen propio (McClure *et al.*, 1999). El patrón de expresión de *NaPEP II* coincide con el patrón de expresión de los genes que hasta la fecha se conoce participan en la respuesta de AI en *N. alata* (la determinante femenina de la reacción, la S-RNasa y el gen modificador *HT-B*) [Figura 18].

NaPEP II es una proteína estilar/estigmática de especies AC y AI

Con el objetivo de determinar si los patrones de expresión de *NaPEP II* a nivel de mRNA y de proteína se correlacionaban, se realizaron inmunoanálisis con anticuerpos anti-*NaPEP II* partiendo de extractos crudos de especies AC y AI y de órganos vegetativos y sexuales de *N. alata* BT. Los resultados obtenidos refuerzan los datos mostrados por los ensayos tipo Northern blots (Figura 11, 17). *NaPEP II* es una proteína estilar/estigmática específica (Figura 21B) y se traduce tanto en plantas AC como en plantas AI (Figura 22). La presencia de esta proteína en todas las especies probadas, independientemente de la capacidad de éstas para rechazar o no su propio polen, no descarta la posibilidad de que este gen pudiese estar involucrado en la

respuesta de AI. En estas especies AC podrían existir genes que en las especies AI estuvieran controlando la respuesta de rechazo del propio polen. Por ejemplo, 120K es una proteína que aunque participa directamente en la respuesta de AI (Hancock *et al.*, 2005), está presente en especies que no rechazan su propio polen. Los datos obtenidos también sugieren que los patrones de expresión de los tres miembros génicos de esta familia son muy parecidos tanto a nivel de proteína como de mRNA.

NaPEP II es una proteína soluble de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo

La presencia de un péptido señal y el patrón de expresión específico mostrado por el mRNA de *NaPEP II* (específico del pistilo), sugiere que estas proteínas podrían ser secretadas desde las células del tejido de transmisión del estilo hacia el espacio extracelular. Con el objetivo de conocer si *NaPEP II* se encontraba en el sitio donde se llevan a cabo las interacciones del gametofito masculino con el femenino, se realizaron experimentos de extracciones secuenciales de proteínas para aislar las proteínas solubles e insolubles presentes en los estilos maduros de *N. alata*. Los resultados obtenidos demostraron que *NaPEP II* es una proteína asociada a la matriz extracelular que comparte las mismas características de solubilidad que presentan los genes modificadores de los grupos III y II (NaTTS, 120K) y las determinantes femeninas de la AI (S RNAsas). La localización de *NaPEP II* en la ECM del tejido de transmisión del estilo la hace sumamente interesante, ya que hacia este sitio son secretadas las proteínas que hasta la fecha se sabe están involucradas en el rechazo del polen y una vez allí son tomadas por los tubos polínicos que se elongan en esta matriz secretora, en su camino hacia el ovario. Es por esto que los factores secretados a la MEC podrían ser necesarios para las interacciones polen-pistilo.

NaPEP II es semejante a inhibidores de metilesterasas de pectina

NaPEP II codifica para proteínas con un 31.9 % de identidad de secuencia con la proteína P18. La secuencia de P18 fue depositada en la base de datos en 1998 y fue recuperada de un

escrutinio realizado con polen de *N. alata*. Aunque no existen reportes relacionados a P18 en la base de datos, la búsqueda por dominios de homólogos distantes a NaPEP II indicó que este gen es similar a inhibidores de metilesterasas de pectina (PMEI).

Los PMEIs están directamente relacionados a la modulación endógena de la actividad de las metilesterasas de pectina (PMEs) durante el desarrollo y el crecimiento de las plantas. Los PMEIs inhiben a las PMEs de origen vegetal formando complejos estequiométricos 1:1 mediante uniones no covalentes y generalmente no inhiben a las PMEs producidas por microorganismos patógenos vegetales. (Mattei *et al.*, 2002; D'Avino *et al.*, 2003; Giovane *et al.*, 2004; Di Matteo *et al.*, 2005). Las PMEs son proteínas que hidrolizan los grupos metilésteres de las pectinas produciendo pectinas con un grado bajo de metilación y metanol. La enzima juega un papel central en todos los procesos que requieran remodelación de paredes celulares vegetales, por lo que están involucradas en el crecimiento y extensión celular (Nari *et al.*, 1986) y en procesos de maduración de frutos (Brady *et al.*, 1987). Además, ha sido demostrado que las PMEs actúan como receptores célula-huésped para la proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco y esta interacción se requiere para el movimiento viral célula-célula (Chen *et al.*, 2000). Este hallazgo sugiere un posible papel de los PMEIs en los mecanismos de defensa de las plantas contra los patógenos.

Hasta la fecha, han sido descubiertos solamente tres PMEIs en plantas, uno detectado en frutos de kiwi (*Actinidia chinensis*) [Balestrieri *et al.*, 1990; Giovane *et al.*, 1995; Camardella *et al.*, 2000] y dos en *Arabidopsis* (Wolf *et al.*, 2003; Raiola *et al.*, 2004).

EL PMEI de *Actinidia chinensis* (AcPMEI) está presente en la fase acuosa del fruto maduro y probablemente se sintetiza como un precursor más grande que es procesado proteolíticamente durante el proceso de maduración del fruto [Giovane *et al.*, 1995]. Esta proteína inhibe a varias PMEs vegetales (PMEs de kiwi, naranja, manzana, tomate, melocotón, zanahoria, papa y plátano) y se mantiene inactiva contra PMEs fúngicas [Balestrieri *et al.*, 1990] y bacterianas (PME de *E. chrysanthemi*). Los estudios de modelación y fluorescencia indican que el PMEI de kiwi interactúa con la PME de tomate a nivel de sitio activo y la diferencia en profundidad de los sitios activos de la PME de tomate y de *E. chrysanthemi*, es lo que evita la interacción entre el PMEI de kiwi y la bacteria [D'Avino *et al.*, 2003].

Los PMEI están codificados en *Arabidopsis* por una pequeña familia de 2 miembros, AtPMEI-1 y AtPMEI-2, localizados en diferentes cromosomas. AtPMEI-1 y AtPMEI-2, comparten un 47% de identidad de secuencia y tienen masas moleculares de 16.3 kD y 15.6 kD con pI de 7.7 y 9.0, respectivamente (Wolf *et al.*, 2003; Raiola *et al.*, 2004). Estos genes se expresan fuertemente en flores y en el polen aunque AtPMEI-1, cuya expresión es mayor que AtPMEI-2, también se expresa en semillas, tallos y hojas maduras (Wolf *et al.*, 2003; Raiola *et al.*, 2004). Los PMEIs de *Arabidopsis* y kiwi tienen conservados estrictamente 5 residuos de Cys, 4 de los cuales formarían puentes disulfuro para mantener la estructura de la proteína (Hothorn *et al.*, 2004; Di Matteo *et al.*, 2005).

La sobreexpresión constitutiva de los genes AtPMEI-1 y AtPMEI-2 en plantas de *Arabidopsis* (Lionetti *et al.*, 2007), provocó una disminución de la actividad de las PMEs vegetales y alteró el nivel de metilesterificación de las pectinas en la pared celular. Además, las plantas transformadas mostraron menor susceptibilidad a *B. cinerea*. Como las endopoligalacturonasas (endoPG) tienen preferencia por los poligalacturanos (PGA) y no por las pectinas metilesterificadas (Kars *et al.*, 2005), el alto grado de metilesterificación (DM) de las pectinas de las plantas AtPMEI obstaculiza la actividad de las endoPGs producidas por este hongo, retrasando la colonización del tejido vegetal. El incremento del contenido de PMEI en las plantas transformadas podría estar impidiendo la desesterificación del polímero péptico por las PMEs de plantas y consecuentemente el acceso de las PG de hongos a su sustrato.

El papel de los DM de las paredes celulares de pectina en la resistencia a enfermedades en plantas ha sido reportado en varios patosistemas. Por ejemplo, la resistencia de algunos cultivares de *Solanum tuberosum* a *Erwinia* se han relacionado con las pectinas altamente metilesterificadas (McMillan *et al.*, 1993; Marty *et al.*, 1997). También se ha reportado que los fragmentos pépticos con mayor grado de DM y mayor actividad elicitora se acumulan en cultivares de *Phaseolus vulgaris* resistentes a *Colletotrichum lindemuthianum* (Boudart *et al.*, 1998).

CAPÍTULO IV

**Caracterización espacio temporal de los genes
NaStEP y *NaSoEP* en algunas especies del género
*Nicotiana***

Introducción

Los escrutinios realizados en las bibliotecas de cDNA (descritos en el Capítulo II [Resultados]) permitieron la identificación de genes con un patrón de expresión semejante al de los genes requeridos en la respuesta de rechazo del polen incompatible. Estos genes podían ser buenos candidatos a genes modificadores. El gen *NaStEP* según estos estudios, se expresa solo en estigmas/estilos maduros de *N. alata* AI y está ausente en estilos/estigmas maduros de *N. plumbaginifolia*, una especie AC.

Para hacer un estudio detallado de *NaStEP* y determinar si su patrón de expresión coincide con el de los genes requeridos en la respuesta de rechazo del polen, la expresión de este gen fue corroborada mediante ensayos tipo réplica en Northern y Western. Esto permitiría relacionarlo con la respuesta de rechazo del polen. De forma adicional, se estudió en detalle la localización subcelular de este gen así como su presencia en varias especies de *Nicotiana*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Las plantas de *N. alata* (genotipos $S_{C10}S_{C10}$, $S_{A2}S_{105}$, $S_{C10}S_{105}$ y $S_{A2}S_{A2}$) y *N. benthamiana* han sido descritas previamente (Beecher and McClure, 2001; Murfett *et al.*, 1994, 1996; Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Los híbridos entre *N. alata* y *N. plumbaginifolia* se obtuvieron mediante cruza usando como parental femenino a *N. plumbaginifolia*. El resto del material vegetal utilizado está descrito en los capítulos II y III (Sección de Materiales y Métodos). Todo el material vegetal creció en invernadero bajo condiciones controladas estándares.

Análisis de secuencias

Los programas empleados para la búsqueda de homología, cálculos de identidades entre proteínas, realización de alineamientos, perfiles de hidropatía, sitios de glicosilación, predicciones de péptidos señales, y sitios de ruptura han sido descritos en el Capítulo III

(Materiales y Métodos). La localización subcelular de las proteínas fue desarrollada con el programa PA-SUB (www.cs.ualberta.ca/~bioinfo/PA/Sub/) (Lu *et al.*, 2004) o con el servidor 1.3 del LOCSVMPSI (bioinformatics.ustc.edu.cn) (Xie *et al.*, 2005). Los análisis filogenéticos fueron conducidos usando la versión 3.1 del MEGA (Kumar *et al.*, 2004). Los árboles filogenéticos fueron construidos por el método de neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987). La información sobre los inhibidores de peptidasas fue suministrada por la sección de Inhibidores del *MEROPS* (Rawlings *et al.*, 2006) disponible en la página <http://merops.sanger.ac.uk/>.

Análisis de los filtros de RNA

El RNA total de hojas, tallos, sépalos, pétalos, y diferentes etapas del desarrollo de las anteras, estilos y estigmas fue preparado y separado en geles de agarosa formaldehído al 2%, transferido a membranas Hybond N⁺ y teñido con azul de metileno como se ha descrito en el Capítulo II (Materiales y Métodos). Los filtros fueron bloqueados, incubados con las sondas de cDNA [³²P] y lavados de acuerdo a lo descrito en el Capítulo III (Materiales y Métodos). Las señales se detectaron usando películas autoradiográficas.

Clonación de los cDNAs de NaStEP en el vector de expresión

El cDNA de *NaStEP* con los sitios *EcoR* I y *BamH* I se obtuvo por PCR usando los oligonucleótidos siguientes NaStEPBamHI_F: 5' CTCTGGATCCATGCCCACTACTACTGATGATGA 3' y NaStEPEcoRI_R 5' CGCGGAATTCCTAGGTTACCACAAACCTAA 3'. Los productos de PCR fueron digeridos con ambas enzimas y ligados en marco con el gen de la glutation *S*-transferasa (GST) contenido en el vector de expresión pGEX-4T-2 (Amersham Pharmacia Biotech Piscataway, NJ). Las construcciones del plásmido recombinante fueron introducidas en *E. coli* BL21-CodonPlus (RIL) (Stratagene) por choque térmico (Capítulo III, Materiales y Métodos).

Sobreexpresión y purificación de la proteína de fusión recombinante GST:NaStEP

La sobreexpresión y purificación de la proteína de fusión recombinante GST:NaStEP se desarrolló como se ha descrito en el Capítulo III (Materiales y Métodos).

Obtención de anticuerpos anti-NaStEP

Un péptido sintético para NaStEP (WEGSKDGMPVKFFT) fue sintetizado y acoplado a hemocianina para producir suero anti-NaStEP (Sigma). El suero anti NaStEP fue purificado por cromatografía de afinidad.

Aislamiento de proteínas

Los extractos crudos de los tejidos vegetales de raíces, tallos, hojas, flores, sépalos, pétalos, pistilos, estilos, estigmas, ovarios y anteras fueron obtenidos y conservados hasta su uso como se ha descrito previamente (Capítulo III, Materiales y Métodos). La concentración de proteína fue estimada como se indica en el mismo capítulo.

Para los estudios de expresión durante la polinización, las flores fueron emasculadas 72 h antes de la antesis. Los estigmas fueron polinizados cuando se alcanzó el estado de receptividad. Los pistilos (excluyendo los ovarios) fueron colectados 5, 12 y 24 h después de la polinización. Los pistilos no polinizados fueron colectados a la 0 y 48 h después de la antesis. Las extracciones secuenciales de proteínas a partir de los pistilos se desarrollaron como describe Wu *et al.*, 2000 y Juarez-Diaz *et al.*, 2006 con ligeras modificaciones. Los estilos y estigmas se sumergieron secuencialmente en dos amortiguadores con diferentes concentraciones de sales por 3 h a 4 °C. Después de sumergir los pistilos en el amortiguador bajo en sales (Tris HCl 100 mM, pH 8.0) y en el amortiguador con alto contenido de sales (NaCl 400 mM, 40 mM Tris HCl, pH 8.0), el tejido estilar residual fue macerado usando nitrógeno líquido, homogenizado en 400 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 8 con 1% Triton X-100 y clarificado a 13 000 g por 30 min.

Cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Para la purificación de NaStEP, se prepararon extractos crudos de estigmas de *N. alata* a partir de 319 mg de tejido (estigmas), como se describe en el Capítulo III sección de Materiales y Métodos. El extracto crudo (1.6 ml) se incubó con 1 ml de la resina de intercambio aniónico Q sefarosa (Sigma), por 1 h a RT con movimiento giratorio constante. La resina se equilibró previamente con Tris HCl 50 mM pH 8.0 (amortiguador de equilibrio=AE). Una vez transcurrido el período de incubación, la fracción no unida se colectó por gravedad y la resina se lavó 10 veces con el AE (mitad del volumen cama). Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con un gradiente discontinuo de NaCl (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 400, mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM, 800 mM, 900 mM and 1000 mM, disueltos en el amortiguador de equilibrio). Todas las fracciones recuperadas de la cromatografía de intercambio iónico fueron analizadas por SDS PAGE y ensayos tipo western blot. Las fracciones en las que se detectó a NaStEP se combinaron y el AE se cambió por un nuevo amortiguador de equilibrio (=NA) [CH₃COONa 50 mM pH 5.5] usando un cartucho de centración con una exclusión molecular de 10 kDa. Para realizar el cambio de amortiguador, el filtro fue hidratado con el AE, la muestra fue añadida al mismo y se centrifugó por 10 min a 1387 g. Posteriormente se adicionaron 3 ml del AE y se centrifugó por 15 min a 1387 g. Este procedimiento se repitió tres veces quedando la muestra lista para ser utilizada en la cromatografía de intercambio iónico. NaStEP se incubó nuevamente con la misma resina pero en esta ocasión, la Q sefarosa fue equilibrada con el NA. Los tiempos de incubación de las proteínas con la resina y la recuperación de las fracciones de la cromatografía, se realizaron como se describió anteriormente exceptuando que el amortiguador empleado fue el NA y que el gradiente de sales utilizado fue preparado en este mismo amortiguador. Las fracciones enriquecidas con NaStEP se combinaron, liofilizaron por vacío y resuspendieron en 100 µl de CH₃COONa 50 mM pH 5.5. Finalmente, la muestra fue aplicada a una columna de exclusión molecular (Superdex 200) [Amersham-Biosciences] y NaStEP fue purificada por la técnica de HPLC. La elusión de las proteínas de la columna se realizó con el NA a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min.

Electroforesis en geles de dos dimensiones

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (IEF [isoelectroenfoque] en la primera dimensión usando las tiras Immobiline™ (pH 3-10) [Amersham Biosciences] y SDS PAGE en la segunda dimensión) fue desarrollada usando el sistema Multiphor II (Amersham). Las muestras de proteínas fueron extraídas como se ha descrito y luego precipitadas con TCA 10% en acetona y disueltas en 125 µl de amortiguador de hidratación (CHAPS 4% (3-[3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propano-sulfonato), urea 7 M, amortiguador IPG 2%, DTT 10 mM y azul de bromofenol 0.002%). Las muestras de proteína fueron aplicadas a tiras secas de gel de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado y se hidrataron a RT por 16 h como mínimo. La primera fase del IEF se desarrolló a 500 V por 1 h; durante la fase dos, el voltage alcanzó 3500 V por 1 h 30 min. El voltage permaneció a 3500 V durante la tercera fase por 1h 30 min con un límite máximo de voltage de 5000 V. Después, las tiras fueron sumergidas en el amortiguador de equilibrio SDS (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2% y unas pocas trazas de azul de bromofenol) y DTT (100 mg por cada 10 ml del amortiguador de equilibrio de SDS) por 15 min. La primera solución de equilibrio se decantó y una solución de equilibrio con iodoacetamida se adicionó a las tiras (250 mg por cada 10 ml de amortiguador de equilibrio de SDS) por 15 min. La electroforesis en segunda dimensión se desarrolló en un gel de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) al 15%, el cual fue teñido con nitrato de plata ó transferido a membranas de nitrocelulosa (Millipore) según se indique.

Desglicosilación enzimática

La desglicosilación enzimática de NaStEP se realizó con la enzima N-Glicosidasa F (PNGase F, New England) de acuerdo a las instrucciones del proveedor con ligeras modificaciones. Los extractos crudos de *N. alata* AI (10 µg) se digirieron con 320 unidades de PNGase F por 25 h a 37 °C.

Pegado a Concanavalina A (Con A) Sepharosa

La cromatografía de afinidad con las isoformas de NaStEP se desarrolló usando Con A Sepharosa (SIGMA). La Con A Sepharosa contiene Ca^{2+} y Mn^{2+} , por lo tanto, estos iones no fueron incluidos en el amortiguador de unión (Tris HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 500 mM). Una alícuota de extractos crudos de *N. alata* AI (1.0 ml) se aplicó a una columna empacada con Con A sefarosa. El extracto crudo se incubó con la resina por 15 min con agitación constante y la columna al término de este tiempo fue lavada 10 veces con el amortiguador de unión para remover interacciones inespecíficas (los lavados se realizaron con la mitad del volumen cama). Las proteínas unidas se eluyeron usando metil- α -D-manopiranosido 500 mM preparado en el amortiguador de unión.

Análisis de las membranas de proteína

Cantidades iguales de proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles al 12% o 15% y luego transferidas a membranas de nitrocelulosa para su inmunoanálisis. El azul brillante de Coomassie G-250 o el nitrato de plata fue usado para corroborar iguales cantidades de cargado. El anticuerpo anti-fosfatasa alcalina conjugado al anticuerpo anti-IgG de conejo (Sigma-Aldrich) fue usado para la detección de proteínas.

Los filtros fueron bloqueados, lavados e incubados con los anticuerpos primarios y secundarios como se indica en el Capítulo III (Materiales y Métodos). Las diluciones de anticuerpo usadas fueron: anti-GST 1:2500 y anti-NaStEP 1:15000. Para la detección de señales, los filtros fueron incubados con el amortiguador de fosfatasa alcalina y sus sustratos (Capítulo III, Materiales y Métodos).

Ensayo de actividad de inhibidor de proteasas

La actividad inhibitoria contra las proteasas de serina se realizó en geles de poliacrilamida SDS-PAGE usando una versión modificada del método de Hou and Lin (1998). Las proteínas en estudio se disolvieron en el amortiguador de muestra sin DTT y sin hervir y se fraccionaron en

geles de poliacrilamida al 12%. Después de la electroforesis, los geles se sumergieron dos veces en isopropanol 25%, Tris-HCl 20 mM pH 8.0 por 10 min para eliminar el SDS. A continuación, los geles se mantuvieron por 30 min en Tris-HCl 20 mM pH 8.0 con el fin de permitir la renaturalización de las proteínas presentes en el gel. Finalmente, los geles se incubaron con una solución de tripsina (50 μ g de tripsina bovina (Sigma) en 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, CaCl₂ 50 mM) por 30 min a 37°C. Los geles se lavaron con el mismo amortiguador (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, CaCl₂ 50 mM) y se colocaron en contacto con la solución fresca de sustrato-colorante (80 ml) necesaria para llevar a cabo el revelado, el cual se realizó por 50 min en la oscuridad a 37°C. La solución de sustrato-colorante estaba compuesta de 20 mg (N-acetyl-DL-phenylalanine β -naphthyl ester (APNE, Sigma) disueltos en 8 ml de N, N-dimethylformamide que se llevaron a 80 ml con 72 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, CaCl₂ 50 mM en los cuales habían sido disueltos previamente 40 mg de o-dianisidina tetrazotized. Los geles se destiñeron con ácido acético 10% por 30 min. En estos ensayos se usó el inhibidor de tripsina de soya (STI, BioChemika) como control positivo.

Microscopía confocal de fluorescencia e inmunomarcaje

Los estilos y estigmas maduros de *N. alata* Sc₁₀Sc₁₀ AI, *N. forgetiana* AI, *N. alata* BT AC, *N. plumbaginifolia* AC, *N. tabacum* AC, *N. glauca* AC y *N. benthamiana* AC fueron colectados y fijados en formaldehído 4% (v/v) con PBS, deshidratados en series de etanol y embebidos en Paraplast Plus (Polysciences Inc. Warrington, PA) como se indica en la siguiente sección. Secciones de 6 a 7 μ m fueron bloqueadas con PBS, BSA 3%, azida de sodio 0.01% y Triton X-100 0.1% por 4 h a 4 °C. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-NaStEP (diluciones 1:3000 ó 1:6000) o con el anticuerpo primario anti-HT-B (dilución 1:3000) a 4 °C toda la noche. Posteriormente, los cortes se pusieron en contacto con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con el fluorocromo Alexa 568 (señal roja) o con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con el fluorocromo FITC (señal verde) por 4 h a 4 °C. Las secciones se observaron usando microscopía confocal de fluorescencia.

Preparación de tejidos para microscopía confocal

Los pistilos fueron colectados en la antesis y los tejidos fijados por 2 h a 4 °C con 4% de formaldehído diluido en PBS. Los tejidos se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se realizaron deshidrataciones graduales a 4 °C con etanol al 30% (1 h), 50% (1 h), 70% (1 h), 85% (1 h), 96% (1 h) y 100% (2 deshidrataciones de 1 h). Los tejidos fueron cortados en fracciones chicas y embebidos en xilol por 15 min y en xilol + paraplast (1:1) por 12-24 h a 55-62 °C. La mezcla xilol + paraplast fue sustituida por paraplast para brindar firmeza y facilitar la ejecución de cortes uniformes en el micrótopo y las muestras se mantuvieron en ella por 24 h a 55-62 °C. Al término de la inclusión, los tejidos se colocaron a RT y 30 min antes de preparar los bloques, se pusieron a 55-62 °C. Los tejidos se colocaron en cubos de 1.5 cm² aproximadamente donde previamente había sido vertido paraplast. Las burbujas fueron eliminadas con una aguja. Una vez solidificado el paraplast a RT, los cubos se pusieron a -20 °C por 5-10 min para contraer el paraplast y poder liberar los bloques del molde. Finalmente, los bloques liberados se rebajaron por los extremos hasta hacer una pirámide donde la mayor área de corte estuviera formada por el tejido. El grosor de los cortes empleado fue de 6 µm y las secciones se pusieron en un baño de flotación (40 °C) antes de colocarse sobre los portaobjetos.

Microscopía electrónica de transmisión (MET) e inmunocitoquímica

Las flores del género *Nicotiana* utilizadas en estos estudios fueron emasculadas 48 h antes de la antesis y polinizadas con el polen de *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia* o *N. alata* BT por 10 h. Los estigmas sin polinizar y polinizados se colectaron y fijaron en formaldehído 3% y glutaraldehído 0.5% en PBS por 19-26 h a 4 °C. El material fue lavado 3 veces con PBS (2 veces por 5 min y una de 15 min) y posfijados con tetraóxido de osmio 1% (diluido en PBS) por 5 h a RT. Se realizaron tres lavados con PBS (dos veces por 5 min y una por 15 min). El material biológico fue deshidratado en una serie gradual de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96, 100%) realizándose dos cambios de cada una de las series cada 10 min y solo en el caso del etanol absoluto se realizaron tres cambios. Las deshidrataciones se realizaron a RT. El material fijado y deshidratado fue infiltrado con la resina LR-White. La primera infiltración se realizó con resina

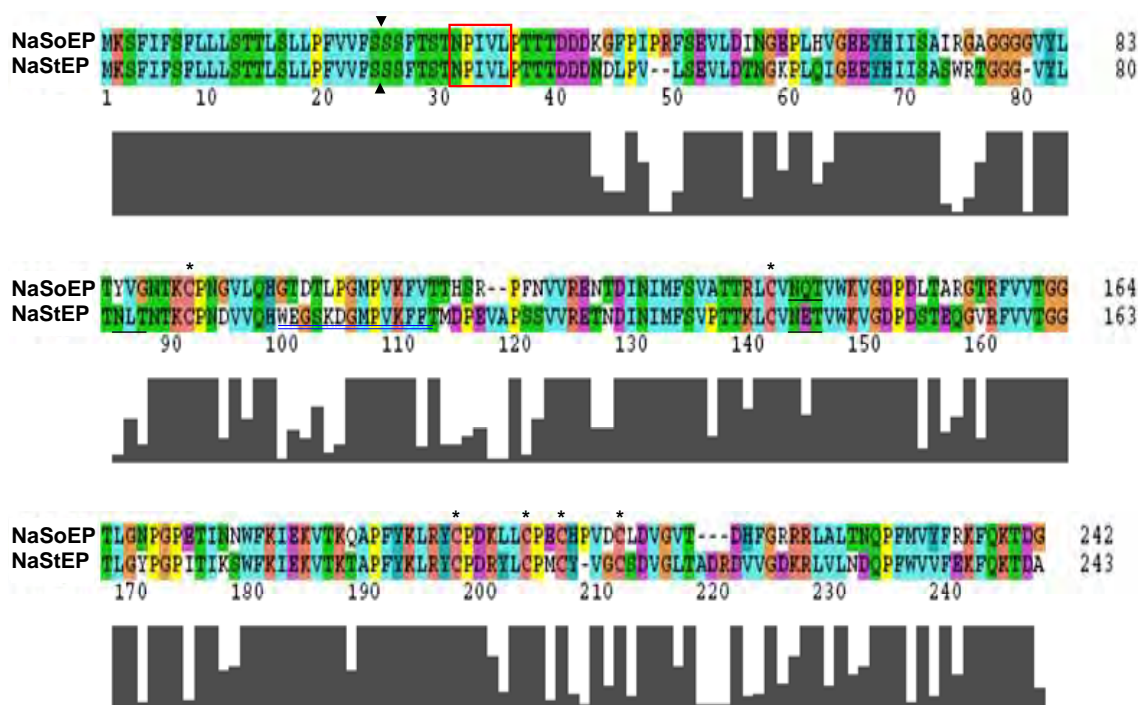
+ etanol absoluto (1:4), la segunda con resina + etanol absoluto (1:1) y la tercera con etanol absoluto + resina (1:4). Todas las infiltraciones se realizaron por 1 h y a 4 °C. Finalmente, se realizaron tres cambios con la resina pura, los dos primeros por 1 h y el tercero por 12 h a la misma temperatura. Las inclusiones del material biológico se realizaron en cápsulas de gelatina a 60 °C en ausencia de oxígeno por 5-8 h. Las secciones de 800 nm fueron obtenidas con el ultramicrotomo LKB. Para las inmunolocalizaciones, las secciones fueron hidratadas y bloqueadas en TBST (Tris pH 7.6, NaCl 150 mM, azida de sodio 20 mM, Tween-20 1%, BSA 5%, suero normal de cabra 5%) por 1 h a RT e incubadas con el anticuerpo anti-NaStEP (1:30) a 4 °C toda la noche. Después de la incubación, las rejillas con los cortes fueron lavadas cuatro veces con TBST por 5 min e incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo (dilución 1:20) acoplado a partículas de oro (20 nm) [Zymed] por 1 h a RT. Finalmente, los cortes se lavaron cuatro veces con TBST por 5 min y por 10 min con H₂O. Las secciones fueron teñidas con acetato de uranilo acuoso 5% y citrato de plomo 3%. Los cortes se observaron con microscopía electrónica de transmisión JEOL a 60 kV.

Resultados

Análisis de secuencias de los genes específicos de pistilo

De las bibliotecas de cDNA fueron recuperadas 9 secuencias completas de cDNA pertenecientes a este gen. Ocho de las clonas tenían secuencia idéntica y sólo una de ellas fue ligeramente diferente. La secuencia de aminoácidos deducida para ambos genes (*NaStEP* y *NaSoEP* [proteína expresada en los órganos sexuales de *N. alata*]) se muestran en la Figura 24A. *NaStEP* y *NaSoEP* codifican para proteínas con 243 y 242 residuos de aminoácidos, respectivamente. A pesar del alto grado de identidad de secuencias entre ellas (70.9%), la proteína madura de *NaStEP* se predice como una proteína ácida (pI 4.68); mientras que la proteína madura de *NaSoEP* se predice como una proteína básica (pI 8.01). Los polipéptidos deducidos tienen 6 cisteínas que están totalmente conservadas en ambas proteínas, las cuales podrían estar participando en el establecimiento de tres puentes disulfuro.

A



B

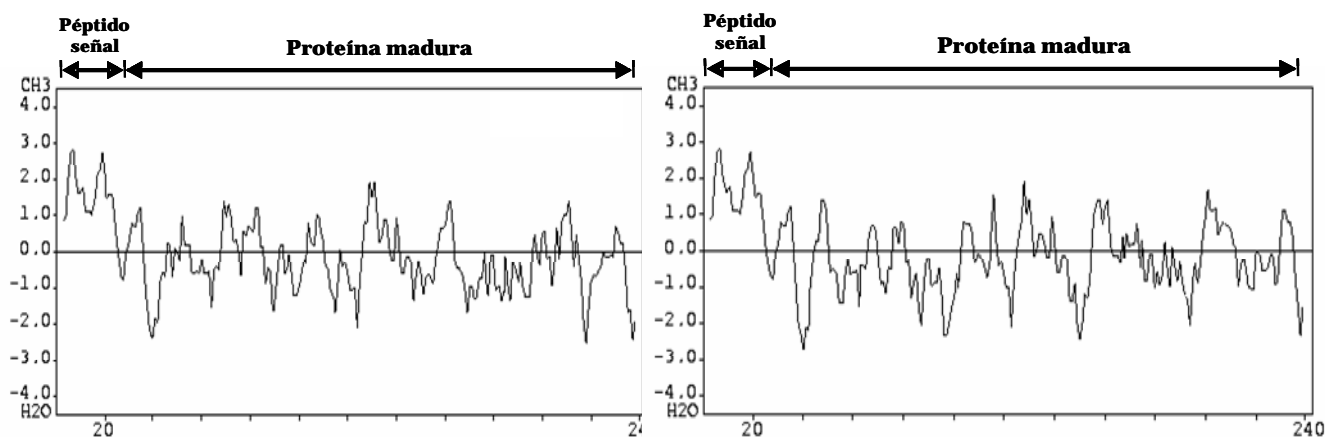


Figura 24. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los cDNAs que codifican para NaStEP y NaSoEP y sus perfiles de hidrofobicidad. (A) Alineamiento de secuencias de NaStEP y NaSoEP. Las secuencias están representadas asignándole colores a residuos específicos. Las cajas negras debajo del alineamiento indican el grado de consenso de las secuencias. Las flechas indican el sitio potencial de ruptura del péptido señal. Los residuos de cisteínas están marcados con un asterisco. Los sitios potenciales de N-glicosilación están subrayados. Las señales de localización vacuolar están marcadas con un rectángulo. La región antigénica está doblemente subrayada. Los guiones en la secuencia indican huecos introducidos con el fin de mantener un buen alineamiento. (B) Índices de hidropatía de los 243 residuos de aminoácidos de NaStEP (izquierda) y 242 aminoácidos de NaSoEP (derecha). Las regiones correspondientes a los péptidos señales y proteínas maduras se encuentran señaladas en los perfiles.

Además, ambas secuencias tienen al menos un sitio potencial de N-glicosilación basado en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina).

Los gráficos de hidropatía (Kyte and Doolittle, 1982) de las secuencias de aminoácidos deducidas de *NaStEP* (Figura 24B izquierda) y *NaSoEP* (Figura 24B derecha), indican que ambas son proteínas solubles con una región hidrofóbica hacia el extremo amino característica de los péptidos señales (Von Heijne, 1986). Un análisis *in silico* con el LOCSVMpsi, predice que estas proteínas son secretadas al espacio extracelular. Otros dos algoritmos diferentes predicen un péptido señal con una probabilidad de 0.994 (Bendtsen *et al.*, 2004; Nielsen and Krogh, 1998). El sitio potencial de ruptura se encuentra entre dos serinas consecutivas en las posiciones 24 y 25 (VFS-SS) para ambas proteínas, produciendo proteínas con masas moleculares teóricas de 24.37 kDa para *NaStEP* y 24.16 kDa para *NaSoEP*. Las proteínas predichas tienen una secuencia específica que señala su envío a vacuolas (ssVSS), de acuerdo al motivo degenerado y conservado [N/L]-[P/L]-[I/S]-[R/S/P] [L/P/M] (Matsuoka and Nakamura, 1999; Holwerda *et al.*, 1992; Frigerio *et al.*, 2001; Saalbach *et al.*, 1996). La secuencia de este pentapéptido específico en *NaStEP* y *NaSoEP* es NPIVL. Análisis posteriores con el programa PA-SUB sugieren que ambas proteínas tienen predicciones positivas para ser secretadas al espacio extracelular (100%) o ser marcadas para ir a vacuolas (99.9% y 99.75%, respectivamente).

El péptido señal completo y la señal de transporte a vacuola están totalmente conservados en ambas proteínas. Comparaciones de la secuencia de aminoácidos deducidas de *NaStEP* y *NaSoEP* con la base de datos de proteínas, revelaron homologías con inhibidores de proteasas de serina, aspártico y cisteína con rangos de identidades de secuencia entre 24.8-79.1%.

La Figura 25 ilustra un árbol filogenético basado en el alineamiento realizado con el CLUSTALX usando algunas de las secuencias completas de inhibidores de proteasas vegetales. El 56% de las proteínas mostradas en el árbol son inhibidores de proteasas tipo Kunitz (homólogos), cuya actividad inhibitoria contra las proteasas aun no ha sido demostrada. Como puede ser visto en el filograma, las proteínas pueden agruparse en seis grupos. De acuerdo a la clasificación de Rawlings *et al.* (2004), todas las secuencias pertenecen a la familia I3 (inhibidores de proteinasas tipo Kunitz de plantas).

El tercero y el sexto grupo están formados por inhibidores de proteasas u homólogos pertenecientes a la subfamilia I3A, la cual corresponde a los inhibidores con un solo sitio reactivo. Los clusters restantes son una mezcla entre inhibidores de las subfamilias I3A e I3B. La subfamilia I3B está restringida a unos pocos miembros que poseen dos sitios reactivos que participan en la inhibición de dos moléculas de peptidasas. Estos inhibidores de peptidasas son conocidos como "inhibidores double-headed" (Ryan and Clary, 1964; Haynes and Feeney, 1967). NaStEP y NaSoEP se agrupan en el grupo V con los inhibidores double-headed de *Solanum tuberosum* y *Lycopersicon esculentum* y junto a NgPI, un nuevo y posible inhibidor de proteasa de *N. glutinosa* (Park *et al.*, 2000 b). El alineamiento de las secuencias correspondiente al grupo V se muestra en la Figura 26. Solo para tres de las proteínas mostradas en el alineamiento (PDI, PCPI y el inhibidor de catepsina D de *S. tuberosum* se ha demostrado que tienen actividad de inhibidores de proteasas. Las secuencias en este grupo tienen un péptido señal y una ssVSS en su propéptido N terminal (NTPP). Los sitios probables de unión para la tripsina Arg99-Phe100 y el quimotripsinógeno Leu144-Leu145, están conservados en cinco de los inhibidores de proteasas u homólogos que caen en este grupo. Los porcentos de identidad de NaStEP/NaSoEP con NgPI, el inhibidor de proteasa de aspártico de *S. tuberosum*, (PIG7) [Heibges *et al.*, 2003], el inhibidor de proteasa de aspártico de *S. tuberosum* (PID4) [Heibges *et al.*, 2003], el inhibidor de catepsina D de *S. tuberosum* (Barlic-Maganja *et al.*, 1992), el inhibidor de catepsina D de *L. esculentum* (Werner *et al.*, 1993), el inhibidor de proteasa de aspártico de *S. tuberosum* (PDI) [Hannapel, 1993], el inhibidor de proteinasa de cisteína de *S. tuberosum* (PCPI) [Brzin *et al.*, 1988], el inhibidor de proteasa de cisteína de *S. tuberosum* (Yamagishi *et al.*, 1991) y el inhibidor de proteasa de cisteína de *S. tuberosum* (S9C11) [Heibges *et al.*, 2003], son: 70.9/79.1%, 33.5/36.0%, 34.4/35.8%, 36.1/39.6%, 35.7/37.3%, 36.5/39%, 43.9/42.5%, 41.3/40.9%, 41.4/40.0%, respectivamente.

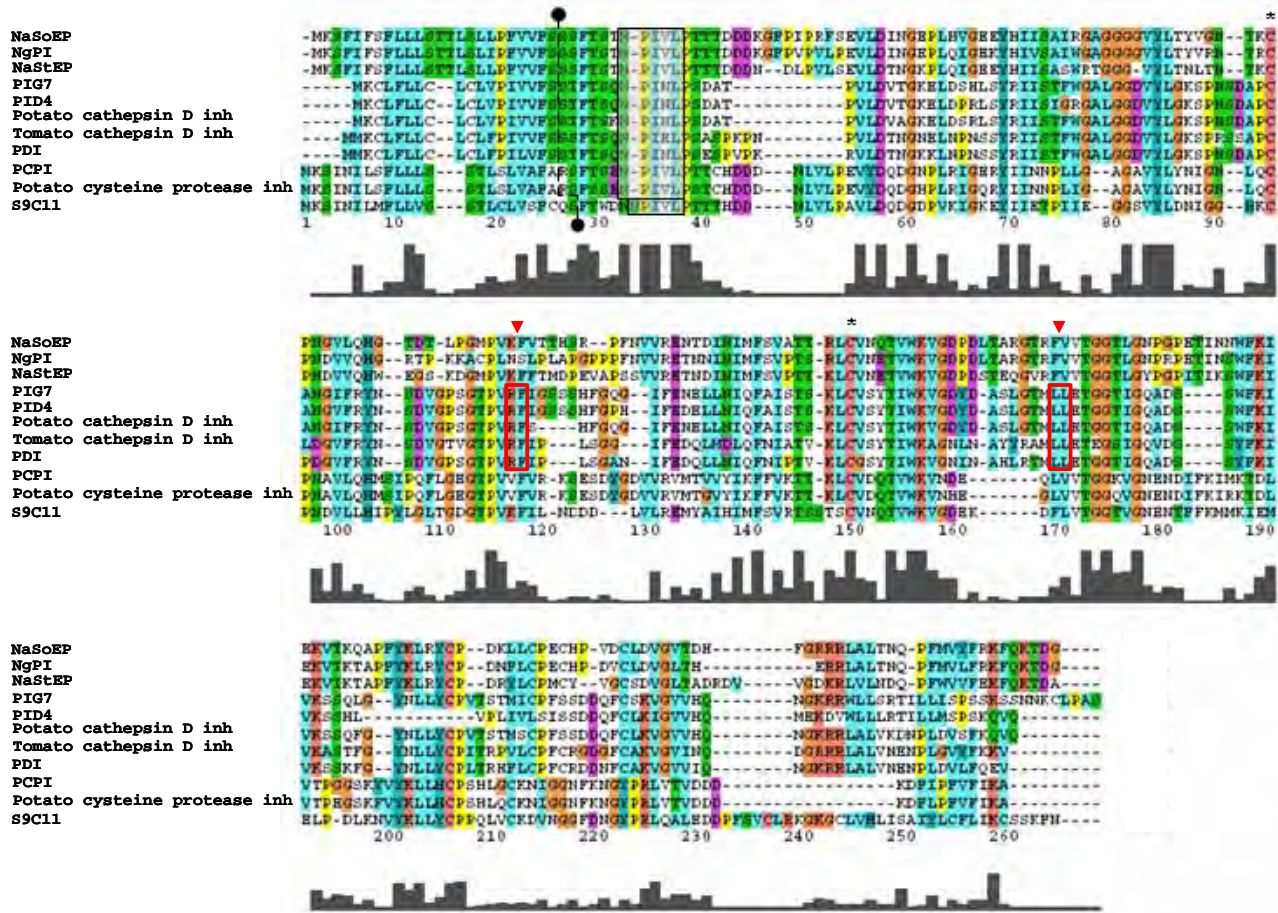


Figura 26. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos más estrechamente relacionadas a NaStEP y NaSoEP. La comparación de las secuencias aminoacídicas se realizó con las proteínas del cluster V: *NaSoEP* de *N.alata*, el inhibidor de proteasas de *N. glutinosa* (NgPI/AF208020), *NaStEP* de *N.alata*, el inhibidor de proteasas de aspártico de *S. tuberosum* (PIG7/AF495581), el inhibidor de proteasas de aspártico de *S. tuberosum* (PID4/AF492358), el inhibidor de catepsina D de *S. tuberosum* (X64370), inhibidor de catepsina D de *L. esculentum* (X73986), el inhibidor de proteasas de aspártico de *S. tuberosum* (PDI/M96257), el inhibidor de proteinasa de cisteína de *S. tuberosum* (PCPI/P20347), el inhibidor de proteinasa de cisteína de *S. tuberosum* (X56874) y el inhibidor de proteasa de cisteína de *S. tuberosum* (S9C11/AF460237). El grado de consenso en las secuencias está indicado por cajas negras debajo del alineamiento. El conector muestra el sitio potencial de ruptura del péptido señal predicho por el algoritmo NN. La señal de localización vacuolar está enmarcada. Los residuos de cisteínas conservados fueron señalados con un asterisco. Los enlaces reactivos para la tripsina y el quimotripsinógeno se encuentran enmarcados con un rectángulo y señalados con una flecha. Los guiones en la secuencia indican huecos introducidos para maximizar la homología de secuencias.

NaStEP y NaSoEP están temporal y diferencialmente regulados en N. alata

Para determinar el patrón de expresión de estos genes en plantas de *N. alata*, se desarrollaron ensayos tipo réplica en Northern con RNA total de anteras y estilos/estigmas en desarrollo, hojas, tallos, sépalos, pétalos y estilos o estigmas maduros usando como sondas, cDNAs [³²P] de *NaStEP* y *NaSoEP*. La Figura 27A muestra los patrones de expresión de *NaSoEP* en pistilos y anteras en desarrollo. El nivel más alto de expresión de este transcrito se alcanzó en las anteras y estilos/estigmas de botones florales de 0.5 a 1.0 cm observándose una marcada disminución de éste en estadios más avanzados del desarrollo del pistilo y la antera. La expresión de este gen es indetectable hacia la madurez (botones desde 3.5-6.0 cm hasta la antesis) en ambos órganos reproductivos (Figura 27A). Sin embargo, cuando los estigmas se separan de los estilos maduros (6 cm) fue posible apreciar una señal del mensajero de *NaSoEP* a la altura de 1.4 kb solamente en el estigma. La presencia de *NaSoEP* en estigmas maduros y su ausencia en estigmas + estilos a partir de los 3.5 cm puede deberse a que su expresión en las etapas maduras del desarrollo del pistilo es tan baja que cuando los tejidos estigmáticos se combinan con los estilares no es posible detectar su expresión, por un efecto de dilución. Al analizar el comportamiento del transcrito de *NaStEP* en diferentes etapas de desarrollo del estilo + estigma, se observó que éste se expresa desde etapas tempranas del desarrollo alcanzando una expresión máxima hacia la madurez del pistilo. Como se puede apreciar (Figura 28B), este gen no se expresa en ninguna etapa del desarrollo de la antera y su expresión se confina específicamente al estigma. Los transcritos de *NaStEP* o *NaSoEP* no se detectaron en ninguno de los órganos vegetativos probados (hoja, tallo, sépalo, y pétalo) [Figura 27A y 28A].

NaStEP es una proteína específica del estigma

Para conocer si el patrón de expresión de la proteína NaStEP era similar al patrón de expresión de su mRNA se prepararon anticuerpos contra NaStEP, basados en un péptido sintético del mismo. Para probar si el anticuerpo anti-NaStEP inmunoreaccionaba con un epítipo en NaStEP, el cDNA de este gen fue sobreexpresado en *E. coli* como proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (GST).

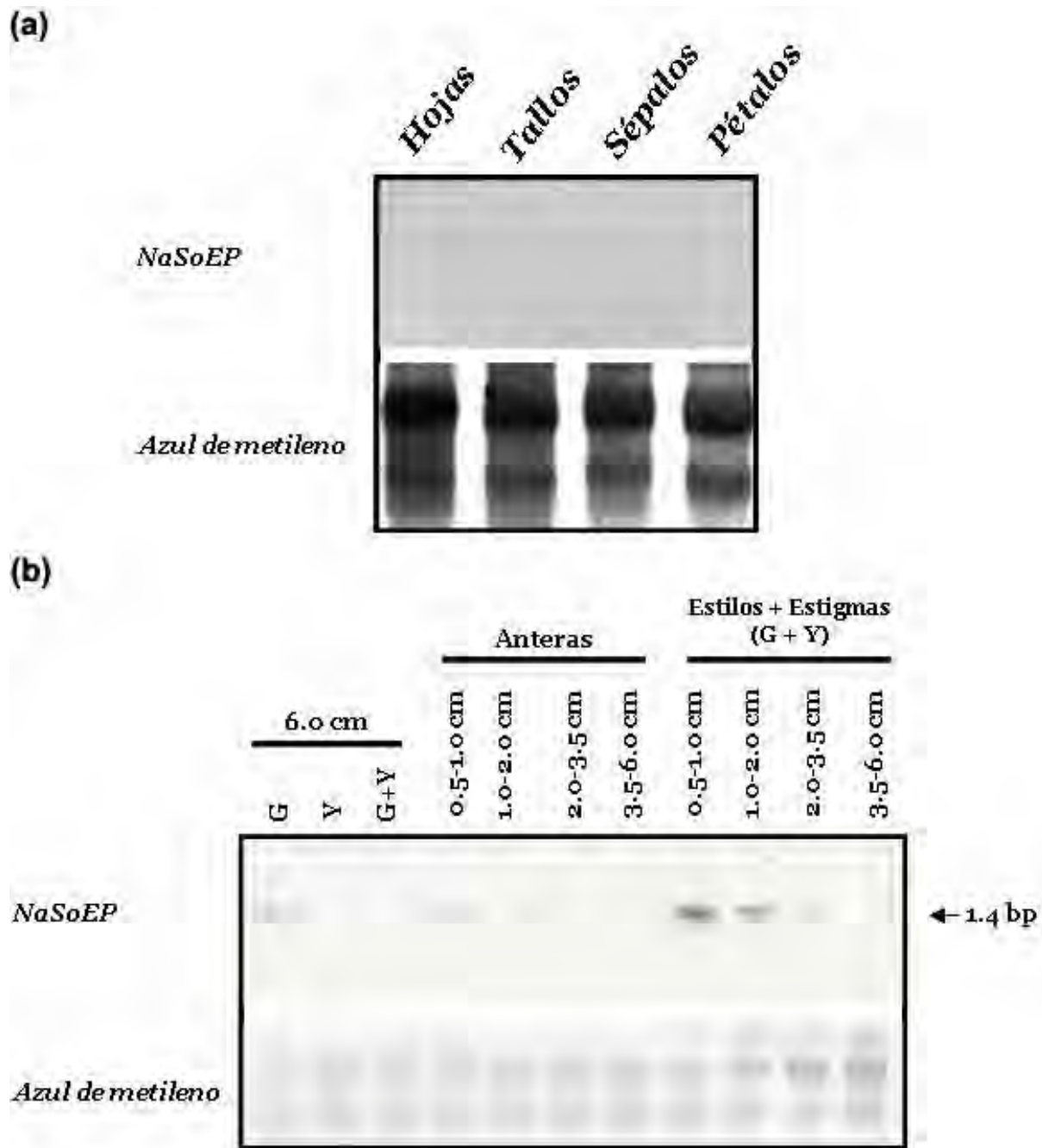
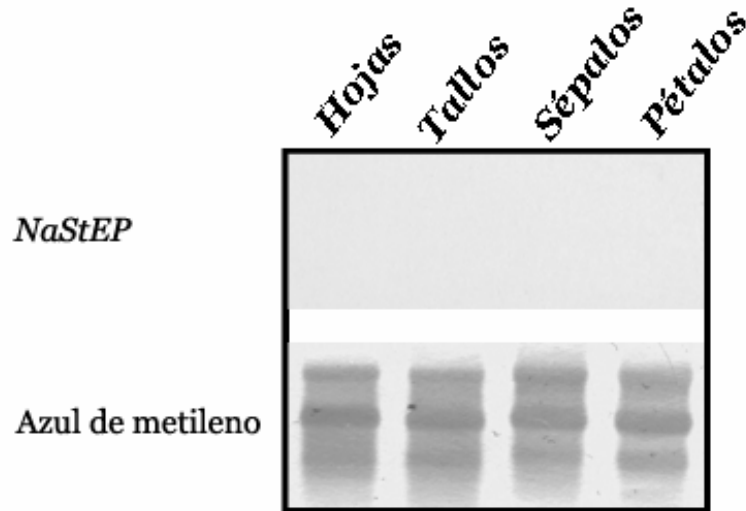


Figura 27. Análisis de la expresión de los transcritos de *NaSoEP* en *N. alata*. (A) Análisis por Northern blot de la expresión de *NaSoEP* en órganos vegetativos de *N. alata* cv Breakthrough AC. (B) Patrón de expresión de *NaSoEP* durante el desarrollo de estilos y anteras de *N. alata* *Sc10Sc10* AI. El RNA total de las especies indicadas (10µg de RNA_T de órganos vegetativos y 5µg del resto) fue cargado en cada pozo, transferido e hibridado con cDNA [³²P] de *NaSoEP*. G, estigmas aislados en la antesis; Y, estilos aislados en la antesis; G+Y, estilos más estigmas en la antesis; carriles 4-7, anteras en desarrollo de las etapas indicadas; carriles 8-11, pistilos en desarrollo (estigmas más estilos) de los tamaños indicados. Los filtros de RNA fueron teñidos con azul de metileno para asegurar condiciones equivalentes de cargado.

(a)



(b)

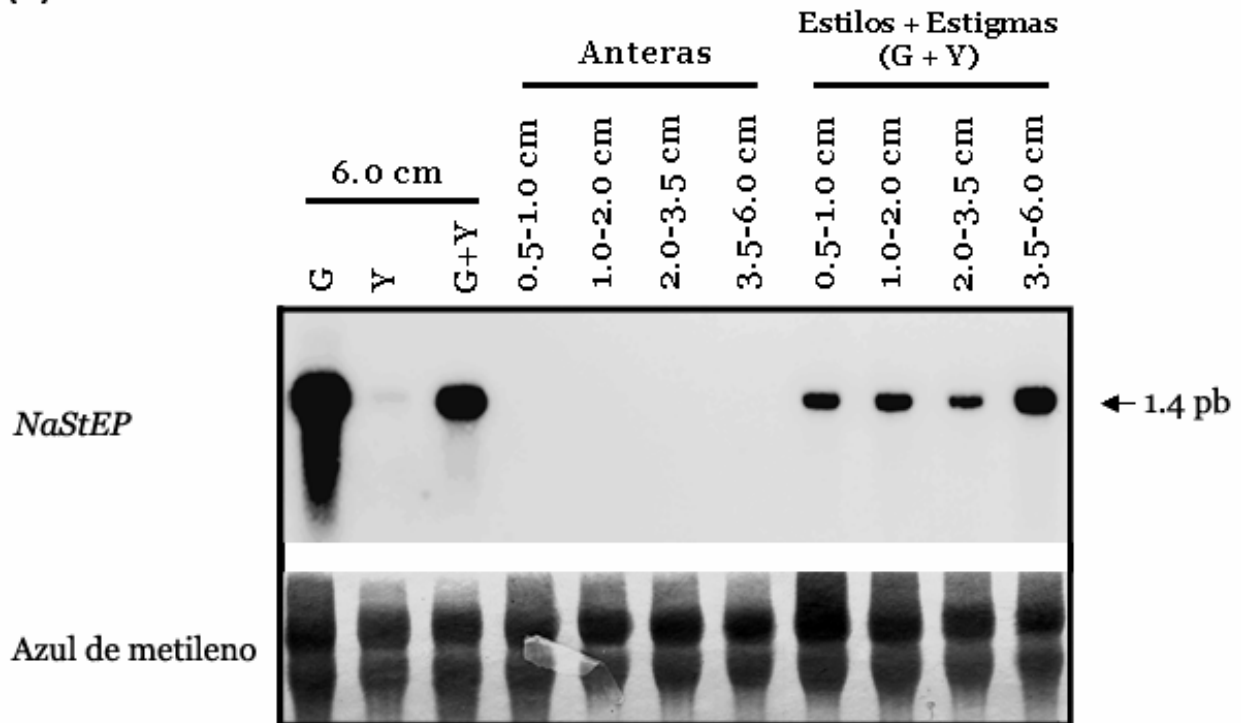


Figura 28. Análisis de la expresión de los transcritos de *NaStEP* en *N. alata*. (A) Análisis por ensayo tipo Northern blot de la expresión de *NaStEP* en órganos vegetativos de *N. alata* cv Breakthrough AC. (B) Patrón de expresión de *NaStEP* durante el desarrollo de estilos y anteras de *N. alata* *Sc10Sc10* AI. El RNA total de las especies indicadas (5µg de RNA_T de órganos vegetativos y 10 µg de RNA_T de órganos sexuales) fue cargado en cada pozo, transferido e hibridado con cDNA [³²P] de *NaStEP*. G, estigmas aislados en la antesis; Y, estilos aislados en la antesis; G+Y, estilos más estigmas en la antesis; carriles 4-7, anteras en desarrollo de las etapas indicadas; carriles 8-11, pistilos en desarrollo (estigmas más estilos) de los tamaños indicados. Los filtros de RNA fueron teñidos con azul de metileno para asegurar condiciones equivalentes de cargado.

La Figura 29 muestra que los anticuerpos anti-NaStEP reaccionan con una proteína de alrededor de 40 kDa la cual se corresponde con la masa molecular predicha para la proteína de fusión GST:NaStEP (14.16 kDa de NaStEP + 26 kDa de la GST) (Figura 29A, panel superior izquierdo e inferior). La misma proteína de fusión recombinante de 40 kDa fue detectada cuando se usaron anticuerpos contra la proteína GST (Figura 29A, panel superior e inferior derecho). Además, como se puede apreciar en la Figura 29A, panel inferior izquierdo, no existe ninguna reacción cruzada con proteínas bacterianas. Esto sugiere que los anticuerpos son específicos para la proteína de interés.

El análisis de la distribución de NaStEP en diferentes órganos de plantas de *N. alata* BT por inmunoanálisis reveló que esta proteína tiene una expresión restringida al estigma (Figura 29B), como su mensajero. La detección de NaStEP en menor proporción en el pistilo, se debe a la contribución aportada exclusivamente por el estigma a este órgano, al no ser detectada la proteína en estilos ni en ovarios (Figura 29B). Como los ensayos tipo réplica en Northern (Figuras 27-28) mostraron que ambos transcritos, *NaSoEP* (menos abundante) y *NaStEP* se expresan en estigmas maduros, podría ser posible que los anticuerpos anti-NaStEP estuvieran detectando a ambas proteínas en los tejidos estigmáticos. Para descartar esto, se fraccionaron en segunda dimensión proteínas estilares y estigmáticas provenientes de pistilos maduros de *N. alata* $S_{A2}S_{A2}$. Si ambas proteínas estuviesen expresadas en estigmas maduros, entonces serían inmunodetectadas proteínas con puntos isoeléctricos de 4.68 (NaStEP) y 8.01 (NaSoEP). La Figura 30 (panel superior izquierdo) muestra que solamente cuatro manchas abundantes del tamaño esperado para NaStEP fueron detectadas a valores ácidos de pH. La detección de la S_{A2} -RNasa (pI 8.016) fue usada como control de perfiles de migración de proteínas básicas. Como se esperaba, la S-RNasa fue detectada a altos valores de pH (Figura 30, panel superior derecho). Los resultados confirmaron que la proteína que inmunoreaccionó con el suero anti-NaStEP fue NaStEP. Existen tres causas que pudieran explicar por qué los anticuerpos anti-NaStEP no reconocieron a NaSoEP en estigmas maduros: 1) su transcrito no se ha traducido a proteína, 2) NaSoEP no es una proteína abundante en estigmas maduros y 3) los anticuerpos anti-NaStEP no reaccionan con NaSoEP.

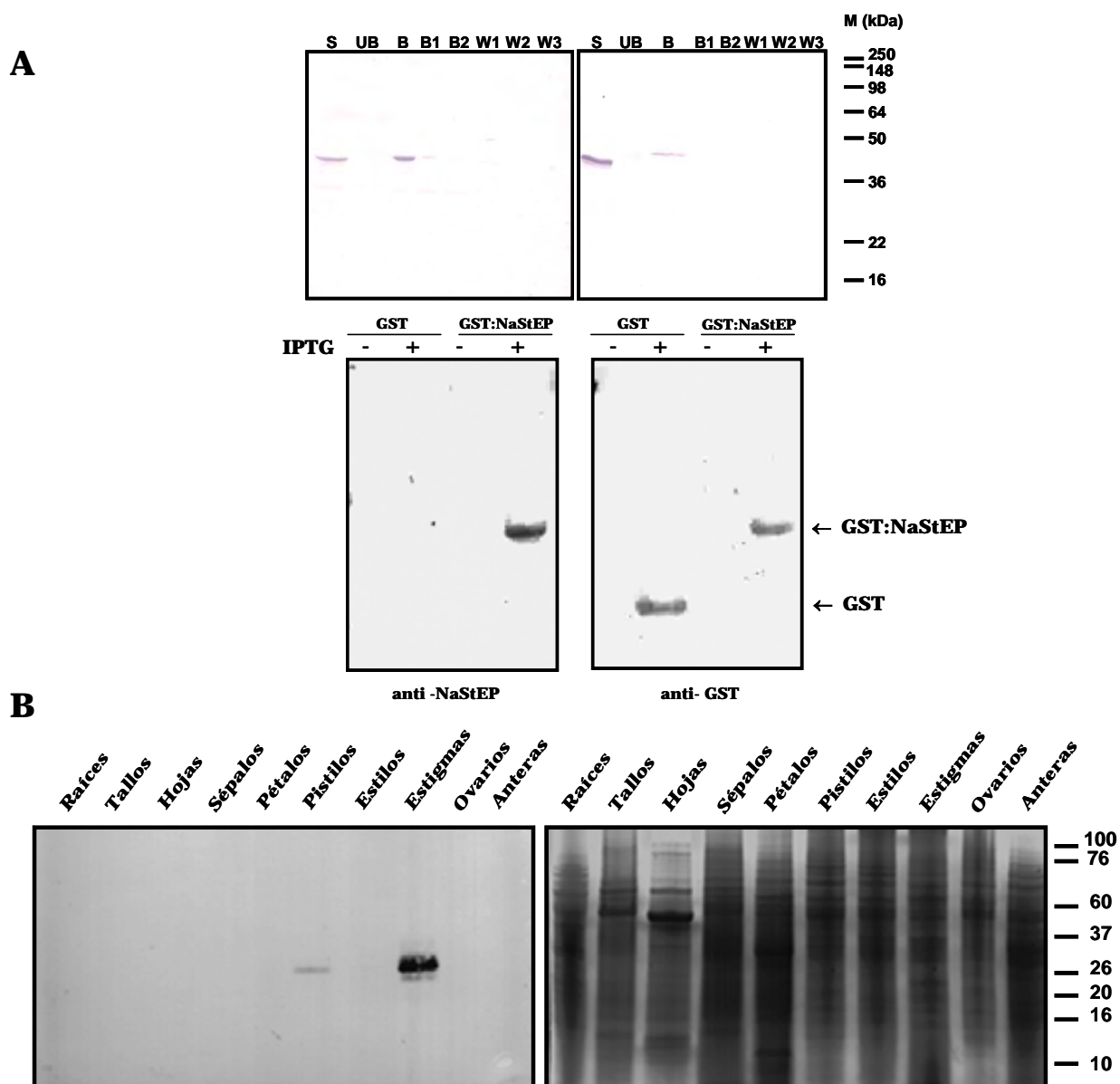


Figura 29. Inmunodetección de la proteína recombinante y nativa NaStEP en *E. coli* y *N. alata* BT. A) La proteína recombinante GST:NaStEP fue purificada por cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa 4B (panel superior). La fracción soluble (S), a partir de la inducción de células de *E. coli* transformadas con el pGEX-4T-2:NaStEP, fue incubada con la resina. Después de recuperar la fracción no unida (UB) se realizaron tres lavados (W1, W2 y W3) y las proteínas fuertemente unidas a la resina fueron eluidas tres veces (B, B1 y B3). Sobreexpresión de NaStEP en células de *E. coli* en ausencia y presencia de IPTG (panel inferior). Las células de *E. coli* sin lisar se sometieron a los tratamientos indicados, se fraccionaron en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas. Las inmunodetecciones se realizaron con los anticuerpos indicados al final de cada panel inferior. B) Iguales cantidades de proteínas de órganos reproductivos y vegetativos de *N. alata* AC (17 μ g) fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12.5 %, teñidas con Azul de Coomassie (panel derecho) o transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo anti-NaStEP (panel izquierdo). Los números indican las masas moleculares aparentes en kilodaltons.

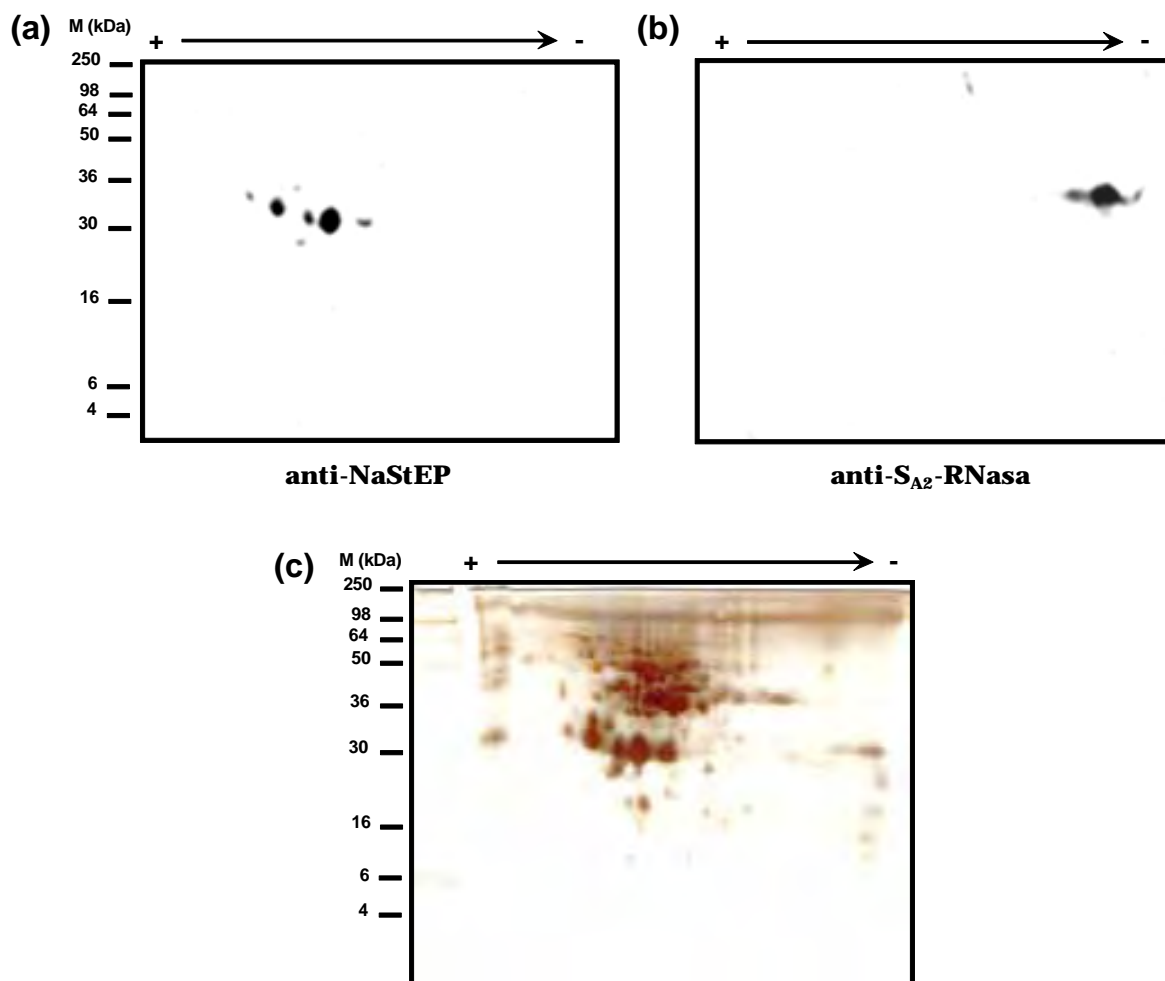


Figura 30. Electroforesis bidimensional de proteínas estilares y estigmáticas de *N. alata* AI e inmunodetecciones de las proteínas NaStEP y S_{A2}-RNasa. Las proteínas estilares y estigmáticas (50 µg) fueron disueltas en solución de rehidratación antes del IEF y aplicadas a las tiras Immobiline (pH 3-10) para la primera dimensión. En la segunda dimensión, las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15 % y teñidas con nitrato de plata (c) o transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con los anticuerpos indicados, anti-NaStEP (a) o anti-S_{A2}-RNasa (b). Los números a la izquierda indican los pesos moleculares aparentes.

Presencia de formas glicosiladas de NaStEP en estigmas de N. alata

La predicción de dos posibles sitios de N-glicosilación durante el análisis de la secuencia de aminoácidos de *NaStEP*, hizo pensar que la aparición de varios puntos en los experimentos de doble dimensión podían deberse a la existencia de formas glicosiladas de esta proteína. Dos aproximaciones experimentales se desarrollaron para determinar la presencia de carbohidratos sobre la proteína de interés: 1) cromatografía de afinidad empleando Con A sefarosa y 2) desglicosilación enzimática utilizando la PNGasa F. Como se puede apreciar en la Figura 31, de las cuatro bandas detectadas por el anticuerpo anti-*NaStEP* en los extractos crudos de *N. alata*, dos de ellas, la tercera y la segunda banda (Figura 31C), se retuvieron en la columna de Con A sefarosa, indicando que estas proteínas están glicosiladas (Figura 31A). Ninguna de las isoformas de *NaStEP* se detectó en los lavados realizados a la columna para eliminar las interacciones inespecíficas con la Con A sefarosa ni en las primeras dos fracciones correspondientes a las proteínas de unión a la resina. Las isoformas dos y tres se detectaron desde la tercera hasta la quinta fracción unida a la Con A (Figura 31A). Aunque la banda superior (la cuarta) [Figura 31C] no se detectó en las fracciones unidas a la Con A sefarosa, esta isoforma desaparece después del tratamiento con la PNGasa F (Figura 31C), sugiriendo que también se encuentra glicosilada.

NaStEP no es un inhibidor funcional de proteasas de serina

Como *NaStEP* es homólogo a inhibidores de proteasas tipo Kunitz, se llevaron a cabo experimentos para determinar si esta proteína era o no un inhibidor de proteasas activo. Para ello, se hizo necesario purificar a homogeneidad a la proteína nativa por cromatografía de filtración en gel e intercambio iónico (Figuras 32 y 33). Como se puede observar, se necesitaron dos cromatografías de intercambio iónico para enriquecer de forma considerable a *NaStEP* (Figura 32). Durante la primera, *NaStEP* se pegó a la Q sefarosa y fue eluida de la misma con concentraciones de NaCl entre 50-250 mM. Como estas fracciones enriquecidas con *NaStEP* no están totalmente puras (Figura 32C), se decidió repetirle el pegado a la Q sefarosa utilizando en esta ocasión un amortiguador de pH ácido.

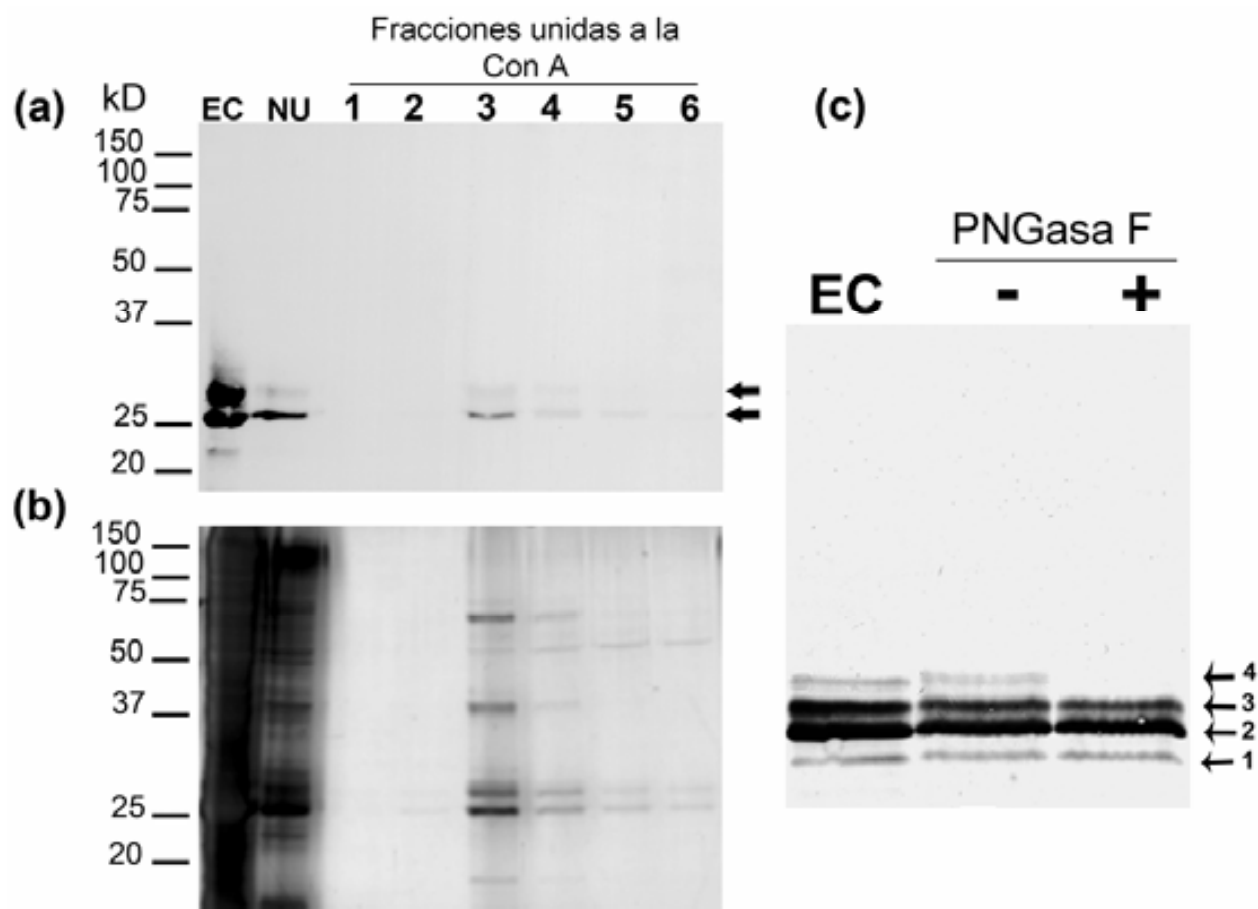


Figura 31. Cromatografía de afinidad y ensayos de desglicosilación enzimática usando extractos proteicos crudos de estigmas más estilos de *N. alata* AI. (a) Inmunodetección de NaStEP en las fracciones recuperadas de la cromatografía de afinidad a Con A sefarosa, una vez fraccionadas y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda de cada panel. (b) Tinción con nitrato de plata de las fracciones recuperadas de la cromatografía de afinidad después de su aplicación en geles de poliacrilamida al 12%. (c) Inmunoanálisis de la desglicosilación de NaStEP por la acción de la PNGase F. CE, extracto crudo; UB, fracción no unida; 1-6, fracciones unidas a la Con A sefarosa colectadas secuencialmente después de la adición de metil- α -D-mannopiranosido; -, control negativo, PNGase inactiva (10 min a 90 °C); +, control positivo, PNGase activa (sin tratamiento térmico).

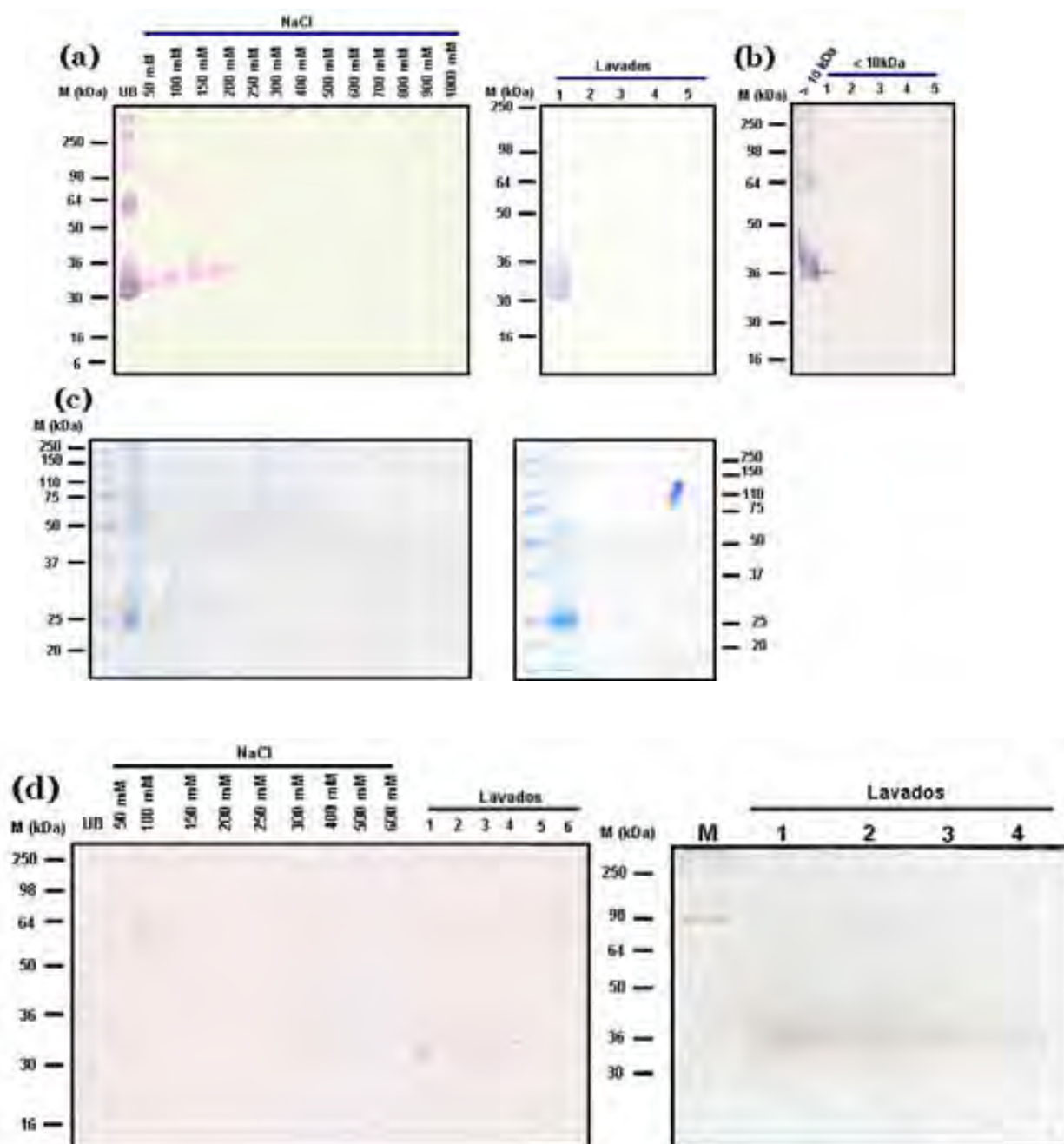


Figura 32. Purificación de NaStEP por cromatografía de intercambio iónico. (a) Inmunodetección de NaStEP Tinción con nitrato de plata de las fracciones recuperadas de la cromatografía de exclusión molecular después de su aplicación en geles de poliacrilamida al 12%. (b) Inmunodetección de NaStEP en las fracciones recuperadas de la purificación por HPLC, una vez fraccionadas y transferidas a membranas de nitrocelulosa. El número de las fracciones obtenidas se indica encima de cada panel. Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda de cada panel.

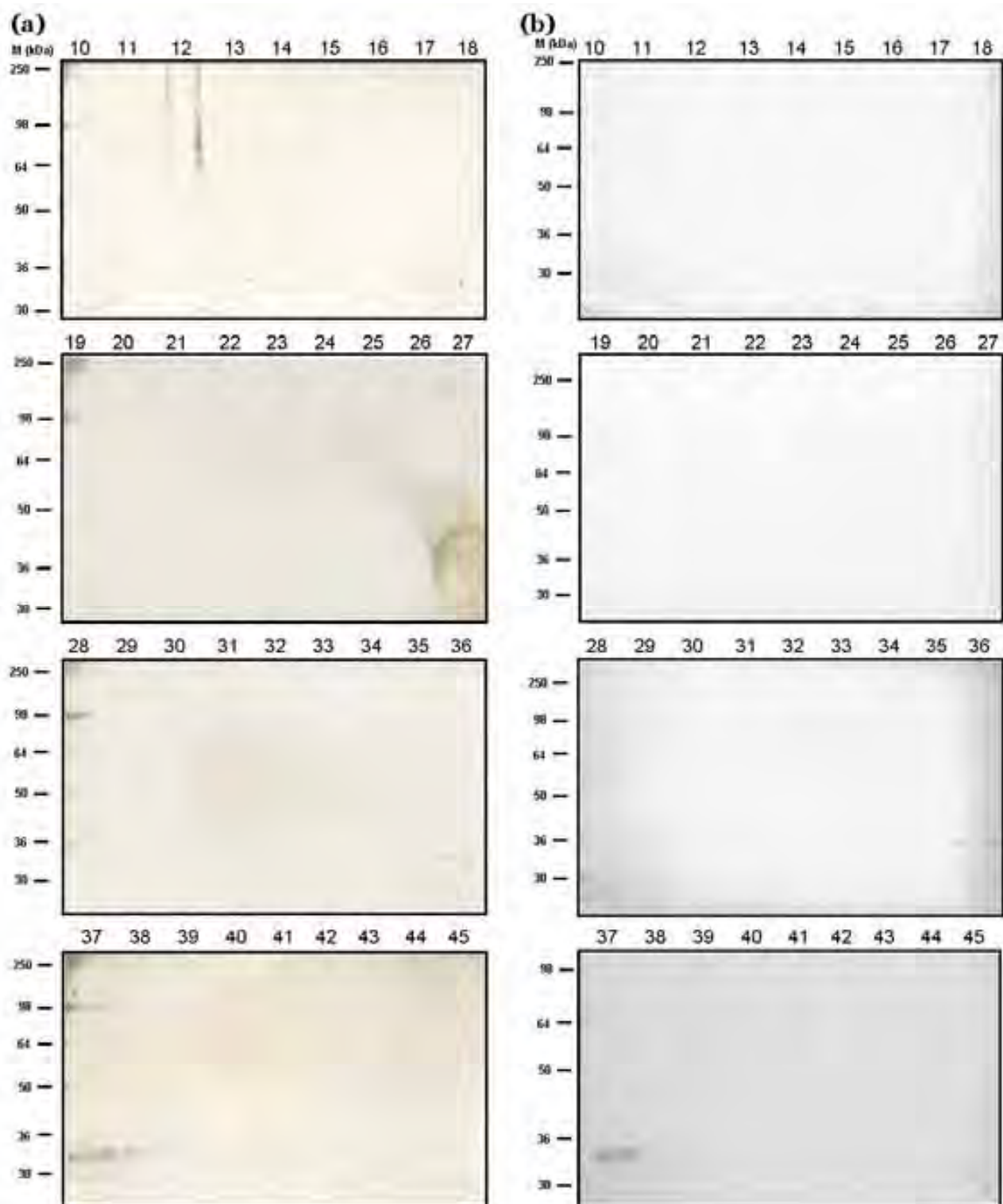


Figura 33. Purificación de NaStEP por HPLC. (a) Tinción con nitrato de plata de las fracciones recuperadas de la cromatografía de exclusión molecular después de su aplicación en geles de poliacrilamida al 12%. (b) Inmunodetección de NaStEP en las fracciones recuperadas de la purificación por HPLC, una vez fraccionadas y transferidas a membranas de nitrocelulosa. El número de las fracciones obtenidas se indica encima de cada panel. Los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda de cada panel.

El cambio de amortiguador de las fracciones enriquecidas con NaStEP muestra que aunque hubo pérdida de proteína en fracciones menores a los 10 kDa, la cantidad de NaStEP era suficiente (Figura 32B) para proseguir con la segunda cromatografía de intercambio aniónico. La Figura 32D muestra que NaStEP no se retuvo en la resina y eluyó en las fracciones correspondientes a los lavados realizados para eliminar interacciones inespecíficas. Las fracciones enriquecidas con NaStEP se combinaron y NaStEP fue purificada por la técnica de HPLC (Figura 33). Como se puede apreciar NaStEP se encuentra totalmente pura en las fracciones 36-39. Las bandas adicionales que aparecen en la fracción 37 se deben a contaminación con los marcadores de masa molecular durante la aplicación de las muestras en el gel de poliacrilamida.

La actividad inhibitoria de la proteína NaStEP nativa y purificada fue probada en geles de poliacrilamida (Figuras 34). En los ensayos de actividad, la actividad catalítica de la tripsina se puede visualizar en toda la superficie colorida del gel, excepto en las áreas donde el inhibidor está presente. La Figura 34 muestra que NaStEP no tiene actividad inhibitoria contra la tripsina, en las condiciones en que el inhibidor de tripsina de soya, usado como control positivo, presenta esta actividad. Resultados similares se obtuvieron cuando tres fracciones de NaStEP enriquecidas a partir de la cromatografía de afinidad con Con A (fracciones 3-5, Figura 31) fueron usadas para los ensayos de actividad (datos no mostrados).

NaStEP se localiza específicamente en papilas estigmáticas

Para investigar la localización de NaStEP sobre los tejidos estigmáticos, se hicieron análisis inmunohistoquímicos usando microscopía confocal en tres dimensiones. Las secciones longitudinales y transversales de estilos de *N. alata* ($S_{105}S_{105}$ y $S_{C10}S_{C10}$) fueron teñidas y visualizadas al microscopio óptico para corroborar el adecuado procesamiento del tejido (Figura 35) y posteriormente se marcaron inmunológicamente con los anticuerpos policlonales anti-NaStEP purificados por afinidad o con los anticuerpos anti HT-B (Figura 36). En la Figura 35, se pueden apreciar perfectamente las zonas correspondientes a los tejidos estigmáticos y estilares en los cortes realizados. Los análisis inmunohistoquímicos muestran que la expresión de NaStEP se encuentra restringida al estigma (Figuras 36b-c).

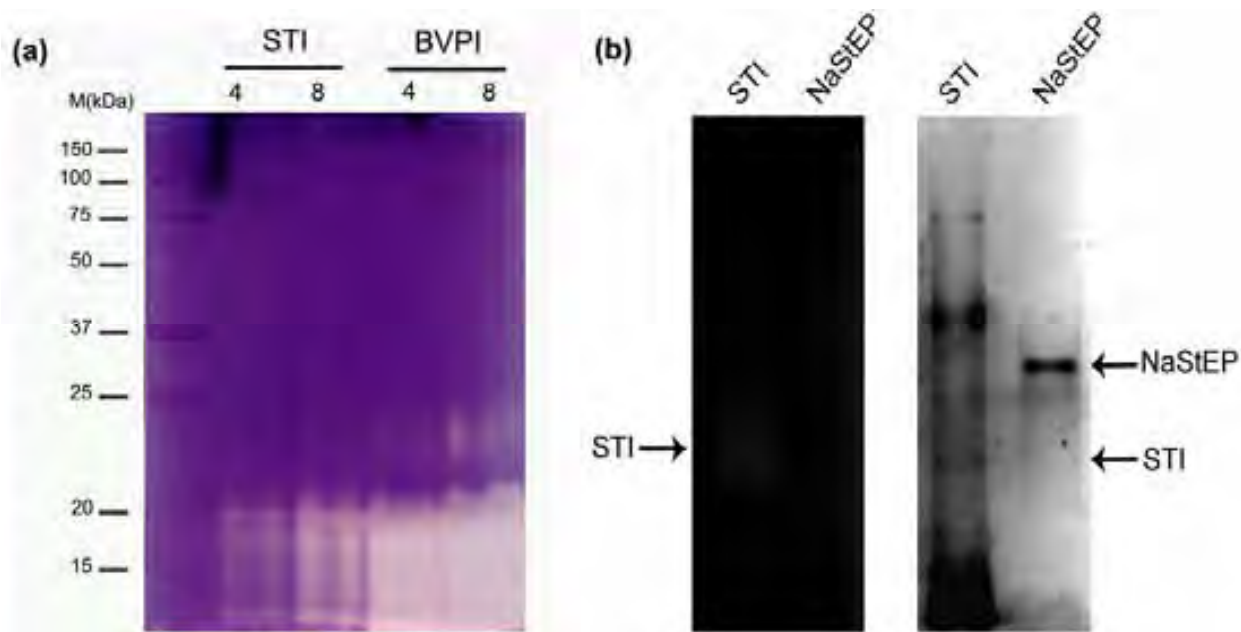


Figura 34. Ensayos de actividad de inhibidores de proteasas de serina. (a) Geles de actividad inhibitoria contra la tripsina usando los inhibidores comerciales STI y BVPI. Los números en los carriles indican la cantidad de inhibidores aplicada a cada carril (4 μg y 8 μg , respectivamente). (b) Gel de actividad inhibitoria contra la tripsina usando a NaStEP (combinación de las fracciones 26-28 de la purificación por HPLC) purificada a partir de estigmas de *N. alata* (panel izquierdo) y tinción con nitrato de plata de una réplica del gel de actividad (panel derecho). STI fue usado como control positivo (3 μg).

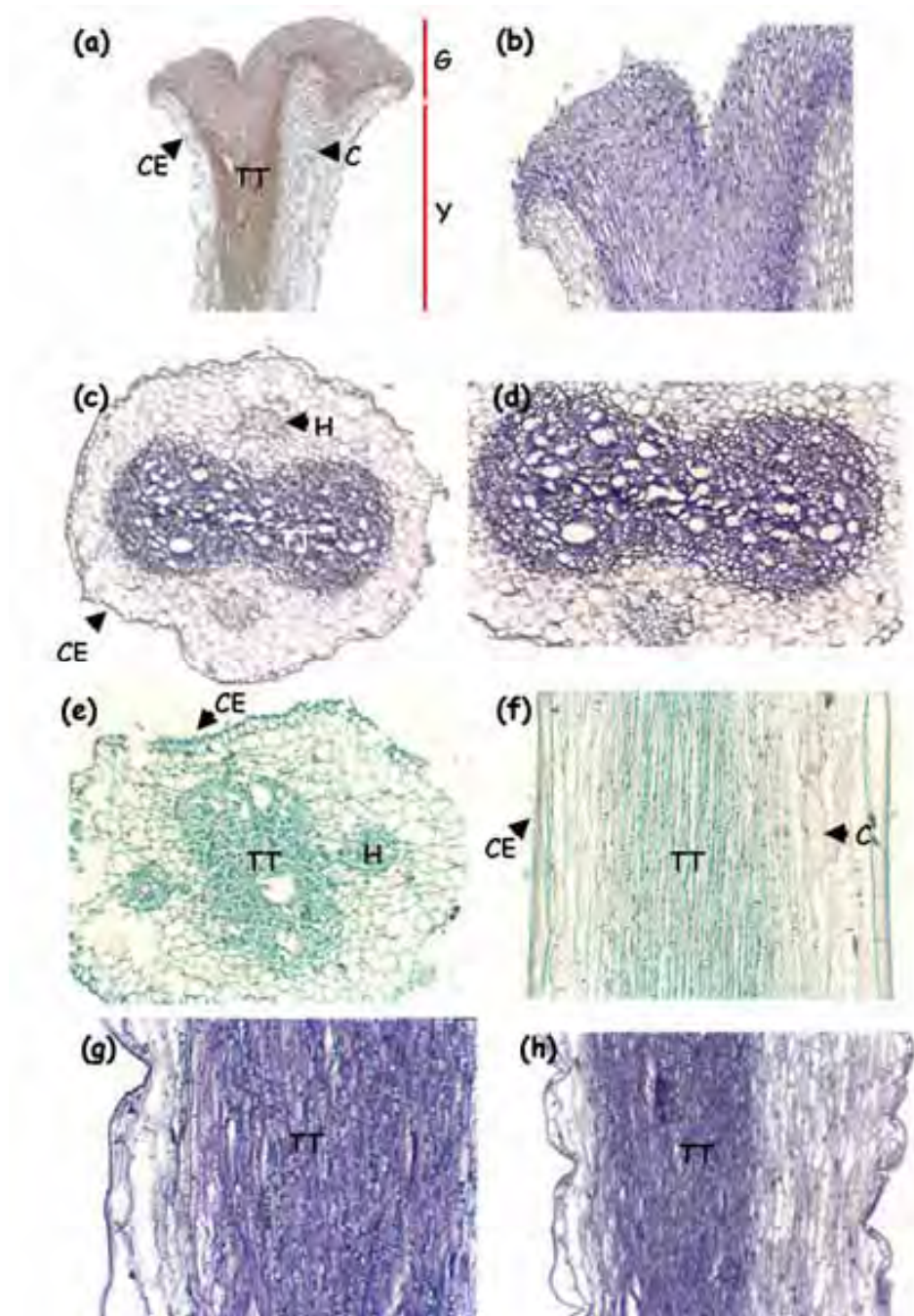


Figura 35. Secciones transversales y longitudinales de estilos y estigmas de *N. alata*. (a) Corte longitudinal del estigma y el primer tercio del estilo. (b) Acercamiento de la zona estigmática presentada en (a). (c) Corte transversal a nivel del estigma. (d) Acercamiento del tejido de transmisión mostrado en (c). (e) Sección transversal a nivel del primer tercio del estilo. (f) Corte longitudinal del estilo. (g) Acercamiento del tejido de transmisión mostrado en (h). (h) Corte longitudinal del estilo. G: estigma, Y: estilo, TT: tejido de transmisión, CE: células epidérmicas, C: cortex, H: haz vascular.

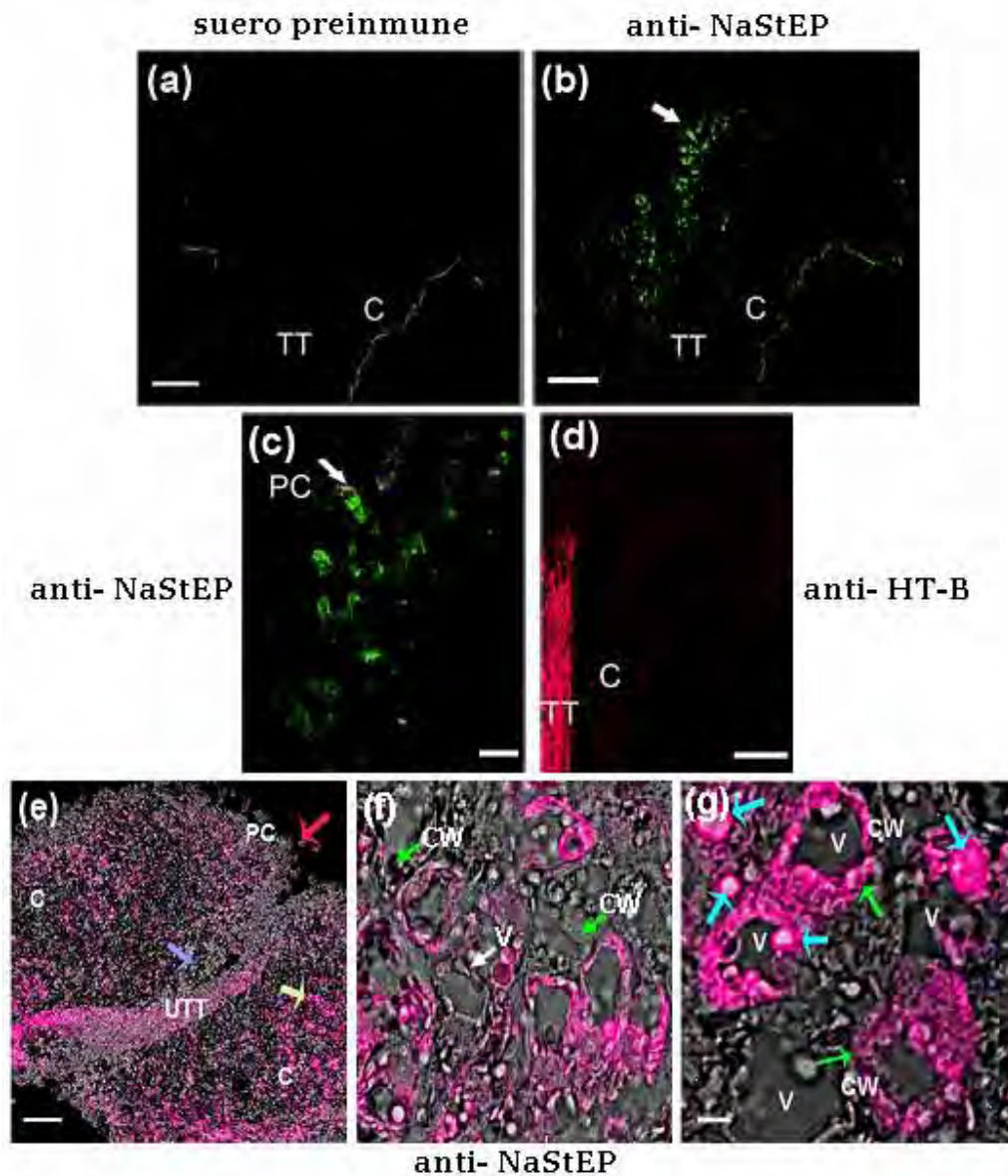


Figura 36. Análisis inmunohistoquímicos de NaStEP y HT-B en tejidos estigmáticos y estilares de *N. alata* BT. (a) Estilos más estigmas tratados con suero preimmune. (b) Estilos más estigmas tratados con el anticuerpo anti-NaStEP (señal verde). (c) ampliación del tejido estigmático mostrado en (b). (d) Estilos más estigmas tratados con el anticuerpo anti-HT-B (señal roja). (e) Secciones transversales de estigma mostrando a NaStEP (señal magenta) en las papilas estigmáticas (flecha roja), las células secretoras (flecha amarilla), células basales (flecha azul) y en la parte superior del tejido de transmisión. (f) Aumento de las células estigmáticas incubadas con el anti-NaStEP. Las flechas blancas y verdes indican la localización de NaStEP en vacuolas y pared celular, respectivamente. (g) Acercamiento de las células estigmáticas secretoras expresando a NaStEP, mostrando su localización en pequeños cuerpos (flechas azules) y en la proximidad de la pared celular (flechas verdes). TT, tejido de transmisión; CW, pared celular; V, vacuolas; UTT, parte superior del tejido de transmisión; C, cortex; PC, células papilares. Las barras se corresponden con 50 μm en (a), (b), (c) y (d), 20 μm en (e), y 5 μm en (f).

NaStEP fue detectada en las células papilares (Figura 36c), a diferencia de HT-B cuya expresión se observa solamente en el TT del estilo (Figura 36d). El suero preinmune fue utilizado como control de autofluorescencia (Figura 36a). En las secciones transversales de estigmas de *N. alata* BT se observa que NaStEP se expresa en el tejido estigmático, incluyendo el TT del estigma (Figura 36e). En una ampliación de las células estigmáticas (Figuras 36f-g), se muestra que NaStEP se localiza en el límite de las células y dentro de compartimentos subcelulares vacuolares, algunos de los cuales están muy próximos a la membrana plasmática.

NaStEP es una proteína vacuolar presente en el exudado estigmático después de la polinización

La presencia en NaStEP de una señal de localización vacuolar (NPVIL) en su NTPP condujo a experimentos de microscopía electrónica de transmisión para determinar su localización celular. Para ello se analizaron estigmas de *N. alata* BT sin polinizar y polinizados por 10 h con polen proveniente de *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia* o *N. alata* cv BT. La Figura 37A muestra secciones transversales de células papilares sin polinizar (intactas) en la anthesis rodeadas por copiosas masas de gotas de secreción en el exudado. Como se puede apreciar, las paredes celulares presentan interrupciones discretas (flechas). En estas células papilares el citoplasma se encuentra desplazado hacia la periferia por grandes vacuolas, las cuales contienen cuerpos osmiofílicos (retienen osmio) que son incorporados dentro de la vacuola por pequeñas vesículas, probablemente llegando del retículo endoplasmático (Figura 37B). Después de la incubación de las células papilares con el anti-NaStEP se detectó que esta proteína se acumuló fundamentalmente en los cuerpos osmiofílicos dentro de la vacuola (Figura 37C), sin ninguna detección perceptible en el exudado estigmático (Figura 37D). Sin embargo, cuando los estigmas de *N. alata* BT fueron polinizados con polen de *N. tabacum*, varios cambios se observaron en las células papilares. La Figura 37E muestra que a las 10 horas después de la polinización (h.d.p.), las células papilares presentan un citoplasma perturbado. Las vacuolas y otros organelos degeneran y los cuerpos osmiofílicos parecen más pequeños que los presentes en estigmas sin polinizar. Las interrupciones en las paredes celulares están más pronunciadas que en los estigmas sin polinizar.

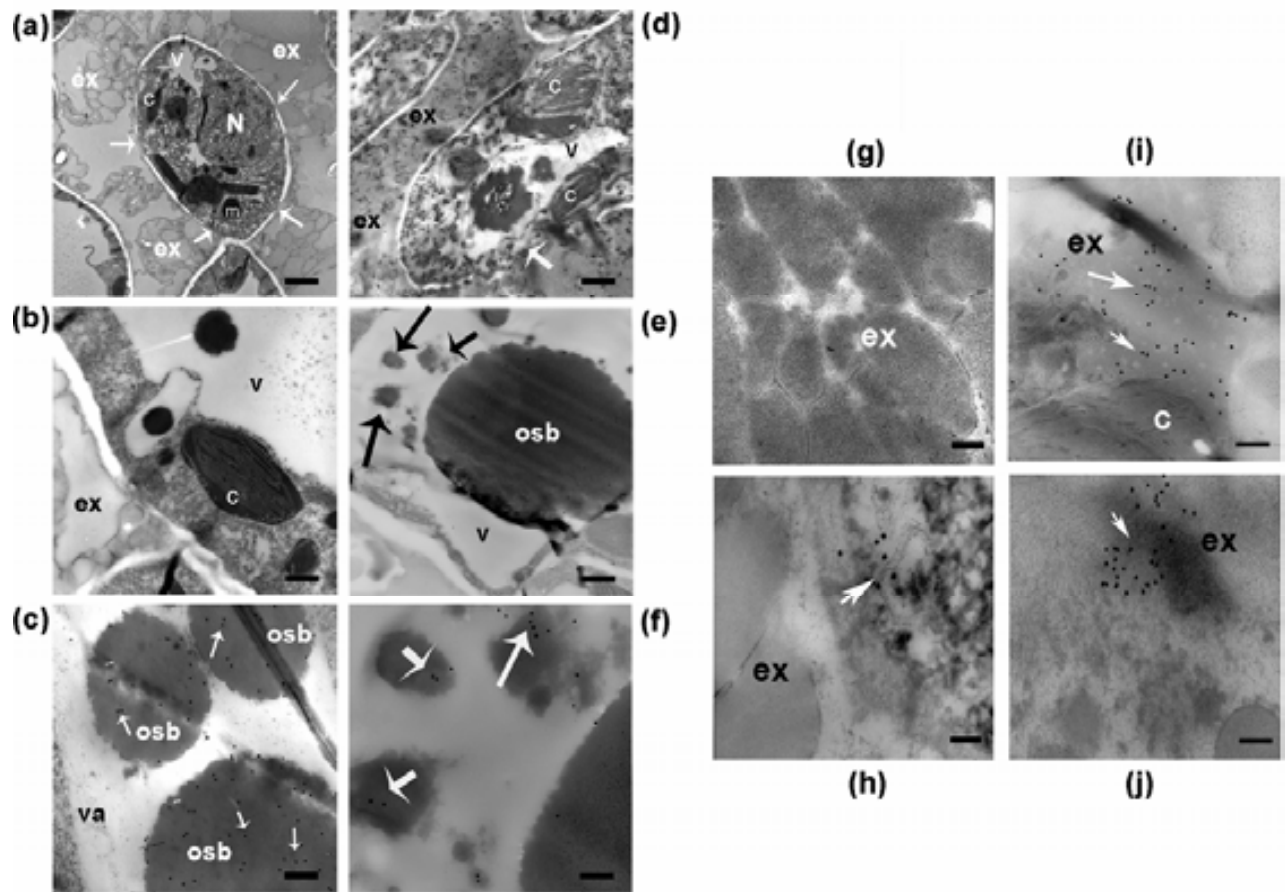


Figura 37. Liberación vacuolar de NaStEP hacia el exudado estigmático durante la polinización. Secciones transversales de estigmas polinizados y sin polinizar de *N. alata* BT. (a-c) Papilas maduras en la antesis sin polinizar. (a) Papila madura rodeada de exudado. Las flechas indican interrupciones en la pared celular. (b) Célula papilar con una vacuola y cuerpos osmiofílicos. (c) Marcaje anti-NaStEP en los cuerpos electrodensos de las vacuolas. Las flechas indican la inmunodetección con partículas de oro. (d-f) Papilas maduras en la antesis 10 h después de la polinización con polen proveniente de *N. tabacum*. (d) Células papilares degeneradas, abundante exudado y citoplasma con organelos deformes y vacuolas desintegradas. (e) Vacuola mostrando a NaStEP dentro de pequeños cuerpos osmiofílicos (flechas). La marca está concentrada en el rectángulo. (f) Acercamiento de la zona indicada en (e), las flechas indican la presencia de NaStEP. (g-j) Exudado estigmático de *N. alata* BT. (g) Estigmas sin polinizar. (h) Estigmas maduros en la antesis 10 h después de la polinización con polen proveniente de *N. tabacum*. (i) Papilas maduras en la antesis 10 h después de la polinización con polen proveniente de *N. plumbaginifolia*. (j) Papilas maduras en la antesis 10 h después de la autopolinización. V, vacuolas; ex, exudado; n, núcleo; m, mitocondria; c, cloroplasto; osb, cuerpos osmiofílicos. Las barras se corresponden con 500 nm en (a) y (e), 1 μ m en (b) y (d); 240 nm en (c) y 200 nm en (f)-(j).

Los cuerpos osmiofílicos no acumulan gran cantidad de NaStEP (Figura 37E), la cual se encuentra ahora localizada en pequeñas vacuolas con cuerpos osmiofílicos que parecen desprenderse de los grandes, dentro de las vacuolas (Figura 37G).

Durante la polinización, el exudado estigmático es más abundante e incluye organelos como cloroplastos, los cuales probablemente son el resultado de la ruptura de las células papilares (Figura 37H). Después de la polinización con polen de *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia* o *N. alata* cv BT, NaStEP se localiza abundantemente en el exudado estigmático (Figura 37H).

NaStEP es específica de especies AI de Nicotiana

Como los transcritos de *NaStEP* están presentes en *N. alata* AI pero no en especies AC de *Nicotiana*, se incluyeron otras especies AC y AI de *Nicotiana* y se analizó la presencia de NaStEP en éstas por ensayos tipo réplica en Western y análisis inmunohistoquímicos. La Figura 38A muestra que NaStEP se detectó solamente en las especies AI de *Nicotiana* probadas. Aunque en algunas especies AI, más de una proteína reacciona con el anticuerpo, esto puede deberse a diferentes grados de glicosilación de NaStEP. En las especies AIs fueron detectadas cantidades diferentes de NaStEP. Esta proteína se expresa mucho más en *N. alata* BT que en *N. forgetiana* y *N. bonariensis*, sin embargo, estos niveles de expresión son menores que los detectados en algunos genotipos de *N. alata* ($S_{A2}S_{A2}$, $S_{A2}S_{105}$ y $S_{C10}S_{105}$). La expresión de *NaStEP* detectada en los híbridos entre *N. plumbaginifolia* y los dos cultivares de *N. alata*, se debe a la herencia de este gen a partir de los cultivares de esta última especie. De hecho los niveles de expresión en estos híbridos son idénticos a los mostrados por los dos cultivares de *N. alata*. El homócigo de *N. alata* $S_{105}S_{105}$ expresa menor cantidad de NaStEP que *N. alata* $S_{A2}S_{A2}$ y en los híbridos se refleja este patrón. Para corroborar los resultados obtenidos mediante análisis tipo réplica en Western se desarrollaron inmunolocalizaciones sobre secciones transversales de estigmas de dos especies AI (*N. alata* y *N. forgetiana*) y cuatro especies AC (*N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *N. glauca* y *N. benthamiana*). La Figura 38B muestra que ambos cultivares de *N. alata* (Panel A y B) y *N. forgetiana* (Panel C) dieron señales positivas para NaStEP en todo el estigma incluyendo el TT estigmático. Como se puede observar, NaStEP no se detecta en las especies AC utilizadas (Panel D-G).

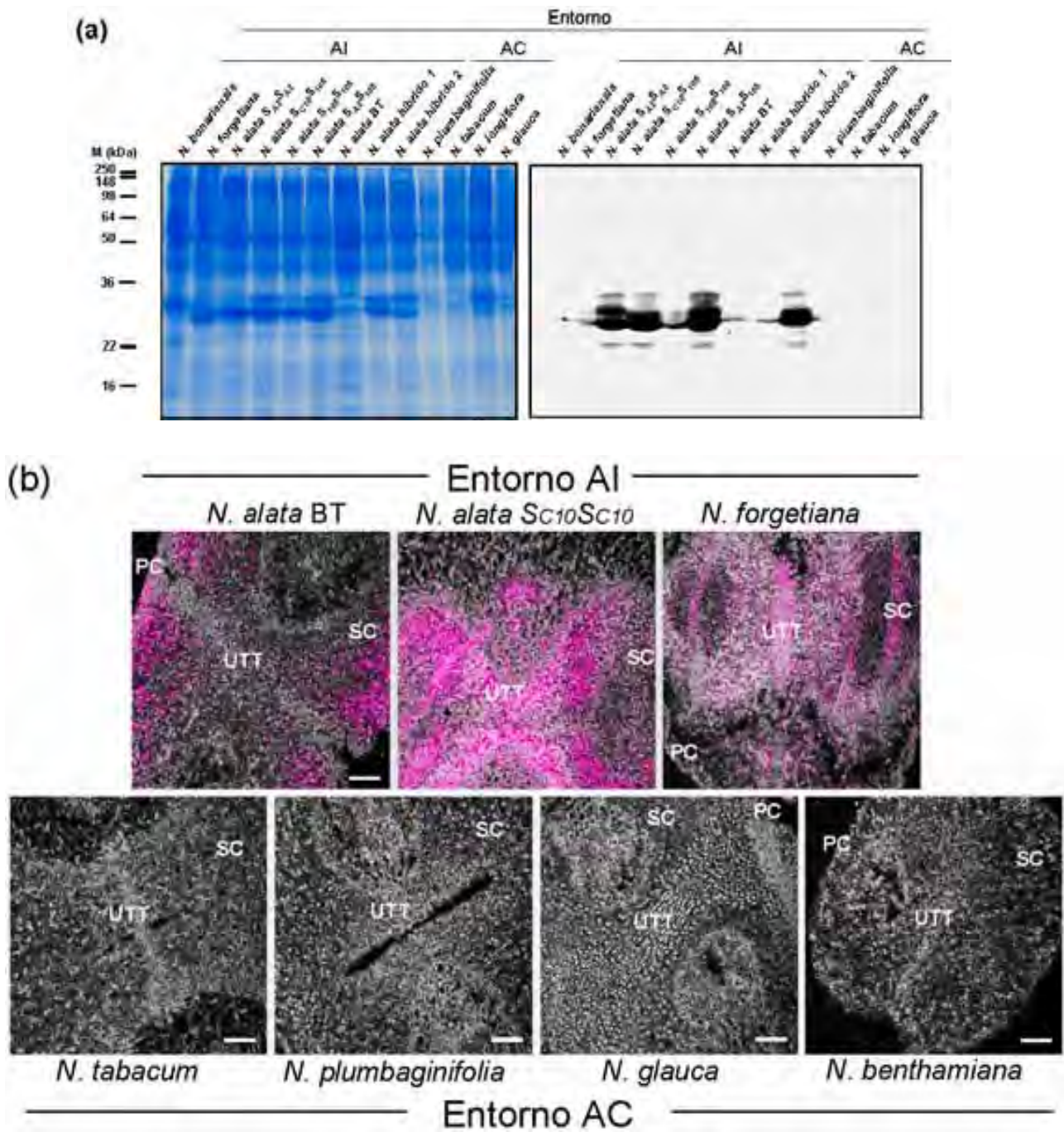


Figura 38. Inmunodetecciones de NaStEP en diferentes especies del género *Nicotiana*. A) Diez μg de proteína total de estilos y estigmas de las especies indicadas se separaron por SDS PAGE y se tiñeron azul de Coomassie (izquierda) o se transfirieron a membranas para su inmunoanálisis con el anticuerpo anti-NaStEP (derecha). B) Las secciones transversales de los estigmas de las especies indicadas fueron inmunoteñidos con anti-NaStEP. Híbrido 1: *N. alata* SC₁₀SC₁₀ X SC *N. plumbaginifolia*. Híbrido 2: *N. alata* S₁₀₅S₁₀₅ X SC *N. plumbaginifolia*. UTT= parte superior del tejido de transmisión. SC= células secretoras. PC= célula papilar. Escala 50 μm .

Aunque fue posible observar una señal débil en el estigma de *N. plumbaginifolia*, ésta parece ser debida a detecciones inespecíficas ya que no se han detectado transcritos de *NaStEP* por Northern blot (Figura 11) ni proteína por ensayos tipo réplica en Western (Figura 38a) en esta especie.

La síntesis y liberación de NaStEP al exudado se estimula fuertemente por polinizaciones incompatibles

Con el objetivo de estudiar el efecto de las polinizaciones compatibles e incompatibles sobre la localización subcelular de NaStEP en el estigma, los estigmas de *N. alata* cv BT fueron polinizados con polen propio o con polen proveniente de *N. tabacum* y las proteínas presentes en el exudado fueron diferencialmente extraídas usando lavados secuenciales con amortiguadores de bajo y alto contenido de sales (Wu *et al.*, 2000; Juarez-Diaz *et al.*, 2006). Las proteínas solubles eluyen con el amortiguador bajo en sales mientras que las que se encuentran unidas más fuertemente a la matriz extracelular son liberadas después del lavado con el amortiguador con alto contenido de sales. El resto de las proteínas celulares fueron colectadas después de la maceración del tejido con N₂ líquido. Las proteínas solubles se colectaron a las 5, 12 y 24 h.d.p. La Figura 39B y C muestra que después de la polinización con polen compatible o incompatible, NaStEP se detecta en la fracción correspondiente al amortiguador bajo en sales 5 h.d.p. con un notable incremento en expresión a las 24 h.d.p. Esta proteína no se detecta en el exudado de estigmas no polinizados a las 48 h después de la antesis (Figura 39A) aunque está presente en la fracción no soluble (fracción intracelular). Si los niveles de NaStEP se comparan antes y después de la polinización, la síntesis total de NaStEP se incrementa 3.7 veces (24 h.d.p. comparada con las 48 h para el control) después de una polinización incompatible y 1.7 veces (24 h, comparadas con 48 h para el control) después de una polinización compatible (Figura 39d–f). Además, la deposición de NaStEP hacia el exudado estigmático se estimuló 20 veces (24 h, comparadas con 48 h para el control) en una polinización incompatible (Figura. 39f) y 12 veces (24 h, comparadas con 48 h para el control) después de una polinización compatible (Fig. 39e).

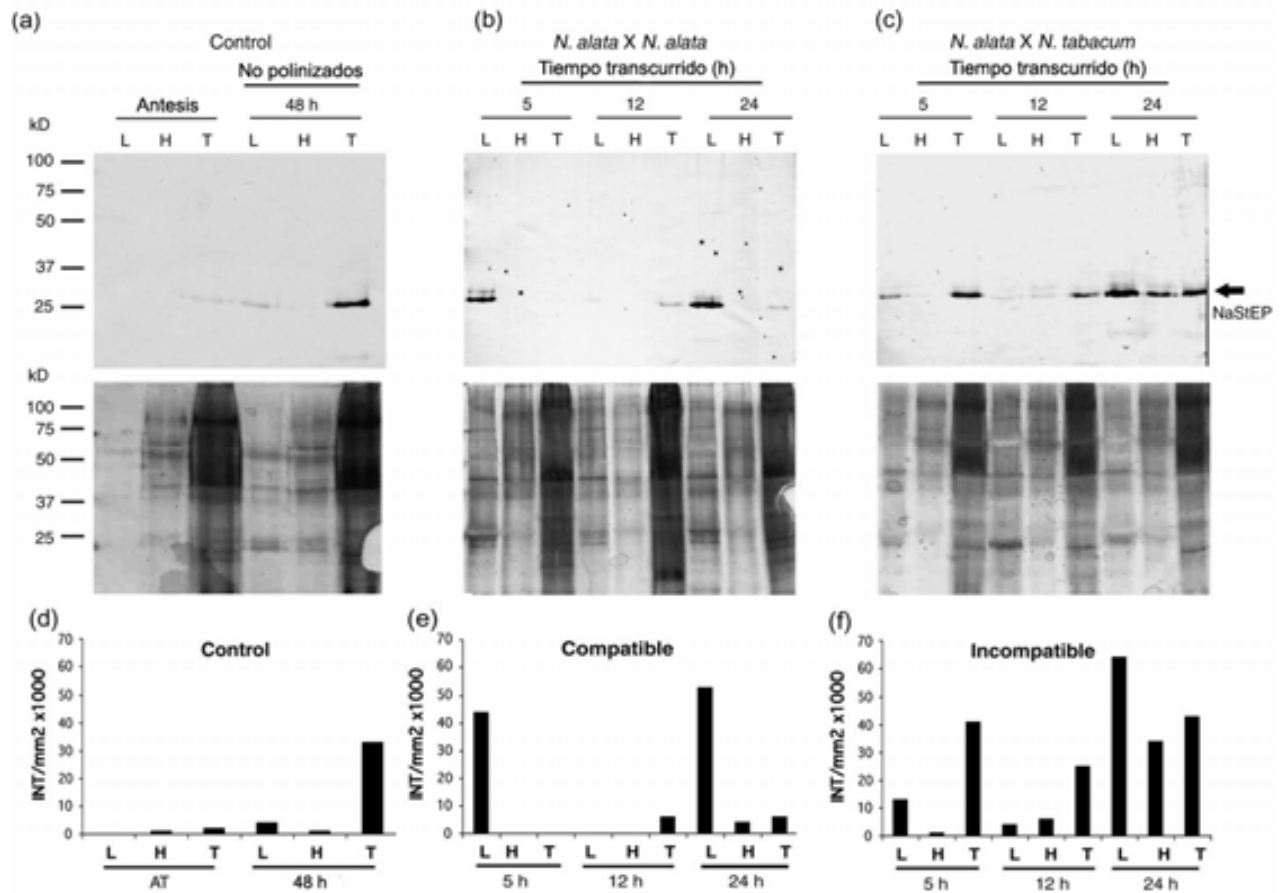


Figura 39. Inmunodetecciones de NaStEP en estilos y estigmas polinizados y sin polinizar de *N. alata* cv Breakthrough. Los extractos de proteína total del exudado de estigmas polinizados y no polinizados de *N. alata* fueron extraídos secuencialmente, separados en SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa para su inmunodetección con anti-NaStEP (Panel superior), o tenidos con nitrato de plata (Panel intermedio). En cada carril fueron cargadas 30 μ l de muestra. (a) Proteína total de exudados de estigmas no polinizados, en antesis y a las 48 h después de la antesis. (b) Proteína total de exudados de estigmas 5, 12, 24 h.d.p. (autopolinización). (c) Proteína total de exudados de estigmas 5, 12, 24 h.d.p. con polen de *N. tabacum*. (d-f) Análisis densitométricos de la expresión de NaStEP y su presencia en el exudado estigmático de *N. alata* antes y después de la polinización con polen propio o con polen proveniente de *N. tabacum*. L, lavado bajo en sales; H, lavado con alta concentración de sales; T, proteínas restantes en el estigma después de los lavados. El marcador de peso molecular en kilodaltons se indica a la izquierda de los paneles superior e intermedio.

Estos resultados demuestran que la polinización estimula la síntesis de NaStEP y su liberación hacia el exudado estigmático, y que esta respuesta llega a duplicarse cuando los estigmas son polinizados con polen de *N. tabacum* (cruza incompatible).

Discusión

La búsqueda de nuevos genes modificadores exclusivos de especies AI condujo a la caracterización de *NaSoEP* y *NaStEP*, dos genes expresados únicamente en pistilos de *N. alata* AI.

Los genes NaStEP y NaSoEP se encuentran diferencial y temporalmente regulados en N. alata

Los patrones de expresión temporal y espacial de *NaStEP* y *NaSoEP* fueron analizados para determinar si estos genes tenían asignada alguna función en el pistilo. La expresión del transcrito de *NaStEP* coincide con el patrón de expresión en el pistilo que podría ser requerido para las interacciones polen-pistilo. En el pistilo (excluyendo el ovario), la expresión de los mensajeros y proteínas de *NaStEP* están restringidos específicamente a los estigmas maduros (Figura 28B, 29B). En órganos vegetativos no se detectaron transcritos ni proteínas correspondientes a este gen (Figura 28A y Figura 29B). La expresión estigmática específica de *NaStEP* sugiere que este gen podría estar involucrado en las primeras interacciones entre el grano de polen y el pistilo. La superficie estigmática es el primer sitio de reconocimiento que distingue entre los lados masculino y femenino de la flor y en algunas especies como *Papaver rhoeas* y *Brassica* es el lugar donde se desarrolla la respuesta de rechazo del polen. En el caso de *NaSoEP*, la expresión de su transcrito se encuentra restringida a los tejidos reproductivos masculino y femenino (Figura 27). *NaSoEP* podría jugar un papel durante los eventos de desarrollo del pistilo y la antera, ya que este gen alcanza su máxima expresión en estados muy tempranos del desarrollo de estos órganos, con una constante disminución hacia la madurez del pistilo y de la antera (Figura 27B).

Estos resultados sugieren que *NaStEP* y *NaSoEP* son genes que están diferencialmente regulados durante el desarrollo del pistilo, implicados posiblemente el primero en interacciones tempranas polen-pistilo y el segundo en el desarrollo de la antera y el estilo.

Varias proteínas estigmáticas han sido implicadas en interacciones tempranas polen-estigma en estigmas húmedos. Por ejemplo, la proteína SCA en *Lilium longiflorum* induce quimotropismo y es necesaria para sostener y guiar el crecimiento *in vitro* de los tubos polínicos (Park *et al.*, 2000a; Park and Lord, 2003). Otra proteína interesante es LeSTIG1, un ortólogo a la proteína estigma específica STIG1 de *N. tabacum* (Goldman *et al.*, 1994) que también estimula *in vitro* el crecimiento del tubo polínico. Recientemente, ha sido propuesto que STIG1 puede jugar un papel en la regulación temporal de la secreción del exudado hacia los estigmas en *Petunia* y *N. tabacum* (Verhoeven *et al.*, 2005).

NaStEP y NaSoEP son semejantes a inhibidores de proteasas tipo Kunitz

Los cDNAs de *NaStEP* y *NaSoEP* codifican para proteínas relacionadas con inhibidores de proteasas tipo Kunitz, con identidades de secuencia entre 24.8-79.1%. Los análisis de identidad de secuencia revelaron que *NaStEP* está estrechamente relacionado con el inhibidor de proteinasa, NgPI (Park *et al.*, 2000b) al presentar la mayor identidad de secuencia con esta proteína. *NgPI* se induce significativamente por infección del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) en hojas y su transcrito se acumula rápida y temporalmente, indicando que la proteína NgPI podría estar involucrada en procesos de señalización que conduzcan a respuestas de defensa como la respuesta de hipersensibilidad (Park *et al.*, 2000b). La similaridad entre los inhibidores de proteasas tipo Kunitz, *NaSoEP* y *NaStEP* está dispersa a través de las regiones central y N-terminal de las proteínas. En estigmas de *N. alata* ha sido previamente descrito un inhibidor de proteasas que se piensa juegue un papel defensivo en el estigma contra la invasión de patógenos (Atkinson *et al.*, 1993). También en otras especies de *Nicotiana* como *N. attenuata* se ha demostrado que el inhibidor endógeno de proteasas de tripsina de esta especie (*Nicotiana attenuata* PI) funciona defensivamente en respuesta a ataques de herbívoros nativos (Zavala *et al.*, 2004).

Aunque la mayoría de los artículos asignan papeles de defensa a los inhibidores de proteasas, incluso cuando su actividad como inhibidor aún no haya sido probada, existen reportes donde se sugiere y/o demuestra que proteínas semejantes a inhibidores de proteasas están involucrados en polinización. El gen denominado *LAT52* semejante a inhibidores de proteasas tipo Kunitz se

expresa fundamentalmente en las anteras y el polen de *Lycopersicon esculentum* (Twell *et al.*, 1989). Se ha sugerido que LAT52 actúa de forma indirecta en la hidratación y germinación del polen ya que las plantas transgénicas que expresan a *LAT52* en antisentido se hidratan y germinan anormalmente y la fecundación no ocurre (Muschietti *et al.*, 1994). LAT52 interactúa físicamente con LePRK2 (Cinasa de proteína tipo receptor de *Lycopersicon esculentum*) activando una cascada de señalización que podría servir como punto regulador para el crecimiento del tubo polínico (Tang *et al.*, 2002; Johnson and Preuss, 2003).

NaStEP es una proteína vacuolar liberada al exudado estigmático después de la polinización

Las secuencias de aminoácidos predichas para NaStEP y NaSoEP presentan un péptido señal que en principio sugiere que las proteínas maduras podrían localizarse extracelularmente. No obstante, localizada unos pocos aminoácidos detrás del sitio de corte del péptido señal, la secuencia NPIVL podría estar dirigiendo a las proteínas a vacuolas. La presencia de este pentapéptido en el extremo amino terminal de NaStEP y NaSoEP coincide con las ssVSS requeridas para el envío de la esporamina del camote (Matsuoka and Nakamura, 1999), la albúmina 2S de la calabaza (Saalbach *et al.*, 1996), la ricina del frijol castor (Frigerio *et al.*, 2001) y la aleurina de la cebada (Holwerda, *et al.*, 1992) a la vacuola. Aunque no hay una secuencia consenso estricta para la señal de marcado vacuolar, se requieren de algunas propiedades físico-químicas con una conservación limitada de secuencia para constituir una señal de localización vacuolar (Matsuoka and Nakamura, 1999). De hecho, los requerimientos aminoacídicos para funcionar como una señal vacuolar son $X_1 - X_2 - I/L - X_3 - X_4$, donde X_1 carece de pequeñas cadenas laterales hidrofóbicas (el aminoácido preferencial es N), X_2 no puede ser un aminoácido ácido, X_3 es cualquier aa y X_4 es un aa de preferencia grande e hidrofóbico (Matsuoka, 2000). Este motivo también está presente en los NTPP de algunos precursores de inhibidores de proteasas tipo Kunitz de tubérculos de papa (Ishikawa *et al.*, 1994) y en el extremo carboxilo terminal del propéptido del inhibidor de proteasa vacuolar Na-PI aislado de estigmas de *N. alata* (Atkinson *et al.* 1993, Miller *et al.*, 1999, Matsuoka, 2000) y en *N. attenuata* PI (Zavala *et al.*, 2004). Las ssVSS encontradas en estos dos últimos casos fueron NDLQK.

Los resultados de MET para determinar la localización subcelular de NaStEP muestran que esta proteína además de ser enviada a vacuolas, también se encuentra presente en el exudado estigmático (Figuras 33B-C, 35 C-D). La presencia de NaStEP en el exudado es relevante porque si esta proteína está involucrada en interacciones polen-estigma, tendría que estar en contacto directo con los granos de polen o tubos polínicos. Una de las formas de explicar la presencia de NaStEP en el exudado estigmático podría ser a través de su envío a dos compartimentos celulares diferentes. Existen varios reportes sobre el envío de las mismas proteínas a compartimentos subcelulares diferentes. La proteína ácida de *N. tabacum* relacionada con la patogenicidad PR-1b, fue encontrada en espacios extracelulares y dentro de las vacuolas de los cristales de idioblastos en plantas transgénicas que expresaban este gen (Dixon *et al.*, 1991). Otra proteína relacionada a la patogenicidad en tomate, P69, fue localizada dentro de las vacuolas de las células de las hojas y en los espacios intercelulares o en el apoplasto de plantas de tomate infectadas con viroides (Vera *et al.*, 1989).

No obstante, nuestros resultados muestran que NaStEP está presente en el exudado estigmático porque las células estigmáticas presentan dramáticos cambios después de la polinización, los cuales incluyen fragmentación de la pared celular que conduce a descargar el contenido del citoplasma al exudado estigmático (Figura 37 E-H), incluyendo algunos organelos como cloroplastos y algún contenido vacuolar como los cuerpos osmiofílicos donde está contenida NaStEP. La liberación del contenido celular puede ser provocada por: 1) el deterioro celular, 2) la discriminación del polen por las especies o 3) por un proceso más generalizado que se dispara por la polinización. Como la liberación de NaStEP ocurre independientemente del tipo de polen que llegue a la superficie del estigma (polen compatible e incompatible) [Figuras 7h-j], aunque inducida por la polinización, este fenómeno parece ser un proceso generalizado que se dispara a la llegada de los granos de polen. En algunas especies se ha reportado que la secreción desde las células estigmáticas hacia el exudado ocurre por degeneración celular. En *Petunia hybrida*, se han observado grandes cantidades de secreciones hacia el exudado después de la ruptura de la papila en degeneración (Herrero and Dickinson, 1980; 1979). De igual forma, las células papilares de estigmas no polinizados de *S. tuberosum* sufren ruptura cuando se aproxima la senescencia y sus contenidos citoplasmáticos se liberan (MacKenzie *et al.*, 1990) en la misma forma que se observa en los estigmas de *N. alata* BT después de la polinización (Figura 37 E-H).

Aunque en estos estudios se reporta que la degeneración ocurre se polinicen o no los estigmas, en nuestro caso, solo se induce la degeneración por efecto de la polinización. Si los cambios mencionados se deben a un efecto específico de la polinización o a una aceleración de la senescencia del estigma, esto representa un nuevo mecanismo para la liberación de proteínas presentes en organelos como NaStEP a una posición donde está disponible para la interacción con el polen.

El incremento de la síntesis y liberación de NaStEP al exudado estigmático, durante polinizaciones incompatibles (Figura 39), sugiere que esta proteína puede ser requerida en interacciones relacionadas directamente con el rechazo de los tubos polínicos incompatibles.

NaStEP se expresa exclusivamente en especies AI

NaStEP tiene una expresión restringida a estigmas maduros de las especies AI probadas (Figura 38). El posible papel de esta proteína en pistilos de *N. alata* no está claro aún pero los datos obtenidos sugieren que este gen podría estar implicado en reacciones tempranas de rechazo del polen. Una hipótesis es que esta proteína podría estar involucrada en la IU.

El locus *S* ha sido implicado en la IU (Chetelat and DeVerna, 1991; Hiscock and Dickinson, 1993; Murfett *et al.*, 1996). La IU implica cualquier barrera entre el pistilo y el polen que evite la formación de cigotos híbridos entre especies inter-fértiles. Se piensa que la IU se manifiesta entre especies estrechamente relacionadas de la misma familia o en grupos de familias con el mismo sistema de AI (de Netancourt, 2001).

La IU sigue la regla de unilateralidad AI X AC, donde el polen proveniente de especies AC es rechazado por pistilos de especies AI, mientras que la crucea recíproca es compatible (Lewis and Crowe, 1958; de Netancourt, 1977). Sin embargo, existen algunas excepciones a la regla de IU, las cuales han sido explicadas como anomalías en las especies AC debido a consecuencias evolutivas (Lewis and Crowe, 1958). En *Nicotiana* existen tres mecanismos genéticos de rechazo del polen diferentes operando en la IU: 1) uno, semejante al rechazo alelo *S* específico del polen requiriendo de las S-RNasas y de otros factores genéticos, 2) otro independiente de S-RNasas y 3) una vía dependiente de S-RNasas e independiente de otros factores (Murfett *et al.*, 1996;

McClure *et al.*, 2000; Hancock, *et al.*, 2003). Hasta la fecha ningún factor de la vía independiente de S-RNasas ha sido identificado.

Aunque ha sido sugerido que los factores diferentes a las S-RNasas que operan en la IU deberían expresarse en el estigma (de Netancourt, 1977; 2000), la información disponible sobre proteínas presentes en los estigmas de *N. alata* y sus funciones en interacciones tempranas polen-estigma es limitada. La expresión estigmática de los factores involucrados en la IU es consistente con la temprana inhibición del crecimiento del tubo polínico de *N. tabacum* sobre estigmas de *N. alata* BT. Los tubos polínicos no pasan de la primera cuarta parte del estilo (Murfett *et al.*, 1996 y F.C-G. resultados no publicados), sugiriendo que éstos no son capaces de pasar la barrera estigmática. La expresión específica de *NaStEP* en estigmas maduros y su presencia solo en especies AI sugiere que este gen podría ser un buen candidato a factor involucrado en la IU independiente de la vía de S-RNasas.

CAPÍTULO V

Datos adicionales

Obtención de plantas transgénicas de *N. alata* que suprimen los niveles de NaStEP y NaPEP II

Introducción

En los capítulos III y IV se mostró que *NaPEP II* y *NaStEP* son genes que se expresan específicamente en el pistilo y que ambos se encuentran en cantidades abundantes en estadios maduros del desarrollo del estilo. Para determinar si estos genes están involucrados en las interacciones polen-pistilo y dentro de éstas si están participando directamente en la respuesta de AI, se procedió a silenciar a estos genes por RNA de interferencia (RNAi) esperando bloquear su traducción. Se sabe que cuando se realizan experimentos de pérdida de función con los genes requeridos en la respuesta de rechazo del polen, las plantas AI cambian su fenotipo de polinización a AC.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Las plantas de *N. alata* (genotipo *S₁₀₅S₁₀₅*) usadas en los experimentos de transformación vegetal están descritas en el capítulo III (Materiales y Métodos). Todo el material vegetal creció en invernadero bajo condiciones controladas estándares.

Diseño de oligos y reacciones de PCRs

Los iniciadores usados para la clonación de *NaStEP* y *NaPEP II* en sentido y antisentido en el vector pHANNIBAL (Apéndice VII) se muestran a continuación. PEP I_BamH I_F_RNAi: 5' CGCCGGATCCATGAAATCCTTTATTTTCAGCTTCCTC 3', PEP I_Cla I_R_RNAi: 5' CGCCATCGATTCAGGACAATACCTTAACTTGGTAGA 3' (para amplificar y clonar en antisentido a *NaStEP*), PEP I_Xho I_F_RNAi: 5' CGCCCTCGAGATGAAATCCTTTATTTTCAGCTTCCTCTTG 3', PEP I_Kpn I_R_RNAi: 5' CGCCGGTACCTCAGGACAATACCTTAACTTGG 3' (para amplificar y clonar el mismo cDNA en sentido), PEP II_BamH I_F_RNAi: 5' CGCCGGATCCATGGACAAATTCACATTCCAATTCCAATTTCCC 3', PEP II_Cla I_R_RNAi: 5'

CGCCATCGATTTCAGGACAATACCTTAACTTGGTAGA 3' (para amplificar y clonar en antisentido a *NaPEP II*) y PEP II_Xho I_F_RNAi, 5' CGCCCTCGAGATGGACAAATTCACATTCCAATTTCCC 3', PEP I_Kpn I_R_RNAi, 5' CGCCATCGATCTAGTCCAGCTTTTTAGGAGGCTTT 3' (para amplificar y clonar el mismo cDNA en sentido). Durante la clonación del cDNA de *NaPEP II* en antisentido en el vector pAGUS1, fueron empleados los oligonucleótidos PEP II_BamH I_R, 5' CGCCGGATCCCTAGTCCAGCTTTTTTA 3' y PEP II_Sac I_F, 5'CGCCGAGCTCATGGACAAATTCACATT 3'. El diseño de los oligos se realizó como se describe en el Capítulo III (Materiales y Métodos). Las reacciones de PCR (2 ng del pTriplEx2, amortiguador de PCR, dNTPs 0.2 mM, iniciadores 0.4 µM cada uno, DNA polimerasa Pfu y H₂O hasta completar un volumen de 25 µl) se desarrollaron bajo las siguientes condiciones: el DNA plasmídico fue desnaturalizado un ciclo por 1 min a 95 °C y amplificado 30 ciclos (30 seg a 95 °C, 1 min a 64 °C, 1 min a 72 °C), terminándose la reacción de PCR con un ciclo de 4 min a 72 °C. Las reacciones de PCR realizadas para corroborar la presencia de insertos o para transferir éstos a membranas fueron hechas empleando las condiciones mencionadas anteriormente. Los productos de PCR obtenidos fueron fraccionados en geles de agarosa al 1.5%.

Clonación de los productos de PCR de NaStEP y NaPEP II en sentido y antisentido

Los productos de PCR de *NaStEP* y *NaPEP II* obtenidos a partir de la amplificación de DNA plasmídico con las parejas de iniciadores PEP I_BamH I_F_RNAi/PEP I_Cla I_R_RNAi, PEP I_Xho I_F_RNAi/PEP I_Kpn I_R_RNAi, PEP II_BamH I_F_RNAi/PEP II_Cla I_R_RNAi y PEP II_Xho I_F_RNAi/PEP I_Kpn I_R_RNAi fueron introducidos en el vector de clonación para RNAi, pHANNIBAL, como se indica a continuación. Los productos de PCR aplicados, separados electroforéticamente y visualizados en geles de agarosa al 1.5 %, fueron escindidos del gel y finalmente purificados usando el kit de purificación de insertos a partir de gel de acuerdo al protocolo suministrado por el proveedor (CONCERT). Los fragmentos purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes como sigue, 500 ng de los cDNAs con los sitios *Xho I/Kpn I* se digirieron con 10 unidades de *Xho I* (Promega), 15 unidades de *Kpn I* (New England BioLabs) usando amortiguador NE2 (New England BioLabs) y BSA (New

England BioLabs). De igual forma, para la digestión de 500 ng de los cDNAs con los sitios *BamH I*/*Cla I* se utilizaron 20 unidades de *BamH I* (Fermentas), 10 unidades de *Cla I* (New England Biolabs) usando amortiguador Y⁺ Tango (Fermentas). Las digestiones se desarrollaron por toda la noche a 37 °C. De forma paralela, el plásmido pHANNIBAL fue digerido con las mismas enzimas de restricción usando idénticas condiciones. Los productos de las seis digestiones realizadas se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5 %, y se purificaron siguiendo el mismo método empleado para la purificación de los productos de PCR. Una vez purificados, se realizaron dos reacciones de ligado usando la proporción inserto/plásmido 3:1 aproximadamente. Los productos de PCR digeridos con *Xho I* y *Kpn I* se ligaron al pHANNIBAL cortado con las mismas enzimas [10 ng de pHANNIBAL, 30 ng de inserto, amortiguador de la DNA ligasa T4 (Invitrogen) y una unidad de la enzima DNA ligasa T4] mientras que los digeridos con *BamH I* y *Cla I* se ligaron al pHANNIBAL correspondiente (digerido con *BamH I* y *Cla I*), utilizando las condiciones mencionadas previamente. Las reacciones de ligado se incubaron a 26 °C toda la noche. Una vez ligados los insertos al vector, se transformaron células competentes de *E. coli* cepa DH5 α con 6 μ l de la reacción de ligado de acuerdo al protocolo descrito en el Capítulo III (Materiales y Métodos) con ligeras modificaciones. Las células transformadas con el pHANNIBAL fueron crecidas en placas de cultivo LB sólido suplementado con ampicilina 100 mg/l. Algunas colonias recombinantes se seleccionaron y fueron crecidas en medio LB líquido suplementado con ampicilina toda la noche a 37 °C con 200-250 rpm; sus plásmidos respectivos se purificaron como se ha descrito previamente (Materiales y Métodos, Capítulo II). La presencia de los insertos de interés fue corroborada mediante digestiones y reacciones de PCR usando las condiciones previamente descritas excepto que fueron digeridos solamente 300 ng de plásmido.

Una vez que se tuvo a los cDNAs de *NaStEP* y *NaPEP II* en sentido y antisentido de forma independiente en el pHANNIBAL, el vector portador del cDNA en antisentido fue escogido para clonar al cDNA en sentido. El pHANNIBAL portando al cDNA de *NaStEP* en sentido fue digerido con las enzimas *Xho I* y *Kpn I* para que liberase el inserto. Este inserto fue purificado a partir de gel y ligado en el pHANNIBAL que portaba el cDNA de *NaStEP* en antisentido, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Algunas de las colonias

recombinantes se seleccionaron, se purificó el DNA plasmídico y se corroboró la presencia en el vector del gen de interés en sentido y antisentido.

Clonación del producto de PCR de NaPEP II en antisentido

El producto de PCR de *NaPEP II* obtenido a partir de la amplificación de DNA plasmídico con los iniciadores PEP II_BamH I_R/PEP II_Sac I_F, fue clonado en antisentido en el vector pAGUS1 como se indica a continuación. El producto de PCR obtenido fue aplicado a un gel de agarosa al 2 %, corrido como se describe en el Capítulo II (Materiales y Métodos), escindido del gel y purificado como ha sido descrito previamente. El fragmento purificado y el pAGUS1 fueron digeridos de forma independiente con las enzimas de restricción *Sac I* (New England Biolabs)/*BamH I* (Fermentas) [500 ng del producto de PCR purificado o 500 ng del plásmido, 1.5 u de *BamH I*, 2.0 u de *Sac I* y amortiguador *BamH I* (Fermentas)]. Las digestiones se realizaron toda la noche a 37 °C. Los productos de las dos digestiones se separaron electroforéticamente, purificaron y ligaron usando el protocolo mencionado en la sección anterior. Una vez ligado en antisentido el cDNA de *NaPEP II* al vector, se transformaron células competentes de *E. coli* cepa DH5 α , se seleccionaron algunas colonias recombinantes para ser crecidas en medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 mg/l) y sus plásmidos respectivos fueron purificados como se ha descrito previamente (Materiales y Métodos, Capítulo II, III). La presencia de los insertos de interés fue corroborada mediante digestiones y reacciones de PCR usando las condiciones descritas en la sección anterior.

Clonación del fragmento CaMV 35S + NaStEP en sentido + intrón + NaStEP en antisentido + t OCS en el vector binario

Se realizaron digestiones con *Not I* para: 1) liberar del pHANNIBAL el fragmento formado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S), *NaStEP* en sentido + intrón + *NaStEP* en antisentido y el terminador OCS de la octopina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* (t OCS) y 2) linearizar el vector binario pART27 (Apéndice VIII), de forma tal que en este último pudiese insertarse la construcción portadora del gen de interés. Los plásmidos

pHANNIBAL y pART27 fueron purificados como se ha descrito (Capítulo II, Materiales y Métodos). Como el pART27 porta el gen de resistencia a espectinomicina para su selección en bacterias, los medios de cultivo estuvieron suplementados con este antibiótico (Apéndice I, Tabla 2). Para la digestión de ambos plásmidos se usaron 500 ng de DNA plasmídico, 0.25 u de *Not I* (Invitrogen) y el reactivo 3 (Invitrogen). Una vez terminadas las digestiones, los productos de éstas fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5 %, se purificaron y ligaron usando el protocolo mencionado previamente. De la reacción de ligado entre el fragmento CaMV 35S + *NaStEP* en sentido + intrón + *NaStEP* en antisentido + t OCS y el pART27 se tomaron 6 µl y se transformaron células competentes de *E. coli* cepa DH5α, se seleccionaron algunas colonias recombinantes para ser crecidas en medio LB líquido suplementado con espectinomicina 100 mg/l y sus plásmidos respectivos fueron purificados como se ha descrito (Capítulo II, Materiales y Métodos,). La presencia de los insertos de interés fue corroborada mediante digestiones y reacciones de PCR usando las condiciones ya mencionadas.

Clonación del fragmento CaMV 35S +NaPEP II en antisentido + t nos en el vector binario

El destino final de este fragmento fue el vector binario pPZP112 (Apéndice IX). Se realizaron digestiones con *EcoR I* :1) para liberar del pAGUS1 el fragmento formado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, *NaPEP II* en antisentido y el terminador nos de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* y 2) para linearizar el vector binario pPZP112, de forma tal que en este último pudiese ser insertada la construcción portadora del gen de interés. Los dos plásmidos fueron purificados como se ha descrito (Capítulo II, Materiales y Métodos) y como el pPZP112 porta el gen de resistencia a cloranfenicol para su selección en bacterias, los medios de cultivo estuvieron suplementados con este antibiótico (Apéndice I, Tabla 2). Para la digestión de ambos plásmidos se usaron 500 ng de DNA plasmídico, 15 u de *EcoR I* (Invitrogen) y el reactivo 3 (Invitrogen). Una vez terminadas las digestiones, los productos de éstas fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5 %, se purificaron, ligaron y transformaron células competentes de *E. coli* cepa DH5α usando los protocolos mencionados previamente. Algunas colonias recombinantes se seleccionaron, fueron crecidas en medio LB líquido

suplementado con cloranfenicol 25 mg/l y sus plásmidos respectivos fueron purificados como se ha descrito (Capítulo II, Materiales y Métodos). La presencia de los insertos de interés fue corroborada mediante digestiones y reacciones de PCR usando las condiciones mencionadas.

Ensayos tipo Southern blot

Los vectores binarios portadores de las construcciones de interés y aquellos usados como control negativo, fueron digeridos con *Not I*, separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5 % y transferidos a membrana Hybond N⁺(Amersham) donde el DNA plasmídico fue fijado covalentemente. En algunos casos en lugar de reacciones de digestión se realizaron reacciones de PCR que fueron igualmente separadas y transferidas a membranas. La transferencia del DNA a membranas y su entrecruzamiento se realizó de la misma forma que para el RNA (Capítulo II, Materiales y Métodos). El DNA transferido fue hibridado con los cDNAs [³²P] de *NaStEP* y *NaPEP II* como se indica en el Capítulo III (Materiales y Métodos). La preparación de las sondas está descrita en el Capítulo II (Materiales y Métodos). La membrana fue bloqueada, hibridada, lavada y revelada siguiendo el procedimiento mencionado para los ensayos tipo réplica en Northern (Capítulo III, Materiales y Métodos).

Análisis de secuencias

El programa empleado para la búsqueda de homologías fue el BLASTX (Capítulo III, Materiales y Métodos).

Cultivo de tejidos vegetales

Las hojas de *N. alata* AI fueron esterilizadas superficialmente, cortadas en discos de aproximadamente 1 cm² y los explantes se colocaron en medio de inducción [vitaminas MS modificadas (R2), 2µg/ml de BAP (bencilaminopurina) y 0.1µg/ml de ANA (ácido naftalenacético)] 2 días previos al bombardeo. Las condiciones óptimas para la regeneración de

brotos de *N. alata*, se alcanzaron probando diferentes composiciones orgánicas y concentraciones hormonales en el medio de cultivo de inducción de brotes.

Biobalística y selección de explantes transformados

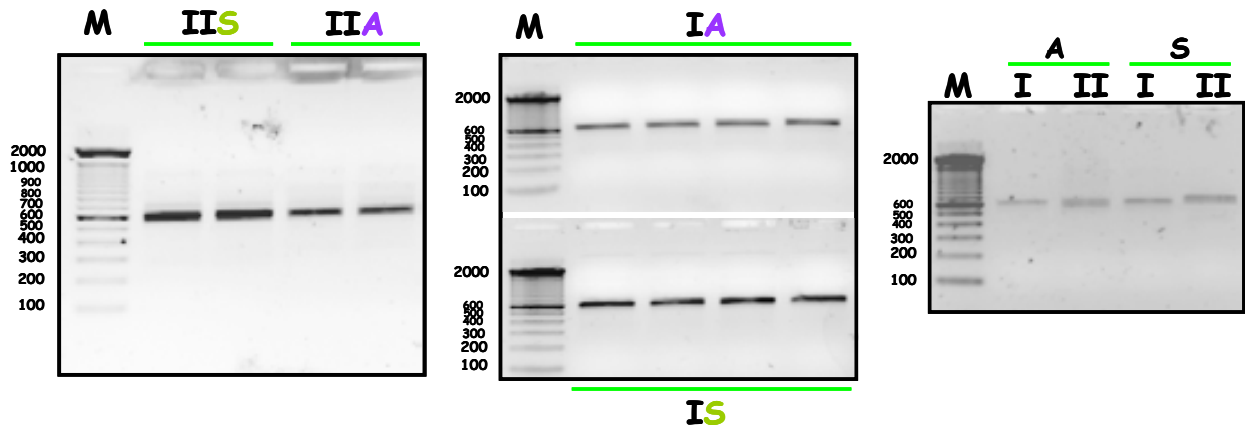
Sesenta discos de hoja fueron bombardeados con balas M10 (0.5 μm), una presión de 8 bar, vacío de -20 a -22 mm de Hg y una distancia de 12 cm. Los explantes bombardeados fueron colocados en medio de inducción de brotes suplementado con 90 mg/l de kanamicina. La concentración adecuada de kanamicina se obtuvo mediante la realización de un gradiente con concentraciones del antibiótico entre 50 y 100 mg/l. La preparación del antibiótico está descrita en el Apéndice I, Tabla 2. Los subcultivos de los explantes en el mismo medio fueron realizados cada 15 días. Los brotes generados a partir de los explantes se individualizaron y colocaron en medio MS suplementado con kanamicina. Los subcultivos en este medio se realizaron cada 20 días hasta que las plantas alcanzaron el vigor suficiente para ser trasladadas a condiciones controladas de invernaderos.

Resultados

Análisis de la clonación de NaStEP y NaPEP II en el vector pHANNIBAL

El vector usado para la clonación de *NaStEP* y *NaPEP II* en sentido y antisentido fue el pHANNIBAL. Como se puede apreciar en la Figura 40, se amplificó por PCR el inserto esperado de 600 pb, correspondiente al cDNA de *NaPEP II* con los sitios *Xho I/Kpn I* (Figura 40A, panel izquierdo, carril 2-3) y *BamH I/Cla I* (Figura 40A, panel izquierdo, carril 4-5). Los productos de PCR correspondientes al cDNA de *NaStEP* con los sitios *Xho I/Kpn I* (Figura 40A, panel centro, gel inferior) y *BamH I/Cla I* se muestran en la Figura 40A (centro, gel superior). Aunque la cantidad de DNA disminuye después de digerir los productos de PCR y el vector con las enzimas de restricción correspondientes y purificarlos, ésta es suficiente para ligar los insertos al vector de clonación (Figura 40A-B, paneles derechos).

A



B

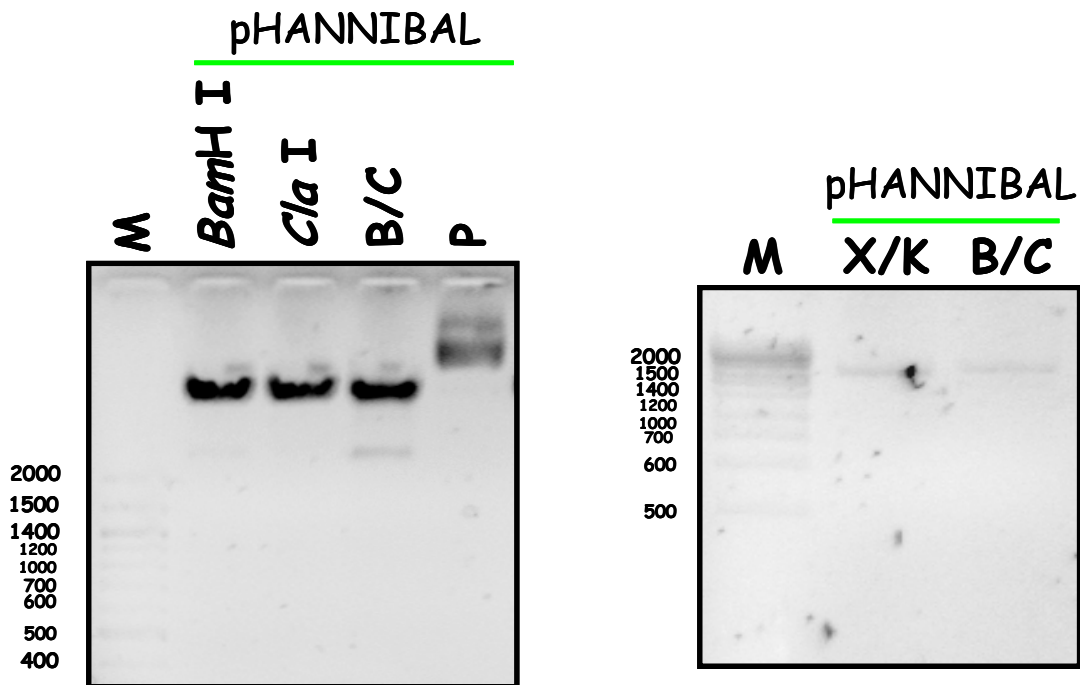


Figura 40. PCRs y digestiones desarrollados para clonar los cDNAs de los genes *NaPEP II* y *NaStEP* en el vector pHANNIBAL. A) Reacciones realizadas para crear los sitios de restricción *BamH I/Cla I* y *Xho I/Kpn I* necesarios para clonar el cDNA de *NaStEP* y *NaPEP II* en el pHANNIBAL (izquierda, centro) y las purificaciones de estos productos (derecha). B) Digestiones (izquierda) y purificaciones del pHANNIBAL (derecha) con las enzimas *BamH I/Cla I* y *Xho I/Kpn I*. Los DNAs plasmídicos portando los cDNAs de *NaPEP II* y *NaStEP* fueron usados como molde en las reacciones de amplificación. Los números romanos I y II representan las amplificaciones de *NaStEP* y *NaPEP II* (respectivamente) y las letras A y S, la correspondencia de las amplificaciones con la clonación del cDNA de interés en antisentido o sentido respectivamente. M: marcador; X/H: digestión con *Xho I/Kpn I*, B/C: digestión con *BamH I/Cla I*. Los marcadores en pb se muestran hacia la izquierda de cada gel. Los productos de PCR se cargaron y corrieron en geles de agarosa al 2 %.

Previo a la digestión de los productos de PCR con los sitios de restricción deseados, se probó el funcionamiento de las enzimas de restricción *Xho* I, *Kpn* I, *Bam*H I y *Cla* I (Figura 40B, panel izquierdo). Las digestiones sencillas y dobles (Figura 40B, panel izquierdo, carriles 2-4) mostraron que el plásmido se lineariza por acción de las enzimas de restricción y dejan de observarse los topoisómeros presentes en el plásmido sin digerir (Figura 40B, panel izquierdo, carril 5). Los productos de PCR y el vector, digeridos y purificados fueron ligados y usados para transformar células de *E. coli*. Los patrones de digestión de los plásmidos purificados de algunas colonias recombinantes seleccionadas se muestran en la Figura 41. De todas las colonias recuperadas, tres clonas (IS₁, ISN [no mostrada en la figura] y ISB) presentan a *NaStEP* clonado en los sitios *Xho* I/*Kpn* I (clonación del cDNA en sentido) y solo una (IA7), a *NaStEP* clonado en los sitios *Bam*H I/*Cla* I (clonación del cDNA en antisentido). Dos clonas positivas de *NaStEP* en sentido y la única clona que porta a *NaStEP* en antisentido se muestran en la Figura 41B (izquierda y derecha respectivamente). De *NaPEP II* solo fueron recuperadas dos clonas donde éste se encontraba clonado en los sitios *Xho* I/*Kpn* I (IISB y IISX) y ninguna donde estuviese clonado en antisentido (Figura 41A). Aunque se recuperaron colonias recombinantes donde se suponía estaba clonado el cDNA de *NaPEP II* con los sitios de restricción *Bam*H I/*Cla* I, los plásmidos después de las reacciones de digestión y PCR (datos no mostrados) estaban vacíos (Figura 41A). De forma general, algunos de los plásmidos digeridos presentaron una banda tenue alrededor de las 600 pb pero resultaron ser falsos positivos (Figuras 41A, 41C). Por ejemplo, la clona IIAC libera esta banda (Figura 41A, derecha); sin embargo, cuando se corroboró nuevamente por digestión la presencia del inserto, el plásmido estaba vacío (Figura 41C). En esta figura también se muestran algunas de las corroboraciones realizadas con las clonas que portaban los cDNAs de *NaStEP* y *NaPEP II*. Aunque estos plásmidos fueron digeridos con las cuatro enzimas (*Xho* I/*Kpn* I y *Bam*H I/*Cla* I) solo el cDNA clonado en sentido se liberó con *Xho* I/*Kpn* I y el cDNA en antisentido con *Bam*H I/*Cla* I, como se esperaba.

La clonación exitosa de *NaStEP* en sentido y antisentido de forma independiente permitió usar el plásmido portador del antisentido como receptor del cDNA de *NaStEP* en sentido para tener finalmente en una sola construcción al CaMV 35S, *NaStEP* en sentido + intrón + *NaStEP* en antisentido y t OCS.

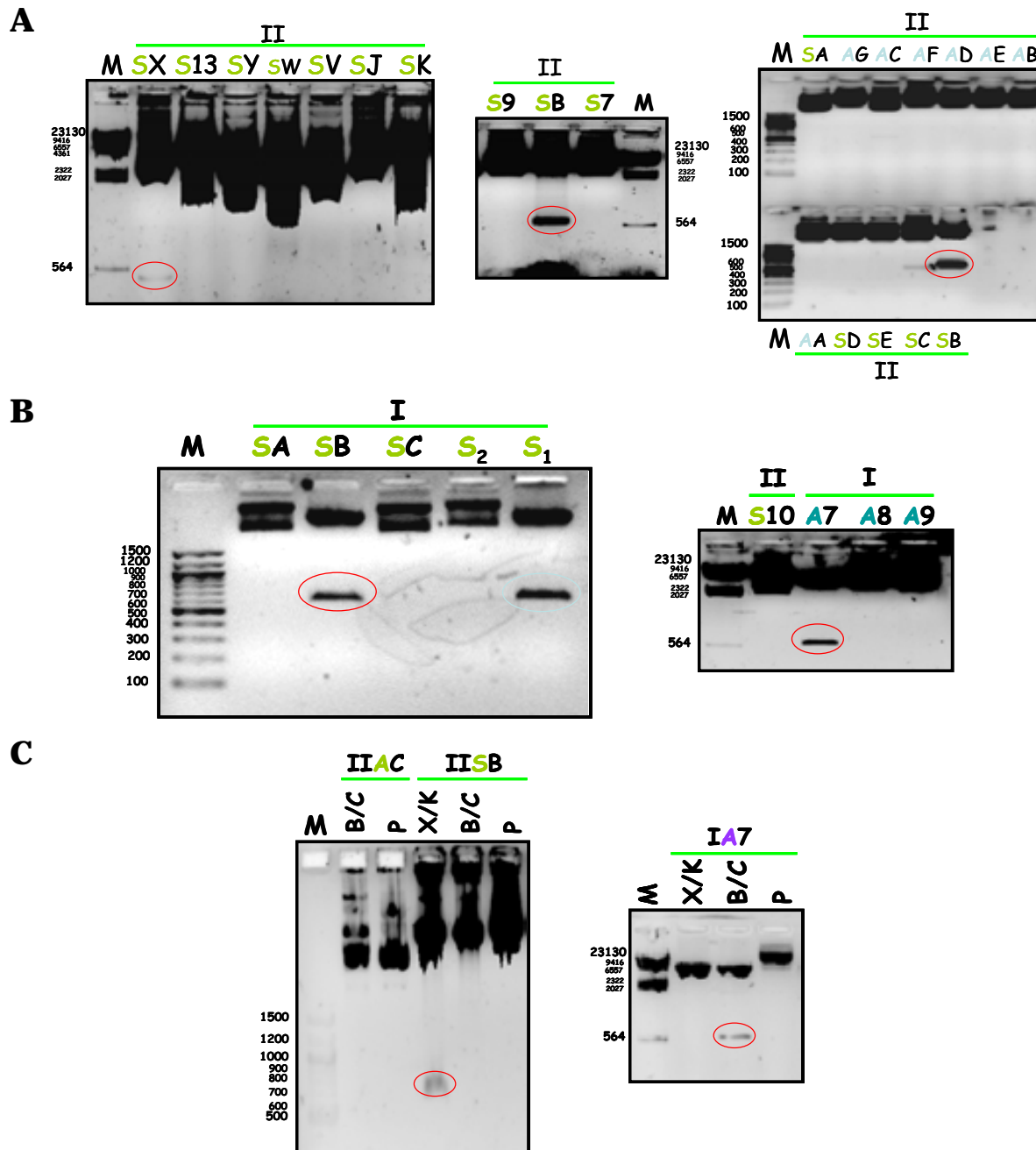


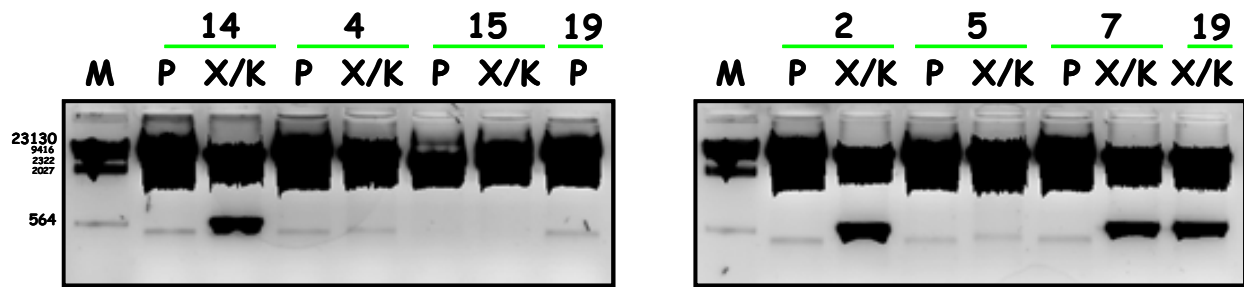
Figura 41. Digestiones realizadas para seleccionar los plásmidos recombinantes portadores de los cDNAs de *NaPEP II* y *NaStEP* en sentido y antisentido. A) Digestiones de los plásmidos recombinantes obtenidos a partir de la reacción de ligado entre el pHANNIBAL y *NaPEP II*. B) Lo mismo que en A pero las reacciones de ligado se efectuaron también entre el pHANNIBAL y *NaStEP*. C) Corroboración de la presencia de *NaPEP II* y *NaStEP* mediante digestiones específicas. Los números romanos I y II se refieren a *NaStEP* y *NaPEP II*, respectivamente. Las letras A y S, se corresponden con las clonaciones de los cDNAs de interés en antisentido o sentido y por ende las digestiones mostradas fueron realizadas en A) y B) con las enzimas *BamH I/Cla I* y *Xho I/Kpn I*, respectivamente. M: marcador; X/H: digestión con *Xho I/Kpn I*, B/C: digestión con *BamH I/Cla I*; P: plásmido sin digerir. Los óvalos representan los insertos de interés adquiridos por el vector. Los marcadores en pb se muestran hacia la izquierda de cada gel.

La clona IS₁ fue digerida con *Xho* I/*Kpn* I y el inserto, liberado, purificado y clonado en IA7 previamente digerido con las mismas enzimas y purificado. Una vez transformadas las células de *E. coli* con la reacción de ligado y recuperados los plásmidos de las colonias recombinantes, se desarrollaron reacciones de digestión para corroborar la presencia de los insertos de interés. La digestión de algunos plásmidos con *Xho* I/*Kpn* I se muestran en la Figura 42A. Como puede ser visto, cuatro de los plásmidos mostrados adquirieron el cDNA de *NaStEP* en sentido (clonas 14, 7, 2 y 19). Las bandas tenues detectadas en el resto de las clonas digeridas son falsos positivos porque también estaban presentes en el plásmido sin digerir. Para verificar que el pHANNIBAL estuviese portando tanto al cDNA en sentido como al antisentido, los plásmidos que adquirieron el cDNA en sentido fueron finalmente digeridos con las 4 enzimas. La Figura 42B muestra que las clonas probadas son portadoras de *NaStEP* en sentido y antisentido.

Análisis de la clonación de NaStEP en el vector binario pART27

Con el objetivo de transferir el fragmento CaMV 35S + *NaStEP* en sentido + intrón + *NaStEP* en antisentido + t OCS, del pHANNIBAL al vector binario pART27 (portador del marcador de selección para restringir el crecimiento de las plantas no transformadas), una de las clonas portadoras del fragmento completo se digirió con *Not* I. La digestión del pHANNIBAL recombinante con esta enzima debe originar fragmentos de 4141 pb y 2859 pb correspondientes al fragmento mencionado y al resto del plásmido respectivamente. En la Figura 43A (izquierda) se pueden observar los patrones de digestión del pART27 y del pHANNIBAL recombinante. Las digestiones produjeron los fragmentos esperados. Si el pHANNIBAL hubiera estado vacío, se hubieran originado producto de la digestión con *Not* I fragmentos de 2859 pb y 2965 pb. El pART27 linearizado (carriles 5-8) y el fragmento de 4141 pb correspondiente al fragmento de interés en el pHANNIBAL (carril 3, banda superior) fueron purificados y 1µl de éstos se aplicaron a geles de agarosa (Figura 43A, derecha) previo a la reacción de ligado para corroborar que se tenían cantidades suficientes de ambos para proceder a su ligado. Los plásmidos purificados a partir de algunas de las colonias recombinantes obtenidas se utilizaron para determinar la presencia del fragmento de interés mediante digestiones. Solo dos de las clonas probadas portaron el inserto deseado (Figura 43B, clonas 126 y 119).

A



B

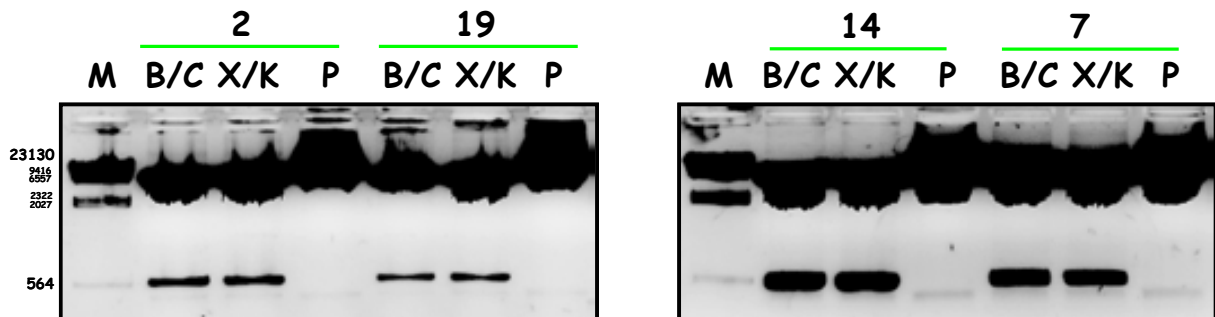
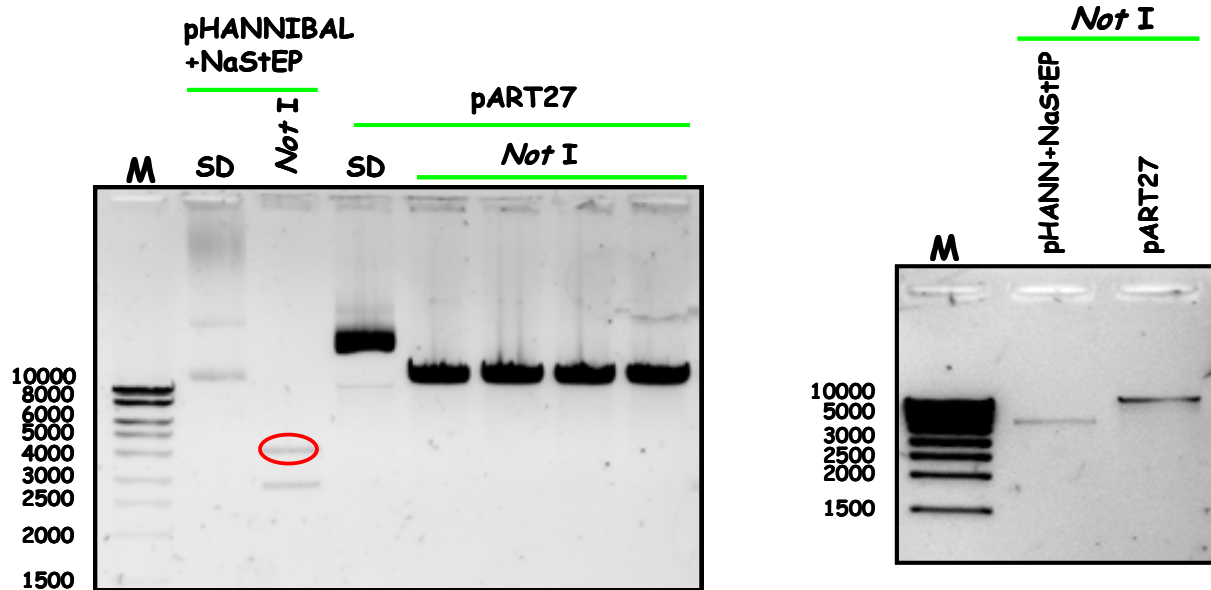


Figura 42. Digestiones realizadas para seleccionar los plásmidos recombinantes portadores de los cDNAs de *NaStEP* en sentido y antisentido. A) Digestiones de los plásmidos recombinantes obtenidos a partir de la reacción de ligado entre el pHANNIBAL::*NaStEP* en antisentido y *NaStEP* en sentido con las enzimas *Xho* I/*Kpn* I. B) Corroboración de la presencia de *NaStEP* en antisentido y *NaStEP* en sentido en el mismo vector de clonación mediante digestiones con las enzimas *Bam*H I/*Cla* I y *Xho* I/*Kpn* I. Los números representan plásmidos independientes. M: marcador; X/H: digestión con *Xho* I/*Kpn* I, B/C: digestión con *Bam*H I/*Cla* I; P: plásmido sin digerir. Los marcadores en pb se muestran hacia la izquierda de cada gel. El marcador de peso molecular empleado fue el DNA del fago λ digerido con *Hin*D III. Las digestiones se cargaron y corrieron en geles de agarosa al 2 % a 120 volts por 20 min aproximadamente. Los productos de visualizaron con bromuro de etidio bajo la luz ultravioleta.

A



B

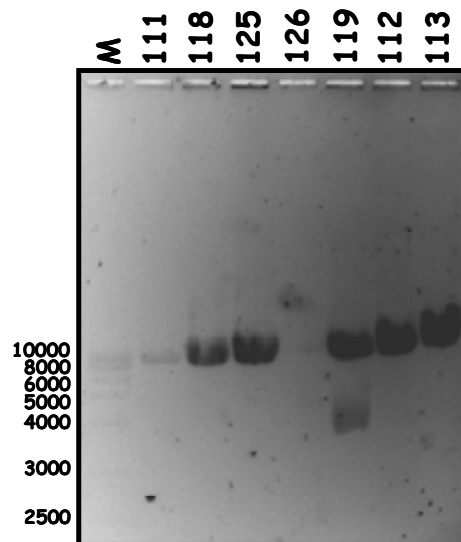


Figura 43. Digestiones realizadas para transferir el cassette CaMV 35S + *NaStEP* en sentido + intrón + *NaStEP* en antisentido + t OCS del pHANNIBAL al pART27 y su clonación en este último. A) Digestiones de los plásmidos con *Not I* (izquierda) y las purificaciones de los fragmentos de interés digeridos (derecha). B) Corroboración de la presencia del cassette portador de *NaStEP* en antisentido y *NaStEP* en sentido en el pART27 mediante digestiones con *Not I*. Los números representan plásmidos independientes. M: marcador; SD: plásmido sin digerir. El marcador de peso molecular en pb, MassRuler High Range (Fermentas) se muestra hacia la izquierda de cada gel. El óvalo representa el cassette CaMV 35S + *NaStEP* en sentido + intrón + *NaStEP* en antisentido y el t OCS liberado del pHANNIBAL. La electroforesis en los geles de agarosa al 2 % se desarrolló a 120 volts por 40 min aproximadamente.

La corroboración de la presencia del inserto se realizó mediante secuenciación y ensayos tipo Southern blot, transfiriendo las reacciones de digestión a una membrana Hybond N⁺ e hibridando ésta con el cDNA de *NaStEP* marcado radiactivamente. Los plásmidos de pHANNIBAL y pART27 vacíos se usaron como controles negativos. Los vectores pART27 vacíos se muestran en la Figura 43B. La Figura 41 muestra los DNAs plasmídicos y las digestiones realizadas (izquierda) y el Southern blot realizado con las mismas muestras transferidas a membrana (derecha). Las señales positivas solo fueron detectadas en los carriles donde se encontraban la sonda y los plásmidos y digestiones que portaban a *NaStEP* (Figura 44, panel izquierdo, carriles 3-5, 8-10). En los carriles correspondientes a las digestiones de los plásmidos portando a *NaStEP* se observa una doble hibridación con *NaStEP* [³²P] debido posiblemente a que las digestiones no fueron completas y algunas moléculas plasmídicas no alcanzaron a liberar el fragmento de interés. Ninguna señal fue detectada en los plásmidos vacíos ni en sus digestiones (Figura 44, carriles 2, 6-7, 12-14).

Construcción de NaPEP II en antisentido en pAGUS1

El plásmido pAGUS1 fue empleado para clonar a *NaPEP II* en antisentido. Mediante PCRs, se amplificó el inserto esperado de 600 pb, correspondiente al cDNA de *NaPEP II* con los sitios *BamH I*/*Sac I* (Figura 45A, derecha, panel superior). Previo a la digestión de los productos de PCR con los sitios de restricción deseados, se probó el funcionamiento de las enzimas de restricción *BamH I* y *Sac I* (Figura 45A). Las digestiones sencillas (Figura 45A, panel central) mostraron que el plásmido se lineariza y las digestiones dobles, que se libera el gen GUS presente en el vector de clonación (Figura 45A, panel izquierdo). Después de digerir los productos de PCR y el vector con las enzimas de restricción correspondientes y purificarlos, éstos fueron ligados y usados para transformar células de *E. coli*. Los fragmentos digeridos y purificados empleados en la reacción de ligado se muestran en la Figura 45A (panel izquierdo, carril 5 y panel derecho). La corroboración de la presencia del cDNA de interés se realizó por PCR (Figura 45B, panel izquierdo) y reacciones de digestión (Figura 45B, panel derecho) usando como molde los plásmidos purificados a partir de las colonias recombinantes seleccionadas.

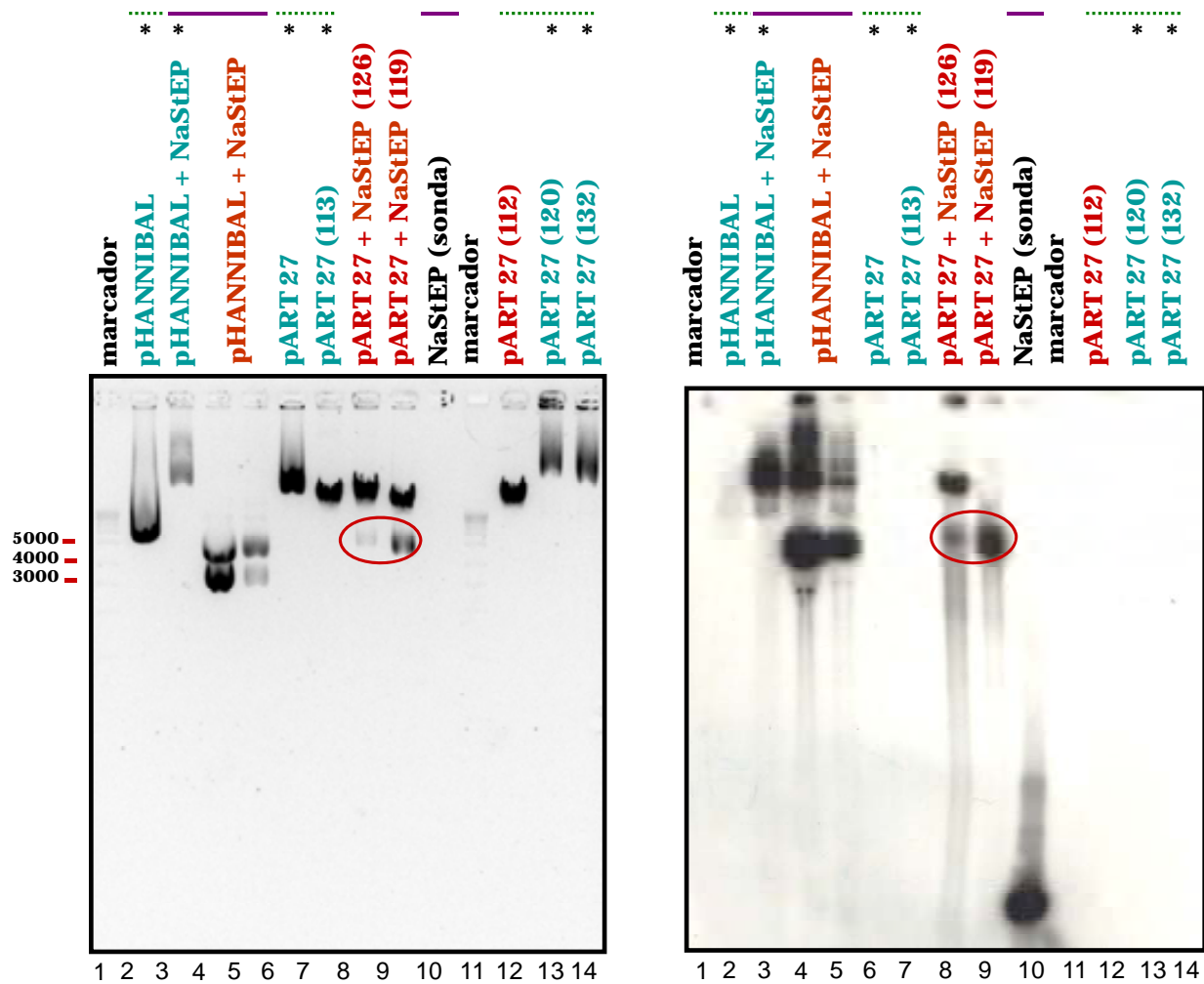


Figura 44. Digestiones y ensayos tipo Southern blot realizados para corroborar la presencia del cassette CaMV 35S + *NaStEP* en sentido + intrón + *NaStEP* en antisentido + t OCS en el pART27. Los plásmidos digeridos o no con *Not* I y el Southern blot realizado al inmovilizar éstos en membranas e incubarlos con *NaStEP* [³²P] se muestran a la izquierda y derecha respectivamente. Los números representan plásmidos independientes. Los asteriscos indican los plásmidos que no fueron digeridos con *Not* I. Las líneas continuas representan los controles positivos empleados y las discontinuas los negativos. El marcador de peso molecular en pb, MassRuler High Range (Fermentas) se muestra hacia la izquierda de cada gel. El óvalo representa el cassette CaMV 35S + *NaStEP* en sentido + intrón + *NaStEP* en antisentido + t OCS presente en el pART27. La electroforesis en los geles de agarosa al 2 % se desarrolló a 100 volts por 60 min aproximadamente.

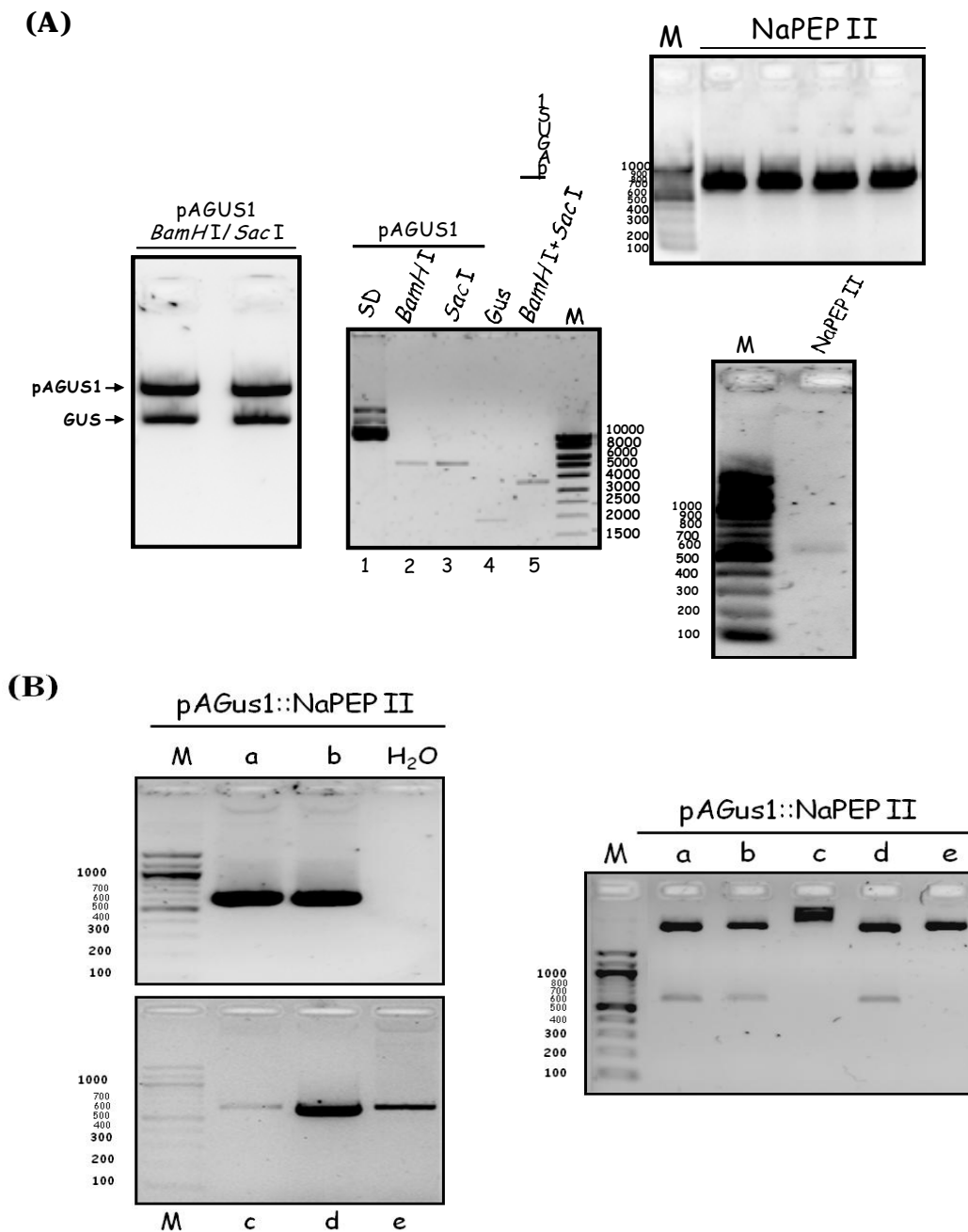


Figura 45. PCRs y digestiones desarrolladas para clonar el cDNA del gen *NaPEP II* en el vector pAGUS1. A) PCRs realizados para crear los sitios de restricción *BamH I/Sac I* necesarios para clonar el cDNA de *NaPEP II* en el pAGUS1 (izquierda), para determinar las clonas portadoras del cDNA de interés (centro) y reacciones de digestión para corroborar la presencia de este cDNA en el pAGUS1 (derecha). B) Digestiones del pAGUS1 con las enzimas *BamH I/Sac I* (izquierda), purificaciones de los fragmentos recuperados de las mismas (centro) y de NaPEP II (derecha). El DNA plasmídico portando el cDNA de *NaPEP II* fue usado como molde en las reacciones de amplificación. M, marcador; a-e, clonas independientes resultantes de la reacción de ligado entre NaPEP II y el pAGUS1; SD, plásmido sin digerir. Los marcadores en pb se muestran hacia la izquierda o derecha de cada gel. Los números en la Figura A se incluyeron para facilitar la identificación de las muestras.

Aunque por PCR se detectó amplificación en las cinco clonas analizadas, las reacciones de digestión corroboraron que solo tres de ellas (a, b, d) presentan a *NaPEP II* clonado en los sitios *BamH I/Sac I* (Figura 45B, panel derecho).

Análisis de la clonación de NaPEP II en el vector binario pPZP112

Con el objetivo de transferir el fragmento CaMV 35S + *NaPEP II* en antisentido+ t NOS, del pAGUS1 al vector binario pPZP112 (portador del marcador de selección para restringir el crecimiento de las plantas no transformadas), una de las clonas portadoras del fragmento completo se digirió con *EcoR I*. Como *NaPEP II* tiene un sitio interno de reconocimiento para esta enzima de restricción, se probaron diferentes tiempos de digestión con el fin de determinar el tiempo óptimo en el que se puede recuperar al fragmento íntegro. Como se puede apreciar, (Figura 46A, tres primeros paneles y panel superior derecho), desde los 5 min hasta los 30 min de incubación con la enzima, se origina el fragmento de interés, el cual comienza a desaparecer a partir de los 40 min. Con estas observaciones se determinó que el tiempo óptimo para las incubaciones era de 5 min (Figura 46A, panel superior derecho). El fragmento de interés digerido fue purificado y 1 µl de éste se fraccionó en geles de agarosa (Figura 46A, panel inferior derecha) para corroborar que se tenía cantidad suficiente para proceder a su ligado en el pPZP112. Diez µl de la reacción de ligado fueron usados para transformar células de *E. coli*. Los plásmidos purificados a partir de algunas de las colonias recombinantes obtenidas se purificaron y la presencia del fragmento CaMV 35S + *NaPEP II* en antisentido+ t NOS se determinó mediante digestiones y PCRs. Las reacciones de digestión no liberaron el inserto deseado y aunque los PCRs resultaron positivos para las dos clonas recuperadas, el pPZP112 usado como control negativo (sin inserto), también mostró amplificación (Figura 46B, izquierda). Para descartar que la amplificación observada en el pPZP112 fuera un artefacto del PCR, una réplica del gel mostrado en la Figura 46B fue usada para transferir los productos de PCR a membranas e hibridarlos con el cDNA de *NaPEP II* [³²P]. Como el ensayo tipo Southern blot realizado no discrimina entre los vectores vacíos y recombinantes (Figura 46B, panel derecho), no fue posible determinar si las colonias recuperadas de la reacción de ligado portaban el fragmento de interés.

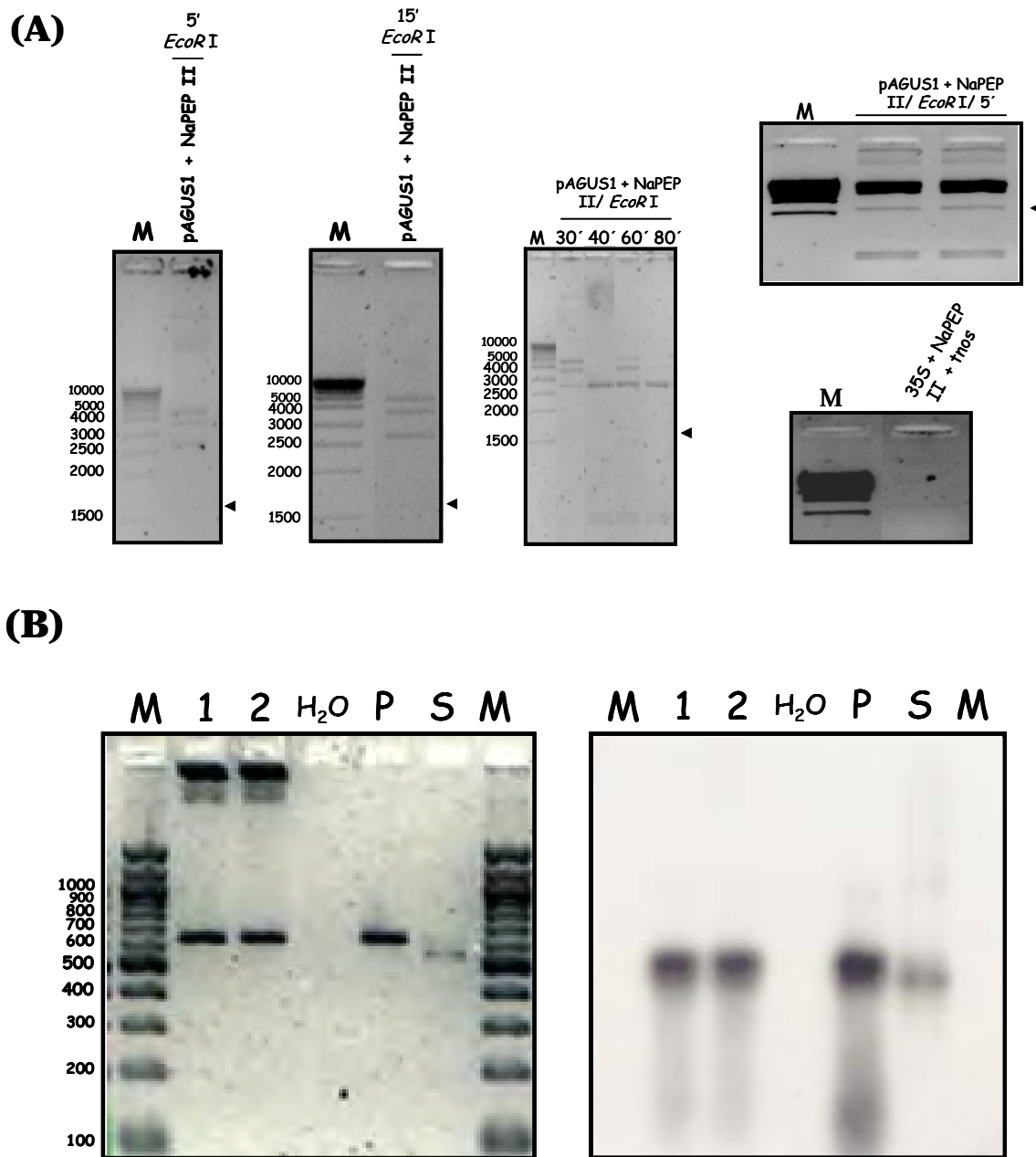


Figura 46. Digestiones, PCRs, y ensayos tipo Southern blot realizados para purificar el fragmento CaMV 35S + *NaPEP II* en antisentido + t NOS y corroborar su presencia en el pZP112. A) Digestiones de los plásmidos recombinantes con *EcoRI* y la purificación del fragmento de interés digerido (derecha, panel inferior). Los tiempos de incubación con la enzima de restricción se muestran encima de cada gel. La flecha representa el fragmento CaMV 35S + *NaPEP II* en antisentido + t NOS presente en el pAGUS1. B) Corroboración por PCR (izquierda) y ensayos tipo Southern blot (derecha) de la presencia de *NaPEP II* en antisentido en el pZP112. Los números representan clones independientes. Los fragmentos de PCR amplificados se fraccionaron en geles de agarosa al 2%, se transfirieron a membranas e incubaron con *NaPEP II* [³²P]. Los marcadores de masas moleculares en pb, se muestran hacia la izquierda de los geles. M, marcador; P, plásmido pZp112; S, sonda.

Transformación vegetal y selección de plantas transgénicas en medio de cultivo

El método de transformación usado para liberar las construcciones de interés (*NaStEP* y *NaPEP II*) en las células vegetales fue la biobalística. Previo a la liberación de las construcciones de interés se realizaron experimentos para buscar la distancia y tamaño de partículas adecuadas para el bombardeo (distancias de 17.5 cm, 12 cm y 7.5 cm con balas de tungsteno de 0.4 μm y 0.5 μm) usando el gen reportero *GUS*. Desafortunadamente las condiciones de disparo no pudieron ser optimizadas ya que *N. alata* tiene mucha actividad endógena de β -glucuronidasa. Los explantes de *N. alata* fueron bombardeados con el vector binario pART27 portando a *NaStEP* en sentido y antisentido y co-bombardeados con el pAGUS1 y el pART27 portando a *NaPEP II* en antisentido y al marcador de selección vegetal respectivamente.

Los explantes bombardeados fueron sometidos a una primera selección en medio de inducción de brotes suplementado con kanamicina a 90 mg/l.

Análisis molecular de las plantas transgénicas resistentes a kanamicina

Una vez que los brotes emergieron y se individualizaron, se verificó que éstos portaran la construcción de interés. Un total de 16 plantas resistentes a kanamicina han sido hasta la fecha analizadas mediante reacciones de PCR usando sus gDNAs como molde. Las reacciones de PCR realizadas mostraron que ninguna de las plantas analizadas porta la región correspondiente a *NaStEP* dentro del fragmento CaMV 35S + *NaStEP* en sentido + intrón + *NaStEP* en antisentido +t OCS.

Discusión

Para bloquear la síntesis de proteína de los genes *NaStEP* y *NaPEP II* en plantas AI de *N. alata* fue empleada la técnica de RNA de interferencia (RNAi) cuya eficiencia supera a la utilización del RNA en antisentido (Wesley *et al.*, 2001). El principio de la técnica se basa en la generación de RNA dúplex utilizando la información portada en el vector que se introduce al organismo blanco. El cDNA del gen cuya traducción se pretendía bloquear, se clona en sentido y

antisentido en el vector pHANNIBAL separándose estos dos cDNAs por un intrón cuya función es aproximar los transcritos una vez que se genere el mRNA.

Construcciones para la transformación de plantas transgénicas

La clonación del cDNA de *NaStEP* en sentido y antisentido en el pHANNIBAL y su posterior transferencia al vector binario pART27 fue exitosa (Figuras 40 y 41). La imposibilidad de clonar al cDNA de *NaPEP II* en antisentido en el pHANNIBAL impidió usar el silenciamiento por RNAi para bloquear la traducción de este gen. Aún no queda claro por qué no se obtuvieron clonas positivas con este cDNA pero una posible hipótesis es que *NaPEP II* y las secuencias que lo flanquean (una vez clonado éste en el pHANNIBAL) recombinen con el genoma de la bacteria portadora del plásmido.

Otra de las alternativas seguidas fue intentar silenciar a este gen por antisentido. Aunque *NaPEP II* pudo ser clonado eficientemente en antisentido en el vector pAGUS1, su transferencia al pPZP112 no fue exitosa (Figura 44) por lo que se decidió co-bombardear con el pAGUS1 y el pART27 portando a *NaPEP II* en antisentido y al marcador de selección vegetal respectivamente.

Obtención de plantas transgénicas

Los experimentos de transformación realizados para corroborar la participación de *NaStEP* y *NaPEP II* en la respuesta de rechazo del polen requirieron la puesta a punto de 1) las condiciones para el cultivo de tejidos del material vegetal a emplear y 2) la concentración adecuada del marcador de selección a utilizar. Aunque concentraciones de 100 mg/l de kanamicina son suficientes para lograr una inhibición casi total de la regeneración de los explantes silvestres, los explantes bombardeados con las construcciones de interés fueron seleccionados con una concentración de 90 mg/l de este antibiótico. Esta concentración, aunque permite pequeños escapes, no debe ser tóxica para las plantas transgénicas. Los experimentos de transformación se realizaron mediante biobalística y a pesar de recuperar plantas resistentes al marcador de selección, el análisis molecular indicó que éstas no portaban la región

correspondiente a *NaStEP* dentro del fragmento transferido al vector binario. Es posible que éste se haya fragmentado durante el proceso de integración al genoma vegetal por lo que aunque las plantas hayan adquirido el gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa (*npt II*), esto no implica que también posean los transgenes *NaStEP*. El análisis de las plantas recuperadas después del co-bombardeo del pAGUS1:NaPEP II y el pART27 aún no ha sido desarrollado.

Función de los genes modificadores en la reacción de AI.

A pesar de no ser detectado el transgen de interés en las plantas resistentes a kanamicina, éstas fueron transferidas a condiciones controladas en invernadero y cuando florezcan, los niveles de expresión del transcrito y la proteína de *NaStEP*, serán analizados mediante ensayos tipo réplica en Northern y Western. Las plantas donde la expresión del gen se afecte por la introducción de su antisentido, serán polinizadas y se evaluará su capacidad de rechazo o aceptación del polen.

CAPÍTULO VI

Discusión general y Conclusiones

Discusión general y Conclusiones

De acuerdo a lo analizando en cada una de las secciones de discusión de los capítulos de esta tesis, *NaPEP II* y *NaStEP* son excelentes candidatos como genes modificadores en *Nicotiana glauca*. Aunque aún no hemos podido determinar la función que realizan *NaPEP II* y *NaStEP* en las interacciones polen-pistilo, se puede pensar que estos genes estén involucrados directa o indirectamente en procesos desencadenados por la llegada y crecimiento del grano de polen y los tubos polínicos en la superficie estigmática y en el tejido de transmisión del estilo, respectivamente.

Nuestros datos sugieren que es poco probable que *NaStEP*, e incluso *NaSoEP*, tengan papeles defensivos como los asociados a la mayoría de los inhibidores de proteasas identificados. Los datos que apoyan esta hipótesis son la expresión temprana de *NaSoEP* durante el desarrollo del pistilo y la expresión estigmática exclusiva de *NaStEP* en especies AI, además de la detección específica de estos transcritos y/o proteínas solamente en los órganos sexuales. El ambiente más favorable para el crecimiento de patógenos sería la madurez del pistilo. El exudado liberado sobre la superficie estigmática cuando la flor madura es rico en proteínas, aminoácidos libres, lípidos, y carbohidratos (Kandasamy and Kristen, 1987). *NaSoEP* no se detecta en estigmas maduros. En el caso de *NaStEP*, aunque los mRNAs y proteínas codificados por este gen están presentes en estigmas maduros, es raro que un gen de defensa aparezca solamente en especies con un comportamiento de polinización específico. La detección de *NaStEP* en las células papilares del estigma hacia la madurez del pistilo y el incremento de su presencia en el exudado estigmático durante la polinización sugieren una participación activa de este gen en interacciones que involucren a los gametofitos masculino y femenino.

La expresión temporal de *NaPEP II* (semejante a la expresión de algunos genes estilares necesarios para la reacción de AI) y su localización exclusiva en la matriz extracelular de tejidos reproductivos femeninos, hace suponer que esta familia o alguno de sus miembros pudieran estar involucrados en eventos de interacción polen-pistilo y ser requeridos en la respuesta de rechazo del polen.

De acuerdo a la similitud de este gen con los inhibidores de metilesterasas de pectina, una posible función de NaPEP II en la MEC del TT del estilo en *N. alata* podría ser bloquear a las metilesterasas de pectina en la punta del tubo polínico para mantener a las pectinas esterificadas y de esta forma interferir con la adhesión de los tubos polínicos incompatibles a las paredes estilares.

Las propiedades y función de las PMEs en la regulación del crecimiento del tubo polínico son aún desconocidas, pero podrían jugar un papel importante en cambios dinámicos de la rigidez/extensibilidad de la pared celular relacionada al crecimiento del mismo.

Aunque se cree que la adhesión celular en las plantas se mantiene por las pectinas no esterificadas, existen algunos datos (Liners and Van Cutsem 1992; Liners *et al.* 1994, Stępka *et al.*, 2000) que también involucran a las pectinas esterificadas en este proceso. Las pectinas se sintetizan y son secretadas como formas altamente metilesterificadas por el aparato de Golgi y a su llegada a la pared celular son desesterificadas por una metilesterasa de pectina para producir pectinas no esterificadas (Heslop-Harrison, 1987; Zhang and Staehelin, 1992). Durante la elongación de los tubos polínicos, las pectinas se depositan en la punta, fundamentalmente en su forma esterificada y en *Arabidopsis* solo en esta forma (Lord, 2000). Como las pectinas desesterificadas forman una rígida pared celular detrás de la punta (Derksen, 1996; Li *et al.* 1997), NaPEP II impediría el fortalecimiento de la pared celular del tubo polínico específicamente en la punta.

Experimentos de pérdida de función de NaPEP II y NaStEP en plantas AI mediante su silenciamiento por RNAi permitirán determinar con certeza la participación o no de estos genes en la respuesta de rechazo del polen.

Las conclusiones a las que hemos arribado con la realización de este trabajo se muestran a continuación:

Conclusiones

1. **Se identificaron dos genes, *NaStEP* y *NaPEP II*, los cuales poseen características que apoyan su posible papel como genes modificadores en *N. alata*.** Aunque no fue posible determinar el papel que estos genes juegan en la AI, su patrón de expresión y su localización celular final, indican que podrían estar involucrados en reacciones de interacción polen-pistilo.
2. ***NaPEP II* se expresa solamente en estilos y estigmas maduros y su expresión se incrementa dramáticamente en el estilo maduro.** En el pistilo (excluyendo el ovario), los primeros niveles de *NaPEP II* se detectaron en botones de 2.0 a 3.5 cm y su nivel de expresión se incrementó gradualmente durante el desarrollo de la flor hacia la antesis, mientras que el transcrito no se detectó en órganos vegetativos.
3. ***NaPEP II* es una proteína asociada a la matriz extracelular.** Durante las extracciones proteicas secuenciales, *NaPEP II* se detectó tanto en la fracción soluble como en la fracción correspondiente a las proteínas asociadas a la ECM, compartiendo las mismas características de solubilidad que presentan los genes modificadores de los grupos III y II (*NaTTS*, 120K) y las determinantes femeninas de la AI (S RNAsas). Todas las proteínas estilares involucradas en la reacción de rechazo del polen son secretadas hacia la ECM.
4. ***NaPEP II* se detectó tanto en especies autocompatibles como autoincompatibles.** Aunque esta proteína está presente en todas las especies probadas, independientemente de su fenotipo de polinización, no se descarta la posibilidad de que pudiese estar involucrada en la respuesta de AI. En especies AC podrían existir genes que en las especies AI estuviesen controlando la respuesta de rechazo del propio polen.
5. **La expresión de *NaStEP* a nivel de transcrito y proteína está restringida específicamente a los estigmas maduros de especies autoincompatibles.** Los análisis tipo réplica en Northern, Western y las inmunolocalizaciones realizadas sobre secciones transversales de estigmas demuestran que esta proteína es exclusiva de especies autoincompatibles (*N. bonariensis*, *N. forgetiana* y cultivares AI de *N. alata*).
6. **El gen *NaStEP* se expresa desde etapas tempranas del desarrollo del estigma, alcanzando una expresión máxima hacia la madurez del pistilo.** En el pistilo

(excluyendo el ovario), los primeros niveles de *NaStEP* se detectaron en botones de 0.5 a 1.0 cm y su nivel de expresión se fue incrementando gradualmente durante el desarrollo de la flor hacia la antesis. La detección de *NaStEP* en menor proporción en el pistilo, se debe a la contribución aportada exclusivamente por el estigma a este órgano, al no ser detectada la proteína en estilos ni en ovarios. Este gen no se expresa en los órganos vegetativos probados (hoja, tallo, sépalo, y pétalo) y en ninguna etapa del desarrollo de la antera.

7. **NaStEP es homólogo a inhibidores de proteasas tipo Kunitz y ensayos de actividad indicaron que no inhibe proteasas de serina como la tripsina.** Los niveles de identidad de secuencia entre *NaStEP* y los inhibidores de proteasas tipo Kunitz se encuentran entre 24-79%. No obstante, no detectamos actividad inhibitoria contra la tripsina cuando la proteína *NaStEP* nativa y purificada se probó en geles de poliacrilamida.
8. **NaStEP es una proteína vacuolar que se localiza específicamente en las papilas estigmáticas de estilos no polinizados.** Mediante los experimentos de microscopía confocal y electrónica de barrido se detectó que esta proteína se acumula fundamentalmente en las vacuolas (dentro de cuerpos osmiofílicos) de estilos sin polinizar. La polinización cambia la localización celular de esta *NaStEP*.
9. **NaStEP se libera al exudado estigmático después de la polinización y su síntesis y transferencia al exudado se ven estimulados fuertemente por polinizaciones incompatibles.** Después de la polinización con polen de *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia* o *N. alata* cv BT, *NaStEP* se localiza abundantemente en el exudado estigmático. La síntesis total de *NaStEP* se incrementa 3.7 veces después de una polinización incompatible y 1.7 veces después de una polinización compatible. Lo mismo sucede con la deposición de *NaStEP* hacia el exudado estigmático, se estimula 20 veces en una polinización incompatible y 12 veces después de una polinización compatible.

Referencias

- Ai, Y., Kron, E. and Kao, T-H.** (1991) *S*-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.*, **230**, 353–358.
- Albani, D., Altosaar, I., Arnison, P.G. and Fabijanski, S.F.** (1991) A gene showing sequence similarity with pectin esterases is specifically expressed in developing pollen of *Brassica napus*. Sequences in 5 flanking region are conserved in other pollen-specific promoters. *Plant Mol Biol.*, **16**, 501–513.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389–3402.
- Anderson, E. and de Winton, D.** (1931) The genetic analysis of an unusual relationship between self-sterility and self-fertile in *Nicotiana*. *A. Missouri. Bot. Garden*, **18**, 97–116.
- Anderson, M.A., Cornish, E.C., Mau, S-L., Williams, E.G., Hoggart, R., Atkinson, A., Boning, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P.J., Haley, J.D., Penschow, J.D., Nial, H.D., Tregear, G.W., Coghlan, J.P., Crawford, R.J. and Clarke, A.E.** (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, **321**, 38–44.
- Atkinson, A.H., Heath, R.L., Simpson, R.J., Clarke, A.E. and Anderson, M.A.** (1993) Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. *Plant Cell*, **5**, 203–213.
- Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L. and Servillo, L.** (1990) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Eur. J. Biochem.*, **193**, 183–187.
- Barlic-Maganja, D., Strukelj, B., Pungercar, J., Gubensek, F., Turk, V. and Kregar, I.** (1992) Isolation and sequence analysis of the genomic DNA fragment encoding an aspartic proteinase inhibitor homologue from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Mol. Biol.*, **20**, 311–313.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M. and Sonnhammer, E.L.L.** (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 276–280.
- Beecher, B. and McClure, B.A.** (2001) Effects of RNases on rejection of pollen from *Nicotiana glauca* and *N. plumbaginifolia*. *Sex. Plant Reprod.*, **14**, 69–76.
- Bellincampia, D.** (2004) Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Lett.*, **557**, 199–203.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S.** (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, **340**, 783–795.
- Bower, M.S., Matias, D.D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S.J., and Goring, D.R.** (1996) Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* S locus receptor kinase. *Plant Cell*, **8**, 1641–1650.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.

- Brady, C.J., McGlasson, W.B. and Speirs, J.** 1987. The biochemistry of fruit ripening. In *Tomato Biotechnology* (Nevins, D. & Jones, R., eds), pp. 288–289. Alan R. Liss, New York.
- Broothaerts, W., Janssens, G.A., Proost, P. and Broekaert, W.F.** (1995) cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol Biol.*, **27**, 499–511.
- Brzin, J., Popovic, T., Drobnic-Kosorok, M., Kotnik, M. and Turk, V.** (1988) Inhibitors of cysteine proteinases from potato. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler Suppl.*, **369**, 233–238.
- Cabrillac, D., Cock, J.M., Dumas, C. and Gaudé, T.** (2001) The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*, **410**, 220–223.
- Camardella, L., Vito, C., Ciardiello, M.A., Servillo, L., Balestrieri, C. and Giovane, A.** (2000) Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase Amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4561–4565.
- Chen, M.H., Sheng, J., Hind, J., Handa, A.K. and Citovsky, V.** (2000) Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and the host cell pectin methylesterase is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.*, **19**, 913–920.
- Chetelat, R.T. and DeVerna, J.W.** (1991) Expression of unilateral incompatibility in pollen of *Lycopersicon pennelli* is determined by major loci on chromosomes 1, 6 and 10. *Theor. Appl. Genet.*, **82**, 704–712.
- Cheung A.Y., Wang H. and Wu, H-M.** (1995a) A floral transmitting tissue specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell*, **82**, 383–393.
- Cheung, A.Y.** (1995) Pollen-pistil interactions in compatible pollination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 3077–3080.
- Clark, A. G. and Kao, T.-h.** (1991). Excess nonsynonymous substitution at shared polymorphic sites among self-incompatibility alleles of Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9823–9827.
- Clarke, A.E., Gleeson, P., Harrison, S. and Knox, R.B.** (1979) Pollen-stigma interactions: Identification and characterization of surface components with recognition potential. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 3358–3362.
- Cornish, E.C., Pettitt, J.M. Böning, I., and Clarke, A.E.** (1987) Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature*, **326**, 99–102.
- Cosgrove, D.J., Bedinger, P., and Durachko, D.M.** (1997). Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6559–6564.
- Cresti M, Ciampolini F, Van Went JL, Wilms HJ.** (1982) Ultrastructure and histochemistry of *Citrus limon* (L.) stigma. *Planta*, **156**: 1–9.
- Cresti, M., Keijzer, J., Tiezzi, A., Ciampolini, F., and Focardi, S.** (1986). Stigma of *Nicotiana*: structural and biochemical studies. *Am. J. Bot.*, **73**, 1713–1722.
- Cruz-Garcia, F., Hanckok, N.C. and McClure, B.** (2003) S-RNase complexes and pollen rejection. *J. Exp. Bot.*, **54**, 123–130.
- Cruz-Garcia, F., Hancock, N., Kim, D. and McClure, B.** (2005) Styelar glycoproteins bind to S-RNase *in vitro*. *Plant J.*, **42**, 295–304.

- D'Avino, R., Camardella, L., Christensen, T.M.I.E., Giovane, A. and Servillo, L.** (2003) Tomato pectin methylesterase: modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies—Comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins*, **53**, 830–839.
- Dafni, A. and Maues, M.M.** (1998) A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity, *Sex. Plant Reprod.* **11**, 177–180.
- de Nettancourt, D.** (1977) Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin.
- de Nettancourt, D.** (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sex Plant Reprod.*, **10**, 185–199.
- de Nettancourt, D.** (2001) *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. 2nd (eds). Berlin: Springer.
- Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D. and Tsernoglou, D.** (2005) Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell*, **17**, 849–858.
- Diatchenko, L., Lau, Y-F., Campell, A., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. and Siebert, P.** (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 6025–6030.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Chris, L. and Siebert, P.D.** (1999) Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Method Enzymol.*, **303**, 349–380.
- Dickinson, H.** (1993) Pollen dressed for success. *Nature*, **364**, 573–574.
- Dickinson, H.** (1995) Dry stigmas, water and self-incompatibility in Brassica. *Sex Plant Reprod*, **8**, 1–10.
- Dickinson, H.G.** (1990) Self-incompatibility in flowering plants. *Bioessays*, **12**, 155–161.
- Dickinson, H.G.** (1994) Self-pollination. Simply a social disease? *Nature*, **367**, 517–518.
- Dixon, D.C., Cutt, J.R. and Klessig, D.F.** (1991) Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *EMBO J.*, **10**, 1317–1324.
- Dumas, C., Rougier, M., Zandonella, P., Ciampolini, F., Cresti, M. and Pacini, E.** (1978). The secretory stigma in *Lycopersicon peruvianum* Mill. Ontogenesis and glandular activity. *Protoplasma*, **96**, 173-187.
- Edlund, A.F., Swanson, R., and Preuss, D.** (2004). Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell*, **16**, S84–S97.
- Foote, H.C.C., Ride, J.P., Franklin-Tong, V.E., Walker, E.A., Lawrence, M.J. and Franklin, F.C.H.** (1994) Cloning and expression of a novel self-incompatibility (S-) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 2265–2269.
- Franklin, F.C.H., Lawrence, M.J. and Franklin-Tong, V.E.** (1995) Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int. Rev. Cytol*, **158**, 1–64.

- Franklin-Tong, V. E.** (2002) Receptor-ligand interaction demonstrated in *Brassica* self-incompatibility. *Trends Genet.*, **18**,113–115.
- Franklin-Tong, V.E. and Franklin, F.C.** (2003) Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci.*, **8**, 598–605.
- Franklin-Tong, V.E., Hackett, G., and Hepler, P.K.** (1997). Ratioimaging of Ca²⁺ i in the self-incompatibility response in pollen tubes of *Papaver rhoeas*. *Plant J.*, **12**, 1375–1386.
- Franklin-Tong, V.E., Ride, J.P. and Franklin, F.C.H.** (1995). Recombinant stigmatic self-incompatibility (*S*-) protein elicits a Ca²⁺ transient in pollen of *Papaver rhoeas*. *Plant J.*, **8**, 299–307.
- Franklin-Tong, V.E., Thorlby, G.J., Lawrence, M.J. and Franklin, F.C.** (1992) Recognition signals and pollen responses in the incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. In: Angiosperm Pollen and Ovules: Basic an applied aspects, pp. 84–93, Mulcahy D.L., Bergamini-Mulcahy G, OttavianoE. (eds), Springer, New York.
- Frigerio, L., Jolliffe, N.A., Di Cola, A., Felipe, D.H., Paris, N., Neuhaus, J.M., Lord, J.M., Ceriotti, A., and Roberts, L.M.** (2001) The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting. *Plant Physiol.*, **126**, 167–175.
- Gamage, N., Matsuura, T., Norioka, N., Yoshimura, Y., Takasaki, T., Nakanishi, T. and Norioka, S.** (2000) Expression of a fusion protein of *Pyrus pyrifolia* S-RNase with glutathione-S-transferase in *E.coli*. *Biotechnol Lett.*, **22**, 1413–1417.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., and Moreno, M.** (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.*, **3**, 72–74.
- Gaude, T.; Rougier, M.; Heizmann, P. Ockendon, D.J. and Dumas, C.** (1995). Expression level of the SLG gene is not correlated with the self-incompatibility phenotype in the class II S haplotypes of *Brassica oleracea*. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 1003–1014.
- Gell, A., Bacic, A. and Clarke, A.E.** (1986) Arabinogalactan-proteins of the female sexual tissue of *Nicotiana glauca*. Changes during floral development and pollination. *Plant Physiol.* **82**, 885–889.
- Giovane, A. Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M.A. and Camardella, L.** (2004) Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim Biophys Acta*, **1696**, 245–252.
- Giovane, A., Balestrieri, C., Quagliuolo, L., Castaldo, D. and Servillo, L.** (1995) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit. Purification by affinity chromatography and evidence of a ripening-related precursor. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 926–929.
- Giranton, J.L, Dumas, C., Cock, J.M., Gaude, T.** (2000) The integral membrane *S*-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers *in planta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3759–3764.
- Gleeson, P.A. and Clarke, A.E.** (1979) Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein. *Biochem. J.*, **181**, 607–621.
- Goldman, M.H.S., Goldberg, R.B. and Mariani, C.** (1994) Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO J.*, **13**, 2976–2984.

- Goldman, M.H.S., Pezzotti, M. Seurinck, J. and Mariani, C.** (1992) Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like protein. *Plant Cell*, **4**, 1041–1051.
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C.B., Hancock, C.N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S. Phillips, T.E., Cruz-Garcia, F. and McClure, B.** (2006) Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, **439**, 805–810.
- Goring, D.R. and Rothstein, S.J.** (1992) The S-locus receptor kinase gene is a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine threonine kinase. *Plant Cell*, **4**, 1273–1281.
- Goring, D.R. and Walter, J.** (2004) Self-rejection- a new kinase connection. *Science*, **303**, 1474–1475.
- Goring, D.R., Gavin, T.L., Schafer, U. and Rothstein, S.J.** (1993) An S-receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1 bp deletion. *Plant Cell*, **5**, 531–539.
- Graaf, B.H.J. de, Knuiman, B. A., van der Weerden, G.M., Feron, R., Derksen, J. and Mariani, C.** (2004) The PELPIII glycoproteins in Solanaceae: stylar expression and transfer into pollen tube walls. *Sex Plant Reprod.*, **16**, 245–252.
- Graaf, B.H.J. de, Knuiman, B.A., Derksen, J. and Mariani, C.** (2003) Characterisation and localisation of the transmitting tissue specific PELPIII proteins of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.*, **54**, 55–63.
- Graaf, B.H.J. de.** (1999) Pistil proline-rich proteins in *Nicotiana tabacum*. Catholic University Nijmegen. Doctoral Thesis.
- Graaf, B.H.J. de., Rudd, J.J., Wheeler, M.J., Perry, R.M., Bell, E.M., Osman, K., Franklin, F.C.H. and Franklin-Tong, V.E.** (2006) Self-incompatibility in *Papaver* targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen. *Nature*, **444**, 490-493.
- Gray, J.E., McClure, B.A., Bönig, I., Anderson, M.A., and Clarke, A.E.** (1991) Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata* (S-RNase) on *in vitro*-grown pollen tubes. *Plant Cell*, **3**, 271–283.
- Green, P.J.** (1994) The ribonucleases of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **45**, 421–445.
- Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D.D., and Goring, D.R.** (1998) Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 382–387.
- Hancock, C.N., Kent, L. and McClure, B.** (2005) The 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.*, **43**, 716–723.
- Hannapel, D.J.** (1993) Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 22-kilodalton cathepsin D inhibitor protein of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiol.*, **101**, 703–704.
- Hearn, M.J, Franklin, F.C.H. and Ride, J.P.** (1996) Identification of membrane glycoprotein in pollen of *Papaver rhoeas* which binds stigmatic self-incompatibility (S-) proteins. *Plant J.*, **9**, 467–475.

- Heibges, A., Glaczinski, H., Ballvora, A., Salamini, F. and Gebhardt, C.** (2003) Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol. Genet. Genomics*, **269**, 526–534.
- Herrero, M. and Dickinson, H.G.** (1979) Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *J. Cell. Sci.*, **36**, 1–18.
- Herrero, M. and Dickinson, H.G.** (1980) Ultrastructural and physiological differences between buds and mature flowers of *Petunia hybrida* prior to the following pollinations. *Planta*, **148**, 138–145.
- Heslop-Harrison J. and Heslop-Harrison, Y.** (1980) The pollen-stigma interaction in the grasses. 1. Fine-structure and cytochemistry of the stigmas of *Hordeum* and *Secale*. *Acta Bot. Neerl.*, **29**, 261–276.
- Heslop-Harrison Y.** 1981. Stigma characteristics and angiosperm taxonomy. *Nord Bot J.*, **1**, 401–420.
- Heslop-Harrison, J.** (1987) Pollen germination and pollen tube growth. *Int Rev Cytol.*, **107**, 1–78.
- Heslop-Harrison, Y.** (2000) Control gates and micro-ecology: The pollen-stigma interaction in perspective. *Ann Bot.*, **85** (Supplement A), 5–13.
- Heslop-Harrison, Y. and Shivanna, K.R.** (1977) The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann Bot.*, **41**, 1233–1258.
- Hiscock S. J. Bown, D., Gurr, S.J. and Dickinson, H.G.** (2002) Serine esterases are required for pollen tube penetration of the stigma in Brassica. *Sex Plant Reprod.*, **15**, 65–74.
- Hiscock, S.J. and McInnis, A.M.** (2003) Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends Plant Sci.*, **8**, 606–613.
- Hiscock, S.J., and Dickinson, H.G.** (1993) Unilateral incompatibility within Brassicaceae: further evidence for the involvement of the self-incompatibility (S)-locus. *Theor. Appl. Genet.*, **86**, 744–753.
- Hiscock, S.J., Dewey, F.M., Coleman, J.O.D. and Dickinson, H.G.** (1994) Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta*, **193**, 377–384.
- Holwerda, B.C., Padgett, H.S., and Rogers, J.C.** (1992) Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *Plant Cell*, **4**, 307–318.
- Hou, W-C and Lin, Y-H.** (1998) Activity staining on polyacrylamide gels of trypsin inhibitors from leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) varieties. *Electrophoresis*, **19**, 212–214.
- Hua, Z.H., and 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**, 2531–2553.
- Hua, Z-H., Fields, A. and Kao, T-h.** (2008) Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Mol Plant*, **1**, 575–585.
- Huang, S., Blanchoin, L., Chaudhry F, Franklin-Tong VE, Staiger CJ** (2004) A Gelsolin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments. *J Biol Chem.*, **279**, 23364–23375.
- Huang, S., Lee, H.-S., Karunanandaa, B., and Kao, T.-h.** (1994). Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell*, **6**, 1021–1028.

- Iorger, T.R., Gohlke, J.R., Xu, B. and Kao, T-h.** (1991) Primary structural features of the self-incompatibility proteins in the Solanaceae. *Sex Plant Reprod.*, **4**, 81–87.
- Ishikawa, A., Ohta, S., Matsuoka, K., Hattori, T and Nakamura, K.** (1994) A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitors: structural comparisons and differential expression. *Plant Cell Physiol.*, **35**, 303–312.
- Iwano, M., Shiba, H., Funato, M., Shimosato, H., Takayama, S. and Isogai, A.** (2003) Immunohistochemical studies on translocation of pollen S-haplotype determinant in self-incompatibility of *Brassica rapa*. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 428–436.
- Johnson, M.A and Preuss, D.** (2003) On your mark, get set, grow! LePRK2-LAT52 interactions regulate pollen tube growth. *Trends Plant Sci.*, **8**, 97–99.
- Jordan N.D., Kakeda, K., Conner, A., Ride, J.P., Franklin-Tong, V.E. and Franklin, F.C.** (1999) S-protein mutants indicate a functional role for SBP in the self-incompatibility reaction of *Papaver rhoeas*. *Plant J.*, **20**, 119–25.
- Juárez-Díaz J. A., McClure, B., Vázquez-Santana, S., Guevara-García, A., León-Mejía, P., Márquez-Guzmán, J. and Cruz-García, F.** (2006) A novel thioredoxin *h* is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNases *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **281**, 3418–3424.
- Kachroo, A., Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E. and Nasrallah, J.B.** (2001) Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science*, **293**, 1824–1826.
- Kandasamy, M.K. and Kristen, U.** (1987) Developmental aspects of ultrastructure, histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana glauca*. *Ann. Bot.*, **60**, 427–437.
- Kao, T-h. and McCubbin, A.G.** (1996) How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 12059–12065.
- Kao, T-h. and Tsukamoto, T.** (2004) The molecular and genetic bases of SRNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*, **16**, 72–83.
- Kars, I., Krooshof, G.H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J.A. and van Kan, J.A.** (2005) Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J.*, **43**, 213–225.
- Kondo, K., Yamamoto, M., Itahashi, R., Sato, T., Egashira, H., Hattori, T. and Kowiyama, Y.** (2002a). Insights into the evolution of self-compatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors. *Plant J.*, **30**, 143–154.
- Kondo, K., Yamamoto, M., Matton, D.P., Sato, T., Hirai, M., Norioka, S., Hattori, T. and Kowiyama, Y.** (2002b) Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant J.*, **29**, 627–636.
- Kornberg, A.** (1962) On the Metabolic Significance of Phosphorolytic and Pyrophosphorolytic Reactions. Academic press, New York pp 251–264.
- Kuboyama, T.** (1998) A novel thaumatin-like protein gene of tobacco is specifically expressed in the transmitting tissue of stigma and style. *Sex. Plant Reprod.* **11**, 251–256.

- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M.** (2004) MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, **5**, 150–163.
- Kusaba, M. and Nishio, T.** (1999) Comparative analysis of *S* haplotypes with very similar SLG alleles in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Plant J.* **17**, 83–91.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F.** (1982) A simple method for displaying the hydrophathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105–132.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Lane, M.D., Lawrence, M.J.** (1993) The population genetics of the self-incompatibility polymorphism in *Papaver rhoeas*. *Heredity*, **71**, 596–602.
- Lewis, D. and Crowe, L.K.** (1958) Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity*, **12**, 233–256.
- Li, Y.Q., Mareck, A., Faleri, C., Moscatelli, A., Liu, Q. and Cresti, M.** (2002) Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, **214**, 734–740.
- Lind, J., Böning, I., Clarke, A. and Anderson, M.** (1996) A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana alata* *in vivo*. *Sex. Plant Reprod.*, **9**, 75–86.
- Lind, J.L., Bacic, A., Clarke, A.E. and Anderson, M.A.** (1994) A stylespecific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant J.*, **6**, 491–502.
- Liners, F. and Van Cutsem P.** (1992) Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells. An immunocytochemical study. *Protoplasma*, **170**,10–21.
- Liners, F., Gaspar, T., Van- Cutsem, P.** (1994) Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. *Planta*, **192**, 545–556.
- Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N. Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F. and Bellincampi, D.** (2007) Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.*, **143**, 1871–1880.
- Liscum, M.** (1999) PCR applications. Amplified Fragment Length Polymorfism: studies on plant development. Academic Press. p. 505–519.
- Lord, E.** (2000). Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends Plant Sci.*, **5**, 368–373.
- Lord, E.M. and Sanders, L.C.** (1992) Roles of the extracellular matrix in plant development and pollination: A special case of cell movement in plants. *Dev. Biol.* **153**, 16–28.
- Lu, Z., Szafron, D., Greiner, R., Lu, P., Wishart, D.S., Poulin, B., Anvik, J., Macdonell, C. and Eisner, R.** (2004) Predicting subcellular localization of proteins using machine-learned classifiers. *Bioinformatics*, **20**, 547–556.
- Luu, D.T., Qin, X., Morse, D. and Cappadocia, M.** (2000) S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, **407**, 649–651.

- Luu, D-T., Qin, X., Laublin, G., Yang, Q., Morse, D. and Cappadocia M.** (2001) Rejection of S heteroallelic pollen by a dual-specific S-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics*, **159**, 329–335
- MacKenzie, C.J., Bong, Y. Y. and Seabrook, J.E.A.** (1990) Stigma of *Solanum tuberosum* cv Shepody: morphology, ultrastructure and secretion. *Am. J. Bot.*, **77**, 1111–1124.
- Martin, F.W.** (1968) The system of self-incompatibility in *Ipomea*. *Genetics*, **60**, 101–109.
- Mather, K.** (1943) Specific differences in *Petunia*. *I. J. Genet* **45**, 215–235.
- Matsuoka, K.** (2000) C-terminal propeptides and vacuolar sorting by BP-80-type proteins: not all C-terminal propeptides are equal. *Plant Cell*, **12**, 181–182.
- Matsuoka, K. and Nakamura, K.** (1999) Large alkyl side chains of isoleucine and leucine in the NPIRL region constitute the core of the vacuolar sorting determinant of sporamin precursor. *Plant Mol. Biol.*, **41**, 825–835.
- Matsuoka, K. and Nakamura, K.** (1999) Large alkyl side chains of isoleucine and leucine in the NPIRL region constitute the core of the vacuolar sorting determinant of sporamin precursor. *Plant Mol. Biol.*, **41**, 825–835.
- Mattei, B., Raiola, A., Caprari, C., Federici, L., Bellincampi, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Giovane, A., and Camardella, L.** 2002. Studies on plant inhibitors of pectin modifying enzymes: polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) and pectin methylesterase inhibitor (PMEI), in: T.T. Teeri, B. Svensson, H.J. Gilbert, T. Feizi (Eds.), *Carbohydrate Bioengineering Interdisciplinary Approaches*, The Royal Society of Chemistry MPG Books, Bodmin, Cornwall, UK. pp. 160–167.
- Matton, D.P., Luu, D.T., Xike, Q., Laublin, G., O'Brien, M., Maes, O., Morse, D. and Cappadocia, M.** (1999) Production of an S RNase with dual specificity suggests a novel hypothesis for the generation of new S alleles. *Plant Cell*, **11**, 2087–2097.
- Matton, D.P., Nass, N., Clarke, A.E. and Newbigin, E.** (1994) Self-incompatibility: how plants avoid illegitimate offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1992–1997.
- Marty, P., Jouan, B., Bertheau, Y., Vian, B. and Goldberg, R.** (1997) Charge density in stem cell walls of *Solanum tuberosum* genotypes and susceptibility to blackleg. *Phytochemistry*, **44**, 1435–1441.
- McClure, B.** (2006). New views of S-RNase-based self-incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 639–646.
- McClure, B. and Franklin-Tong, V.** (2006) Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanism involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta*, **224**, 233–45.
- McClure, B.A, Mou, B., Canevascini, S. and Bernatzky, R.** (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 13548–13553.
- McClure, B.A.** (2004) *S-RNase* and *SLF* determine *S*-haplotype-specific pollen recognition and rejection. *Plant Cell*, **16**, 2840–2847.
- McClure, B.A., Cruz-García, F., Beecher, B. and Sulaman, W.** (2000) Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann Bot*, **85**, 113–123.

- McClure, B.A., Du, H., Lui, Y. H., and Clarke, A.E.** (1993) S-locus products in *Nicotiana alata* pistils are subject to organ-specific post-transcriptional processing but not post-translational processing. *Plant Mol. Biol.*, **22**, 177–187.
- McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A. and Clarke, A.E.** (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, **347**, 757–760.
- McClure, B.A., Haring, V., Ebert, P.R. Anderson, M.A. Simpson, R.J. Sakiyama, F., and Clarke, A. E.** (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonuclease. *Nature*, **342**, 955–957.
- McCubbin, A.G. and Kao, T.H.** (1996) Molecular mechanisms of self-incompatibility. *Curr. Op. Biotechnol.* **7**, 150–154.
- McCubbin, A.G. and Kao, T.H.** (2000) Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 333–364.
- McMillan, G.P., Hedley, D., Fyle, L. and Perombelon, M.C.M.** (1993) Potato resistance to soft-rot erwinias is related to cell wall pectin esterification. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **42**, 279–289.
- Miller, E.A., Lee, M.C.S. and Anderson, M.A.** (1999) Identification and characterization of a prevacuolar compartment in stigmas of *Nicotiana alata*. *Plant Cell*, **11**, 1499–1508.
- Miller, E.A., Lee, M.C.S., Atkinson, A.H.O. and Anderson, M.A.** (2000) Identification of a novel four-domain member of the proteinase inhibitor II family from the stigmas of *Nicotiana alata*. *Plant Mol. Biol.* **42**, 329–333.
- Murfett, J., Strabala, T.J., Zurek, D.M., Mou, B., Beecher, B. and 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. *Plant Cell*, **8**, 943–958.
- Murfett, J.M., Atherton, T.L., Mou, B., Gasser, C.S. and McClure, B.A.** (1994) S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S allele-specific pollen rejection. *Nature*, **367**, 563–566.
- Muschietti, J., Dircks, L., Vancanneyt, G. and McCormick, S.** (1994) LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant J.*, **6**, 321–338.
- Myers, E. and Miller, W.** (1988) Optimal Alignments in Linear Space. *CABIOS*, **4**, 11–17.
- Nari, J., Noat, G., Diamantidis, G., Woudstra, M. and Ricard, J.** (1986) Electrostatic effects and the dynamics of the enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methylesterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur. J. Biochem.*, **155**, 199–202.
- Nasrallah, J.B.** (1997) Signal perception and response in the interactions of self-incompatibility in *Brassica*. *Essays Biochem.*, **32**, 143–160.
- Nasrallah, J.B.** (2002) Recognition and rejection of self in plant reproduction. *Science*, **296**, 305–308.
- Nasrallah, J.B. and Nasrallah, M.E.** (1993) Pollen-Stigma Signaling in the Sporophytic Self-Incompatibility Response. *Plant Cell*, **5**, 1325–1335.

- Newbiggin, E., Anderson, M.A. and Clarke, A.E.** (1993) Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell*, **5**, 1315–1324.
- Nielsen, H. and Krogh, A.** (1998) Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6)*. Menlo Park, CA: AAAI Press, pp. 122–130.
- Nieuwland, J., Feron, R., Huisman, B.A.H., Fasolino, A., Hilbers, C.W., Derksen, J. and Mariani, C.** (2005) Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *Plant Cell*, **17**, 2009–2019.
- Nou, I.S., Watanabe, M., Isogai, A. and Hinata, K.** (1993) Comparison of *S*-alleles and *S*-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex. Plant Reprod.*, **6**, 79–86.
- Ockendon, D.J.** (2000) The *S*-allele collection of *Brassica oleracea*. *Acta Hort.*, **539**, 25–30.
- Park, K.S., Cheong, J.J., Lee, S.J., Suh, M.C. and Choi, D.** (2000b) A novel proteinase inhibitor gene transiently induced by tobacco mosaic virus infection. *Biochim. Biophys. Acta*, **1492**, 509–512.
- Park, S.Y., Jauh, G-Y., Mollet, J-C., Eckard, K.J., Nothnagel, E.A., Walling, L.L. and Lord, E. M.** (2000a) A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *Plant Cell*, **12**, 151–163.
- Park, S-Y. and Lord, E.M.** (2003) Expression studies of SCA in lily and confirmation of its role in pollen tube adhesion. *Plant Mol. Biol.* **51**, 183–189.
- Pezzotti, M., Feron, R., and Mariani, C.** (2002). Pollination modulates expression of the PPAL gene, a pistil-specific beta-expansin. *Plant Mol. Biol.*, **49**, 187–197.
- Pierson, E.S., de Graaf, B.H.J. and Derksen, J.** (1999) Immunofluorescence localization of glycoproteins using tissue printing: detection of pistil extensin-like proteins in tobacco. *Biotechniques*, **26**, 450–453
- Qiao, H., Wang, H., Zhao, L., Zhou, J., Huang, J., Zhang, Y., and Xue, Y.** (2004). The F-box protein Ah SLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell*, **16**, 582–595.
- Raghavan, V.** 1997. *Molecular Embryology of Flowering Plants*. Cambridge, Cambridge University Press. pp 690.
- Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Mattei, B., De Lorenzo, G., Cervone, F. and Bellincampi, D.** (2004) Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Lett.*, **557**, 199–203.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R. and Barrett, A.J.** (2006) *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 270–272.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. and Barrett, A.J.** (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.*, **378**, 705–716.

- Rudd, J. J., Franklin, F. C. H., Lord, J. M. & Franklin-Tong, V. E.** (1996) Increased phosphorylation of a 26-kD pollen protein is induced by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell*, **8**, 713–724.
- Rudd, J.J. and Franklin-Tong, V.E.** (2003) Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *J. Exp. Bot.* **54**, 141–48.
- Rudd, J.J., Osman, K., Franklin, F.C.H. and Franklin-Tong, V.E.** (2003) Activation of a putative MAP kinase in pollen is stimulated by the self-incompatibility (SI) response. *FEBS Lett.*, **547**, 223–227.
- Saalbach, C., Rosso, M. and Schumann, U.** (1996) The vacuolar targeting signal of the 2s albumin from Brazil nut resides at the C terminus and involves the C-Terminal propeptide as an essential element. *Plant Physiol.*, **112**, 975–985.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406–425.
- Sanchez, A.M., Bosch, M., Bots, M., Nieuwland, J., Feron, R., and Mariani, C.** (2004). Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell*, **16**, S98–S106.
- Sassa, H., Nishio, T., Kowyama, Y., Hirano, H., Koba, T. and Ikehashi, H.** (1996) Self-incompatibility (*S*) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/*S*-ribonuclease superfamily. *Mol Gen Genet.*, **250**, 547–557.
- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E. and Nasrallah, J.B.** (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, **286**, 1697–1700.
- Sedgley, M. and Clarke, A.E.** (1986) Immunogold localization of arabinogalactan protein in the developing style of *Nicotiana glauca*. *Nord Bot J.*, **6**, 591–598.
- Shiba H, Takayama S, Iwano M, Shimosato H, Funato M, Nakagawa, T., Che, F-S., Suzuki, G., Watanabe, M. and Isogai, A.** (2001) A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen *S*-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiol.*, **125**, 2095–2103.
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A.L., Wang, Y., Dowd, P.E., McCubbin, A.G., Huang, S. and Kao, T-H.** (2004) Identification of the pollen determinant of *S*-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, **429**, 302–305.
- Silva, N.F. and Goring, D.R.** (2001) Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 1988–2007.
- Sommer-Knudsen, J., Clarke, A.E. and Bacic, A.** (1996) A galactose-rich, cell wall glycoprotein from styles of *Nicotiana glauca*. *Plant J.*, **9**, 71–83.
- Sommer-Knudsen, J., Clarke, A.E. and Bacic, A.** 1997. Proline- and hroxiproline-rich gene products in the sexual tissues of flowers. *Sex. Plant Reprod.*, **10**, 253–260.
- Stein, J.C., Howlett, B., Boyes, D.C., Nasrallah, M.E., and Nasrallah, J.B.** (1991) Molecular cloning of a putative receptor kinase gene encoded by the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 8816–8820.

- Stepka, M., Ciampolini, F., Charzynaska, M and Cresti, M.** (2000) Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L. Does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube? *Planta*, **210**, 630–635.
- Stone, S.L., Anderson, E.M., Mullen, R.T. and Goring, D.R.** (2003) ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell*, **15**, 885–898.
- Stone, S.L., Arnoldo, M. and Goring, D.R.** (1999) A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science*, **286**, 1729–1731.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A. and Hinata, K.** (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*, **403**, 913–16
- Takayama, S. and Isogai, A.** (2005) Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **56**, 467–489.
- Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M. and Che, F-S.** (2001) Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, **413**, 534–538.
- Tang, W. Ezcurra, I., Muschietti, J. and McCormick, S.** (2002) A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2. *Plant Cell*, **14** 2277–2287.
- Thomas, S.G. and Franklin-Tong, V.E.** (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature* **429**, 305–309.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J. Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G.** (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4876–4882.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680.
- Thompson, R.D. and Kirch, H-H.** (1992). The S-locus of flowering plants: when self-rejection is self interest. *Trends Genet.*, **8**, 383–387.
- Tsukamoto, T., Ando, T., Takahashi, K., Omori, T., Watanabe, H., Kokubun, H., Marchesi, E. and Kao, T-H.** (2003) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiol.*, **131**, 1903-1912.
- Tsukamoto, T., Ando, T., Kokubun, H., Watanabe, H., Masada, M., Zhu, X., Marchesi, E. and Kao, T-H.** (1999) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaries* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. *Sex. Plant Reprod.*, **12**, 6–13.
- Twell, D., Wing, R., Yamaguchi, J. and McCormick, S.** (1989) Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol. Gen. Genet.*, **217**, 240–245.

- Ushijima, K., Yamame, H., Watari, A., Kakehi, E., Ikeda, K., Hauck, N.R., Lezzoni, A.F. and Tao, R.** (2004) The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.*, **39**, 573–586.
- Vanoosthuysse, V., Tichtinsky, G., Dumas, C., Gaude, T. and Cock, J.M.** (2003) Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea S* locus receptor kinase. *Plant Physiol.*, **133**, 919–929.
- Vera, P., Hernandez-Yago, J. and Conejero, V.** (1989) Immunogold localization of the citrus exocortis viroid-induced pathogenesis-related proteinase P69 in tomato leaves. *Plant Physiol.*, **91**, 119–123.
- Verhoeven, T., Feron, F., Wolters-Arts, M., Edqvist, J., Gerats, T., Derksen, and Mariani, C.** (2005) STIG1 controls exudate secretion in the pistil of *Petunia* and tobacco. *Plant Physiol.*, **138**, 153–160.
- Von Heijne, G.** (1986) Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J. Mol. Biol.*, **189**, 239–242.
- Watanabe, M., Suzuki, G., Takayama, S., Isogai, A. and Hinata, K.** (2000) Genomic organization of the SLG/SRK region of the *S* locus in *Brassica* species. *Ann. Bot.*, **85**, 155–160.
- Watanabe, M., Takayama, S., Isogai, A. and Hinata, K.** (2003) Recent progress on self-incompatibility research in *Brassica* species. *Breed. Sci.*, **53**, 199–208.
- Werner, R., Guitton, M.C. and Muhlbach, H.P.** (1993) Nucleotide sequence of a cathepsin D inhibitor protein from tomato. *Plant Physiol.*, **103**, 1473.
- Wesley, V.S., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbot, D., Stoutjedijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. and Waterhouse, P.M.** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.*, **27**, 581–590.
- Wolf, S., Grsic-Rausch, S., Rausch, T. and Greiner, S.** (2003) Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.*, **555**, 551–555.
- Wolters-Arts, M., Lush, W.M., and Mariani, C.** (1998). Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature*, **392**, 818–821.
- Woodward, J., Basic, A., Jahnen, W. and Clarke, A.** (1989) N-linked glycan chains on S-allele-associated glycoproteins from *Nicotiana glauca*. *Plant Cell*, **1**, 511–514.
- Wu, H-M., Wang, H. and Cheung, A.Y.** (1995) A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell*, **83**, 395–403.
- Wu, H-M., Wong, E., Ogdahl, J., and Cheung, A.Y.** (2000) A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant J.*, **22**, 165–176.
- Xie, D., Li, A., Wang, M., Fan, Z. and Feng, H.** (2005) LOCSVMPSI: a web server for subcellular localization of eukaryotic proteins using SVM and profile of PSI-BLAST. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 105–110.

- Xue, Y., Carpenter, R., Dickinson, H.G. and Coen, E.S.** (1996) Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus RNases. *Plant Cell*, **8**, 805–814.
- Yamagishi, K., Mitsumori, C. and Kikuta, Y.** (1991) Nucleotide sequence of a cDNA encoding the putative trypsin inhibitor in potato tuber. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 287–288.
- Zavala, J.A., Patankar, A.G., Gase, K., Hui, D. and Baldwin, I.T.** (2004) Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuate* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiol.*, **134**, 1181–1190.
- Zhang, G.F. and Staehelin, L.A.** (1992) Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. *Plant Physiol.*, **99**, 1070–1083.

Apéndices

Apéndice I

Tabla 1. Preparación del medio de cultivo LB.

Reactivo	LB líquido	LB sólido
Extracto de levadura	5.0 g	5.0 g
Peptona/Triptona/Caseína hidrolizada ¹	10 g	10.0 g
NaCl	5 g	5 g
H ₂ O	X ml	X ml
Agar	-	15 g
TOTAL *	1000 ml	1000 ml

* Autoclavear el medio por 20 min a 1.2 kg/cm²

¹ Cualquiera de estos reactivos puede ser usado como fuente de nitrógeno

Tabla 2. Preparación de los antibióticos.

Antibióticos*	Solución stock	Concentración de trabajo	Disolvente
Carbencilina	100 mg/ml	100 mg/l	H ₂ O
Ampicilina	100 mg/ml	100-300 mg/l	H ₂ O
Espectinomicina	100 mg/ml	100 mg/l	H ₂ O
Cloranfenicol	50 mg/ml	25 mg/l	Etanol
Kanamicina	100 mg/ml	90 mg/l	H ₂ O

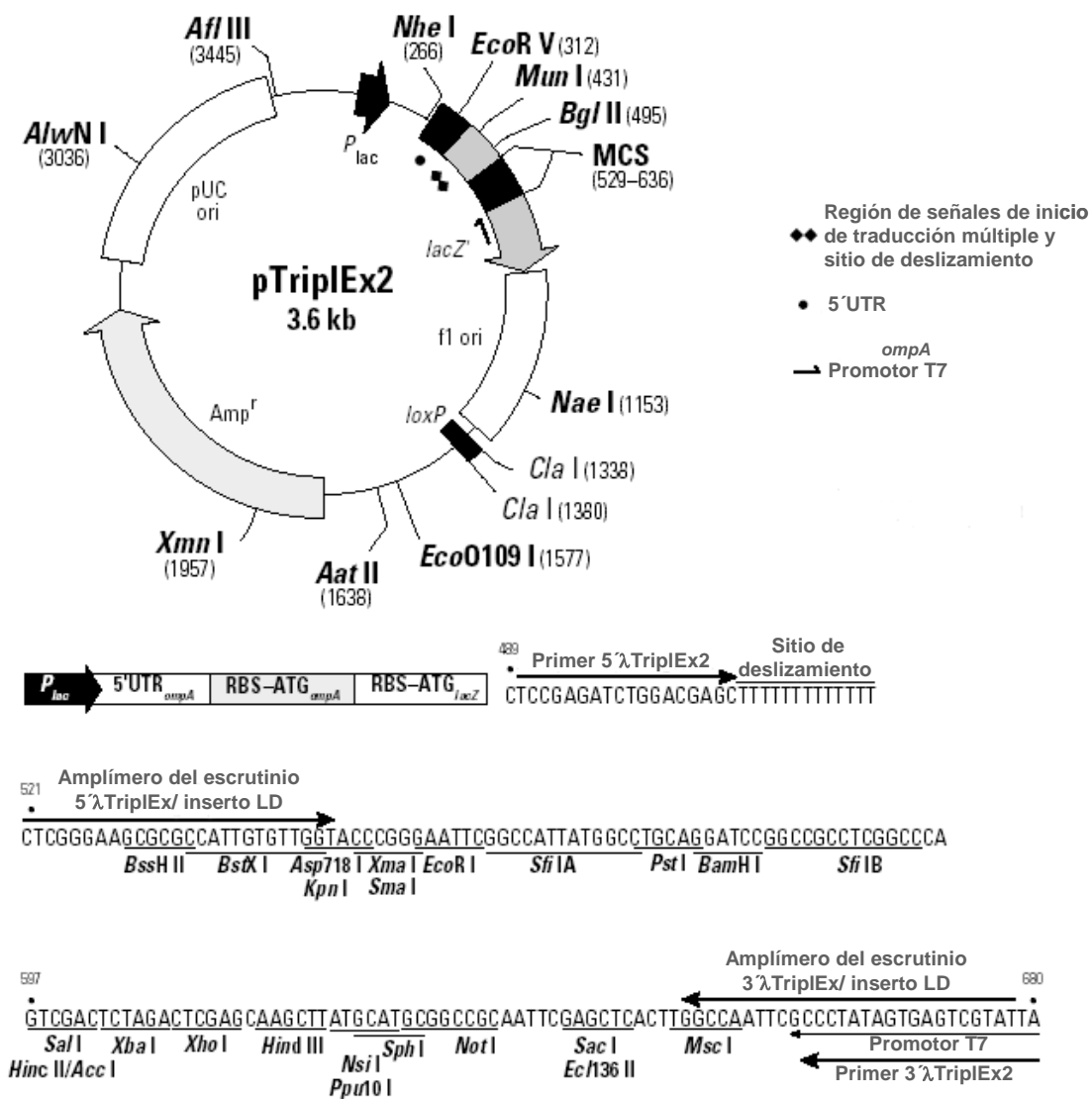
* Una vez preparados, los antibióticos son esterilizados por filtración (0.22 µm) y adicionados a los medios de cultivo a temperaturas por debajo de los 45 °C.

Tabla 3. Preparación de los suplementos de los medios de cultivo.

Suplemento	Concentración de trabajo	Disolvente
XGAL	80 µg/ml	N-N dimetil formamida
IPTG	0.5 mM	H ₂ O

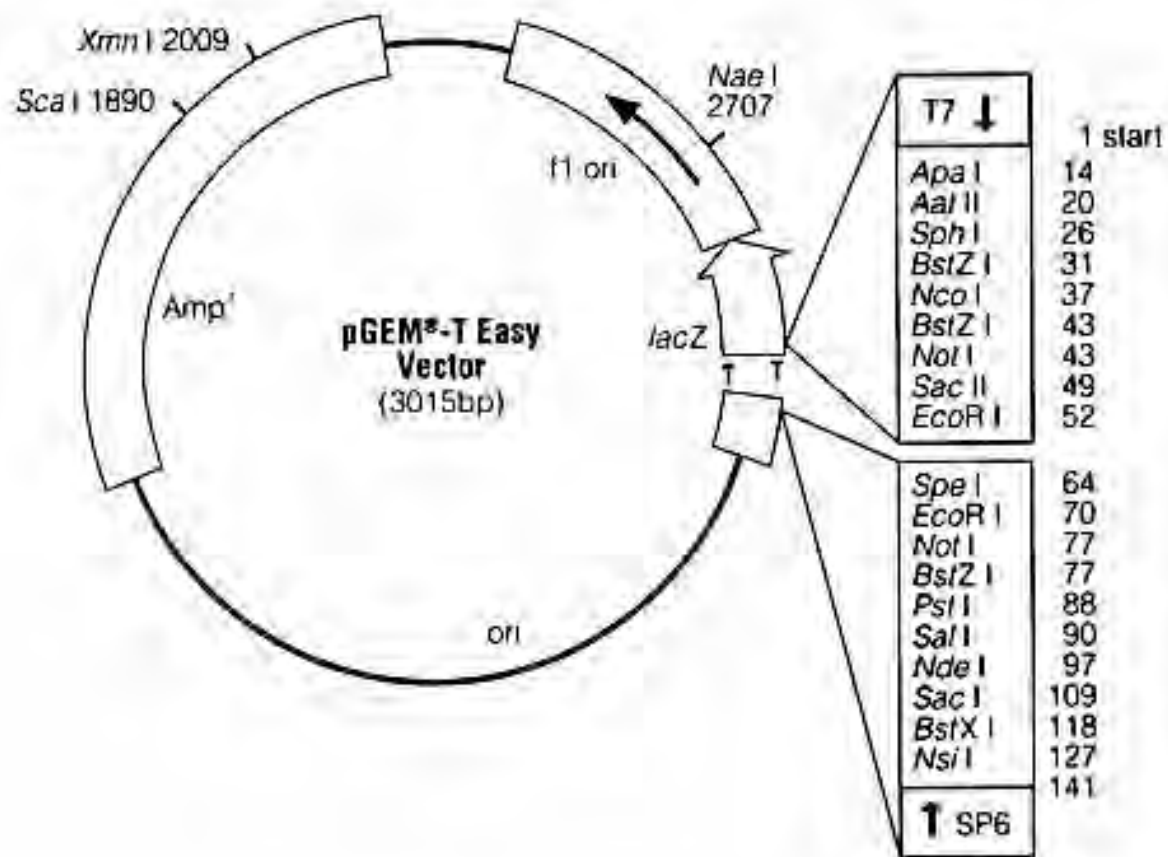
Apéndice II

Mapa de restricción y sitio múltiple de clonación (MCS) del pTriplEx2.



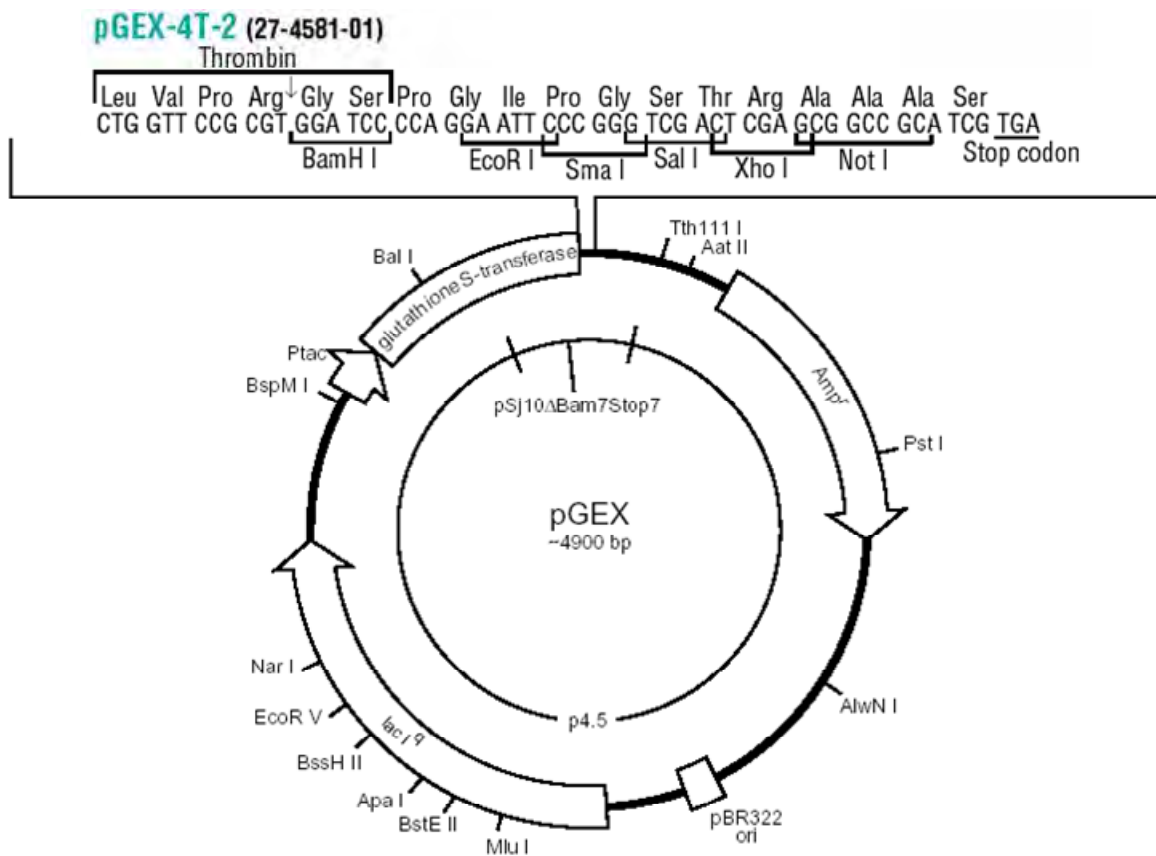
Apéndice III

Mapa de restricción y sitio múltiple de clonación del pGEM-T Easy.



Apéndice IV

Mapa de restricción y sitio múltiple de clonación del pGEX-4T-2.



Apéndice V

Tabla 1. Preparación de geles de poliacrilamida (8.0 cm X 10 cm X 1.5 cm). Gel separador.

Reactivo	7 %	10 %	12 %	15 %
H ₂ O	5.1 ml	4.1 ml	3.4 ml	2.4 ml
Buffer separador	2.505 ml	2.505 ml	2.505 ml	2.505 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30 %/0.8 %)	2.3 ml	3.3 ml	5 ml	5 ml
Persulfato de amonio (10 %)	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
TEMED	0.005 ml	0.005 ml	0.005 ml	0.001 ml
Total	10.005 ml	10.005 ml	10.005 ml	10.005 ml

Tabla 2. Preparación de geles de poliacrilamida (8.0 cm X 10 cm X 1.5 cm). Gel concentrador.

Reactivo	4 %
H ₂ O	3.075 ml
Buffer concentrador (25 X)	1.275 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30 %/0.8 %)	0.670 ml
Persulfato de amonio (10 %)	0.025 ml
TEMED	0.005 ml
Total	5.050 ml

Tabla 3. Preparación de geles de poliacrilamida (8.0 cm X 10 cm X 1.5 cm). Composición de buffers separador y concentrador.

Buffer separador (25 X) pH 8.8 (HCl)	Buffer concentrador (25 X) pH 6.8 (HCl)
Tris base 1.5 M	Tris base 0.5 M
SDS 0.4 %	SDS 0.4 %

Apéndice VI

Tabla 1. Solución de quimioluminiscencia para la detección de señales.

Reactivo	Agregar
100 mM Tris-HCl pH 8.5	10.0 ml
2 % H ₂ O ₂	0.017 ml
Solución A	0.025 ml
Solución B	0.05 ml
TEMED	0.005 ml
Total	10.005 ml

Tabla 2. Soluciones stock de quimioluminiscencia.

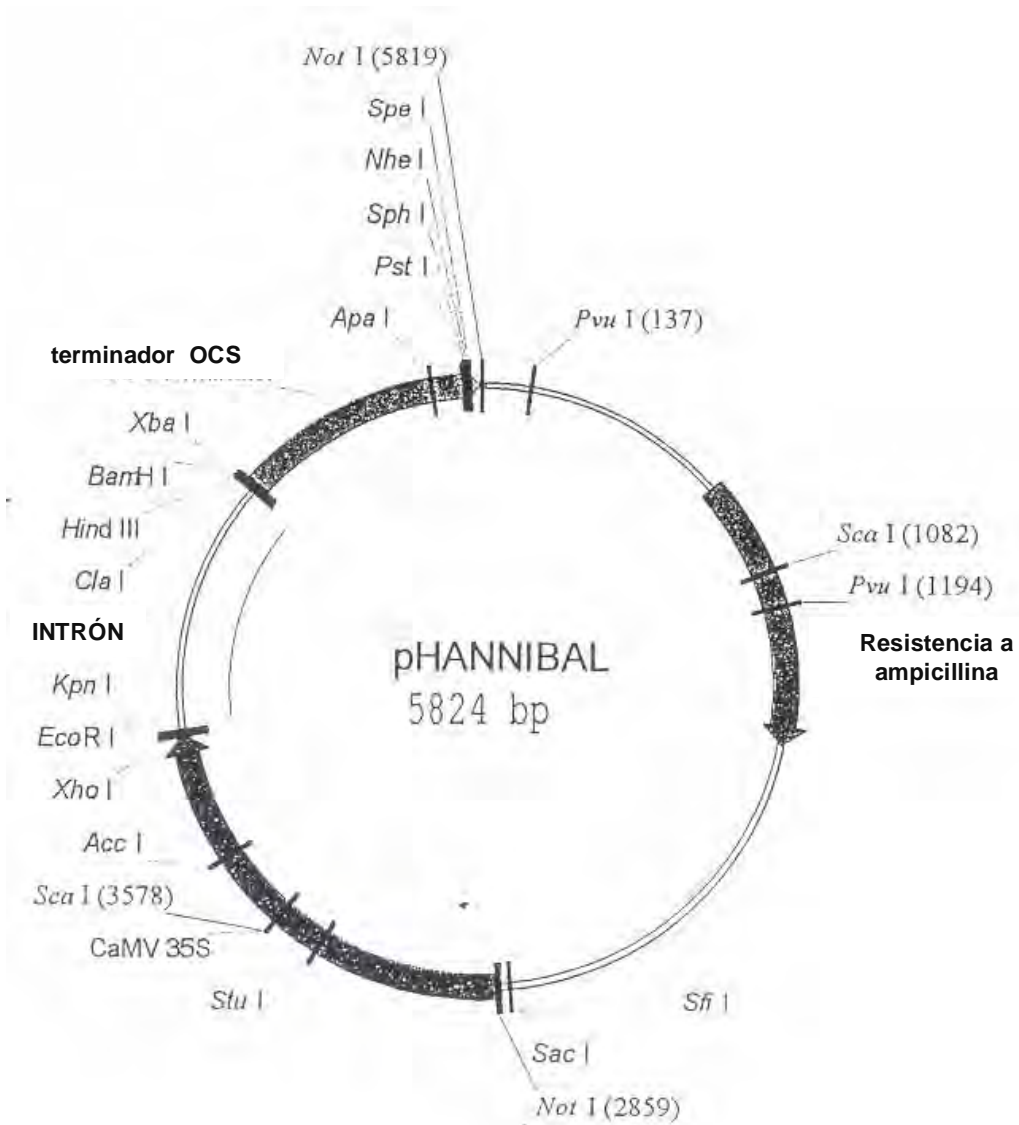
Solución A (25 ml)	Solución B (25 ml)
0.35 g p-ácido cumárico (ácido 4-hidroxicinámico)	1.1 g luminol (5-amino 2,3-dihidroxi 1,4-pnthalazinedione)
Disolver en DMSO	Disolver en DMSO

Tabla 3. Soluciones stock de los sustratos de la fosfatasa alcalina.

Sustratos	Disolvente
NBT (33 mg/ml)	70 % DMSO
BCIP (17 mg/ml)	100 % DMSO

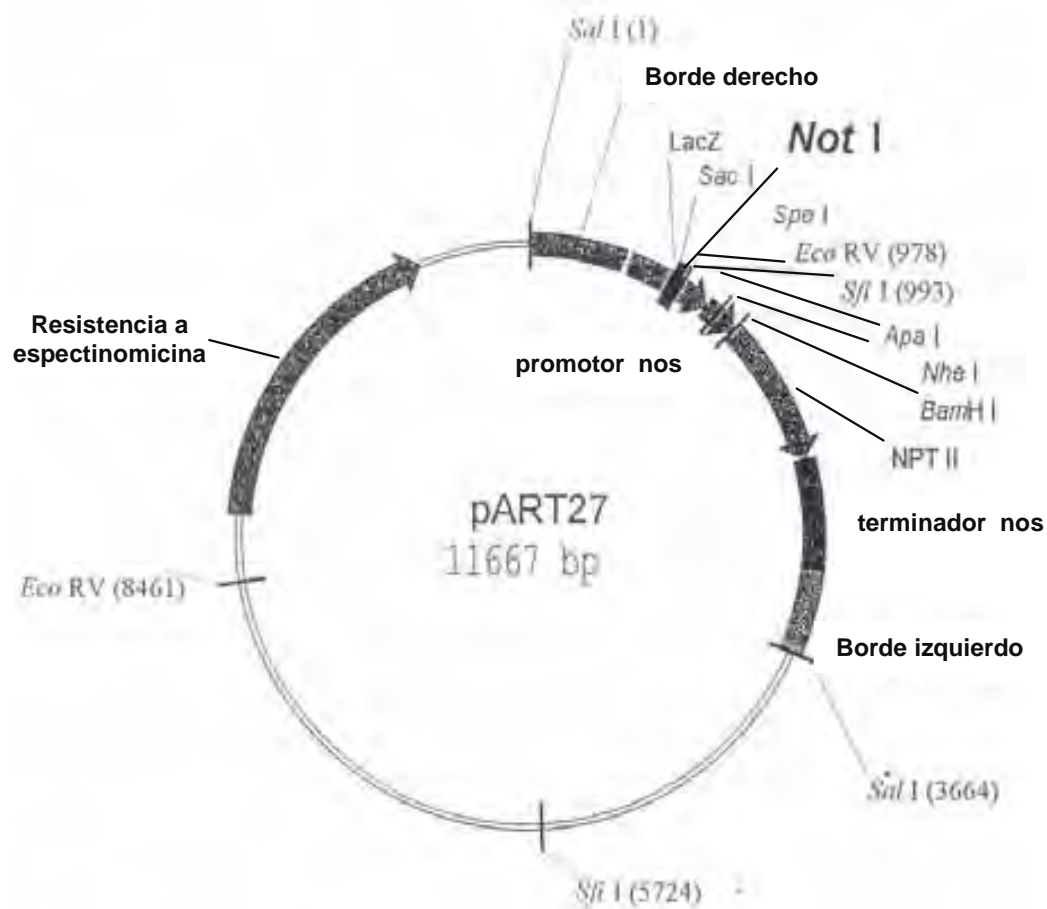
Apéndice VII

Mapa de restricción y sitio múltiple de clonación del pHANNIBAL.



Apéndice VIII

Mapa de restricción y sitio múltiple de clonación del pART27



Publicación

RESEARCH PAPER

Pollination in *Nicotiana alata* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue

Grethel Yanet Busot¹, Bruce McClure², Claudia Patricia Ibarra-Sánchez^{1,*}, Karina Jiménez-Durán^{1,*}, Sonia Vázquez-Santana³ and Felipe Cruz-García^{1,†}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

² Division of Biochemistry, 105 Life Sciences Center, 1201 E. Rollins, Columbia, MO 65211, USA

³ Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

Received 26 March 2008; Revised 29 May 2008; Accepted 3 June 2008

Abstract

After landing on a wet stigma, pollen grains hydrate and germination generally occurs. However, there is no certainty of the pollen tube growth through the style to reach the ovary. The pistil is a gatekeeper that evolved in many species to recognize and reject the self-pollen, avoiding endogamy and encouraging cross-pollination. However, recognition is a complex process, and specific factors are needed. Here the isolation and characterization of a stigma-specific protein from *N. alata*, NaStEP (*N. alata* Stigma Expressed Protein), that is homologous to Kunitz-type proteinase inhibitors, are reported. Activity gel assays showed that NaStEP is not a functional serine proteinase inhibitor. Immunohistochemical and protein blot analyses revealed that NaStEP is detectable in stigmas of self-incompatible (SI) species *N. alata*, *N. forgetiana*, and *N. bonariensis*, but not in self-compatible (SC) species *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *N. benthamiana*, *N. longiflora*, and *N. glauca*. NaStEP contains the vacuolar targeting sequence NPVIL, and immunocytochemistry experiments showed vacuolar localization in unpollinated stigmas. After self-pollination or pollination with pollen from the SC species *N. tabacum* or *N. plumbaginifolia*, NaStEP was also found in the stig-

matic exudate. The synthesis and presence in the stigmatic exudate of this protein was strongly induced in *N. alata* following incompatible pollination with *N. tabacum* pollen. The transfer of NaStEP to the stigmatic exudate was accompanied by perforation of the stigmatic cell wall, which appeared to release the vacuolar contents to the apoplastic space. The increase in NaStEP synthesis after pollination and its presence in the stigmatic exudates suggest that this protein may play a role in the early pollen–stigma interactions that regulate pollen tube growth in *Nicotiana*.

Key words: Kunitz proteinase inhibitor homologue, *Nicotiana*, pollen–pistil interactions, pollination.

Introduction

Once a pollen grain lands on the stigma, several recognition cascades are activated in the pistil. Although many types of pollen may land on the stigmatic surface, usually only pollen of the same or closely related species will be accepted. Compatible pollen grains germinate on the stigma surface, and the emerging pollen tubes grow through the extracellular matrix (ECM) of the transmitting

* These authors contributed equally to this work

† To whom correspondence should be addressed. E-mail: fcg@servidor.unam.mx

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; ECM, extracellular matrix; DTT, dithiothreitol; ER, endoplasmic reticulum; GST, glutathione S-transferase; hap, hours after pollination; IEF, isoelectric focusing; 120K, 120 kDa glycoprotein; Na-PI, *N. alata* serine proteinase inhibitor; NaSoEP, *N. alata* sexual organs expressed protein; NaStEP, *N. alata* stigma expressed protein; NTPP, N-terminal propeptide; PBS, phosphate-buffered saline; PPAL, pistil pollen allergen-like; SC, self-compatible; SI, self-incompatible/self-incompatibility; SsVSS, sequence-specific vacuolar sorting signal; STIG1, stigma-specific protein.

tissue of the style toward the ovary. The ECM is rich in lipids, carbohydrates, amino acids, glycoproteins, and polysaccharides (Clarke *et al.*, 1979; Gleeson and Clarke, 1979; Herrero and Dickinson, 1979; Gell *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1995; Cheung *et al.*, 1995). The role of the pistil is multifunctional. It is thought to provide factors that act as directional cues, as well as providing physical and nutritional support for pollen tube growth. The pistil also produces factors required for recognition and rejection of incompatible pollen (Lord and Sanders, 1992). In general, all the pistil side factors involved in pollen–pistil interactions need to be secreted to the ECM. Arabinogalactan proteins (AGPs) involved in pollen tube growth, such as pistil extensin-like protein III (PELPIII) and transmitting tract-specific glycoprotein (TTS), comprise an abundant component of the pistil ECM (Goldman *et al.*, 1992; Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 1997; Graaf *et al.*, 2004; Cruz-García *et al.*, 2005). The S-RNases required in self-incompatibility (SI), one of the best characterized pollen–pistil interactions (Kao and Tsukamoto, 2004; Takayama and Isogai, 2005), are major protein components of this matrix as well. In *Nicotiana*, besides S-RNases, the other stylar proteins required for the biochemical pathway of pollen rejection in Solanaceae, such as HT-B (McClure *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2002) and the 120 kDa glycoprotein (120K) (Hancock *et al.*, 2005; Goldraij *et al.*, 2006), are also secreted to the ECM.

In addition to those proteins present in the ECM, several proteins that may have implications in pollen–pistil interactions have been identified in stigmatic exudates. In fact, in wet-type stigma species (i.e. *Nicotiana* sp.), stigma germination and pollen tube growth depend on exudate components produced by stigmatic cells. Several of these identified proteins have homology to various classes of proteins but do not possess the implied activity. For example, pistil pollen allergen-like (PPAL) and lipid transfer protein (LTP) are two proteins present in the stigmatic exudate of *N. tabacum* (Nieuwland *et al.*, 2005). Although PPAL has homology to β -expansins suggesting it may be involved in cell wall loosening (Pezzotti *et al.*, 2002), no cell wall-loosening activity has been demonstrated. Instead, LTP, a cysteine-rich protein, has cell wall-loosening activity even though it shares no homology to β -expansins (Nieuwland *et al.*, 2005). Proteins related to pathogen resistance proteins such as thaumatin-like proteins, β -1-3 glucanases, and chitinases have also been identified in stigmatic exudates, but their expression characteristics suggest that they may have a role in plant sexual reproduction as well as plant defence (Leung, 1992; Kuboyama *et al.*, 1997; Kuboyama, 1998). In particular, proteinase inhibitors, known to have a role in plant defence, have been identified in stigma exudates. The processing of the *N. alata* serine proteinase inhibitors (Na-PI II and Na-PI IV) from precursor protein to mature

peptide is correlated with floral development, suggesting an alternative role (Atkinson *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2000).

How and if some of these proteins in both the stigmatic exudates and the ECM contribute to either pollen tube growth, pollen tube recognition by the pistil (implying acceptance or rejection of pollen tubes), or both is still not clear. While attempting to identify genes that could be involved in pollen–pistil interactions, NaStEP (*N. alata* Sigma Expressed Protein), a Kunitz proteinase inhibitor homologue specifically expressed in *N. alata* stigmas, was isolated. Activity gel assays show that NaStEP is not a serine proteinase inhibitor, implying minimal involvement in plant defense. Protein blot and immunohistochemical analysis showed that NaStEP has a restricted localization defense in mature stigmas of SI *Nicotiana* and is deposited into the stigmatic cell vacuoles. When *N. alata* stigmas were pollinated with *N. alata* or *N. tabacum* pollen, NaStEP synthesis was stimulated and released onto the stigma exudate by a novel mechanism involving cell rupture. Taken together, the results suggest that NaStEP may play a role in the early pollen–stigma interactions that regulate pollen tube growth in *Nicotiana*.

Materials and methods

Plant material

Nicotiana alata (*S*₁₀₅*S*₁₀₅, *S*_{C10}*S*_{C10}, and *S*_{A2}*S*_{A2} genotypes), *N. glauca*, and *N. tabacum* cv Praecox have been previously described (Murfett *et al.*, 1994, 1996; Beecher and McClure, 2001). *Nicotiana plumbaginifolia* (inventory number TW107, accession 43B), *N. longiflora* (inventory number TW79, accession 30A), *N. forgetiana* (inventory number TW50, 21A), and *N. bonariensis* (inventory number TW28, accession 11) were obtained from the US Tobacco Germplasm Collection (Crops Research Laboratory, USDA-ARS, Oxford, NC, USA). *Nicotiana benthamiana* has been previously described (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). *Nicotiana alata* cv Breakthrough was obtained from Thompson and Morgan, Jackson, NJ, USA. *Nicotiana alata* (*S*_{C10}*S*₁₀₅, and *S*_{A2}*S*₁₀₅ genotypes) have been previously described (Goldraij *et al.*, 2006). All plant material was grown under greenhouse conditions.

cDNA library construction and screening

A cDNA library was constructed with the SMART cDNA library construction kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) using a poly(A)⁺ RNA from SI *N. alata* pistils and cloned in λ Triplex2™ according to the manufacturer's instructions. S-RNase, HT-B, and 120K cDNA probes were used to identify and discard some previously identified sequences implicated in SI. A total of ~31 000 colonies were screened. RNA corresponding to some of the clones was determined to be strongly expressed in mature SI *N. alata* pistils and undetectable in mature SC *N. plumbaginifolia* pistils. Partial sequencing and RNA blot analyses were used to identify nine pistil-specific sequences. Eight sequences were identical, corresponding to NaStEP, and one was slightly different, NaSoEP (*N. alata* Sexual Organs Expressed Protein).

Sequence analysis

The nucleotide sequences of *NaStEP* and *NaSoEP* are accessible at GenBank under the accession numbers EU253563 and EU253564, respectively. For homology searches, the NCBI GenBank BLAST server 2.2.12 was used (Altschul *et al.*, 1997), through the BLASTX program provided by the San Diego Supercomputer Center (<http://workbench.sdsc.edu>). Protein sequences were aligned using the ClustalX program (Thompson *et al.*, 1997). Protein identities were calculated with ALIGN (<http://workbench.sdsc.edu>; Myers and Miller, 1988). The signalP program (<http://us.expasy.org/>) was used for signal peptide and cleavage site predictions using neural networks (Bendtsen *et al.*, 2004) and hidden Markov models (Nielsen and Krogh, 1998) trained on eukaryotes. Protein subcellular localization was predicted with PA-SUB (Lu *et al.*, 2004; www.cs.ualberta.ca/~bioinfo/PA/Sub/) or with the LOCSVMPSI 1.3 server (Xie *et al.*, 2005; <http://bioinformatics.ustc.edu.cn>).

RNA blot analysis

Leaves, stems, sepals, petals, anthers, stigmas, styles, and stigmas plus styles (pistils excluding the ovary) were ground under liquid nitrogen, and the total RNA was prepared and separated in 2% agarose formaldehyde gels as described by McClure *et al.* (1990). RNA was blotted onto Hybond N⁺ (Amersham) and methylene blue stained to check for equal loading. Filters were blocked in hybridization solution (0.3 M sodium phosphate buffer pH 7.2, 7% SDS, and 1 mM EDTA pH 8) for at least 1 h. The blots were then hybridized overnight with [³²P]cDNAs probes at 68 °C, and stringent washes were performed in 0.1× SSC, 0.1% SDS at 68 °C. Hybridization was detected by autoradiography.

Cloning and expression of NaStEP

The coding region from the *NaStEP* cDNA was amplified with NaStEPBamHI-F (5' CTCTGGATCCATGCCCACTACTACTGATGATGA3') and NaStEPEcoRI-R (5' CGCGGAATTCCTAGGTTACCACAAACCTAA3') primers and ligated in-frame with the glutathione *S*-transferase (GST) gene in pGEX-4T-2 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). After transformation into *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (RIL) (Stratagene), cells were induced with isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and fusion proteins purified by batch affinity chromatography with glutathione-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) as recommended by the manufacturer.

Protein isolation

Roots, stems, leaves, flowers, sepals, petals, pistils, styles, stigmas, ovaries, and anthers were ground under liquid nitrogen and homogenized in 50 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl pH 8, and 1% β-mercaptoethanol. Extracts were clarified by centrifugation for 10 min at 13 000 g at 4 °C and supernatants were kept at -80 °C until use. Protein concentration was estimated by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as the standard.

High-performance liquid chromatography (HPLC) and ion exchange chromatography

For NaStEP purification, stigma crude extracts from SI *N. alata* were prepared as indicated above, and then incubated with a quaternary ammonium Q-Sepharose fast flow anion exchange resin (Sigma) equilibrated in 50 mM TRIS-HCl pH 8.0 [equilibration buffer (EB)] for 1 h at room temperature. The resin was then washed 10 times with five bed volumes of EB. Elution was carried out using an increasing NaCl gradient (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, and 1000 mM prepared in EB).

Fractions containing most of the specifically bound NaStEP were pooled, and the EB plus the salt was changed to a new buffer [50 mM CH₃COONa pH 5.5 (NB)]. Partially purified NaStEP in NB was bound again to the same resin and fractions were eluted as described above using 50 mM CH₃COONa pH 5.5 plus the same increasing NaCl series. NaStEP-enriched fractions were pooled and analysed by HPLC using a Superdex 200 molecular exclusion column (Amersham-Biosciences). The column was eluted with NB at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. Protein fractions were separated by SDS-PAGE, and gels were stained with silver nitrate or blotted to nitrocellulose for immunoanalysis.

Two-dimensional gel electrophoresis

Two-dimensional PAGE [isoelectric focusing (IEF) in the first dimension using Immobiline™ drystrip (pH 3–10) (Amersham Biosciences) and SDS-PAGE in the second dimension] was performed by using the Multiphor II system (Amersham). Protein samples were extracted as described above, precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) in acetone, and dissolved in 125 μl of hydration buffer {4% CHAPS (3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane-sulphonate, 7 M urea, 2% IPG buffer, 10 mM dithiothreitol (DTT) and 0.002% bromophenol blue}. Protein samples were applied to dry polyacrylamide gel strips formulated with immobilized pH gradients and the gel strips were allowed to hydrate at room temperature for at least 16 h. IEF was performed in a Multiphor II system at 500 V for 1 h for the first phase, and for phase two the voltage was raised to 3500 V for 90 min. The voltage remained at 3500 V throughout phase three for 90 min, with an upper voltage limit of 5000 V. The gel strips were then dipped in SDS equilibration solution (50 mM TRIS-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, and a few traces of bromophenol blue) plus DTT (100 mg per 10 ml SDS equilibration buffer) for 15 min. The first equilibration solution was decanted, and iodoacetamide-containing equilibration solution was added to the strips (250 mg per 10 ml of SDS equilibration buffer) for 15 min. Second dimension SDS-PAGE was performed in a 15% gel (Laemmli, 1970), which was subsequently silver stained or blotted to nitrocellulose membranes (Millipore) for immunoanalysis.

Protein gel blot analysis

The affinity-purified polyclonal antiserum was prepared against the NaStEP peptide WEGSKDGMVKKFFT (Sigma). Equal amounts of protein were separated by 12% or 15% SDS-PAGE and blotted to nitrocellulose. Immunoblotting was performed essentially as described (Cruz-Garcia *et al.*, 2005). Primary antibody dilutions were: anti-NaStEP 1:15 000 and anti-S_{A2}-RNase 1:100 000.

Proteinase inhibitory activity assays

Proteinase inhibitory activity was assayed on SDS-polyacrylamide gels using a modified version of the method of Hou and Lin (1998). The protein samples were dissolved in the sample buffer without either DTT or boiling. After electrophoresis, gels were soaked twice in 25% isopropanol in 20 mM TRIS-HCl pH 8.0 for 10 min each prior to any additional treatment. The gel was then dipped in 20 mM TRIS-HCl buffer pH 8.0 for 30 min. Next the gel was placed in a trypsin solution [50 units of bovine trypsin (Sigma) in 1 ml of 50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 50 mM CaCl₂] for 30 min at 37 °C. The gel was rinsed in the same buffer before incubation in a fresh substrate-dye solution and then incubated for 50 min in the dark at 37 °C with 80 ml of the substrate-dye solution. The substrate-dye solution consisted of 20 mg of *N*-acetyl-DL-phenylalanine β-naphthyl ester (APNE, Sigma) in 8 ml of *N,N*-dimethylformamide that was brought to 80 ml with 72 ml of 50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 50 mM CaCl₂ in which 40 mg of tetrazotized *O*-dianisidine was dissolved.

The gel was destained with 10% acetic acid for 30 min. The soybean trypsin inhibitor (BioChemika) was used as a positive control.

Sequential protein extractions

Nicotiana alata cv Breakthrough stigmas plus styles were treated as described previously (Wu *et al.*, 2000; Juárez-Díaz *et al.*, 2006), with the following modifications. *Nicotiana alata* cv Breakthrough stigma plus styles were submerged sequentially in two different salt concentration buffers for 3 h at 4 °C: low-salt buffer (100 mM TRIS-HCl, pH 8.0) and high-salt buffer (400 mM NaCl, 40 mM TRIS-HCl, pH 8.0). Finally, the stigmas plus styles were ground in liquid N₂, homogenized in 400 mM NaCl, 40 mM TRIS-HCl, pH 8.0, 1% Triton X-100, and then clarified at 13 000 g for 30 min.

Microscopy and immunolocalization

Mature pistils from SI *N. alata* S_{C10}S_{C10}, SI *N. alata* S_{A2}S_{A2}, SI *N. alata* S₁₀₅S₁₀₅, SI *N. forgetiana*, SC *N. alata* Breakthrough, SC *N. longiflora*, SC *N. plumbaginifolia*, SC *N. tabacum*, SC *N. glauca*, and SC *N. benthamiana* were harvested and fixed in 4% (v/v) formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), dehydrated in an ethanol series, and embedded in Paraplast Plus (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). Sections of 6–7 µm were blocked with PBS plus 3% BSA, 0.01% sodium azide, and 0.1% Triton X-100 for 4 h at 4 °C. Sections were incubated with either primary rabbit anti-NaStEP antibody (1:3000 or 1:6000 dilutions) or the primary anti-HT-B antibody (1:3000 dilution) at 4 °C overnight. Sections were then incubated with either secondary goat anti-rabbit Alexa 568-fluorochrome- (HT-B) conjugated or goat anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC)-fluorochrome- (NaStEP) conjugated antibodies for 4 h at 4 °C. Sections were observed using a confocal fluorescence microscope.

Immunogold and transmission electron microscopy

Nicotiana alata flowers were emasculated 48 h before anthesis. When the flowers matured, pollinations were performed with *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, or *N. alata* Breakthrough pollen. Unpollinated and pollinated stigmas were collected after 10 h and then fixed in 3% formaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PBS for 2 h at room temperature. Tissues were then dehydrated in a series of ethanol concentrations (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96, and 100%) and infiltrated with LR White resin by gradually increasing its concentration (25, 50, 75, and 100%) then rinsed in PBS and post-fixed with 1% osmium tetroxide. For immunolocalization, 800 nm sections were hydrated and blocked in TBS (20 mM TRIS pH 7.6, 150 mM NaCl, 20 mM sodium azide, 1% Tween-20, 5% BSA, and 5% normal goat serum) for 1 h at room temperature and incubated with anti-NaStEP antibody (1:30) at 4 °C overnight. The sections were washed four times in TBS and incubated for 1 h at room temperature with 20 nm gold particle conjugates of rabbit IgG (Zymed) at a dilution of 1:20 in TBS. Before observation, sections were stained with aqueous 5% uranyl acetate followed by 3% lead citrate, and then observed with a transmission electron microscope (JEOL) at 60 kV.

Results

Identification of pistil-specific genes in SI *Nicotiana alata*

To identify factors that may contribute to early specific pollen–pistil interactions in SI *Nicotiana*, a cDNA library from SI *N. alata* stigma plus style was prepared and

screened with *S-RNase*, *HT-B*, and *120K* probes. After discarding the known sequences implicated in SI, clones that did not hybridize were sequenced and the ones that appeared more frequently were selected as good candidates. The screen identified one major sequence that met the necessary criteria, which was designated *NaStEP*. Figure 1a shows that *NaStEP* is highly expressed in *N. alata* pistils but is undetectable in SC *N. plumbaginifolia*, SC *N. longiflora*, and *N. tabacum*. Interestingly, all these species show DNA hybridization with a *NaStEP* probe in DNA blot assays (Supplementary Fig. S1 available at *JXB* online).

The compatibility phenotypes of *Nicotiana* species used in this work are shown in Supplementary Table S1 at *JXB* online. Figure 1b shows that *NaStEP* displays stigma-specific expression. *NaStEP* transcripts were expressed in styles plus stigmas from early developing stages but not in developing anthers. *NaStEP* expression tends to increase towards maturity, since the highest expression was detected in mature pistils (Fig. 1b–d, 6 cm). RNA blot analysis with other tissues (stems, leaves, sepals, and petals) showed no expression of *NaStEP* (Fig. 1e, upper panel). Interestingly, a similar sequence isolated in the screening, *NaSoEP* (i.e. one of nine clones), was expressed in early pistil developmental stages, with a marked decrease in expression as the pistil matures (Fig. 1c, d). However, those very low levels of *NaSoEP* were still detectable from the 2–3.5 cm to 6 cm stages (Fig. 1c) in contrast to the complete lack of transcript detected in non-sexual organs (Fig. 1e, lower panel).

Sequence analysis suggests that NaStEP and NaSoEP are vacuolar proteins. *NaStEP* and *NaSoEP* encode very similar proteins of 243 and 242 residues, respectively, with 70.9% sequence identity (Fig. 2). Although the predicted polypeptides are similar, NaStEP is acidic (pI 4.68), while NaSoEP is basic (pI 8.01). Both deduced polypeptides possess six cysteine residues that may form three disulphide bridges, putative *N*-glycosylation sites, and a predicted signal peptide (SP) (probability 0.994; Nielsen and Krogh, 1998; Bendtsen *et al.*, 2004). Cleavage at the predicted site (Nielsen and Krogh, 1998; Bendtsen *et al.*, 2004) shown in Fig. 2 would generate proteins of 24.37 kDa for NaStEP and 24.16 kDa for NaSoEP. The SP targets proteins for translocation across the endoplasmic reticulum (ER) membrane in eukaryotes (Von Heijne, 1990). Proteins translocated across the ER membrane devoid of specific retention signals in their sequence are by default secreted. NaStEP and NaSoEP both include a sequence-specific vacuolar sorting signal (ssVSS) NPVIL similar to the degenerate motif [N/L]-[P/L]-[I/S]-[R/P] [L/P/M] (Holwerda *et al.*, 1992; Saalbach *et al.*, 1996; Matsuoka and Nakamura, 1999; Frigerio *et al.*, 2001). Although the LOCSVMpsi algorithm (Xie *et al.*, 2005) predicts that both proteins are secreted to the extracellular space, the PA–SUB program (Lu *et al.*,

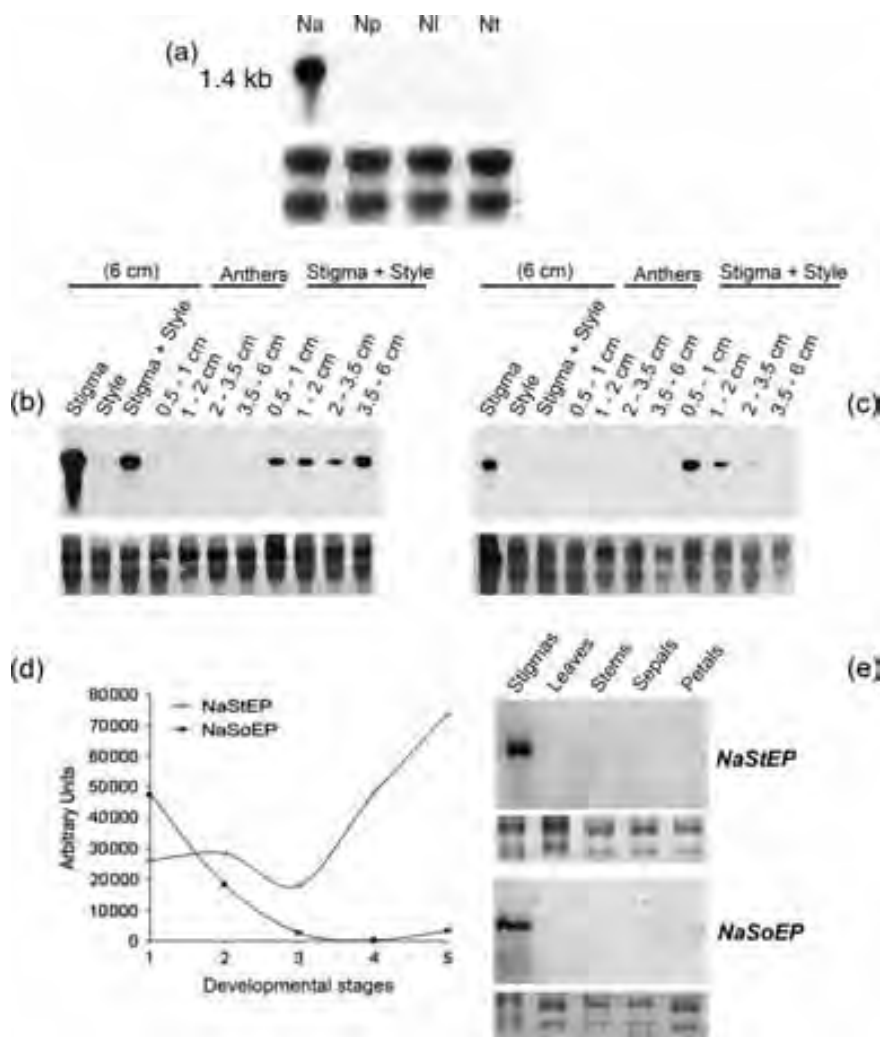


Fig. 1. Species-specific and developmental expression of *NaStEP* and *NaSoEP*. (a) Detection of *NaStEP* in different genetic backgrounds. Total RNA (10 µg) from mature pistils of SI *N. alata* (*Na*) and SC *N. plumbaginifolia* (*Np*), *N. longiflora* (*NI*), and *N. tabacum* (*Nt*) was blotted and hybridized with ³²P-labelled *NaStEP*. (b) *NaStEP* expression in developing anthers and pistils of *N. alata* *SC10SC10*. Total RNA (10 µg) was loaded in each lane, blotted, and probed with ³²P-labelled *NaStEP*. (c) *NaSoEP* expression in developing anthers and pistils of *N. alata* *SC10SC10*. Total RNA (10 µg) was loaded in each lane, blotted, and probed with ³²P-labelled *NaSoEP*. (d) Densitometric analysis of *NaStEP* and *NaSoEP* expression during the development of stigmas plus styles. Numbers 1–5 represents the developmental stages of stigmas plus styles: 1, 0.5–1.0 cm; 2, 1–2 cm; 3, 2–3.5 cm; 4, 3.5–6 cm; and 5, 6 cm. (e) *NaStEP* and *NaSoEP* expression in non-sexual organs of *N. alata*. Total RNA (10 µg) was loaded in each lane, blotted, and probed with a ³²P-labelled *NaStEP* (upper) or *NaSoEP* (lower). The same amount of stigma RNA was loaded as hybridization control. To ascertain equal RNA loading, blots were stained with methylene blue (lower sections of a–c and e).

2004) predicts that NaStEP and NaSoEP are likely to be either secreted to the extracellular space (100%) or sorted to the vacuole (99.9% and 99.75%, respectively). The signal peptide sequence and the putative vacuolar sorting signal are completely conserved in both proteins.

NaStEP and NaSoEP are most similar in sequence to Kunitz-type proteinase inhibitors. Alignment with a variety of serine, aspartic, and cysteine protease inhibitors showed identities ranging from 24.8% to 79.1%. Supplementary Fig. S2a at *JXB* online presents a phylogenetic tree showing six main clades of plant proteinase inhibitors or homologues, designated I–VI. According to the proteinase inhibitors classification of Rawlings *et al.* (2004), all these proteins belong to the I3 family (the plant Kunitz-type

proteinase inhibitor). NaStEP and NaSoEP cluster with clade V together with NgPI, a putative proteinase inhibitor from *N. glutinosa* (KS Park *et al.*, 2000), and double-headed cysteine and aspartic protease inhibitors from *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum* (tomato, formerly *Lycopersicon esculentum*). Supplementary Fig. S2b at *JXB* online shows an alignment of the proteins in clade V. All the proteins have a predicted signal peptide (Supplementary Fig. S2b) and an ssVSS in their N-terminal propeptides (NTPPs). The putative binding sites for trypsin-like (Arg₉₉Phe₁₀₀) and chymotrypsin-like (Leu₁₄₄Leu₁₄₅) inhibitors are conserved in the five aspartic proteinase inhibitors (Supplementary Fig. S2b, red boxes and arrowheads). Only three of the proteins shown in the



Fig. 2. Alignment of the amino acid sequences of the cDNA encoding NaStEP and NaSoEP proteins. The black boxes under the alignment indicate the degree of sequence consensus. Arrowheads indicate the potential signal peptide cleavage sites. Cysteine residues are marked with an asterisk. Putative glycosylation sites are single underlined. Presumed vacuolar sorting signals are boxed. The antigenic region is double underlined. A dash in the sequence indicates a gap introduced to maintain a good alignment.

alignment (PDI, PCPI, and *S. tuberosum* cathepsin D inhibitor) have been demonstrated to exhibit protease inhibitor activity. The percentage identities of NaStEP and NaSoEP with proteins that fall in clade V are shown in Supplementary Table S2 at *JXB* online.

NaStEP is a stigma-specific protein

Because *NaStEP* was strongly expressed in mature stigmas, it seemed to be the most promising candidate for pollen–stigma interactions deserving further characterization. For these studies, a NaStEP-specific antibody was raised against the sequence WEGSKDGMPVKFFT, which shares only seven identical positions with NaSoEP. Antibody specificity was proved against a GST:NaStEP fusion protein. No binding was observed to GST alone or other *E. coli* proteins (Supplementary Fig. S3b, d at *JXB* online). The antibody reacted specifically with a GST:NaStEP fusion protein expressed in *E. coli*, confirming that the antibody recognized the NaStEP epitope (Supplementary Fig. S3a, c). Figure 3 shows antibody detection of a 32 kDa protein in SC *N. alata* cv Breakthrough, a natural mutant that does not express any S-RNase (Murfett *et al.*, 1996; Beecher and McClure, 2001), but keeps the genetic background of an SI plant. Because of this, no differences are expected in the NaStEP cell biology with respect to the wild-type SI *N. alata*. The protein was evident in the mature stigma and pistils but not in any other sexual or non-sexual organ. Protein blots of stigma polypeptides separated by 2D PAGE were used to test whether the antibody detects only NaStEP and does not cross-react with NaSoEP. Since mature NaStEP has a predicted pI of 4.68 and mature NaSoEP a predicted pI of 8.01, an anti-S_{A2}-RNase (i.e. pI 8.016) antibody was used as a control. The results showed

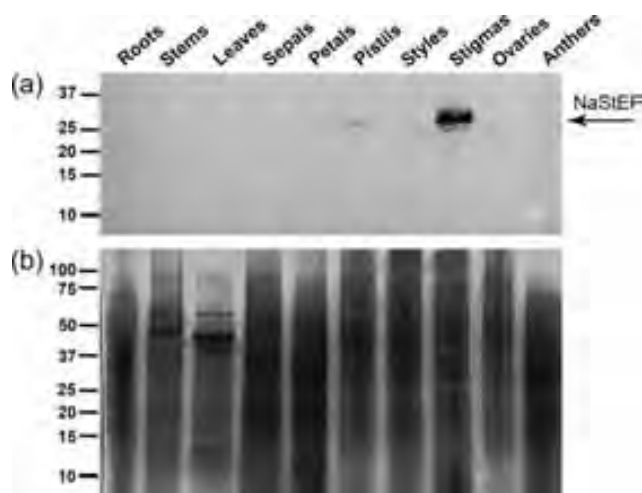


Fig. 3. Immunoanalysis of NaStEP in *N. alata* organs. Equal amounts of total protein (10 µg) of roots, stems, leaves, sepals, petals, pistils, styles, stigmas, ovaries, and anthers were separated by SDS–PAGE. (a) Proteins transferred onto nitrocellulose and immunostained with anti-NaStEP antibody. (b) Coomassie blue-stained proteins.

that the anti-NaStEP antibody detects a small family of acidic polypeptides in extracts of SI *N. alata* S_{A2}S_{A2}, but shows no cross-reaction with any basic polypeptide (Fig. 4). Deglycosylation assays performed with peptide-*N*-glycosidase F (PNGase-F) (Supplementary Fig. S4c at *JXB* online), and concanavalin A (Con A) binding experiments (Supplementary Fig. S4a) revealed that some of these acidic polypeptides are glycosylated forms of NaStEP.

Since NaStEP is a homologue of Kunitz-type proteinase inhibitors, we determined whether NaStEP is an active proteinase inhibitor. The native NaStEP protein was purified to homogeneity by ionic and gel filtration chromatography (Fig. 5a, b) and tested for proteinase inhibitory activity

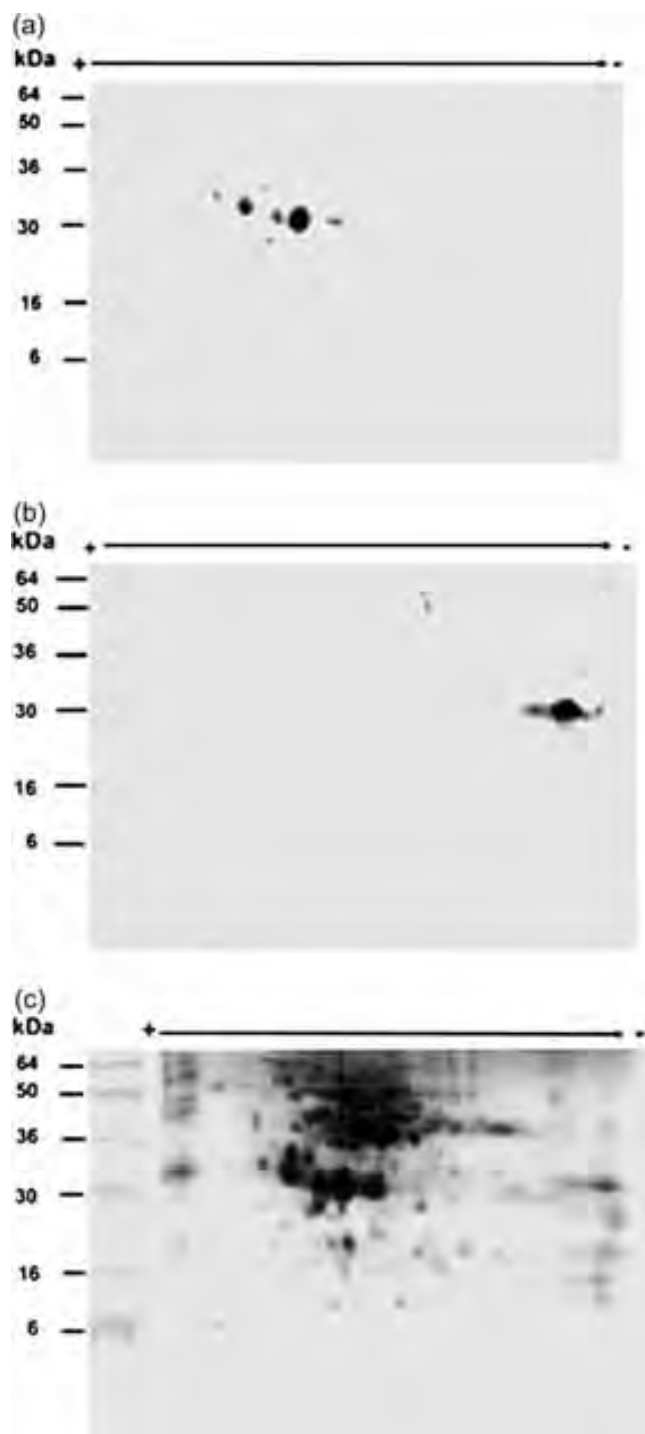


Fig. 4. Two-dimensional gel analysis of NaStEP in stigmatic extracts. Total protein (50 μ g) from mature styles plus stigmas of SI *N. alata* $S_{A2}S_{A2}$ were fractionated by two-dimensional electrophoresis. (a) Proteins transferred onto nitrocellulose and immunodetected with anti-NaStEP antibody. (b) Proteins blotted and immunodetected with the anti- S_{A2} -RNase antibody. (c) Mature proteins silver stained.

(Fig. 5c, d). In activity gel assays, the catalytic activity of the trypsin is visualized for the whole stained gel surface, except those areas where the inhibitor is present. Figure 5c shows that NaStEP does not exhibit inhibitory activity

against trypsin as the soybean trypsin inhibitor does. Similar results were obtained when three NaStEP-enriched fractions from Con A affinity chromatography (fractions 3–5, Supplementary Fig. S4a, b at *JXB* online) were tested for proteinase inhibitory activity (data not shown).

To investigate further the tissue specificity of NaStEP localization, immunohistochemical analyses were performed in stigmatic tissues of SC *N. alata* cv Breakthrough. Longitudinal sections of unpollinated styles, including the stigma and the upper portion of the style, were immunostained with anti-NaStEP or anti-HT-B antibodies (Goldraj *et al.*, 2006) and viewed by three-dimensional confocal microscopy. Figure 6 shows that NaStEP expression was restricted to the stigma and was especially conspicuous in papillary cells (Fig. 6b); while HT-B was restricted to the stylar transmitting tissue (Fig. 6c). A cross-section of the unpollinated stigma shows NaStEP immunostaining in the secretory zone (yellow arrow) and stigmatic basal cells (blue arrow), as well as in the papillary cells (red arrow) (Fig. 6f). In Fig. 6g, a higher magnification shows NaStEP localization in the periphery of the cells (green arrows) and inside subcellular vacuolated compartments (blue arrows).

NaStEP is predominantly expressed in SI Nicotiana species

We examined expression of NaStEP-like proteins in other *Nicotiana* species and *N. alata* accessions using the anti-NaStEP antibody. Figure 7a shows immunoblot results obtained with pistil extracts (i.e. stigma plus style) from SI *N. forgetiana*, *N. bonariensis*, and three SI and two SC accessions of *N. alata*. NaStEP-like proteins were readily detected in all cases, although the expression levels vary. As expected from the transcript level results shown in Fig. 1a, no NaStEP-like proteins were detected in the SC species *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum*, *N. longiflora*, *N. glauca*, or *Nicotiana alata* \times *N. plumbaginifolia* hybrids, which also express NaStEP. Similar results were obtained in immunolocalization experiments. Stigma cross-sections (including the upper portion of the transmitting tract) from two SI (*N. alata* and *N. forgetiana*) and four SC species (*N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *N. glauca*, and *N. benthamiana*) show that NaStEP was strongly expressed in the stigmas of the SI species, but not in the SC species (Fig. 7b).

Pollination-induced discharge of NaStEP to stigmatic exudate

Electron microscopy and immunogold labelling experiments showed that NaStEP is discharged into the stigmatic exudate upon pollination (Fig. 8). Figure 8a shows a papillary cell cross-section from a mature/open flower, surrounded by copious masses of secretory droplets in the exudate. The cell wall shows discrete interruptions (arrows, Fig. 8a, b). The cytoplasm is

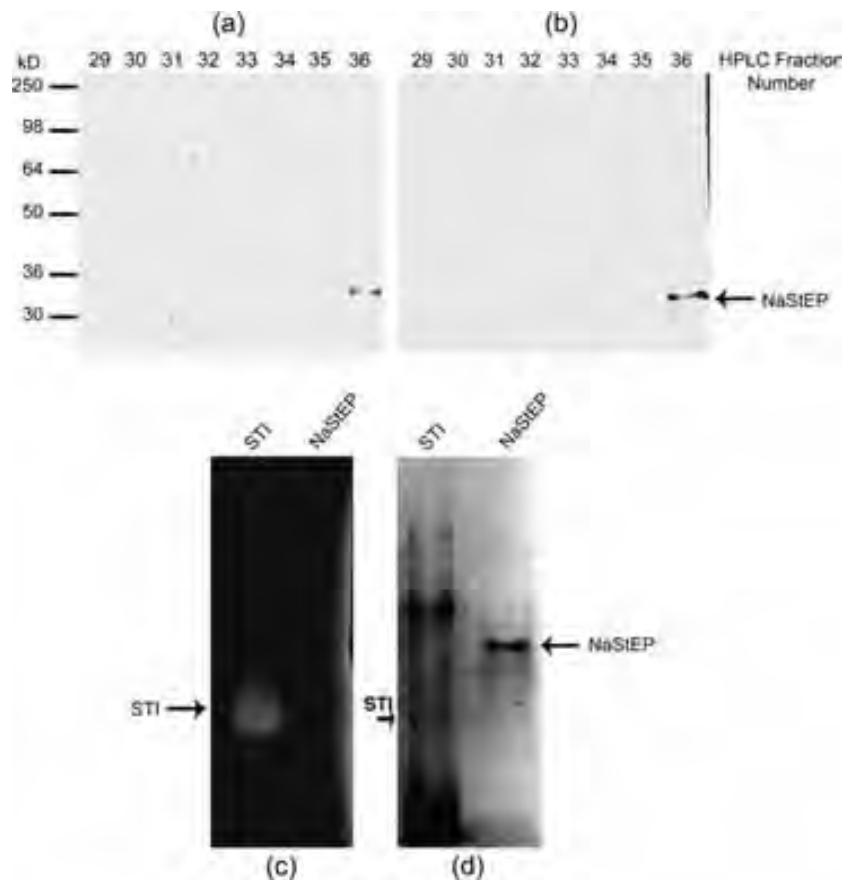


Fig. 5. Native NaStEP from *N. alata* stigmas and serine proteinase inhibitor activity assay. Purified HPLC fractions (29–36) of NaStEP were resolved by SDS–PAGE. (a) Proteins present in the HPLC fractions were transferred onto nitrocellulose and immunostained with the anti-NaStEP antibody. (b) Silver-stained proteins. (c) Inhibitory activity gel assay against trypsin. A 3 μ g aliquot of the soybean trypsin inhibitor (STI) was run as a positive control. (d) A silver-stained replicate of the inhibitory activity assay gel.

displaced to the periphery of the papillary cells by large vacuoles containing osmiophilic bodies (electron-dense bodies, structures darkly stained with osmium tetroxide). These osmiophilic bodies were also present in smaller vesicles (Fig. 8b). Immunogold labelling with anti-NaStEP antibody showed that NaStEP accumulates mainly in these osmiophilic bodies (Fig. 8c). No NaStEP was detected in stigmatic exudate in unpollinated stigmas (Fig. 8i). However, after pollination, several changes were observed. Figure 8d shows that 10 h after pollination with *N. tabacum* pollen, the papillary cell cytoplasm appears different. Vacuoles and other organelles in these cells seem to degenerate and the osmiophilic bodies are smaller than in unpollinated stigmas. The papillary cell wall interruptions were more pronounced (arrow), and the large osmiophilic bodies did not label well with anti-NaStEP (Fig. 8e). Rather, labelling was localized in smaller vacuoles with smaller osmiophilic bodies (Fig. 8f).

After pollination, stigmatic exudate was more abundant. Cellular organelles were present in the exudate, indicating that some papillary cells discharged their contents (Fig. 8d). NaStEP labelling was abundant in the exudate

after pollination with *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, or *N. alata* cv Breakthrough pollen (Fig. 8j–l).

Synthesis and release of NaStEP onto the exudate is strongly stimulated by incompatible pollination

To investigate further the effect of compatible and incompatible pollination on NaStEP subcellular localization in the stigma, proteins present in the exudate were differentially extracted using sequential washes with low and high salt buffers as described (Wu *et al.*, 2000; Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Under this procedure, the low salt buffer elutes soluble proteins, whereas more tightly bound proteins are released after the high salt buffer wash. The remaining cellular proteins were collected after N_2 grinding. Sequential protein extractions were performed from *N. alata* cv Breakthrough stigmas, pollinated with either self or *N. tabacum* pollen. Soluble proteins were recovered at 5, 12, and 24 h after pollination (hap). Figure 9b and c shows that after pollination with either compatible or incompatible pollen, NaStEP was observed in the low salt fraction after 5 h, with a noteworthy increase at 24 hap. NaStEP was not detectable in the

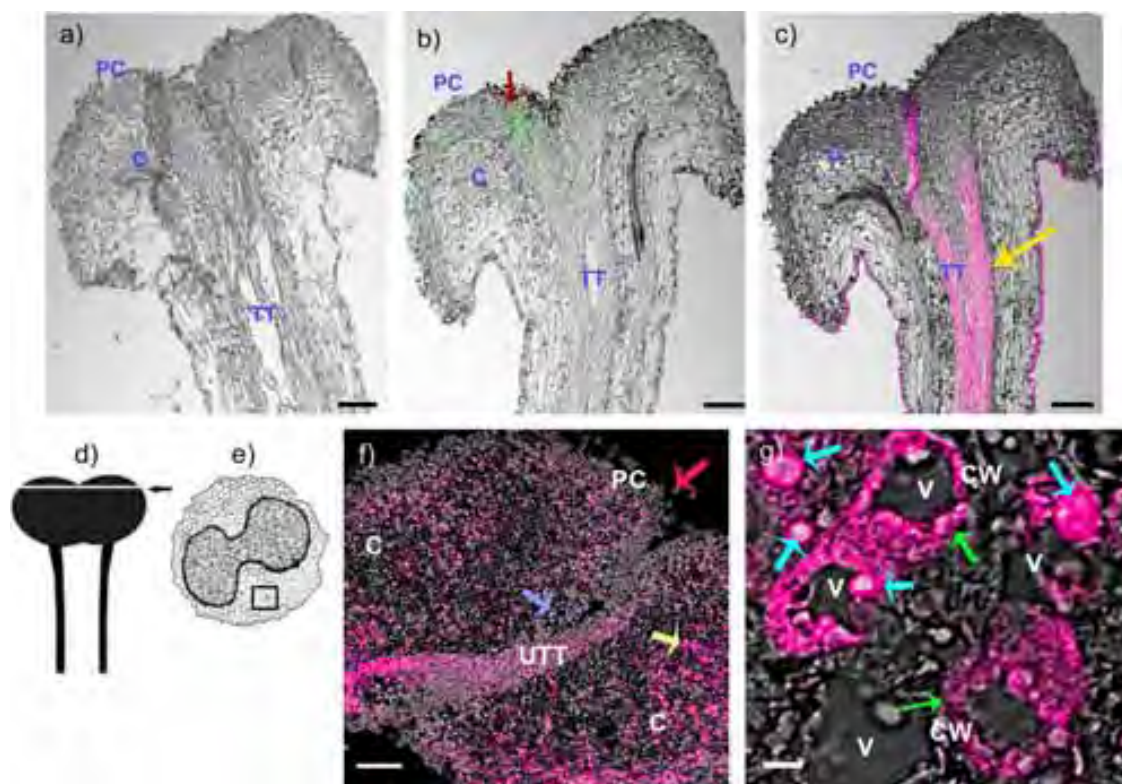


Fig. 6. Immunohistochemical localization of NaStEP in stigmatic tissues of SC *N. alata* Breakthrough. (a) Stigma and style treated with pre-immune serum. (b) Stigma and style treated with anti-NaStEP antibody (green). (c) Stigma and style treated with anti-HT-B antibody (magenta). (d) and (e) Diagrams of stigma plus style of *N. alata* and a transverse section of a stigma. The arrow and square show zones where images were taken. (f) Stigma cross-sections showing NaStEP (magenta) in papillary cells (red arrow), secretory cells (yellow arrow), basal cells (blue arrow), and in a portion of the upper transmitting tract. (g) High magnification view of stigmatic secretory cells shows that NaStEP is in small bodies (blue arrows) and in the proximity of the cell wall (green arrows). All figures represent merges of immunostained and phase contrast images of stigmas plus styles. CW, cell wall; V, vacuole; TT, transmitting tissue; UTT, upper transmitting track; C, cortex; PC, papillae cell. Bars, 50 μm for (a), (b), (c) and 20 μm for (f) and 5 μm for (g).

exudate from unpollinated stigmas 48 h after anthesis (Fig. 9a); however, the protein was clearly present in the non-soluble component (intracellular). Whether the levels of NaStEP before and after pollination are compared, it seems that the total NaStEP synthesis was increased 3.7-fold (24 h after incompatible pollination, compared with 48 h for the control) and 1.7-fold (24 h, compared with 48 h for the control) after compatible pollination (Fig. 9d–f). In addition, the deposition of NaStEP into the stigmatic exudate was stimulated 20-fold (24 h, compared with 48 h for the control) in incompatible pollination (Fig. 9f) and 12-fold (24 h, compared with 48 h for the control) in compatible pollinations (Fig. 9e). Based on these results, it was concluded that NaStEP synthesis and release onto the stigmatic exudates were both stimulated by pollination, with a stronger response after *N. tabacum* pollination.

Discussion

NaStEP and *NaSoEP* cDNAs were isolated as part of an effort to identify *N. alata* factors with high potential to

contribute to pollen recognition. Although central and N-terminal regions of both proteins show extensive sequence similarity to Kunitz homologue proteinase inhibitors (Supplementary Fig. S2a, b at *JXB* online), no serine proteinase inhibitor activity was associated with NaStEP. The present data show that NaStEP is stored in the vacuole of stigmatic papillae and is released upon pollination. Moreover, NaStEP is not expressed in a selection of species that accept *N. tabacum* but is expressed in several species showing *N. tabacum* pollen rejection. DNA blot analysis (Supplementary Fig. S1 and data not shown) showed that SC species such as *N. plumbaginifolia*, *N. glauca*, and *N. tabacum* present positive hybridization against a *NaStEP* probe, suggesting that these species encode a gene orthologous to *NaStEP*, but they have lost the ability to express it, since neither transcripts (Fig. 1a) nor proteins (Fig. 7) were detected in their stigmas.

Proteinase inhibitors are common in plants and have been previously identified in sexual tissues of solanaceous plants. Atkinson *et al.* (1993) described Na-PI II, a stigma-specific proteinase inhibitor from *N. alata* that

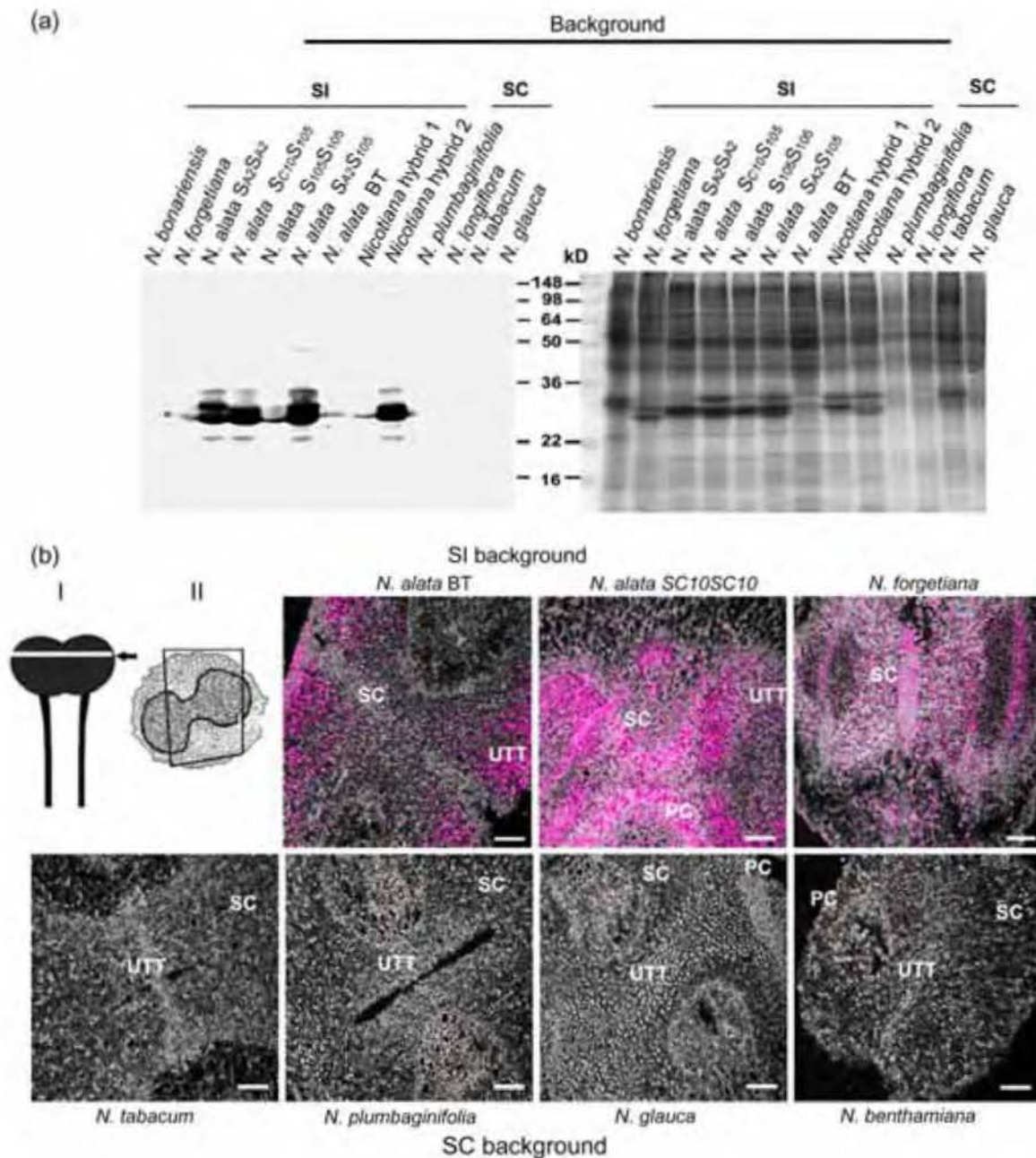


Fig. 7. NaStEP-like proteins are expressed in stigmas of SI *Nicotiana* species but not in SC species. (a) Total proteins (10 µg) from stigmas and styles of SI *N. bonariensis*, SI *N. forgetiana*, SI *N. alata* $S_{A_2}S_{A_2}$, SI *N. alata* $S_{105}S_{C_{10}}$, SI *N. alata* $S_{105}S_{105}$, SC *N. alata* $S_{105}S_{A_2}$, SC *N. alata* Breakthrough, SI Hybrid 1 (SC *N. plumbaginifolia* × SI *N. alata* $S_{105}S_{105}$), SI Hybrid 2 (SC *N. plumbaginifolia* × SI *N. alata* $S_{C_{10}}S_{C_{10}}$), SC *N. plumbaginifolia*, SC *N. tabacum*, SC *N. longiflora*, and SC *N. glauca* were separated by SDS-PAGE and either Coomassie blue stained (left) or blotted to nitrocellulose for immunostaining with anti-NaStEP antibody (right). (b) Cross-sections of *N. alata* Breakthrough, SI *N. alata* $S_{C_{10}}S_{C_{10}}$, SI *N. forgetiana*, SC *N. tabacum*, SC *N. plumbaginifolia*, SC *N. glauca*, and SC *N. benthamiana* stigmas immunostained with anti-NaStEP. I and II: diagrams of a stigma plus style of *N. alata* and a transverse section of a stigma. The arrow and square show zones where images were taken. UTT, upper transmitting tissue; SC, secretory cells; PC, papillae cell. Bars, 50 µm.

inhibits the digestive proteases of several insect species (Heath *et al.*, 1997). Na-PI II is a type II proteinase inhibitor that is delivered to the vacuole as a 40.2 kDa precursor and processed to release six mature 6 kDa trypsin or chymotrypsin inhibitors (Atkinson *et al.*, 1993; Heath *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1999). A trypsin inhibitor

from *N. attenuata* has been shown to function in defence against herbivore attack (Zavala *et al.*, 2004). LAT52, a protein with similarity to Kunitz-type proteinase inhibitors (Twell *et al.*, 1989; McCormick *et al.*, 1991), has been directly implicated in pollination. LAT52 is highly expressed in mature pollen and is essential for normal

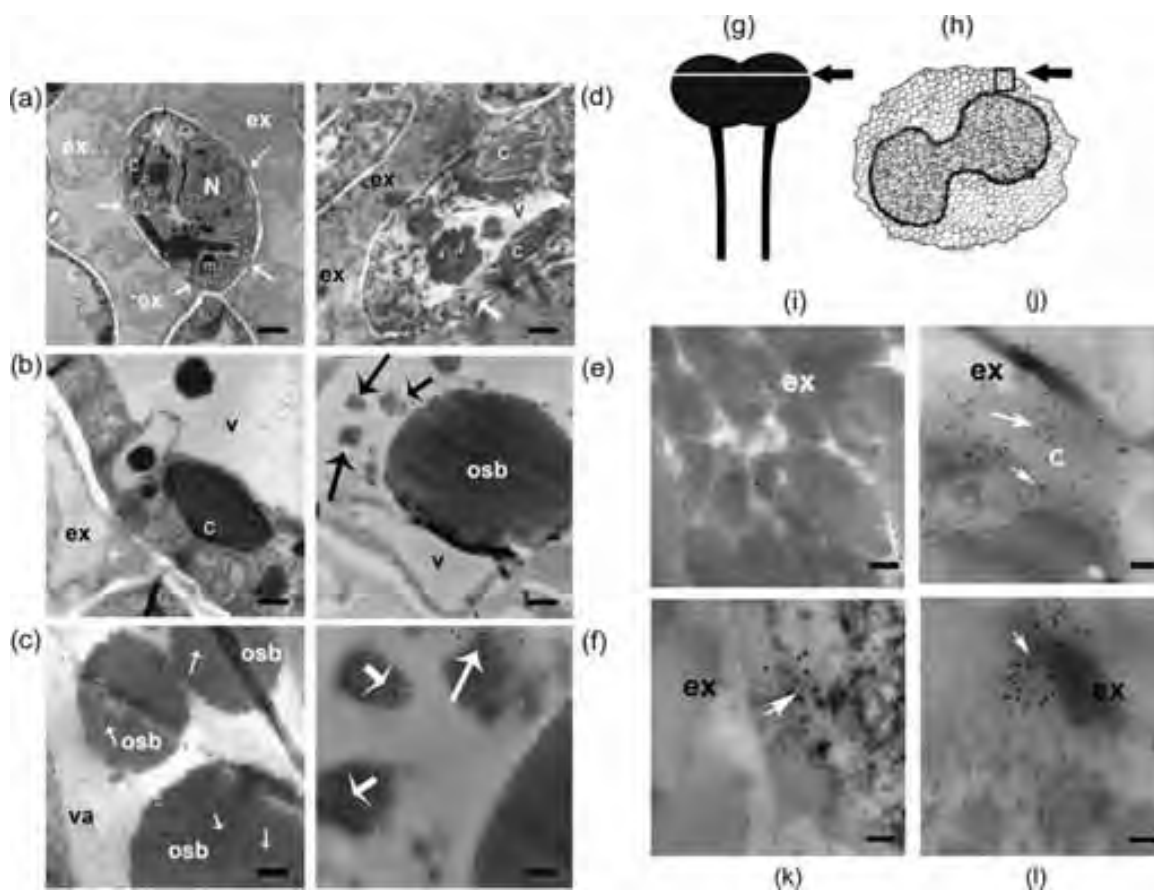


Fig. 8. NaStEP is discharged from the vacuole to the stigmatic exudate upon pollination. Unpollinated stigma from SC *N. alata* cv Breakthrough showing NaStEP localization in vacuoles and osmiophilic bodies. (a) Cross-section of mature papillae surrounded by copious exudate containing secretory droplets. Arrows show cell wall interruptions. (b) A papillary cell with a large vacuole and osmiophilic bodies. (c) Anti-NaStEP labelling of vacuolar electron-dense bodies. Arrows show immunogold secondary antibody labelling. *Nicotiana alata* cv Breakthrough stigma 10 h after pollination with *N. tabacum* pollen. (d) Degenerating papillary cells (arrow), showing abundant exudate and a disordered cytoplasm with abnormal organelles and disintegrated vacuoles. (e) Vacuole showing poor anti-NaStEP labelling of the osmiophilic bodies (arrows). (f) A close-up of the labelling shown in (e) (black arrows) showing anti-NaStEP labelling (white arrows) in smaller osmiophilic bodies. Stigmatic exudate of *N. alata* cv Breakthrough. (g) and (h) Diagrams of a stigma plus style of *N. alata* and a transverse section of a stigma. The arrow and square show zones where images were taken. (i) Unpollinated stigmas. (j) At 10 h after pollination with *N. tabacum* pollen. (k) At 10 h after pollination with *N. plumbaginifolia* pollen. (l) At 10 h after self-pollination. N, nucleus; m, mitochondria; c, chloroplast; v, vacuole; osb, osmiophilic bodies; ex, exudate. Bars, 500 nm for (a), 1 μ m for (b) and (d), 240 nm for (c), 500 nm for (e), and 200 nm for (i)–(l).

pollen hydration and tube growth (Muschiatti *et al.*, 1994). It binds to the receptor kinase LePRK2 in yeast-two hybrid and co-immunoprecipitation experiments, and it has been proposed to be a ligand *in vivo* (Tang *et al.*, 2002). This interaction may activate a signalling cascade that regulates pollen tube growth (Johnson and Preuss, 2003).

We focused attention on NaStEP because its expression and pollination-induced synthesis and deposition onto the stigma surface are consistent with a role in early pollen–pistil interactions (Figs 1b, d, 3, 6–9). Although *NaSoEP* is a similar gene, its expression pattern in early anther and pistil development (Fig. 1c) is different and is more likely to be involved in flower development. Nevertheless, since there is low *NaSoEP* expression in mature stigmas, a possible role in pollination cannot be totally excluded. Stigma proteins have been previously implicated in the regulation of pollen tube growth. For example, a lily lipid

transfer-like protein, SCA (stigma/stylar cysteine-rich adhesin) is necessary for adhesion of pollen tubes in the style (SY Park *et al.*, 2000). SCA, together with a chemocyanin, displays chemotropic *in vitro* activity in lily pollen tube growth (SY Park *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Park and Lord, 2003). LeSTIG1, the *Solanum lycopersicum* orthologue of the stigma-specific protein STIG1 from *N. tabacum* (Goldman *et al.*, 1994), interacts with the extracellular domain of the tomato pollen-specific receptor kinases LePRK1 and LePRK2 and promotes pollen tube growth *in vitro* (Tang *et al.*, 2004). As already mentioned, LAT52, a pollen protein, also binds LePRK2. Therefore, stigmatic LeSTIG1 might displace LAT52 after germination and contribute to growth regulation through the pistil (Tang *et al.*, 2004). A role for STIG1 in the regulation of stigmatic exudate secretion has also been proposed in *Petunia hybrida* and *N. tabacum* (Verhoeven *et al.*, 2005).

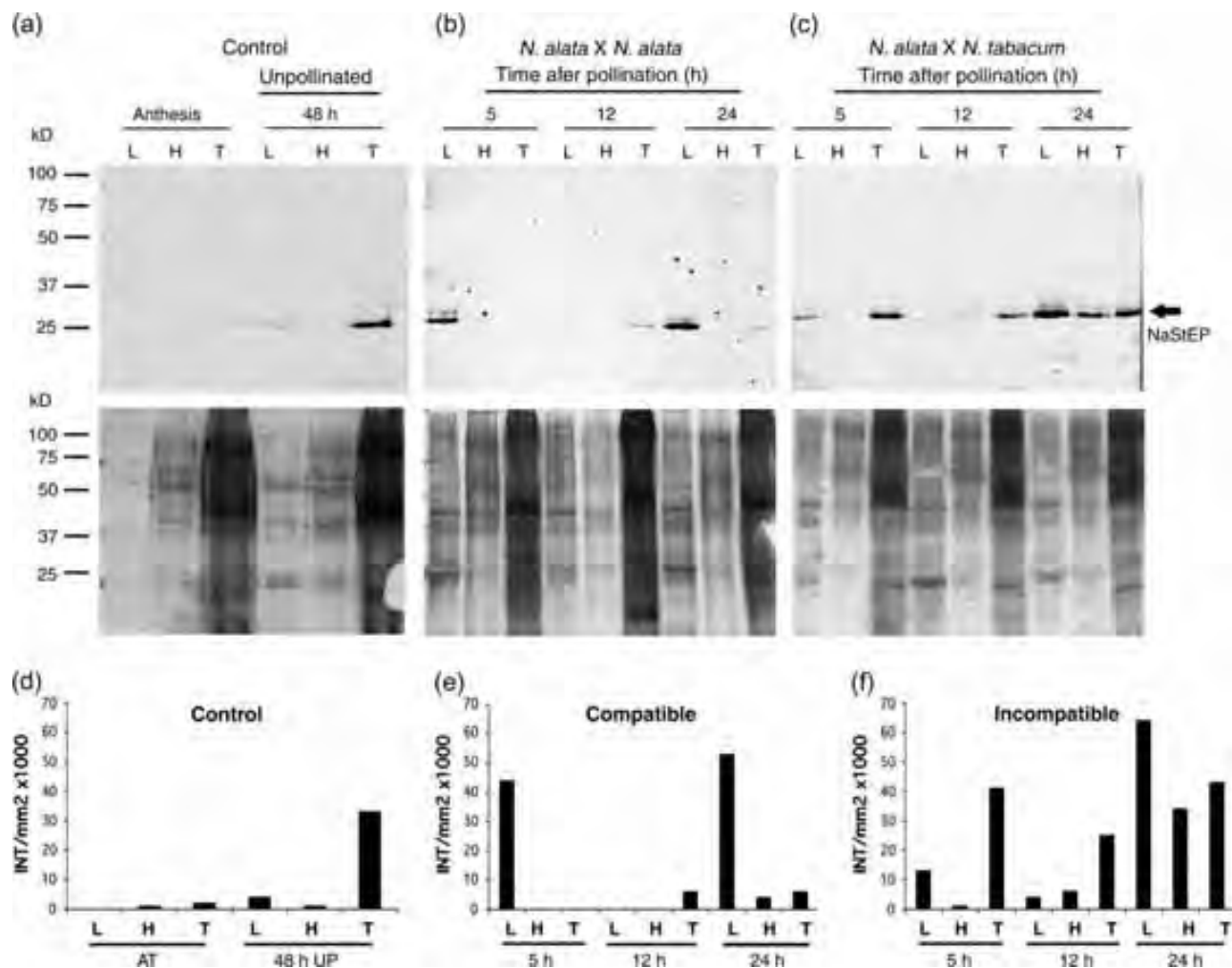


Fig. 9. Pollination induces synthesis and release of NaStEP into the *N. alata* stigmatic exudate. Total protein from exudate of unpollinated and pollinated stigmas of *N. alata* cv Breakthrough were sequentially extracted, separated by SDS-PAGE, and blotted to nitrocellulose for immunostaining with anti-NaStEP (top) or silver nitrate stained (bottom). Equal volumes (30 μ l) were loaded in each lane. (a) Total protein from exudate of unpollinated stigmas at anthesis and at 48 h old. (b) Total proteins from exudate after 5, 12, and 24 h of self-pollination. (c) Total proteins from exudate after 5, 12, and 24 h of pollination with *N. tabacum* pollen. (d), (e), and (f) Densitometric analysis of NaStEP expression and its presence in the stigmatic exudate of *N. alata* before and after pollination with self- and *N. tabacum* pollen. L, low-salt wash; H, high-salt wash; T, proteins remaining in the stigma after washes.

Because the expression of NaStEP-like proteins is induced by pollination and preferentially expressed in SI species (Fig. 7), general roles in defence, as with Na-PI (Heath *et al.*, 1997), are unlikely.

NaStEP may play a role in specific pollen–pistil interactions like LaT52, which also has similarity to Kunitz-type proteinase inhibitors (Twell *et al.*, 1989; McCormick *et al.*, 1991; Muschiatti *et al.*, 1994), but it is unlikely to encode a functional proteinase inhibitor (Lee and Lee, 2003). Since NaStEP-like protein expression is correlated with SI among species and its expression is strongly induced by pollination with incompatible pollen, it is hypothesized that it may also contribute to unilateral incompatibility. In this process, interspecific pollen from SC species is frequently inhibited directly on the SI stigma or very soon after pollen tube penetration into the

style (de Nettancourt, 2001; Mutschler and Leidl, 1994). As a consequence of the interaction between NaStEP and pollen factors, pollen tubes to be rejected would trigger signal cascades that would inhibit their growth, as happens in other SI species such as *Papaver rhoeas* (McClure and Franklin-Tong, 2006). A clearer picture of the role of NaStEP in the pollen rejection response may be gained in future experiments involving RNA interference (RNAi)-mediated silencing of NaStEP.

Both NaStEP and NaSoEP contain the pentapeptide NPVIL near the N-terminus. This sequence is similar to the ssVSS required for vacuolar targeting of sweet potato sporamin (Matsuoka and Nakamura, 1999), Brazil nut 2S albumin (Saalbach *et al.*, 1996), castor bean ricin (Frigerio *et al.*, 2001), and barley aleurain (Holwerda *et al.*, 1992). Although there is no strict vacuolar targeting consensus

sequence, conserved physicochemical properties combined with limited sequence conservation are sufficient (Matsuoka and Nakamura, 1999). The NPIVL sequence in NaStEP and NaSoEP is a good match to the signal proposed by Matsuoka (2000): $X_1-X_2-I/L-X_3-X_4$, where X_1 lacks a small hydrophobic side chain (N is preferred), X_2 may not be acidic, X_3 is any amino acid, and X_4 is large and preferably hydrophobic. A similar motif is present in the NTPP of some potato Kunitz-type proteinase inhibitor precursors (Ishikawa *et al.*, 1994), the aureusidin synthase (AmAS1) of snapdragon (Ono *et al.*, 2006), the C-terminal propeptide of Na-PI from *N. alata* (Atkinson *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1999; Matsuoka, 2000), and the *N. attenuata* proteinase inhibitor (Zavala *et al.*, 2004). Interestingly, if the vacuolar sorting signal is proteolytically processed in the ER, proteins can be secreted instead of sorted to the vacuole, as has been shown in *N. alata* (Johnson *et al.*, 2006).

The process by which NaStEP is discharged from the vacuole is a mechanism for presenting potential pollination factors for interaction not described so far. The present results show dramatic changes in some stigmatic cells after pollination (Fig. 8). Perforation of the cell wall associated with the discharge of cytoplasmic contents into the stigmatic exudate was observed (Fig. 8d). This discharge includes organelles such as chloroplasts and vacuolar materials (the osmiophilic bodies containing NaStEP). The phenomenon seems to be a generalized process because it happens independently whether the *N. alata* Breakthrough stigmas are pollinated with self-pollen or with pollen from *N. plumbaginifolia* or *N. tabacum* (Fig. 8j–l and data not shown). However, the increase of NaStEP synthesis seen 24 h after either compatible or incompatible pollen (Fig. 9) suggests that not all stigmatic cells suffer cell damage after pollination. Release of material into the stigmatic exudate has also been reported in *P. hybrida* and *Solanum tuberosum* (Herrero and Dickinson, 1979, 1980; MacKenzie *et al.*, 1990). However, in these previous studies the dramatic degeneration of papillary cells 6 h after pollination seen here was not observed. Perhaps this was because these authors worked either with unpollinated stigmas before and after anthesis or with stigmas 2 h after pollination (Herrero and Dickinson, 1979, 1980). Whether these changes are due to a pollination-specific effect or an acceleration of stigma senescence, they represent a novel mechanism for delivery of organellar proteins such as NaStEP to a position where they are available for pollen–pistil interactions.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Figure S1. DNA gel-blot analysis of *NaStEP*.

Figure S2. NaStEP and NaSoEP are homologous to Kunitz-type protease inhibitors.

Figure S3. Anti NaStEP antibody specificity.

Figure S4. Affinity chromatography of a protein crude extract bound to Con A-Sepharose resin and PNGase F deglycosylation analysis.

Table S1. Pollination phenotypes of the *Nicotiana* species studied.

Table S2. Identity percentages between NaStEP/NaSoEP and the proteinase inhibitors in clade V.

Appendix S1. Materials and methods and references.

Acknowledgements

We thank Laurel Fábila, Javier Andrés Juárez-Díaz, Yuridia Cruz González-Zamora, and Carlos Mújica for technical support. We also thank Dr K O'Grady and Dr William B Gurley for critical review of the manuscript. This material is based upon work partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant 40614Q, 54586), Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (Grant IN207406) and National Science Foundation under Grant No. 0315647 and 0614962.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Atkinson AH, Heath RL, Simpson RJ, Clarke AE, Anderson MA. 1993. Proteinase inhibitors in *Nicotiana alata* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. *The Plant Cell* **5**, 203–213.
- Beecher B, McClure BA. 2001. Effects of RNases on rejection of pollen from *Nicotiana tabacum* and *N. plumbaginifolia*. *Sexual Plant Reproduction* **14**, 69–76.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* **340**, 783–795.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Cheung AY, Wang H, Wu H-M. 1995. A floral transmitting tissue specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**, 383–393.
- Clarke AE, Gleeson P, Harrison S, Knox RB. 1979. Pollen–stigma interactions: identification and characterization of surface components with recognition potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 3358–3362.
- Cruz-García F, Hancock N, Kim D, McClure B. 2005. Styler glycoproteins bind to S-RNase *in vitro*. *The Plant Journal* **42**, 295–304.
- de Nettancourt D. 2001. *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants*, 2nd edn. Berlin: Springer.
- Frigerio L, Jolliffe NA, Di Cola A, Felipe DH, Paris N, Neuhaus JM, Lord JM, Ceriotti A, Roberts LM. 2001. The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting. *Plant Physiology* **126**, 167–175.
- Gell A, Bacic A, Clarke AE. 1986. Arabinogalactan-proteins of the female sexual tissue of *Nicotiana alata*. Changes during floral development and pollination. *Plant Physiology* **82**, 885–889.

- Gleeson PA, Clarke AE.** 1979. Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein. *Biochemical Journal* **181**, 607–621.
- Goldman MHS, Golberg RB, J, Mariani C.** 1994. Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *EMBO Journal* **13**, 2976–2984.
- Goldman MHS, Pezzotti M, Seurinck J, Mariani C.** 1992. Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like protein. *The Plant Cell* **4**, 1041–1051.
- Goldraj A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-Garcia F, McClure B.** 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* **439**, 805–810.
- Graaf BHJ, Knuiman BA, Weerden GM, Feron R, Derksen J, Mariani C.** 2004. The PELP III glycoproteins in Solanaceae: stylar expression and transfer into pollen tube walls. *Sexual Plant Reproduction* **16**, 245–252.
- Hancock CN, Kent L, McClure B.** 2005. The 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal* **43**, 716–723.
- Heath RL, Barton PA, Reid GEM, Lim G, Anderson MA.** 1995. Characterization of the protease processing sites in a multidomain proteinase inhibitor precursor from *Nicotiana glauca*. *European Journal of Biochemistry* **230**, 250–257.
- Heath RL, McDonald G, Christeller JT, Lee M, Bateman K, West J, van Heeswijk R, Anderson MA.** 1997. Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance resistance to insect pests. *Journal of Insect Physiology* **43**, 833–842.
- Herrero M, Dickinson HG.** 1979. Pollen–pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *Journal of Insect Physiology* **36**, 1–18.
- Herrero M, Dickinson HG.** 1980. Ultrastructural and physiological differences between buds and mature flowers of *Petunia hybrida* prior to the following pollinations. *Planta* **148**, 138–145.
- Holwerda BC, Padgett HS, Rogers JC.** 1992. Proaleurain vacuolar targeting is mediated by short contiguous peptide interactions. *The Plant Cell* **4**, 307–318.
- Hou W-C, Lin Y-H.** 1998. Activity staining on polyacrylamide gels of trypsin inhibitors from leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) varieties. *Electrophoresis* **19**, 212–214.
- Johnson DJ, Miller EA, Anderson MA.** 2006. Dual location of a family of proteinase inhibitors within the stigmas of *Nicotiana glauca*. *Planta* **225**, 1265–1276.
- Johnson MA, Preuss D.** 2003. On your mark, get set, grow! LePRK2–LAT52 interactions regulate pollen tube growth. *Trends in Plant Science* **8**, 97–99.
- Juárez-Díaz JA, 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-RNases *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 3418–3424.
- Kao TH, Tsukamoto T.** 2004. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell* **16**, S72–S83.
- Kim S, Mollet J-C, Dong J, Zhang K, Park S-Y, Lord EM.** 2003. Chemocyanin, a small, basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**, 16125–16130.
- Kuboyama T.** 1998. A novel thaumatin-like protein gene of tobacco is specifically expressed in the transmitting tissue of stigma and style. *Sexual Plant Reproduction* **11**, 251–256.
- Kuboyama T, Yoshida KT, Takeda G.** 1997. An acidic 39-kDa protein secreted from stigmas of tobacco has an amino-terminal motif that is conserved among thaumatin-like proteins. *Plant and Cell Physiology* **38**, 91–95.
- Laemli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lee J-Y, Lee D-H.** 2003. Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in Arabidopsis pollen undergoing cold stress. *Plant Physiology* **132**, 517–529.
- Lee MCS, Scanlon MJ, Craik DJ, Anderson MA.** 1999. A novel two-chain proteinase inhibitor generated by circularization of a multidomain precursor protein. *Nature Structural Biology* **6**, 526–530.
- Leung DWM.** 1992. Involvement of plant chitinase in sexual reproduction of higher plants. *Phytochemistry* **31**, 1899–1900.
- Lord EM, Sanders LC.** 1992. Roles of the extracellular matrix in plant development and pollination: a special case of cell movement in plants. *Developmental Biology* **153**, 16–28.
- Lu Z, Szafron D, Greiner R, Lu P, Wishart DS, Poulin B, Anvik J, Macdonell C, Eisner R.** 2004. Predicting subcellular localization of proteins using machine-learned classifiers. *Bioinformatics* **20**, 547–556.
- McCormick S, Twell D, Vancanneyt G, Yamaguchi J.** 1991. Molecular analysis of gene regulation and function during male gametophyte development. In: Jenkins GI, Schuch W, eds. *Molecular biology of plant development*. London: Company of Biologists, 229–244.
- MacKenzie CJ, Bong YY, Seabrook JEA.** 1990. Stigma of *Solanum tuberosum* cv Shepody: morphology, ultrastructure and secretion. *American Journal of Botany* **77**, 1111–1124.
- Matsuoka K.** 2000. C-terminal propeptides and vacuolar sorting by BP-80-type proteins: not all C-terminal propeptides are equal. *The Plant Cell* **12**, 181–182.
- Matsuoka K, Nakamura K.** 1999. Large alkyl side chains of isoleucine and leucine in the NPIRL region constitute the core of the vacuolar sorting determinant of sporamin precursor. *Plant Molecular Biology* **41**, 825–835.
- McClure B, Franklin-Tong V.** 2006. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanism involved in ‘self’ pollen tube inhibition. *Planta* **224**, 233–245.
- McClure BA, Gray JE, Anderson MA, Clarke AE.** 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* **347**, 757–760.
- McClure BA, 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, USA* **96**, 13548–13553.
- Miller EA, Lee MCS, Atkinson AHO, Anderson MA.** 2000. Identification of a novel four-domain member of the proteinase inhibitor II family from the stigmas of *Nicotiana glauca*. *Plant Molecular Biology* **42**, 329–333.
- Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA.** 1994. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes S allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**, 563–566.
- Murfett J, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure BA.** 1996. S-RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *The Plant Cell* **8**, 943–958.
- Muschietti J, Dircks L, Vancanneyt G, McCormick S.** 1994. LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *The Plant Journal* **6**, 321–338.
- Mutschler MA, Liedle BE.** 1994. Interspecific crossing barriers in *Lycopersicon* and their relationship to self-incompatibility. In: Williams EG, Clarke AE, Knox RB, eds. *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 164–188.

- Myers E, Miller W.** 1988. Optimal alignments in linear space. *Computer Applications in the Biosciences* **4**, 11–17.
- Nielsen H, Krogh A.** 1998. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6)*. Menlo Park, CA: AAAI Press, 122–130.
- Nieuwland J, Feron R, Huisman BAH, Fasolino A, Hilbers CW, Derksen J, Mariani C.** 2005. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco W. *The Plant Cell* **17**, 2009–2019.
- O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, Matton DP.** 2002. Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *The Plant Journal* **32**, 985–996.
- Ono E, Hatayama M, Isono Y, et al.** 2006. Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *The Plant Journal* **45**, 133–143.
- Park KS, Cheong JJ, Lee SJ, Suh MC, Choi D.** 2000. A novel proteinase inhibitor gene transiently induced by tobacco mosaic virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta* **1492**, 509–512.
- Park SY, Jauh G-Y, Mollet J-C, Eckard KJ, Nothnagel EA, Walling LL, Lord EM.** 2000. A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *The Plant Cell* **12**, 151–163.
- Park S-Y, Lord EM.** 2003. Expression studies of SCA in lily and confirmation of its role in pollen tube adhesion. *Plant Molecular Biology* **51**, 183–189.
- Pezzotti M, Feron R, Mariani C.** 2002. Pollination modulates expression of the PPAL gene, a pistil-specific β -expansin. *Plant Molecular Biology* **49**, 187–197.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ.** 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal* **378**, 705–716.
- Saalbach C, Rosso M, Schumann U.** 1996. The vacuolar targeting signal of the 2s albumin from Brazil nut resides at the C terminus and involves the C-terminal propeptide as an essential element. *Plant Physiology* **112**, 975–985.
- Schultz CJ, Hauser K, Lind JL, Atkinson AH, Pu ZY, Anderson MA, Clarke A.** 1997. Molecular characterization of a cDNA sequence encoding the back-bone of a style-specific 120 kDa glycoprotein which has features of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant Molecular Biology* **35**, 833–845.
- Takayama S, Isogai A.** 2005. Self-incompatibility in plants. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 467–489.
- Tang W, Ezcurra I, Muschietti J, McCormick S.** 2002. A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2. *The Plant Cell* **14**, 2277–2287.
- Tang W, Kelley D, Ezcurra I, Cotter R, McCormick S.** 2004. LeSTIG1, an extracellular binding partner for the pollen receptor kinases LePRK1 and LePRK2, promotes pollen tube growth *in vitro*. *The Plant Journal* **39**, 343–353.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**, 4876–4882.
- Twell D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick S.** 1989. Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Molecular and General Genetics* **217**, 240–245.
- Verhoeven T, Feron F, Wolters-Arts M, Edqvist J, Gerats T, Derksen J, Mariani C.** 2005. STIG1 controls exudate secretion in the pistil of *Petunia* and tobacco. *Plant Physiology* **138**, 153–160.
- Von Heijne G.** 1990. The signal peptide. *Journal of Membrane Biology* **115**, 195–201.
- Wu H-m, Wang H, Cheung AY.** 1995. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* **83**, 395–403.
- Wu H-m, Wong E, Ogdahl J, Chueung AY.** 2000. A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana alata* is similar to the tobacco TTS protein. *The Plant Journal* **22**, 165–176.
- Xie D, Li A, Wang M, Fan Z, Feng H.** 2005. LOCSVMPSI: a web server for subcellular localization of eukaryotic proteins using SVM and profile of PSI-BLAST. *Nucleic Acids Research* **33**, W105–W110.
- Zavala JA, Patankar AG, Gase K, Hui D, Baldwin IT.** 2004. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiology* **134**, 1181–1190.