



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CLONACION Y CARACTERIZACION
MOLECULAR DE *StEP* DE
Nicotiana rastroensis Y *Solanum sp*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JESÚS IGNACIO CISNEROS
SEGURA



MEXICO, D. F.

2010



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.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Marisol López López

Vocal: Prof. Luz del Carmen Castellanos Román

Secretario: Prof. Felipe Cruz García

1er. Suplente: Prof. Norma Trejo Medina

2° suplente: Prof. José Ignacio Paramo Ramírez

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 104, edificio E,
Facultad de Química, UNAM

Asesor: Dr. Felipe Cruz García

Supervisor técnico: M. en C. Karina Jiménez Duran

Sustentante: C. Jesús Ignacio Cisneros Segura

La tesis se llevo a cabo con el apoyo de CONACYT con los proyectos No. 102142, 81968, DGAPA y PAIP-FQ con los proyectos No. IN205009 y 629015 respectivamente. Del mismo modo, con la Cátedra *Fernando Orozco Díaz* otorgada por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química.

El presente trabajo lo dedico a todas aquellas personas que estuvieron a mi lado y me apoyaron para que lograr a culminar con esta etapa profesional de mi vida, en especial:

A mi Abuelo, Erasmo Cisneros, quien con sus consejos, correcciones y constantes alientos, formaron desde pequeño un deseo inquebrantable de progreso.

A mis padres, Mercedes Segura y José I. Cisneros, por su gran apoyo y paciencia que me han brindado desde la niñez y que ha rendido frutos al cumplir esta valiosa etapa de la vida.

Con amor a Karla González, mi compañera, amiga y pareja, que ha estado a mi lado brindándome su apoyo, su confianza, su tiempo y consejo. Le agradezco su sincera compañía y amor que ayudo a que este sueño se pudiera cumplir.

A mis grandes amigos de la "Barda": Paloma, Griselda, Paulina (Pachis), Azalia, Ximena, amigas con las que he tenido una gran confianza, gracias por los grandiosos episodios que compartieron conmigo.

A Francisco (Panda), David (Miss), Odín (Chino), Roberto (Stimpy), Jorge (Super), Salvador (Chava), Oscar (Duende), Ulises (Chabelo) y Omar, con quienes pase inigualables, inolvidables e innumerables momentos y con quienes he contado incondicionalmente a lo largo de nuestro camino por la Facultad.

A mis amigos del laboratorio 104, Karina, Alejandra, Claudia, Alex, Yuridia, Goyo, Javier A. Liliana, Carolina y Normita. Quienes me instruyeron en diversos temas y que disfrute convivir, desde el congreso de Veracruz hasta los seminarios del laboratorio.

A los amigos de con quienes compartí materias en la facultad: Vera Teresa, amiga que desde la preparatoria disfrutamos increíbles momentos, Alejandra C. y Susana F., grandes amigas que son muy especiales y que sin ellas la clases hubieran sido muy tranquilas, Marcela F., José O., Sin olvidar en las clases de Ingeniería Química a Dulce, Maribel, Mariana, Bustillos y Oscar.

A los profesores que en verdad lograron transmitir sus enseñanzas, no solo académicas sino compartieron grandes experiencias de la vida con la que me ayudaron a extender la visión sobre muchos aspectos: Ing. Ramón D. Betancourt, Dr. Felipe Cruz G., QFB. Raúl Garza V., Dr. Constantino L., Ing. León Coronado, Ing. Martin Rivera T. Dr. Cardoso III López M.,y al Ing. Luis T. Septien.

Sinceramente y de corazón MUCHAS GRACIAS

Jesús I. Cisneros Segura

*“Nunca se olvide que la constancia y
el estudio hacen a los hombres grandes,
y que los hombres grandes son el porvenir de su patria”*

Benito Juárez García.
Benemérito de las Américas.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción:	2
2.1 Reproducción Sexual en Plantas	2
2.2 Reproducción Sexual en Angiospermas	2
2.3 Anatomía de la Flor.	3
2.4 Polen.....	4
2.5 Estigma.....	8
2.6 Adhesión del polen al estigma.	8
2.7 Hidratación del Polen.....	9
2.8 Desarrollo del Tubo Polínico.	10
2.9 Crecimiento del Tubo Polínico	11
2.10 Incompatibilidad en Plantas	13
2.10.1 Autoincompatibilidad Esporofítica (AIS)	16
2.10.2 Autoincompatibilidad en <i>Brassica</i>	16
2.10.3 Autoincompatibilidad Gametofítica	19
2.10.4 Autoincompatibilidad Gametofítica en la familia Papaveraceae	19
2.10.5 Incompatibilidad en Solanaceae	22
2.11 Genes Modificadores.	25
2.12 Mecanismos de inhibición del polen S-haplotipo-especifico	27
2.13 Antecedentes Inmediatos.	34
3. Objetivos.....	36
3.1 Objetivo General.....	36
3.2 Objetivos Particulares.....	36
4. Materiales y Métodos.....	37
4.1 Amplificación de la región codificante para el gen <i>StEP</i> en <i>Nicotiana rastroensis</i>	37
4.2 Amplificación por PCR del gen <i>StEP</i>	38
4.3 Clonación del gen <i>StEP</i>	39
4.4 Secuenciación.	43
4.5 Análisis Bioinformático.....	43
4.6 Identificación de la expresión de <i>StEP</i> en <i>N. rastroensis</i> y de <i>Solanum sp.</i>	43
4.7 Localización celular de <i>StEP</i> en <i>N. rastroensis</i>	45
5. Resultados.....	47
5.1 Amplificación del cDNA de <i>StEP</i> a partir de <i>N. rastroensis</i>	47
5.2 Clonación del gen <i>StEP</i>	49
5.3 Secuenciación y análisis Bioinformático de <i>StEP</i>	50
5.4 Evaluación de la homología de la secuencia obtenida	50
5.6 Identificación de la localización de <i>StEP</i> en <i>N. rastroensis</i>	58
5.7 Identificación de la localización de <i>StEP</i> en <i>Solanum sp.</i>	60
5.8 Identificación de la presencia de <i>StEP</i> en diferentes etapas de desarrollo del pistilo de <i>N. rastroensis</i>	61
5.9 Identificación celular de <i>StEP</i>	63
6. Discusión.....	69
7. Conclusiones.	71
8. Bibliografía:.....	72
9. Apéndice.....	81

RESUMEN

1. Resumen

Clonación y caracterización molecular de StEP de *Nicotiana rastroensis* y de *Solanum sp.*

Varias especies de angiospermas previenen la autofecundación para evitar los efectos deletereos de la endogamia y promover al mismo tiempo la diversidad genética. Este proceso ocurre porque presentan un sistema de reconocimiento y rechazo del polen propio que se conoce como el sistema de incompatibilidad (SI). En varias familias el SI está controlado por el locus multialélico S, el cual determina la especificidad del reconocimiento tanto en la parte masculina (grano de polen) como en la femenina (pistilo).

En la familia Solanaceae, el SI es gametofítico. La determinante femenina codifica para una ribonucleasa específica del pistilo, denominada S-RNasa; mientras que la determinante masculina codifica una proteína específica del polen con una caja F, llamada SLF. El rechazo del polen ocurre cuando las determinantes de la especificidad del mismo haplotipo interactúan físicamente en el citoplasma del tubo polínico. Sin embargo, además de las determinantes de especificidad se requiere de genes modificadores, tanto del pistilo como del polen para que el rechazo del polen ocurra.

En nuestro grupo se clonó al GM *NaStEP*, el cual codifica para una proteína con homología a inhibidores de proteasas tipo Kunitz. Tanto el transcrito, como la proteína *NaStEP* tienen una expresión y localización específica en el estigma donde se almacena en las vacuolas de sus células papilares. Cuando los estigmas son polinizados *NaStEP* se libera al exudado estigmático, donde interactúa con los tubos polínicos. Experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana*, indican que *NaStEP* es un gen esencial en el rechazo del polen en Solanáceas. A pesar de la relevancia de nuestros hallazgos, es todavía necesario comprobar si StEP funciona de igual manera en otras especies de la familia Solanaceae. Si es así, se establecería que en esta familia este gen es importante como factor del pistilo que participa en el control del reconocimiento y rechazo del polen. De esta manera, el objetivo de esta investigación fue clonar y caracterizar molecularmente al gen *StEP* de *Nicotiana rastroensis* y de *Solanum sp.*

La clonación de *StEP* se hizo por RT-PCR a partir de RNA de pistilos de *N. rastroensis*. La secuencia de *StEP* en esta especie muestra que a nivel de proteína hay un 86 % de similitud con la de *N. alata*. Para determinar la distribución de *StEP* en diferentes órganos de la planta y etapas de desarrollo, se realizó un inmunoanálisis mediante ensayos tipo WesternBlot. Los resultados indicaron que la proteína *StEP* se expresa solo en el pistilo de *N. rastroensis* desde etapas tempranas de su desarrollo. Asimismo, estudios de inmunolocalización en estilos de esta especie indicaron que *StEP* localiza en las células papilares del estigma. Por otra parte, el inmunoanálisis demostró que en *S. lycopersicum* existen proteínas con un epítipo y una masa molecular aparente similar a la de *NaStEP*, las cuales se detectaron en otros órganos de la planta además del pistilo. A partir de estos datos y en conjunto con otros obtenidos en nuestro grupo, proponemos un modelo de acción de *StEP* en el rechazo del polen en *Nicotiana*.

INTRODUCCIÓN

2. Introducción

2.1. Reproducción Sexual en Plantas

Mientras que en los animales la reproducción involucra a dos sujetos generalmente, las plantas no se ven limitadas por tal condición. Las plantas pueden llevar a cabo dos tipos de reproducción: sexual y asexual. En la reproducción asexual los descendientes son una copia genética exacta de los padres; mientras que en la reproducción sexual los hijos son el producto de la contribución genética de ambos progenitores. En algunas plantas no es necesaria la participación de dos individuos, ya que son hermafroditas y se pueden auto-fecundar (Zinkl, 2002).

La reproducción sexual ocurre cuando dos células haploides formadas a través del proceso de meiosis, se fusionan para formar un cigoto diploide, el cual formará un embrión diploide. La reproducción sexual puede ser **Oogámica** o **Isogámica**. La primera es heterospórica, y se encuentra en todas las plantas con semilla. En este tipo de reproducción se presenta un gameto femenino llamado **meogoespora** y otro masculino mucho más pequeño y móvil que es el esperma o **microespora**. La reproducción Oogámica incluye la homospórica en la que la planta solo produce un solo tipo de espora bisexual, este comportamiento se observa en muchos helechos. Por último en la reproducción isogámica se encuentran algunas variedades de algas, y es característica de esta variante que entre los gametos no haya una distinción morfológica evidente (Zinkl, 2002).

2.2. Reproducción Sexual en Angiospermas

Las angiospermas comprenden una parte importante del reino de las plantas con las que la humanidad ha tenido mucho contacto a lo largo de la historia, ya que son fuente de alimentos, fármacos y materiales de construcción, lo que promueve una gran actividad económica en torno a ellas (Chase 2001).

La reproducción sexual está dada por la interacción de los dos gametos, el masculino (polen) y el femenino (saco embrionario). Cuando el grano de polen se

Introducción

deposita en la superficie receptiva del estigma se llama **polinización**, mientras que cuando se fusionan los núcleos de ambos gametos se llama **fecundación** (Zinkl, 2002).

Este tipo de reproducción es altamente selectivo. Los tejidos femeninos son capaces de discriminar entre los granos de polen, reconociendo sólo los de especies apropiadas y rechazando los de especies no relacionadas. Esta selectividad es acompañada por una gran diversidad en las superficies celulares de las estructuras reproductivas femeninas y masculinas (Edlund *et al.*, 2004)

2.3. Anatomía de la Flor.

Las angiospermas están caracterizadas por la presencia de la flor, la cual está constituida por cuatro verticilos iniciando por la base:

- Sépalos
- Pétalos
- Androceo
- Gineceo

Los sépalos forman el cáliz mientras que la suma de todos los pétalos es conocida como corola. Debido a que no son necesarios para la reproducción corresponden a los verticilos no sexuales y juntos son conocidos como el Perianto. Los verticilos sexuales son el Gineceo y el Androceo. El Gineceo está formado por los carpelos, y cada carpelo generalmente posee un estigma, estilo y ovario. El estigma, es la superficie receptiva en donde se depositan los granos de polen. El estilo, es una masa sólida de tejido que divide el estigma del ovario y es por donde crecen los tubos polínicos para llegar al ovario donde se localizan los óvulos o megasporas (Figura 1) (Zinkl, 2002).

El androceo es un conjunto de estambres. Cada estambre está formado por un filamento y una antera (Figura 1).

Introducción

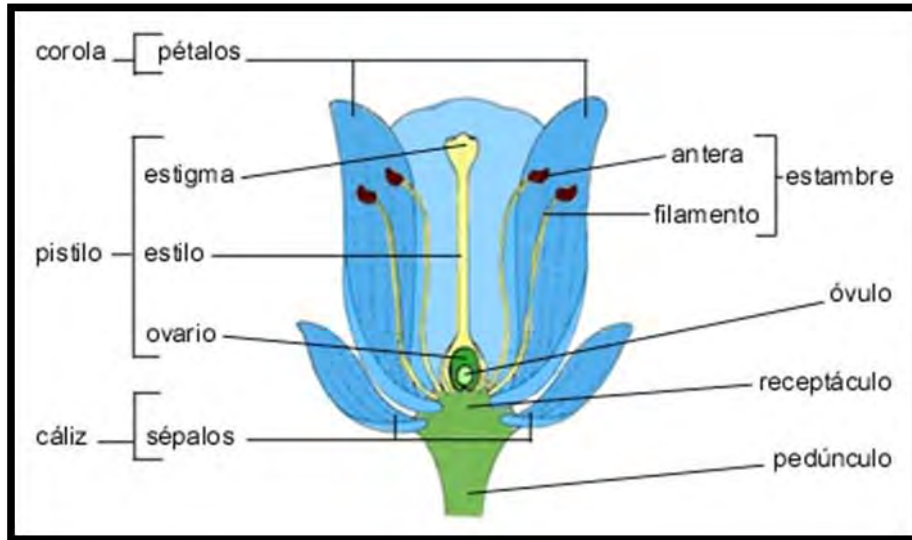


Figura 1. Diagrama de la Flor, donde se muestran las distintas partes que la conforman. Imagen tomada de <http://regularsolamente.blogspot.com/>

2.4. Polen

El polen es producido dentro de las anteras de la flor, donde madura conteniendo los productos de la expresión génica esporofítica, proveniente de la capa del tapete de la pared de la antera y la expresión génica gametofítica, dado por el núcleo vegetativo y por el núcleo de la célula generatriz (Taylor y Hepler, 1997).

Dos distintas y sucesivas fases de desarrollo, conducen a la producción de microgametofitos maduros, éstas son: **Microesporogénesis** y la **Mircrogametogénesis** (Twell, 2001).

Durante la microesporogénesis, los miroesporocitos, que son células diploides sufren meiosis, produciendo cuatro microesporas unicelulares haploides (Figura 2) (Twell, 2001).

Por otra parte, la microgametogénesis comprende los eventos que conducen al desarrollo progresivo del microgametofito maduro que contiene los gametos. Esta fase de desarrollo comprende la expansión de la microespora que comúnmente se asocia a la formación de una vacuola, la cual comienza con el desplazamiento del

Introducción

núcleo hacia la membrana de la microespora, en este momento ocurre la primera mitosis, provocando la formación de dos células distintas, una célula vegetativa grande y una célula generatriz pequeña y cada una contiene un núcleo haploide. La célula generatriz subsecuentemente se separa del polen acoplando la membrana de este último en sí, para formar una estructura única una célula dentro de otra célula. La célula generatriz embebida en la microespora se divide una vez más por mitosis para dar lugar a la formación de dos células espermáticas en el citoplasma junto con la célula vegetativa (Figura 2) (Twell, 2001).

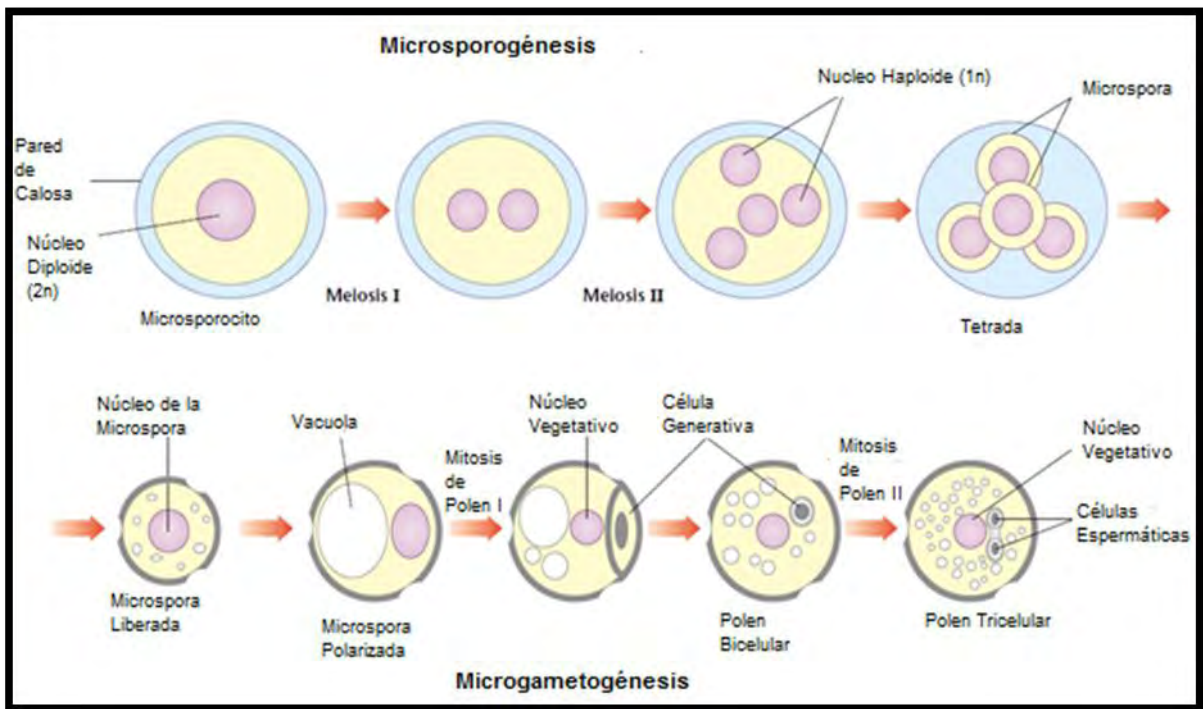


Figura 2. Diagrama de los estados morfológicos de microesporogénesis y microgametogénesis, que ocurren durante el desarrollo del polen tritelular (*Arabidopsis*). Durante la microesporogénesis el microsporocito (célula madre del polen), que está rodeada por una densa capa de calosa ($\beta(1-3)$ glucano), y sufre una división meiótica para así obtener cuatro núcleos haploides en un mismo citoplasma. La citocinesis, es simultánea, produciendo el mismo número de microesporas haploides en un arreglo tetraédrico. Durante la microgametogénesis las microesporas son liberadas dentro de la antera, mediante la disolución de la capa de calosa, momento en el cual, por dos divisiones mitóticas, Mitosis de Polen I y Mitosis de Polen II, se produce un grano de polen maduro tritelular. Imagen modificada de Twell, 2001.

Introducción

La fase progámica de desarrollo comienza con la deshidratación del grano de polen antes de ser dispersado en el ambiente. Posteriormente, cuando caen en un estigma apropiado, la reserva de RNA, proteínas y pequeñas moléculas bioactivas permiten una rápida germinación y la salida de los tubos polínicos, los cuales penetran y crecen dentro del estilo (Taylor y Hepler, 1997).

La deshidratación usualmente ocurren justo antes de la antesis, induciendo de forma metabólica un estado quiescente, el cual le confiere cierta tolerancia al estrés ocasionado por su medio ambiente, ya sea dispersado por el agua, el viento, los insectos o los animales, y que en ciertos casos es necesario para la viabilidad y posterior germinación (Taylor y Hepler, 1997).

Principales componentes del Polen.

Los componentes del polen involucrados en la germinación son:

- **Cubierta:** formada por diversas moléculas en su superficie las cuales entran en contacto con el estigma para su adhesión y su posterior germinación. Está formada por dos capas distinguibles de afuera hacia adentro, la exina y la intina (Taylor y Hepler, 1997). Los orígenes de estas dos barreras son distintos. La intina es depositada durante el desarrollo de la microespora haploide (Zinkl, 2002), ya que la síntesis de esta capa está bajo control de la expresión de genes gametofíticos del núcleo haploide de estas microesporas. La intina está compuesta mayoritariamente por pectina y celulosa. La exina está formada por esporopolenina, el cual es un polímero altamente resistente a base de esteres carotenoides (Figura 3). Esta capa se desarrolla por la contribución temprana de las microesporas y del tapete, que juega un papel importante en la incorporación de escoporopolenina en la superficie del grano de polen, por lo que la síntesis de esta capa tiene un control esporofítico (Twell, 2001).

Introducción

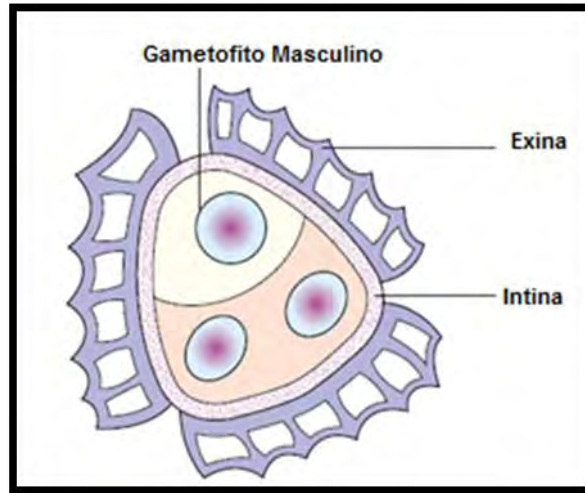


Figura 3. Estructura del Grano de Polen, donde se aprecian las capas que lo forman, una Interna constituida por intina y otra externa compuesta por la exina. Imagen modificada de Ingrouille, 2002.

- Ceras: Este tipo de moléculas se ha encontrado que participan en el reconocimiento célula-célula necesaria para la hidratación del grano de polen al contacto con el estigma (Taylor y Hepler, 1997).
- Oleosinas: Son proteínas que se encuentran asociadas con cuerpos grasos y que confieren estabilidad (Taylor y Hepler, 1997).
- Flavonoides: son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua se ha descubierto un importante rol en la fertilidad del polen. Son sintetizados en el tapete por lo que su origen es esporofítico con un posterior desarrollo gametofítico. Su función es estimular el desarrollo del tubo polínico (Taylor y Hepler, 1997).

2.5. Estigma

Esta estructura se encarga de la captura del polen, su soporte, hidratación y germinación, así como ser la entrada y guía a los tubos polínicos hacia los ovarios. Los estigmas no solo discriminan entre diferentes tipos de polen, ya que también pueden evitar la autopolinización.

Los estigmas maduros presentan en su superficie secreciones y enzimas requeridas para la polinización y también cuenta con carbohidratos como galactosa, manosa, glucosa y arabinosa (Clarke *et al.*, 1979).

Se pueden encontrar dos tipos de estigmas, **húmedos y secos**. Los estigmas húmedos regularmente están envueltos en exudados de las células estigmáticas y bloquean la polinización inapropiada. Mientras que los estigmas secos poseen sitios de recepción selectivos al polen donde les dan el soporte necesario para su hidratación y germinación (Edlund *et al.*, 2004).

El contacto entre el polen y el estigma y la fusión de las capas de cada uno, desencadenan procesos como la hidratación, la germinación y la invasión al estigma (Edlund *et al.*, 2004).

2.6. Adhesión del polen al estigma.

La interface polen-estigma varía mucho entre especies y como resultado existe una gran variedad en la morfología y en el contenido de los exudados estigmáticos y las cubiertas del polen (Edlund *et al.*, 2004).

En *Arabidopsis* la adhesión depende de la exina del polen ya que en esta especie la captura del polen no radica en la interacción proteína-proteína, sino que está relacionada con las interacciones químicas entre la superficie del estigma y los polímeros de la exina. Después de esta adhesión, la movilización de la cubierta del polen se lleva a cabo, conduciendo a una mezcla entre lípidos y proteínas de la cubierta del polen, para formar el “pie” que entra en contacto con la superficie del estigma (Figura 4B) (Edlund *et al.*, 2004).

Introducción

En la segunda fase de adhesión se requiere de la interacción proteína-proteína, incluyendo las encontradas en la cubierta del polen como las proteínas relacionadas al locus S como sucede en *Brassica* (*SLR1*) (Luu *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000), el cual es un gen perteneciente al Locus-S que expresa una glicoproteína estigmática involucrada en la autoincompatibilidad (Figura 4A) (Lalonde *et al.*, 1989).

Con la emergencia de los tubos polínicos comienza la tercera fase, este comportamiento es muy común en plantas que tienen “estigmas húmedos”, en donde son hidratados sin que exista ningún tipo de selectividad (Wheeler *et al.*, 2001).

2.7. Hidratación del Polen

Los granos de polen al dispersarse son quiescentes y están deshidratados, con un contenido de agua entre 15 y 35%, (Heslop-Harrison, 1979., Buitink *et al.*, 2000).

La hidratación de los granos de polen en la familia *Brassicaceae* presenta dos fases, en la primera se lleva a cabo un intercambio de señales entre el grano de polen y el estigma, posteriormente en la segunda fase ocurre la invaginación de la intina en la zona del colpo, lugar de donde emergerá el tubo polínico (Taylor y Hepler, 1997). El agua inmediatamente rodea los granos de polen en los estigmas húmedos, pero en los estigmas secos se movilizan lípidos de la cubierta del polen para formar una interface entre las dos superficies. Dicha interface se convierte en una forma distinguible histoquímicamente, que promueve el flujo de agua (Elleman y Dickinson, 1986; Elleman *et al.*, 1992). Agua, nutrientes y otras pequeñas moléculas son transportadas rápidamente dentro del exudado estigmático hacia el grano de polen (estigmas húmedos) o en la papila estigmática (estigmas secos). El descubrimiento de la expresión de una acuaporina en el estigma ha llevado a la propuesta de que existen canales de agua involucrados en la regulación de la liberación del líquido en el estigma (Dixit *et al.*, 2001). En plantas con estigmas secos, la regulación de la hidratación del polen proporciona una barrera temprana

Introducción

en contra de la polinización incompatible, así el estigma podrá hidratar al grano de polen compatible, mientras que en una cruz incompatible se restringe su hidratación (Dickinson, 1995).

2.8. Desarrollo del Tubo Polínico.

La hidratación vuelve al grano de polen de una célula no polar a una altamente polarizada. Cuando emerge el tubo polínico en un estigma, los granos organizan su citoplasma y su citoesqueleto. Estos cambios ocurren en cuestión de minutos después de la hidratación, e incluye la formación de estructuras citoesqueléticas filamentosas alrededor del núcleo y del citoesqueleto polarizado, hacia el sitio de salida del tubo polínico (Tiwari y Polito, 1988; Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1992).

La evidencia de que el agua es la señal de polaridad viene de experimentos realizados en *Nicotiana*, por la inmersión de los granos de polen en lípidos purificados o exudados estigmáticos y proporcionando una interface cercana acuosa, resultando en un crecimiento polarizado hacia el medio acuoso imitando el comportamiento *in vivo*. Los tubos polínicos emergen de la apertura más cercana hacia la interface acuosa, sugiriendo que el recurso líquido provee la dirección para establecer la polaridad (Lush *et al.*, 1998; Wolters-Arts *et al.*, 1998).

Una vez que la célula ha establecido una polaridad interna relativa a la señal externa, el tubo polínico debe irrumpir en la pared de exina para emerger del grano. Dependiendo de la especie estudiada, los tubos polínicos pueden salir por una abertura o romper directamente la pared de exina. A pesar de que existe un sitio de salida, los tubos polínicos pueden requerir cualquiera de las siguientes necesidades:

- El debilitamiento por la acción de enzimas desde dentro o por fuera de la pared de exina.
- Secreción de exina ocasionada por la acción local de presión (Edlund *et al.*, 2004).

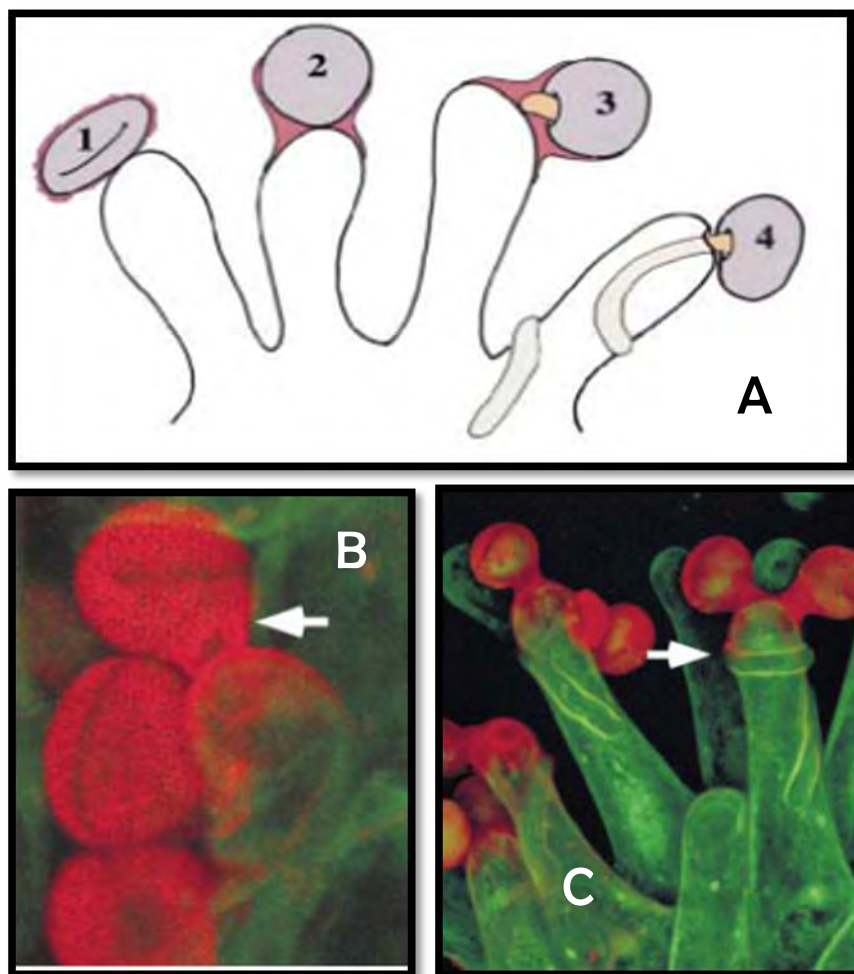


Figura 4. A) Diagrama de los primeros eventos de la interacción polen-estigma: 1) Adhesión, 2) Formación del "pie" e hidratación, 3) Salida del tubo polínico, 4) Invasión del tubo polínico hacia la superficie estigmática y su extensión a través del estilo. B) Micrografía de la formación del pie en la superficie de la papila estigmática y crecimiento del tubo polínico de la capa de exina. C) Micrografía del crecimiento de tubos polínicos a través del estilo. Imagen tomada de Edlund *et al.* (2004).

2.9. Crecimiento del Tubo Polínico

Los tubos polínicos se desarrollan dentro del pistilo a una gran velocidad cercana a los 300 nm/s *in vitro*, y teniendo como objetivo el alcanzar los óvulos que a menudo están localizados a distancias de cientos de veces del diámetro del grano de polen (Figura 4C) (Cheung y Wu, 2008).

El crecimiento del tubo polínico está caracterizado por una deposición de calosa (Figura 5), en la parte distal del frente de avance y una compartimentalización de

Introducción

protoplastos en la más próxima región de elongación del tubo polínico (Cheung y Wu, 2008).

La superficie del tubo polínico permite la rápida expansión celular en la punta y proporciona un sostén para las demandas estructurales, bioquímicas y de respuesta a señales que son necesarias para el proceso de crecimiento. El ápice es delgado y en él se encuentra la pectina, que se cree le confiere dureza pero a la vez le permite ser maleable, con lo que contribuye la rápida expansión celular. Una vez que cumple su objetivo esta pectina es esterificada mediante la enzima pectina metil-esterasa (PME) y llevada hacia la parte distal formando parte de los depósitos de calosa (Cheung y Wu, 2008).

La organización intracelular es muy dinámica y tiene un patrón con una alta estructuración. Es muy notable la gran cantidad de transporte de vesículas hacia la región apical y una apreciable red de retículos endoplásmicos y organelos biosintéticos. La actina en el citoesqueleto es esencial para el crecimiento y tráfico intracelular en los tubos polínicos (Cheung y Wu, 2008).

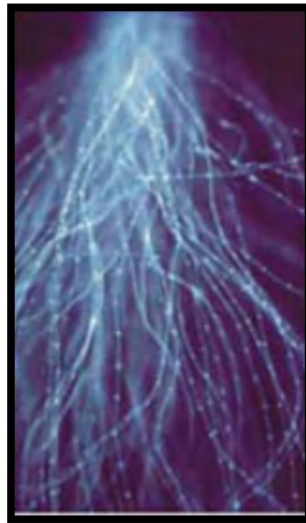


Figura 5. Crecimiento de tubos polínicos de *Nicotiana tabacum*. Con el colorante azul de anilina en los puntos brillantes se pueden observar los depósitos periódicos de calosa. Imagen tomada de Cheung y Wu, (2008).

2.10. Incompatibilidad en Plantas

La incompatibilidad es uno de los sistemas más importantes desarrollados en varias especies vegetales de angiospermas, para evitar la autopolinización y promover la diversidad genética entre especies (de Nettancourt, 2001).

Los sistemas de incompatibilidad en las plantas son categorizados en base a su morfología (Franklin-Tong y Franklin, 2007) en:

- Heteromórficos.
 - Dicogamia.
 - Hercogamia.
- Homomórficos.

Las especies con sistemas de incompatibilidad heteromórficos producen flores con diferencias morfológicas, tales como la longitud del estilo y la posición de las anteras. Esto crea una barrera física que actúa en conjunción en algunas ocasiones con barreras bioquímicas para prevenir la autopolinización, así como la maduración diferencial de los órganos sexuales (Franklin-Tong y Franklin, 2007).

Por otro lado las especies con sistemas de incompatibilidad homomórficos, tienen flores que son indistinguibles morfológicamente y son agrupadas generalmente en base al control genético de su fenotipo de autoincompatibilidad del polen, diferenciando entre dos grupos principales Gametofíticos y Esporofíticos (Sims, 1993, Newbigin *et al*, 1993).

Se calcula que la autoincompatibilidad (AI) ocurre entre un 30 y 50 % de las plantas con flores. Varios sistemas de AI se han descrito y en todos los casos están involucrados el polen y pistilo a través de un reconocimiento altamente específico y genéticamente controlado, el que deriva en un mecanismo por el cual existe la inhibición selectiva de la germinación del polen en el estigma, o del desarrollo del tubo polínico en el pistilo con los mismos caracteres génicos. La discriminación del polen es controlado por una región en el DNA altamente polimórfica llamada locus-S (Zhang *et al.*, 2009). El rechazo del polen sucede

Introducción

cuando el mismo alelo-S es expresado tanto en el polen como en el pistilo. Este mecanismo se lleva a cabo por interacciones proteína-proteína, entre proteínas del estilo y del tubo polínico (Franklin-Tong y Franklin, 2007).

En el locus *S* existen al menos dos genes fuertemente ligados; uno de ellos codifica a la determinante masculina y el otro para la determinante femenina. Las variantes de este complejo génico son llamadas “haplotipos *S*” (Takayama e Isogai, 2005).

Las determinantes de especificidad (masculina y femenina) fueron primero identificadas en la familia Brassicaceae y en posteriormente en familias como Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae (Takayama e Isogai, 2005).

La interacción entre una determinante femenina S_1 con una masculina S_1 es considerada incompatible, mientras que una entre diferentes haplotipos es compatible (Figura 6).

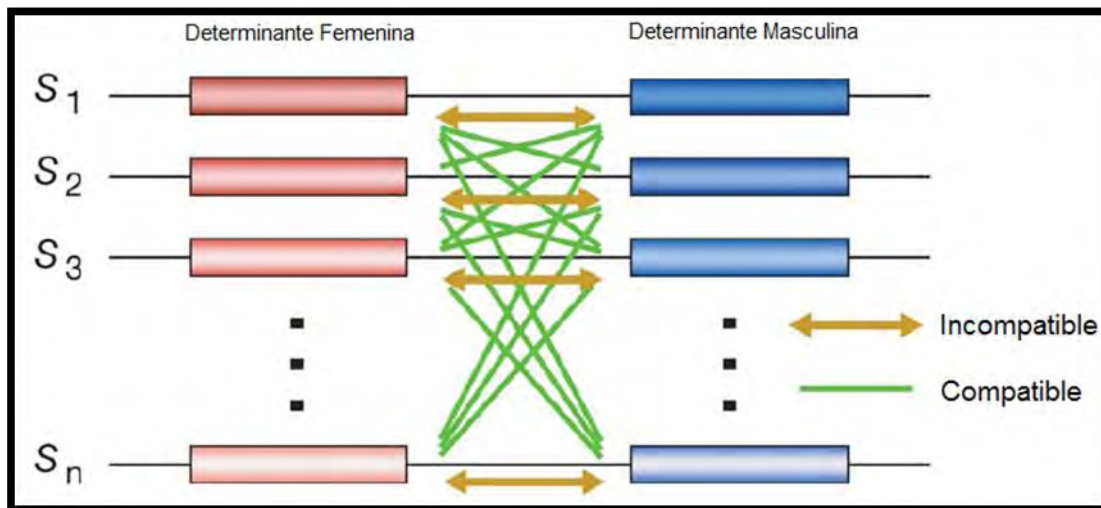


Figura 6. La interacción de las dos determinantes ubicadas dentro del Locus-S, puede conducir a una respuesta de incompatibilidad si las variantes (haplotipos) son los mismos. Las líneas verdes muestran interacciones compatibles mientras que las flechas doradas indican interacciones incompatibles. Imagen Modificada de Takayama e Isogai,(2005).

Introducción

Existen dos tipos de control genético de la AI, la gametofítica (AIG) y la esporofítica (AIE) (Figura 7). El fenotipo de AI en AIG está determinado por el genoma haploide proveniente del gametofito, mientras que en la AIE es determinada por el esporofito durante la formación del grano de polen en la antera (Franklin-Tong y Franklin, 2007).

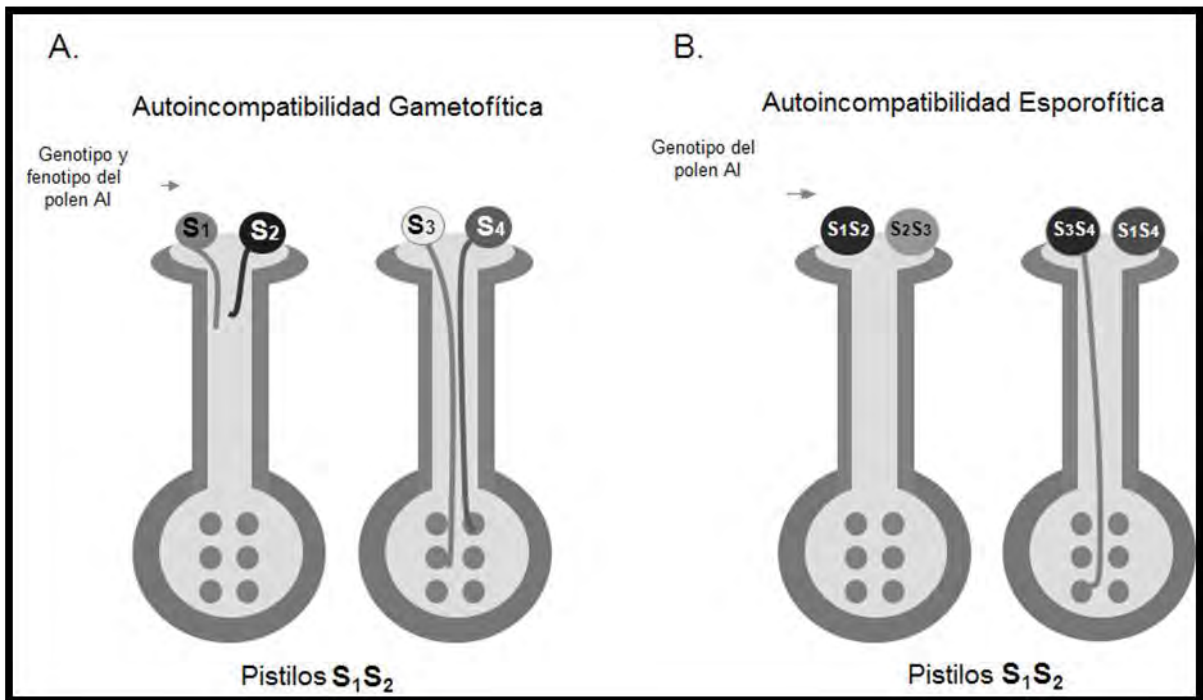


Figura 7. A) Autoincompatibilidad Gametofítica, si los haplotipos-S haploides del polen son idénticos a los pertenecientes al del pistilo, el polen se rechaza (S₁,S₂), en caso de ser diferente (S₃,S₄) la germinación y fertilización es posible. B) La autoincompatibilidad esporofítica, está determinada por el haplotipo-S diploide adquirido por el polen durante su desarrollo en la antera. En este modelo se asume codominancia, por lo que si un alelo empata con alguno del pistilo (S₁, S₂), el polen es rechazado, en caso de ser diferente el polen germina y puede fecundar el óvulo. Imagen modificada de Hernández-Navarro *et al.*, 2009.

2.10.1. Autoincompatibilidad Esporofítica (AIS)

Este mecanismo se presenta en especies como *Brassica sp.*, *Ipomoea trifida* y *Senecio squalidus* (Franklin-Tong y Franklin., 2007). La característica de este tipo de autoincompatibilidad es que mantiene una relación con la dominancia que presente, así podemos separar en:

- Clase 1 a los haplotipos que presentan un fenotipo fuerte de autoincompatibilidad y que generalmente son dominantes o codominantes,
- Clase 2 haplotipos que son recesivos con un fenotipo de autoincompatibilidad más débil (Franklin-Tong y Franklin, 2007).

La reacción de autoincompatibilidad resulta en el bloqueo de la hidratación del grano de polen, o en su defecto en una rápida detención del desarrollo del tubo polínico sobre la superficie estigmática (Takayama e Isogai, 2005).

2.10.2. Autoincompatibilidad en Brassica

Determinante Femenina

El locus-S codifica para dos unidades transcripcionales dentro de la determinante femenina. Una de ellas es la proteína SLG (*S-locus glycoprotein*), que es una glicoproteína estigmática, cercana a los 60 kDa, esta proteína posee varios sitios de unión a oligosacáridos y doce residuos de cisteínas altamente conservados (Nasrallah *et al.*, 1987, Takayama *et al.*, 1987). Su descubrimiento condujo a la identificación del otro gen del locus-S, denominado SRK (*S-locus receptor kinase*) que codifica para un receptor S transmembranal de 120 kDa con actividad de serina/treonina cinasa, en su región citoplasmática, la cual pertenece a una familia grande de receptores tipo cinasas en plantas (Stein *et al.*, 1991). Estos dos elementos forman un complejo durante la reacción de incompatibilidad provocando la inhibición de la germinación del grano de polen (Silva *et al.*, 2001).

Las proteínas, SLG y SRK son sintetizadas exclusivamente en las células de la papila estigmática. La expresión de ambas ocurre justo antes de la antesis, la que

Introducción

coincide con la adquisición de la incompatibilidad. SRK presenta una gran diversidad alélica (Takayama e Isogai, 2005). Los estudios indican que SRK por sí sola, determina la especificidad de la reacción del rechazo del polen en el estigma, mientras que SLG solo aumenta la actividad de SRK en algunas especies de *Brassica* (Takayama e Isogai, 2005).

Determinante Masculina

La determinante masculina codifica una proteína de alrededor de 10 kDa que se localiza en la superficie del polen y es llamada **SP11** (S-locus protein 11) o **SCR** (S-locus cysteine-rich) (Schopfer *et al.*, 1999, Suzuki *et al.*, 2000., Takayama *et al.*, 2000).

Estudios de hibridaciones *in situ*, señalan que *SP11/SCR* se expresa tanto esporofíticamente en las células del tapete de la antera como gametofíticamente en las microesporas. De hecho, lo que se sugiere es que *SP11/SCR* es secretada de las células de la antera y translocada a la superficie del polen (Takayama *et al.*, 2000).

La interacción física de ambas determinantes en la reacción de autoincompatibilidad provoca la autofosforilación de SRK en la membrana de las células papilares del estigma. La fosforilación de SRK conduce a una serie de reacciones que culminan en el rechazo del polen incompatible (Figura 8) (Takayama *et al.*, 2000).

Además de las determinantes de especificidad, existen otras proteínas involucradas en la respuesta de autoincompatibilidad. Una de ellas fue encontrada mediante ensayos de doble híbrido en levaduras y se conoce como **ACR1** (Armadillo-repeat-containing 1). Esta proteína se sintetiza en el estigma y su delección provoca la pérdida parcial de la respuesta de autoincompatibilidad (Gu T *et al.*, 1998; Muzzurco. *et al.*, 2001). La otra proteína es **MLPK** (*M* locus protein kinase), esta proteína también se localiza en la membrana de la célula de la papila estigmática, posiblemente interacciona con la enzima ligasa E3 de la cascada de

Introducción

ubiquitinación, vía que está involucrada en el rechazo del polen incompatible (Stone *et al.*, 1999 2003)

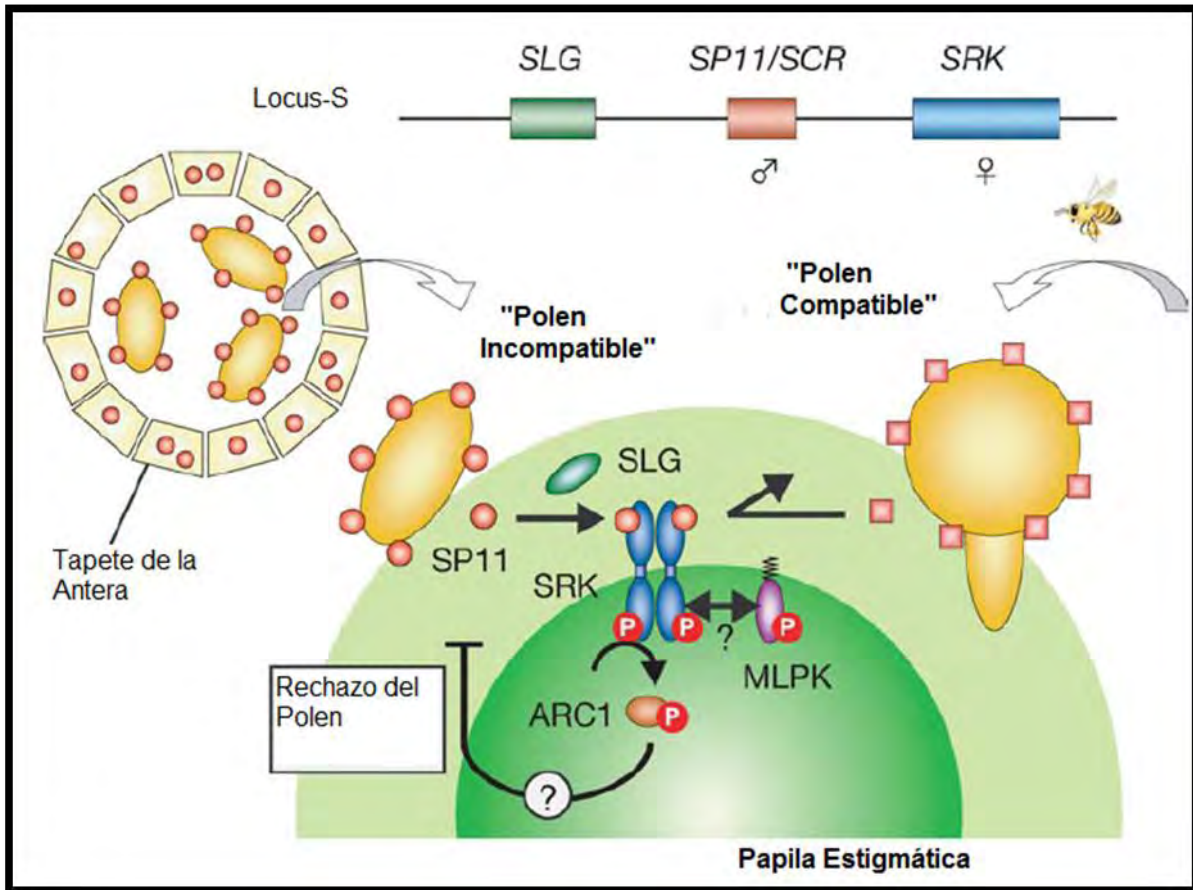


Figura 8. Modelo de autoincompatibilidad en la familia Brassicaceae. El Locus-S está formado por tres genes *SRK*, *SP11* y *SLG*. *SRK*, es la determinante femenina y tiene un papel de receptor transmembranal de las células de la papila estigmática. *SP11*, que es la determinante masculina, se expresa predominantemente en el tapete de la antera y se deposita en el polen mientras se lleva a cabo su proceso de maduración. En la polinización estas dos determinantes interactúan de manera específica, provocando la autofosforilación de *SRK* y provocando una cascada de señalización que termina en el rechazo del polen incompatible. Por otro lado *SLG*, está ubicado en la pared de la célula estigmática, no es fundamental en la reacción de AI, pero en algunos haplotipos, aumenta la respuesta AI. Dentro de la cascada de señales, están involucradas *MLPK* y *ARC1*, las cuales están localizadas en la membrana de la célula de la papila estigmática, siendo integrantes del complejo *SRK*. Se piensa que *ARC1* interactúa con la enzima 3(E3) de la vía de Ubiquitinación suponiendo que este proceso deriva en el rechazo del polen. Imagen Modificada de Takayama e Isogai, 2005.

2.10.3. Autoincompatibilidad Gametofítica

Esta forma de autoincompatibilidad se encuentra catalogada dentro de los sistemas homomórficos, y se ha encontrado que a lo largo del tiempo ha variado debido a que al menos dos distintos mecanismos de AIG se han reportado. El primero de ellos es el sistema de la S-RNasa, el cual fue encontrado en miembros de las familias Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae. La S-RNasa degrada el RNA del polen inhibiendo el crecimiento del tubo polínico. El segundo mecanismo es el reportado en la familia Papaveraceae, donde interviene una proteína S localizada en el pistilo, la cual interacciona con un receptor del polen, y cuya interacción desencadena una respuesta de despolimerización de la actina y la muerte celular programada, inhibiendo el desarrollo del tubo polínico incompatible (McClure y Franklin-Tong, 2006).

2.10.4. Autoincompatibilidad Gametofítica en la familia Papaveraceae

En esta familia la autoincompatibilidad está regulada a través del multialélico locus-S. Dentro de este locus se encuentran codificadas la determinante femenina, proteína-S de unión estigmática que es de un tamaño aproximado de 15kDa se cree que está en la superficie estigmática y que posee cierta homología con transportadores de iones (McCubbin y Kao 2000). Por otro lado para la determinante masculina se ha descrito a una proteína asociada a la membrana plasmática del tubo polínico, con un tamaño de 20.5 kDa y de pI 7.55, posee un dominio transmembranal con el cual interactúa con la determinante femenina y cuyo gen es denominado *PrPS* (*Papaver rhoeas pollen S*) (Wheeler *et al.*, 2009).

La respuesta de incompatibilidad ocurre en la superficie del estigma y la detención inicial del polen autoincompatible sucede muy rápido, en cuestión de minutos (McCubbin y Kao 2000).

La inhibición del polen incompatible está mediada por el Ca^{2+} , el cual activa una vía de transducción de señales que culmina con la muerte del polen incompatible. La interacción haplotipo-específica entre la proteína-S estigmática y la determinante masculina, permiten un incremento en la cantidad de Ca^{2+} libre

Introducción

citoplasmático, resultando en una pérdida del gradiente de Ca^{2+} apical necesario para el crecimiento del tubo polínico (Franklin-Tong *et al.*, 2002). Muchos estudios bioquímicos y fisiológicos sugieren que el Ca^{2+} actúa como un segundo mensajero de múltiples cascadas de señalización intracelulares, que resultan en una rápida inhibición del crecimiento del tubo polínico y en última instancia la muerte del polen incompatible (Takayama e Isogai, 2005).

La respuesta de incompatibilidad causa una rápida y dramática alteración en el citoesqueleto de actina del tubo polínico. La despolimerización de F-actina se observa en los primeros minutos, causando el dinámico rearrreglo de la actina citoplasmática en forma de pequeños cúmulos, en el tubo polínico incompatible (Geitmann *et al.*, 2000). Los niveles de F-actina despolimerizada después de 10 min de la respuesta incompatible parecen ser suficientes para inhibir el crecimiento del tubo polínico, esto causado a partir de la alteración en los niveles de Ca^{2+} (Snowman *et al.*, 2002). Asimismo, la estabilidad de los microtúbulos que forman parte en el crecimiento celular (Gibbon *et al.*, 1999); se ve afectada en el primer minuto de la respuesta de incompatibilidad causada por la despolimerización de la tubulina (Poulter *et al.*, 2008).

Otro blanco durante la respuesta de AI es p26, una proteína que se activa mediante su de-fosforilación, y tiene un papel de pirofosfatasa fundamental en el crecimiento del tubo polínico, al producir ATP y biopolímeros intracelulares (Franklin-Tong y Franklin, 2003). Sin embargo, en una respuesta de AI esta proteína se inactiva, con lo que el crecimiento del tubo polínico incompatible es afectado por el agotamiento de los biopolímeros necesarios para el desarrollo del tubo (Rudd y Franklin-Tong, 2003).

Así también se encontró que relacionado con lo anterior, se lleva a cabo la activación de la muerte celular programada derivando a la apoptosis, mediante la vía clásica de activación de un tipo de proteína Caspasa 3, en los tubos polínicos incompatibles (Figura 9) (Franklin-Tong y Franklin, 2007).

Introducción

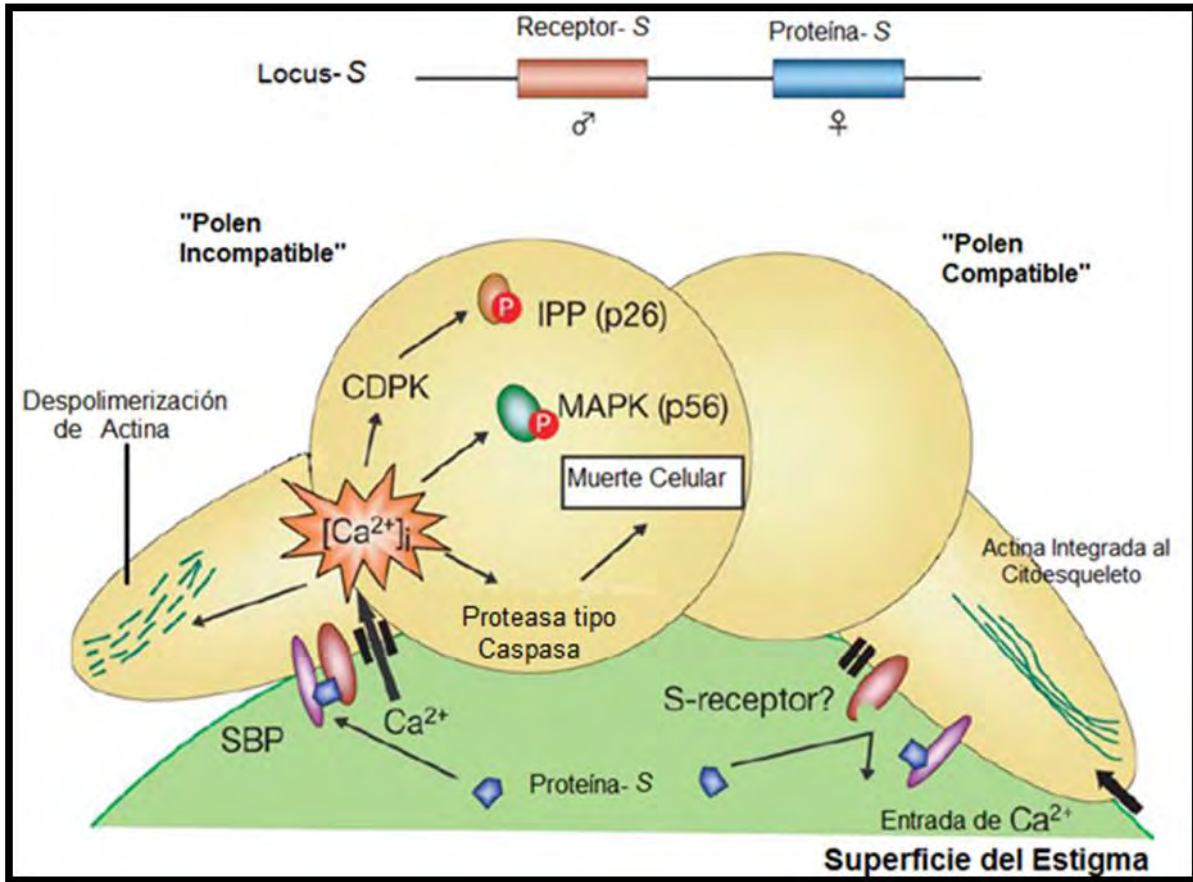


Figura 9.

Modelo de autoincompatibilidad en la familia Papaveraceae. La proteína-S (SBP), que se asume interacciona con un receptor de polen haplotipo-S-específico y desencadena un flujo del ion Ca^{2+} hacia el tubo polínico incompatible. Este aumento de Ca^{2+} conduce a una cascada de señales que promueven la inhibición rápida del crecimiento del tubo polínico a través de la muerte celular programada. Imagen Modificada de Takayama S e Isogai, 2005.

2.10.5. Incompatibilidad en Solanaceae

En esta familia se identificó como determinante femenina a la S-RNasa. El rechazo del polen incompatible se lleva a cabo durante el crecimiento del tubo polínico en el estilo.

Determinante Femenina.

En un análisis de las proteínas estilares en *Nicotiana glauca*, se encontró una abundante glicoproteína cercana a los 30 kDa llamada S-RNasa y está ligada con el locus S. Posteriormente, a través de análisis de clonación de otros genes de la S-RNasa de diferentes especies, se encontró que esta ribonucleasa es altamente polimórfica ya que tiene rangos de similitud desde 38% hasta 98%. La secuencia proteica se divide en 5 regiones conservadas, denominadas C1, C2, C3, C4, C5 y dos regiones hipervariables llamadas HVa y HVb (Ida *et al.*, 2001; Matsuura *et al.*, 2001).

La S-RNasa se expresa exclusivamente en el pistilo, donde la proteína se localiza mayoritariamente en la parte superior, donde ocurre la inhibición de los tubos polínicos (Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994).

Un importante descubrimiento fue que las S-RNasas del pistilo exhibían una homología con el dominio catalítico con dos RNAsas fúngicas, la Rh de *Rhizopus niveus* y la T2 de *Aspergillus oryzae* (Ida *et al.*, 2001) (Matsuura *et al.*, 2001). Otros estudios confirmaron que presenta la actividad catalítica de ribonucleasas que es crucial para la interrupción del crecimiento del polen incompatible (McClure *et al.*, 1989). Con lo anterior se propuso que cada haplotipo S codifica una distinta S-RNasa, que es secretada a la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo (McClure *et al.*, 1990). Esta S-RNasa entra al citoplasma del tubo polínico provocando una degradación del RNA del tubo polínico en una cruz incompatible (Goldraij *et al.*, 2006). Esta actividad citotóxica presumiblemente interfiere con el crecimiento de los tubos polínicos, mediante la prevención de la expresión génica del polen (Franklin-Tong y Franklin, 2007).

Introducción

Las regiones hipervariables de la S-RNasa están conformadas por una larga asa cargada positivamente, seguido de una corta cargada negativamente, lo que sugiere que las regiones HVa y HVb, forman una especie de dominio que interacciona con la determinante masculina, por lo que podrían jugar un papel importante en la determinación específica del haplotipo (Matton *et al.*, 1997; Matton *et al.*, 1999).

Determinante Masculina

La primer pista sobre esta determinante fue obtenida a partir del análisis de la secuencia del locus S en *Antirrhinum hispanicum* y la cual codifica a una proteína del tipo caja-F llamada *AhSLF-S2* (*A. hispanicum* S-locus F-box of S2-haplotype), expresándose específicamente en la antera y los granos de polen del haplotipo S2 (Lai *et al.*, 2002). La prueba definitiva llegó en el 2004, cuando Sijacic *et al.*, mediante de experimentos de interacción competitiva demostraron que en *Petunia inflata*, SLF es la determinante masculina.

Sin embargo, en otros haplotipos se ha identificado con una similitud aproximada del 97.9 % en aminoácidos, tal es el caso de la encontrada en *Prunus nume* un miembro de la familia Rosaceae, en la cual alrededor de la zona de la S-RNasa se encontraron cuatro genes tipo F-Box. De los cuales uno llamado **PmSLF** presenta las condiciones del gen determinante en el polen:

- a) Está localizado en una región genómica altamente divergente.
- b) Exhibe una diversidad haplotipo-específica de aproximadamente 78 a 81 %
- c) Se expresa específicamente en el polen.

Casi al mismo tiempo se encontraron genes F-Box polimórficos en la región del locus-S de diversas especies de *Prunus*, los cuales fueron independientemente llamados **SFB** (S-haplotype-specific F-Box) (Takayama e Isogai, 2005).

SFB/SLF de *Prunus* como características cumple las condiciones de determinante S del polen, así como la presencia de dos regiones hipervariables **HVa** y **HVb**.

Introducción

Los genes SLF/SFB pertenecen a una larga familia de proteínas con caja-F. Se cree que están involucradas en marcar sustratos para su poliubiquitinación y así ser degradadas mediante el proteosoma 26S. Así se propone que una interacción compatible conduce a la ubiquitinación de la S-RNasa y su posterior degradación mediante el proteosoma 26S, por lo que el polen es "rescatado" de la actividad citotóxica de la S-RNasa. Mientras que en una interacción incompatible no existe tal degradación de la S-RNasa, dejándola libre para degradar al RNA del polen, e inhibiendo el crecimiento del tubo polínico (Figura 10) (Franklin-Tong y Franklin, 2007).

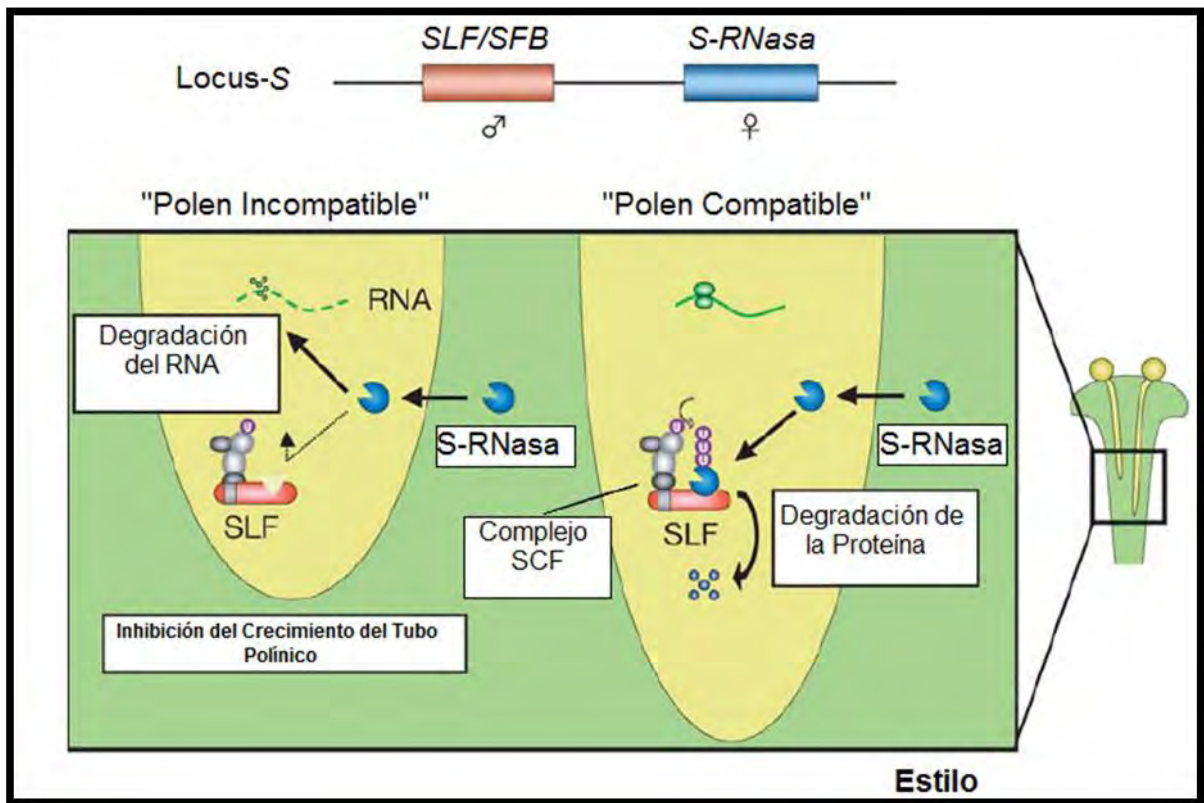


Figura 10.

Modelo de autoincompatibilidad en la familia Solanaceae, Rosaceae y Scrophulariaceae. El locus-S consiste de dos genes *S-RNasa* y *SLF/SBF*. La *S-RNasa* es la determinante femenina, que es excretada en grandes cantidades en la matriz extracelular del estilo. Cuando la polinización ocurre, la *S-RNasa* entra a los tubos polínicos donde interactúa con la determinante masculina (*SLF/SBF*), la cual pertenece a la familia de proteínas con caja-F y que son componentes del complejo enzimático E3 ubiquitin ligasa; intervienen en la degradación de la *S-RNasa* en una cruz compatible, mientras que en una incompatible, la *S-RNasa* ejerce su actividad citotóxica en el tubo polínico. Imagen modificada de Takayama e Isogai, 2005.

2.11. Genes Modificadores.

Como se describió antes, tanto la determinante femenina como la masculina juegan un papel esencial en los sistemas de autoincompatibilidad, sin embargo, con el constante avance del estudio de estos sistemas se ha dilucidado que existen otros factores que intervienen y permiten la acción del mecanismo de AI en cada familia. Estos factores se denominan “genes modificadores” (GM). Los GM no están ligados al locus S, pero son parte de la vía genética del rechazo del polen y se han dividido en tres grupos (Cruz-García *et al.*, 2003).

- **Grupo I:** Son aquellos que afectan directamente a la expresión de los genes-S, que determinan la especificidad.
- **Grupo II:** Son los que interaccionan genética o bioquímicamente con los determinantes de la especificidad pero no afectan su expresión.
- **Grupo III:** Se encuentran relacionados con el mecanismo de autoincompatibilidad, aunque desempeñan otras funciones en la polinización.

Al momento solo se han identificado tres GM del grupo II mediante experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana*. Estos genes son:

- *120k*
- *HT-B*
- *NaStEP*

La glicoproteína de 120 kDa (120k), se encuentra abundantemente en la matriz extracelular (MEC) del estilo (Lind *et al.*, 1994, 1996) y entra en los tubos polínicos por medio de endocitosis (Goldraij *et al.*, 2006) donde se acumula en el citoplasma dentro de vacuolas (Goldraij *et al.*, 2006). 120k se ha encontrado en especies autocompatibles y autoincompatibles de *Nicotiana sp* (Hancock *et al.*, 2005). Su papel en la incompatibilidad se evaluó por experimentos de pérdida de función en híbridos transgénicos de *Nicotiana plumbaginifolia* x *N. alata*. En donde el

Introducción

silenciamiento de su expresión rompe la respuesta de incompatibilidad (Hancock *et al.* 2005). Sugiere

Por otra parte la proteína HT-B, codifica una pequeña proteína rica en asparaginas, la cual se expresa en etapas tardías del desarrollo del estilo (McClure *et al.*, 1999). Su silenciamiento con RNA de interferencia (RNAi) en especies de *Nicotiana* y *Solanum*, provoca la falla en el rechazo del polen incompatible, por lo que esta proteína es esencial en la incompatibilidad (McClure *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2002). La proteína HT-B se transporta también desde el estilo al tubo polínico y en una cruce compatible sus niveles disminuyen en el tubo polínico, en comparación con los encontrados al tratarse de una autopolinización (Goldraij *et al.*, 2006).

Dentro del grupo III se proponen a las proteínas NaTrxh, NaTTS, NaPCCP, NaSBP1 y PELP III como buenos candidatos de GM para este grupo.

La proteína NaTrxh, es una tiorredoxina tipo h del grupo II, se encuentra en la matriz extracelular (MEC) del tejido de transmisión estilar en *N. alata* aunque no presenta una señal de secreción reconocible, también se expresa en otros tejidos florales como la antera, los sépalos, el pétalo y el ovario. Así como en tejidos vegetales como las hojas. Experimentos *in vitro* demostraron que esta proteína interacciona con la S-RNasa reduciéndola; sin embargo, su papel en la autoincompatibilidad no ha sido demostrado mediante experimentos de pérdida o ganancia de función (Juarez-Diaz *et al.*, 2006).

La proteína NaTTS, es una glicoproteína específica de la MEC del tejido de transmisión del estilo, la cual tiene la función de guía para los tubos polínicos, mostrando altos niveles de glicosilación en la base del estilo cerca del ovario (Wu, *et al.*, 1995, 2000). Esta proteína, contribuye positivamente al crecimiento de los tubos polínicos (Cheung *et al.*, 1995).

La proteína PELP III, así como la proteína NaTTS, es del tipo arabinogalactano, tiene un peso de 78kDa, en lo que difiere con la proteína NaTTS, es en no afectar el crecimiento de los tubos polínicos si es silenciada su expresión (Bosch, 2002).

Introducción

Se acumula principalmente en la MEC del tejido de transmisión del estilo de *N. tabacum* durante su desarrollo (de Graaf *et al.*, 2003). En pistilos no polinizados se encuentra en la matriz intercelular (MI), mientras que después de la polinización PELP III se transloca a la pared de calosa de los tubos polínicos, por lo que se sugiere que podría ser un componente importante de la pared del tubo polínico (de Graaf *et al.*, 2003).

La proteína NaPCCP es una proteína que interactúa físicamente con la región del carboxilo terminal de 120K para su transporte dentro del tubo polínico (Lee *et al.*, 2008a). Mediante ensayos de doble híbrido en levaduras se observó que presenta un dominio de unión C2 para fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P), con lo cual podría tener una función intracelular de transporte de la proteína de 120k hacia los tubos polínicos (Lee *et al.*, 2008a).

La proteína NaSBP1 es una proteína de unión a la S-RNasa que fue encontrada en el polen de *Petunia* (Sims y Ordanic 2001). Asimismo, se une con el CTD (dominio del carboxilo terminal) de algunas arabinogalactano proteínas del estilo, NaSBP1 es una proteína con un dominio de anillo. Este dominio a menudo está presente en enzimas E3 de ligasa de ubiquitina y cataliza la poliubiquitinación de proteínas blanco de degradación por el proteosoma 26S, con lo que se piensa NaSBP1 funciona como mediador del proceso de ubiquitinación (Lee *et al.*, 2008b).

2.12. Mecanismos de inhibición del polen haplotipo S específico

Como se ha mencionado existen dos genes fuertemente ligados en locus-S y que cuya interacción depende la respuesta en el polen.

En este apartado se describen los sustentos experimentales que tratan de explicar el mecanismo de autoincompatibilidad en la familia Solanaceae.

La forma de acción de la S-RNasa ha llevado a diversas discusiones, llegando a identificar varios mecanismos de acción posibles en una polinización autoincompatible.

Introducción

El primero de ellos es el denominado el **Modelo del Receptor**, el cual sugería, que la S-RNasa es secretada hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, donde es sintetizada, para entrar posteriormente en el citoplasma de los tubos polínicos incompatibles y ejercer su acción citotóxica (McClure *et al.*, 1990). Este modelo predice que el producto del gen-S del polen, es un receptor localizado en la membrana plasmática o en la pared celular del tubo polínico, y que cada variante alélica interacciona específicamente con la S-RNasa. De este modo, es selectivamente transportada la S-RNasa al interior de los tubos polínicos (Thompson y Kirch, 1992; Kao y McCubbin, 1996) Esto fue desechado con el descubrimiento de que SLF localiza en el citoplasma de los tubos polínicos (Wang y Xue, 2005). Posteriormente, surgió una evidencia definitiva en contra de esta hipótesis, obtenida por Luu *et al.* (2000) y Goldraij *et al.* (2006), quienes mediante el uso de experimentos de inmunolocalización mostraron que la S-RNasa se localizaba tanto en tubos polínicos compatibles como en los incompatibles, sugiriendo que la entrada de la S-RNasa a los tubos polínicos no era mediada por un receptor producto del alelo S del polen.

El siguiente modelo propuesto fue el del **Inhibidor**, en el cual la S-RNasa se encuentra de forma inactiva en los tubos polínicos compatibles, mientras que en los incompatibles esta activa. La versión original de este modelo proponía que en el citoplasma del tubo polínico se encontraba el producto del gen S del polen y que cada variante alélica interaccionaba con la S-RNasa, ya sea para inhibir o activar su actividad citotóxica (Thompson y Kirch, 1992). Posteriormente, Kao y McCubbin (1996), expandieron esta teoría mediante los siguientes parámetros:

- El producto de la expresión del gen S posee tanto especificidad S como funciones de inhibición.
- La interacción entre el dominio específico del alelo S del polen con el dominio de la S-RNasa, debe excluir la interacción entre el dominio inhibidor tanto del alelo masculino como del femenino.

Introducción

- La interacción entre los dominios de los alelos del polen y la S-RNasa, deben verse termodinámicamente favorecidos sobre la interacción entre los dominios inhibitorios.

Un modelo más actual es el de **Degradación de Proteína**, el cual es una modificación del modelo anterior, con el descubrimiento de que SLF contiene un dominio F-Box en su región amino terminal, se propone, que como muchas proteínas F-Box son componentes de un tipo de subunidad del complejo E3-Ubiquitin Ligasa. SLF puede ser componente del llamado SCF (Skp1-Cullin-F-Box), el cual mediante diversas activaciones, regula la degradación específica de proteínas a través del proteosoma 26-S (Qiao *et al.*, 2004; Sijacic *et al.*, 2004). Los resultados que sostienen esta hipótesis fueron los obtenidos por Huang *et al.*, 2006, quien mediante el uso de la técnica de doble híbrido identificó que Skp1 denominada AhSSK1 interactuaba con el dominio de caja F de AhSLF (S-allele product of *A. hispanicum* SLF) de *Antirrhinum* (Plantaginaceae), sugiriendo que AhSLF puede ser un componente del complejo SCL_{AhSLF}.

SLF, se ha dividido en 3 regiones ampliamente estudiadas, denominadas FD1, FD2 y FD3. El dominio FD2 tiene un papel de unión a la S-RNasa o SBD (S-RNase-binding domain), FD1 y FD3 juntos determinan la especificidad S-alélica del SLF además de ser dominios reguladores de unión a la S-RNasa o SRBD (S-Rnase-binding-regulating domains) (Hua *et al.*, 2008).

En el caso de la polinización incompatible la interacción entre SBD (Dominio de unión a la S-RNasa) del SLF₁ y la S₁-RNasa se ve desfavorecida, volviéndola inestable, así la S-RNasa se encontrará libre en el citoplasma del tubo polínico incompatible, deteniendo el desarrollo de éste a través de la degradación de su RNA (Figura 11A) (Hua *et al.*, 2008).

Por otro lado, en una cruce compatible, la interacción es mucho mas fuerte entre la S₂-RNasa y el SRBD (Dominio regulado de unión a la S-RNasa) de SLF₁, resultando en un complejo muy estable donde se lleva a cabo la ubicuitinación de

Introducción

la S₂-RNAsa para así ser blanco de la degradación por parte del proteosoma 26S (Figura 11B) (Hua *et al.*, 2008).

Finalmente, el caso de una interacción competitiva tal como una polinización con un pistilo S₁S₂ y un polen tipo S₁S₂ (Figura 11C), existen dos diferentes tipos de S-RNAsa en el citoplasma así como dos diferentes tipos de SLF. Las interacciones más favorecidas serán SLF₁ - S-RNAsa₂ y SLF₂ - S₁-RNAsa, como en el caso de una cruce compatible, así las interacciones como SLF₁ - S₁-RNAsa que puedan existir, no destacarán debido a que el complejo posee poca estabilidad, llevándolas a una interacción estable como SLF₁ - S₂-RNAsa donde la S-RNAsa será ubiquitinada y posteriormente degradada por el proteosoma 26S (Hua *et al.*, 2008).

Introducción

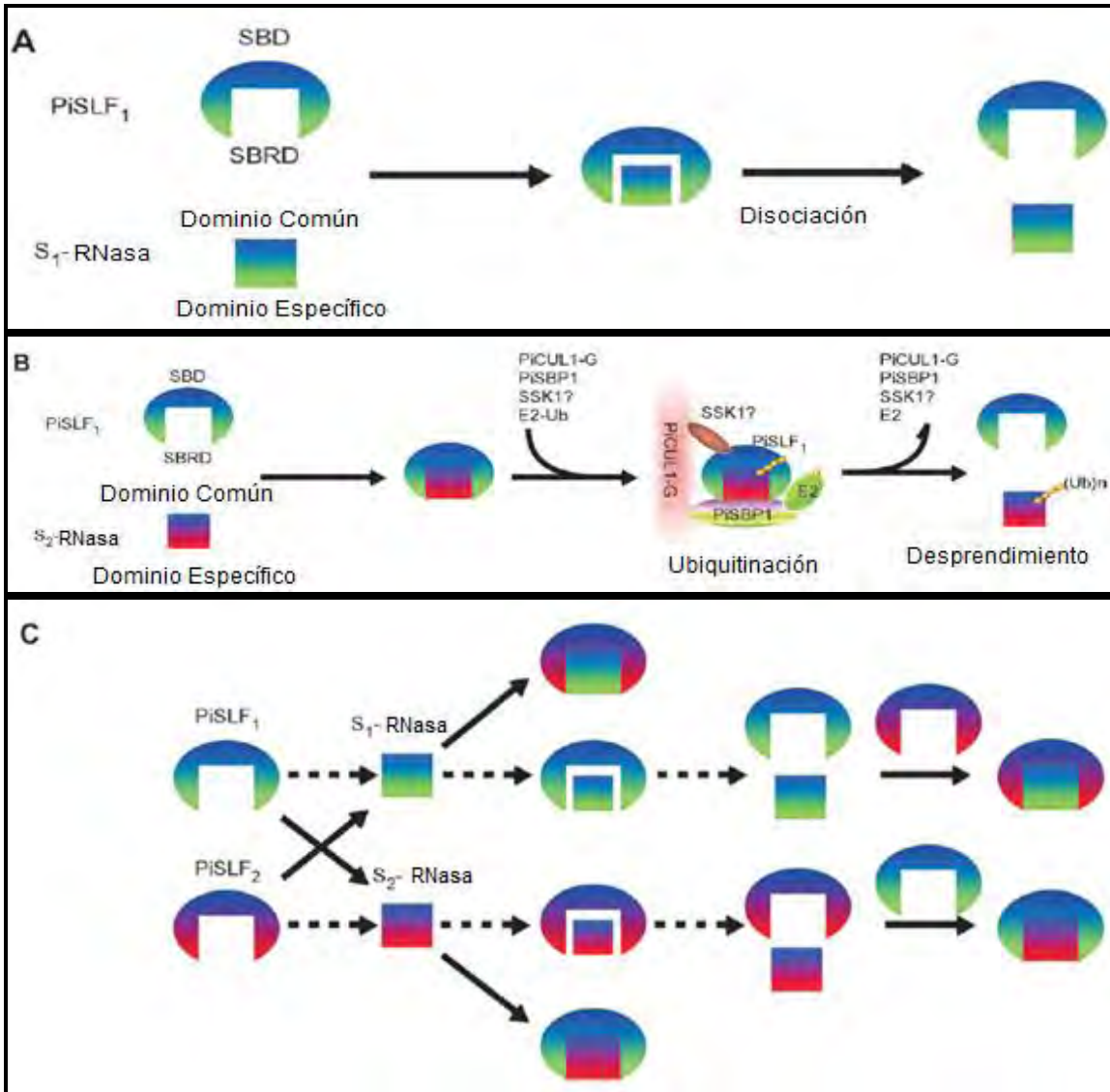


Figura 11. Modelo de la degradación de la S-RNasa. A) Interacción incompatible, en la cual el complejo entre SLF₁ y S₁-RNasa no resulta estable, por lo que la S-RNasa se encuentra libre en el citoplasma inhibiendo el crecimiento del tubo polínico. B) Interacción compatible, donde el complejo formado entre SLF₁ y S₂-RNasa se ve favorecido, y propicia la ubiquitinación de la S-RNasa para su posterior degradación por el proteosoma 26S. C) Interacción competitiva, en la cual existen determinantes heteroalélicas, los complejos formados por alelos distintos se ven favorecidos en su estabilidad, así se lleva a cabo la ubiquitinación de ambas S-RNasas permitiendo el desarrollo del tubo polínico. Imagen modificada de Hua *et al.*, 2008.

Introducción

El último modelo es el de la **Compartimentalización de la S-RNasa**, en el cual se explica que inmediatamente después de realizarse una cruce compatible o incompatible, la S-RNasa se transporta a los tubos polínicos donde se almacena en una vacuola. Esta vacuola permanece intacta si la cruce es compatible, pero en una incompatible al parecer su membrana se degrada liberando las S-RNasas al citosol del tubo polínico y ejerciendo su efecto citotóxico sobre el RNA, lo que provoca la muerte del tubo polínico (Goldraij *et al.*, 2006).

Los genes modificadores como HT-B y 120k juegan un papel importante en este modelo, ya que se observó que HT-B, se degradada en lo tubos polínicos compatibles por una proteína hipotética del polen (PP) y que esto no sucedía en una cruce incompatible, sugiriendo que HT-B regula la degradación de la vacuola donde se encuentran las S-RNasas (Goldraij *et al.*, 2006).

Asimismo, en el modelo se menciona la participación de 120k como una proteína que se encuentra en la membrana vacuolar donde es almacenada la S-RNasa, que además puede tener algún tipo de interacción con ella; sin embargo su función exacta es desconocida (Figura 12) (Goldraij *et al.*, 2006).

Introducción

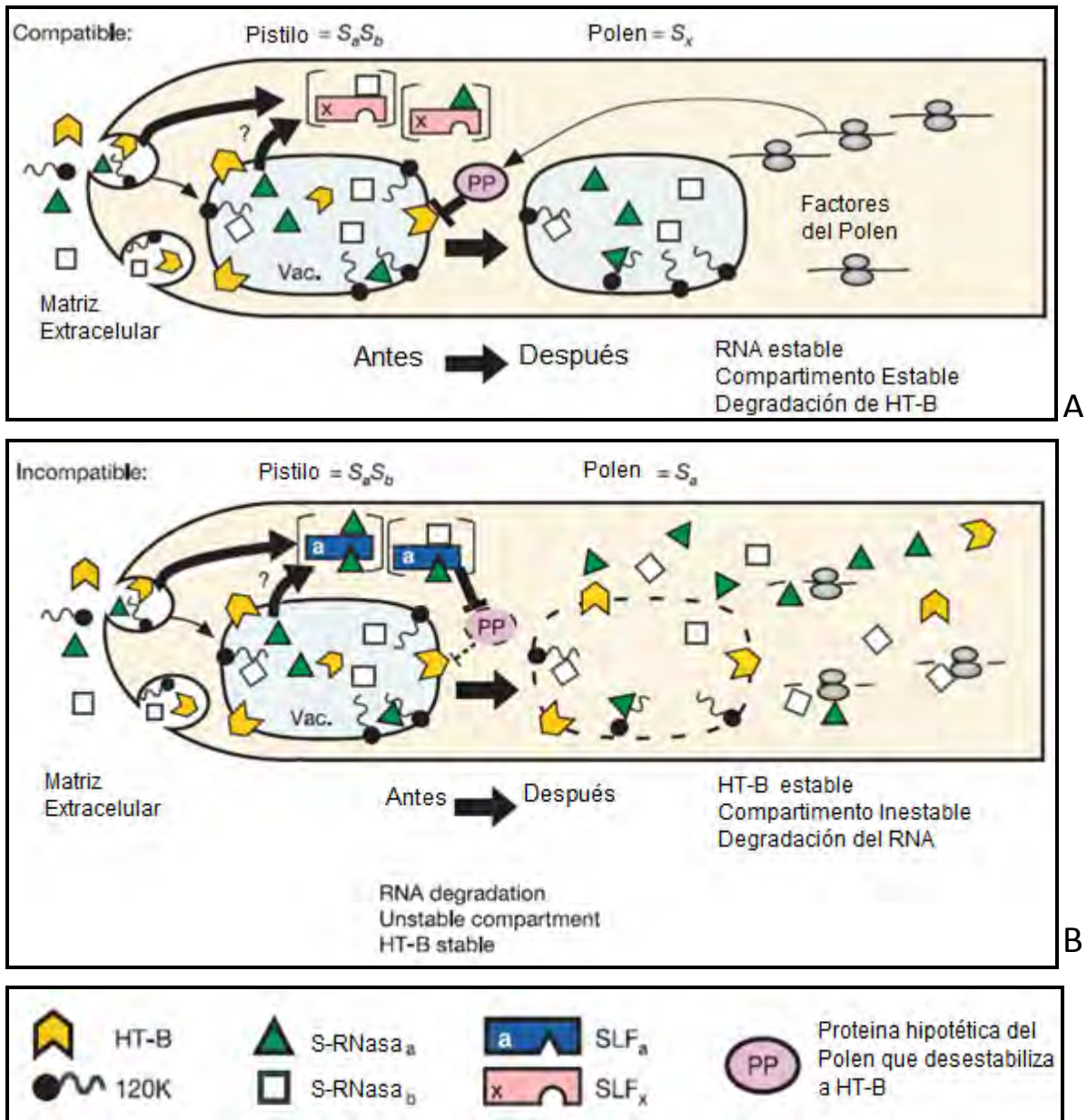


Figura 12. Modelo de Compartimentalización de S-RNasa. Inicialmente 120k, la S-RNasa y HT-B entran al tubo polínico integrándose en una vacuola. Una pequeña cantidad de S-RNasa escapa al citoplasma para interactuar con SLF del polen. A) En una cruce compatible al interactuar, S-RNasa con SLF se desencadena una reacción en la cual HT-B es degradado a través de una proteína hipotética del polen (PP), así la S-RNasa permanece dentro de la vacuola impidiendo que se lleve a cabo su acción citotóxica. B) En una polinización incompatible se inhibe la acción de PP provocando la estabilización de HT-B y el rompimiento de la vacuola, liberando a la S-RNasa con lo que se inhibe el desarrollo del tubo polínico. Imagen tomada de (Goldriaj *et al.*, 2006).

2.13. Antecedentes Inmediatos.

Recientes estudios en nuestro grupo muestran un posible nuevo gen modificador *StEP* (Stigma Expressed Protein). Aislado y caracterizado por primera vez de plantas de *Nicotiana alata* (Busot *et al.*, 2008).

StEP es una proteína de 24.37 kDa y un pI de 4.68, con similitud a un inhibidor de la familia I3 de proteasas tipo Kunitz, contiene 6 residuos de cisteínas que probablemente interaccionan formando tres puentes disulfuro, tiene sitios de N-glicosilación y también posee una señal de destino vacuolar (Busot *et al.*, 2008).

La expresión de esta proteína es específica de estigmas y su concentración es proporcional a su estado de maduración, siendo muy abundante al momento de la antesis. *NaStEP* es un gen cuyo transcrito no se detecta en especies compatibles de *Nicotiana sp.* (Busot *et al.*, 2008).

Su papel dentro de la autoincompatibilidad se demostró, mediante experimentos de pérdida de función, usando un RNA interferente y plantas transgénicas de *Nicotiana*, donde se observó que plantas transgénicas con *NaStEP* silenciado, fueron incapaces de rechazar el polen con el mismo haplotipo S que el pistilo receptor (Jiménez-Duran, comunicación personal).

En recientes estudios se ha visto que en ambientes donde StEP es silenciada y existe una cruz incompatible HT-B se encuentra degradada (Jiménez-Duran, comunicación personal), con lo que según el modelo de compartimentalización de la S-RNasa, la respuesta del mecanismo de incompatibilidad se ve interferido (McClure 2006).

De manera interesante se sabe que en ausencia de *NaStEP*, la proteína HT-B se degrada en tubos polínicos incompatibles, lo cual es contrario a lo que se observa en plantas silvestres.

Sin embargo, estos resultados a pesar de ser muy relevante en el entendimiento de los sistemas de incompatibilidad basados en S-RNasa, solo se limitan a *N. alata*, por lo que es de suma importancia investigar si este mecanismo donde

Introducción

StEP es esencial en el rechazo del polen, se conserva en otras especies incompatibles como *N. rastroensis* y *Solanum sp.*

OBJETIVOS

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo General.

Clonar y caracterizar molecularmente al gen *StEP* de *N. rastroensis* y de *Solanum sp.*

3.2. Objetivos Particulares.

- ❖ Obtener la secuencia del cDNA de *StEP* perteneciente a *N. rastroensis* y analizar su homología con *NaStEP* de *N. alata*.
- ❖ Evaluar la presencia de *StEP* en los diferentes tejidos vegetales y florales de *N. rastroensis* y de *Solanum sp.*
- ❖ Conocer la localización subcelular de *StEP* en *N. rastroensis*.

MATERIALES
Y MÉTODOS

4. Materiales y Métodos.

4.1. Amplificación de la región codificante para el gen *StEP* en *Nicotiana glauca*

Extracción de RNA total

Se realizó la extracción de RNA total, a partir de pistilos de *N. glauca*, mediante el uso del Trizol (Invitrogen) como agente de separación diferencial entre el DNA y el RNA con el siguiente procedimiento:

1. Obtener 100 mg de tejido fresco.
2. Pulverizar el tejido con N₂ líquido y agregar 1 mL del reactivo Trizol y mezclar vigorosamente.
3. Incubar 5 min a temperatura ambiente y centrifugar a 14,000 rpm por 10 min.
4. Recuperar el sobrenadante e incubar 5 min a 30°C.
5. Adicionar 200 µL de cloroformo y agitar manualmente de manera vigorosa por 15 s.
6. Incubar por 2 min a 30°C y centrifugar a 14,000 rpm por 15 min.
7. Recuperar la fase acuosa y agregar 500µL de isopropanol frío.
8. Incubar por 10 min y centrifugar a 12,000 rpm por un tiempo de 10 min.
9. Retirar el sobrenadante y lavar el precipitado utilizando 1 mL de etanol 70% v/v, agitar vigorosamente.
10. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min y repetir el lavado 2 veces.
11. Resuspender en 20 µL de agua DEPC (ver apéndice).

4.2. Amplificación por PCR del gen *StEP*.

Se utilizaron los oligonucleótidos que flanquearon al gen de interés y por medio de una reacción de amplificación denominada PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), que tiene como objetivo el amplificar de manera exponencial una secuencia específica de DNA, partiendo de un mínimo de ésta, se obtuvo una gran cantidad de *StEP*, el cual posee la característica de tener extremos pegajosos y ser sitios de corte para *EcoRI* dentro del vector de clonación.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue la siguiente.

Oligonucleótido “Forward”

5'-GCCGAATTCATGAAATCCTTTATTTTCAGCTTCC-3'

Oligonucleótido “Reverse”

3'-AAAAGTGCAGCCTTATGCATCAGTCTTCTG-5'

La mezcla fue la siguiente:

	µl/ reacción
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂) 25 mM	2.0
Betaína 5M	2.0
Amortiguador de Taq Polimerasa 10x (Ver Apéndice)	2.0
dNTP's 10mM	0.5
Oligo 5' 10mM	1.0
Oligo 3' 10mM	1.0
Taq Polimerasa (2.5 u/µL)	0.2
cDNA <i>N. rastroensis</i>	1
Agua	10.3
Volumen Final	20

Materiales y Métodos

Las condiciones a las cuales se realizó la reacción fueron:

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Inicialización	94.0	5.0
Desnaturalización	94.0	0.5
Alineamiento	58.0	1.0
Extensión	72.0	1.0
Elongación Final	72.0	7.0

Cabe destacar que la duración fue de 35 ciclos excluyendo tanto a la inicialización como a la elongación final, en cuyo caso fueron de 1 ciclo para ambas.

El producto de PCR se analizó por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %, a 100 V por un tiempo aproximado de 30 min,

En el caso de RNA, se realizó un RT-PCR, primero obteniendo el cDNA correspondiente para amplificar el cDNA de *StEP*.

4.3. Clonación del gen *StEP*

Una vez amplificado *StEP* se purificó a partir del gel de electroforesis, de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Corte de la banda de interés.
2. Colocar la banda del gel de agarosa dentro de un microtubo de 0.6 mL con fibra de vidrio, dentro de otro tubo de 1.5 mL.
3. Centrifugar por 7 min a 11,000 rpm.
4. Agregar agua desionizada y estéril hasta alcanzar un volumen de 0.5 mL.
5. Agregar 0.5 mL de la solución de PCI, agitar en “vortex” y centrifugar a 14,000 rpm por 5 min.
6. Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo.
7. Agregar 1/3 parte del volumen de acetato de amonio 10 mM y 2 volúmenes de etanol al 100 % v/v.

Materiales y Métodos

8. Dejar reposar a una temperatura de -20°C por 24 h.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min.
10. Descartar el sobrenadante.
11. Agregar 0.5 mL de etanol al 70% v/v y centrifugar por 3 min a 14,000 rpm.
12. Descartar el sobrenadante y dejar secar.
13. Resuspender el botón en 15 a 30 µL de agua estéril y desionizada.

El producto de PCR purificado se ligó al vector pGEM T-EASY (Figura 13). Las características del medio de reacción fueron:

Descripción	Cantidad (µL)
Producto de PCR	3
Plásmido (pGEM)	1
Amortiguador 2X	5
Enzima T4 DNA Ligasa	1

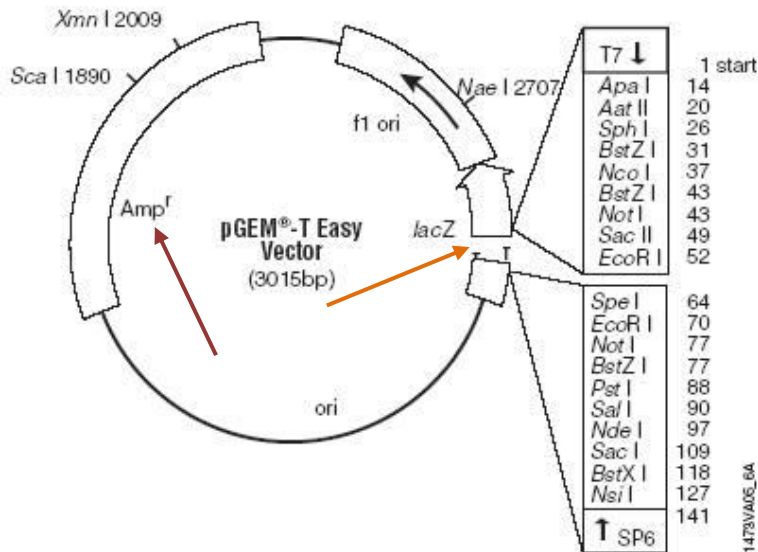


Figura 13. Vector de clonación, pGEM T-EASY. El producto de PCR se inserta dentro del gen lac Z (flecha naranja) con lo que evita su expresión y las colonias de *E. coli* transformantes toman un color blanco, el inserto queda delimitado por extremos donde tiene acción la enzima de restricción *EcoRI*. Las bacterias transformantes tendrán resistencia a la ampicilina conferida por el vector (flecha roja) (Manual técnico Promega, pGEM®-T y pGEM®-T Easy Vector Systems).

Materiales y Métodos

La reacción de ligado se incubó a una temperatura de 4°C por toda la noche o en su defecto a temperatura ambiente por un tiempo aproximado de 1 a 2 h.

Posteriormente, se llevó a cabo la transformación en la cepa de *Escherichia coli* DH5α para su sobreexpresión. La técnica tiene las siguientes características.

1. Colocar todo el volumen de la reacción de ligación en 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α.
2. Dejar incubar en hielo por 30 min.
3. Colocar el tubo de reacción a una temperatura de 42°C por un tiempo exacto de 45 s, e inmediatamente colocar en hielo por 2 min.
4. Adicionar 950 µL de medio SOC (ver apéndice).
5. Incubar por 2 h a una temperatura de 37°C a 150 rpm.
6. Centrifugar por 2 min a una velocidad de 8,000 rpm y desechar el sobrenadante.
7. Resuspender el botón en 200 µL de medio LB (ver apéndice).
8. Inocular en una caja petri con medio LB con ampicilina [100 µg/ml], IPTG [0.5mM] y X-GAL [80µg/mL] con todo el volumen anterior.
9. Incubar de 12 a 16 h a una temperatura de 37°C.

Las colonias positivas (color blanco) son inoculadas en 5 mL de medio LB líquido para su propagación y purificación del plásmido de interés a través del kit “*GenElute-Plasmid Miniprep*” (SIGMA) que incluye los siguientes pasos:

1. Centrifugar todo el volumen de medio LB.
2. Agregar 200 µL de la solución de resuspensión, y pipetear o mezclar en vortex.
3. Adicionar 200 µL de la solución de lisis e invertir suavemente para mezclar.
4. Dejar incubar por un tiempo no mayor a 5 min.
5. Agregar 350 µL de la solución de neutralización y mezclar por inversión de 3 a 6 veces.
6. Centrifugar a máxima velocidad por 10 min.

Materiales y Métodos

7. Preparar la columna mediante la adición de 500 μL de la solución de preparación y colocar la columna en un tubo colector.
8. Centrifugar por 1 min a 14,000 rpm.
9. Transferir el sobrenadante a la columna y centrifugar por 1 min a 14,000 rpm.
10. A la columna, se le agregaron 500 μL de la solución opcional de lavado y se centrifugó por 1 min a 14,000 rpm.
11. Posteriormente se agregaron 750 μL de la solución de lavado, se centrifugó por 1 min a 14,000 rpm y se descartó el sobrenadante.
12. Se transfirió la columna a un tubo colector nuevo y se le adicionaron 50 μl de la solución de elución, se dejó incubar por 1 min y posteriormente se centrifugó por 1 min a 14,000 rpm.

La inserción del fragmento de DNA se comprobó por medio de una reacción de digestión usando la enzima *EcoRI*. El producto de la digestión se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5 % p/v.

Las condiciones de la reacción de digestión fueron:

Descripción	Cantidad (μL)
Plásmido purificado	5
Enzima <i>EcoRI</i> (100000 unidades/ml)	1
Amortiguador <i>EcoRI</i>	3
Agua	cpb 10

El medio de reacción se incubó por 2 horas a una temperatura de 37°C.

4.4. Secuenciación.

La secuenciación de los cDNA de interés, insertado en los plásmidos se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM.

4.5. Análisis Bioinformático.

Este se llevó a cabo mediante el uso del Software “MATLAB *The Language of technical Computing*. V. 7.6.0”, el cual con su herramienta de trabajo “Bioinformatics toolboxes”, nos permitió hacer una comparación de secuencias tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, mediante el uso del algoritmo Needleman-Wunsch, el cual se basa en la Programación Dinámica formando una matriz cuadrada con los elementos de las secuencias a analizar, para que se comparen entre sí, y se distingan los elementos iguales y diferentes de cada una, llegando a una solución óptima (Durbin *et al.*, 1998).

4.6. Identificación de la expresión de StEP en *N. rastroensis* y de *Solanum lycopersicum*.

La expresión de la proteína StEP se evaluó en *N. rastroensis* y en *S. lycopersicum* en diferentes tejidos vegetales (tallo y hoja) y florales (pétalo, sépalo, antera, estilo, estigma y ovario); así como de cuatro diferentes etapas de desarrollo del pistilo, escogidas en base a los diferentes tamaños del botón antes de la antesis, de ambas plantas. La extracción de proteína se realizó con el amortiguador de carga al 2.5% (Ver apéndice) y cuyo procedimiento consiste en:

1. Triturar 100 mg de muestra de tejido.
2. Adicionar 100 μ L de amortiguador de carga al 2.5%.
3. Hervir la muestra en baño María durante 10 min.
4. Centrifugar por 10 min a 14,000 rpm.
5. Recuperar el sobrenadante.

Materiales y Métodos

Las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida al 12%. Un gel fue teñido con azul de Coomassie, y otro fue transferido a una membrana de nitrocelulosa tipo: Immobilon®-P (MILLIPORE), en la cual se llevó a cabo la inmunodetección mediante el siguiente procedimiento:

1. Transferir el gel de SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa por 45 min a un amperaje de 75 mA por membrana.
2. Incubar la membrana con solución de bloqueo (ver apéndice) a temperatura ambiente por 2 h o toda la noche a 4 °C.
3. Desechar la solución
4. Agregar solución fresca con el anticuerpo contra StEP a una dilución de 1:10,000 e incubar por 3 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.
5. Recuperar la solución y guardarla.
6. Lavar con PBS (ver apéndice) por 5 min y desechar solución.
7. Lavar con PBS, por 10 min y desechar solución.
8. Agregar solución fresca con el anticuerpo anti-conejo de la fosfatasa alcalina a una dilución de 1:10,000 e incubar a temperatura ambiente por 1h.
9. Hacer 3 lavados con PBS, de 10 min cada uno.
10. Revelar la membrana, adicionando amortiguador de fosfatasa (ver apéndice) por 10 min.
11. Desechar la solución.
12. Agregar 10 mL del amortiguador de fosfatasa con 100 µL de NBT [33 mg/mL] y 100 µL BCIP [17 mg/mL].
13. Al aparecer el revelado se lava con agua y se deja secar la membrana.

4.7. Localización celular de StEP en *N. rastroensis*.

Para la realización de este objetivo, se realizaron cortes histológicos de pistilo, para lo cual la técnica comenzó con la emasculación de los botones de *N. rastroensis*, en el momento de la antesis, se les retiró el pistilo y fijó en 4% de formaldehído en PBS, para su posterior inclusión en parafina, técnica cuyo procedimiento es el siguiente:

1. Deshidratar los pistilos, mediante lavados con etanol a concentraciones de 10, 25, 35, 50, 70 y 96 %, con un tiempo de 15 min cada uno.
2. Realizar tres lavados con etanol al 100% de 15 min cada uno
3. Incubar en una solución 50:50 de etanol 100% y stedman wax, por 24 h a 37°C.
4. Incubar con stedman wax por 48 h, con cambio de la misma a las 24h a 37°C.

Posteriormente se llevaron a cabo los cortes histológicos de 8 μm utilizando un Microtomo, los cortes fueron colocados en portaobjetos Kling-On HIER Slides, mediante el siguiente procedimiento:

1. Obtener los bloques del tejido con ayuda de una navaja.
2. Montar los bloques en pedazos de madera.
3. Realizar cortes de 8 μm de grosor en un microtomo de rotación.
4. Colocar los cortes en un baño de flotación con agua destilada a temperatura ambiente y capturarlos en los portaobjetos Kling-On HIER Slides.
5. Dejar secar los cortes perfectamente por dos días a temperatura ambiente y posteriormente guardarlos libres del polvo a 4°C hasta su uso.

Materiales y Métodos

Una vez obtenidos los cortes, se sometieron a una inmunodetección utilizando un anticuerpo contra la proteína StEP, para confirmar su localización en el pistilo.

El procedimiento involucrado en esta técnica es el siguiente.

1. Hidratar el tejido en una serie gradual de etanol 75, 50 y 25% por 15 min en cada uno.
2. Colocar las preparaciones en PBS por 15 min.
3. Secar las preparaciones con papel filtro o gasa y marcar alrededor de los cortes con un plumón Dako Pen.
4. Colocar las preparaciones en una cámara húmeda y aplicar 100 μ L de solución de bloqueo al 10% en BPS
5. Eliminar la solución de bloqueo y colocar el anticuerpo anti-NaStEP a una dilución 1:2000 en solución de bloqueo fresca por toda la noche a 4°C.
6. Lavar 3 veces con PBS por 10 min cada uno con agitación.
7. Aplicar el anticuerpo segundo anti conejo Alexa 488 (Invitrogen) en una dilución 1:200. Incubar por 2 h a temperatura ambiente con agitación.
IMPORTANTE Mantener en obscuridad el resto de la técnica.
8. Lavar 3 veces con PBS por 10 min cada uno y en obscuridad.
9. Montar las preparaciones con el medio de montaje (SIGMA).
10. Guardar las preparaciones a 4°C en obscuridad.

La visualización de las muestras se llevó a cabo en un microscopio confocal FV-1000 Olympus. Las imágenes se analizaron mediante el uso del programa FV.10-ASW 1.7.

RESULTADOS

5. Resultados.

5.1. Amplificación del cDNA de *StEP* a partir de mRNA de *N. rastroensis*

El gen *StEP* de *N. alata* (*NaStEP*) tiene una longitud de 700 pb y codifica para una proteína de 23 kDa, la cual es esencial en el rechazo del polen en *N. alata*, ya que cuando *NaStEP* se silencia por un RNA interferente las plantas transgénicas resultantes, no reconocen ni rechazan el polen con el mismo haplotipo-S que el pistilo receptor (Jiménez-Durán *et al.*, sin publicar).

Para conocer si existe un gen homólogo de *StEP* en *N. rastroensis*, fue necesario realizar un análisis de su secuencia; es pertinente el mencionar que *StEP* presenta un alto porcentaje de identidad con *NaSoEP* (*N. alata* Sexual Organs Expressed Protein). De esta manera, para clonar un ortólogo de *NaStEP* a partir de mRNA de *N. rastroensis*, se diseñaron cebadores de DNA basados en la secuencia nucleotídica de *NaStEP*, eligiendo una zona en la que no se presentara identidad con *NaSoEP*.

El templado para la amplificación de *StEP* de *N. rastroensis*, fue cDNA que se sintetizó a partir de RNA total de pistilos de *N. rastroensis* (AI). Además, se incluyó el cDNA de tres genotipos *N. alata* incompatible $S_{A2}S_{A2}$, $S_{105}S_{105}$, $S_{C10}S_{C10}$ y *N. alata* BT. También se usó como control negativo RNA de especies compatibles como *N. plumbaginifolia* y de *N. tabacum* (Figura 14B).

En la Figura 14A se observa que en todas las especies incompatibles de *Nicotiana* se obtuvo un producto de PCR de 700 pb, el cual no se detectó en las especies compatibles como *N. plumbaginifolia* ni de *N. tabacum*.

Resultados

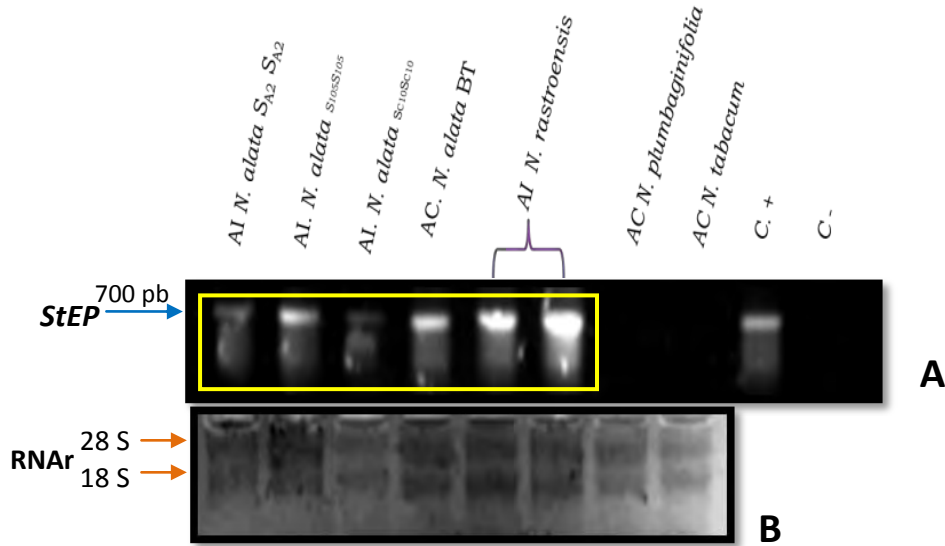


Figura 14. A) Amplificación por RT-PCR de *StEP* de diferentes especies de *Nicotiana*. B) RNA_T de pistilo de las especies analizadas, que sirve como control de cargado de RNA total.

Cabe mencionar que en el genotipo *N. alata* BT es una variedad compatible porque no expresa ninguna S-RNasa pero que sigue manteniendo el entorno genético de incompatibilidad. En esta variedad también fue posible amplificar un cDNA ortólogo a *NaStEP* (Figura 14A).

En todos los casos la longitud del cDNA de *StEP* fue de aproximadamente 700 pb. Este producto de PCR de *N. rastroensis* se purificó y se ligó al vector pGEM para llevar su la clonación en *Escherichia coli* y así conocer su secuencia nucleotídica.

Resultados

5.2. Clonación del gen *StEP*.

Al transformar con el vector pGEM-*StEP* a *E. coli* DH5 α , se obtuvieron varias colonias presuntamente positivas por haber crecido en el medio LB con ampicilina, además de presentar el color blanco característico cuando el gen *lacZ* es interrumpido por el cDNA que se insertó en medio de este gen, ya que el sitio múltiple de clonación reside justo a la mitad de la secuencia de *lacZ* (Manual técnico Promega, pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T y pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy Vector Systems). Con este criterio se seleccionaron 5 colonias al azar, a las cuales se les purificó el DNA plasmídico, para ser evaluado mediante una reacción de digestión con la enzima *EcoRI*, ya que este sitio flanquea el cDNA de *StEP*.

En la figura 15 se muestra que cuatro de las clonas analizadas liberaron un fragmento de cDNA de aproximadamente 700 pb, el cual corresponde al tamaño de *StEP* de *N. alata*, por tal motivo se determinó secuenciar este cDNA utilizando los servicios de secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

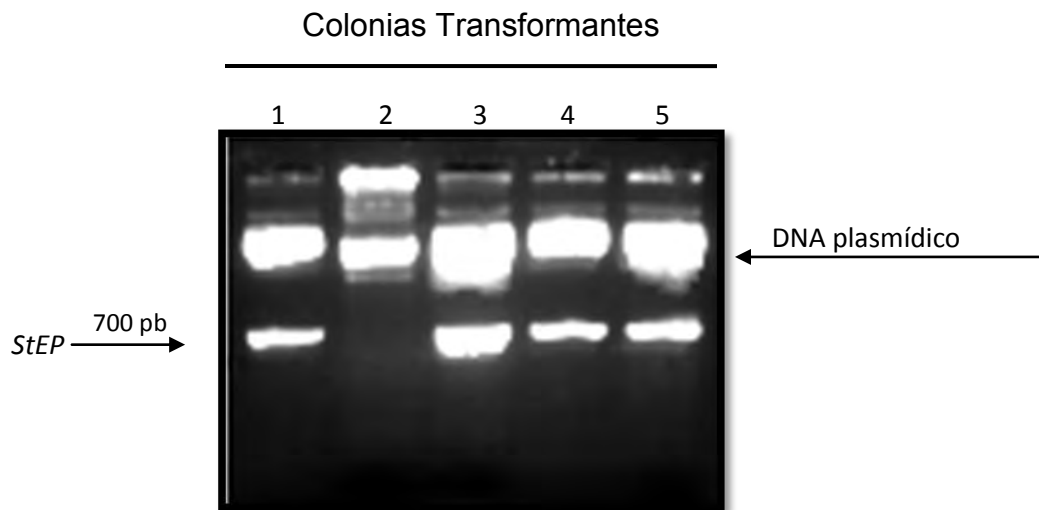


Figura 15. Las colonias transformantes 1, 3, 4 y 5 liberan un inserto de 700 pb. Los productos de digestión fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

Resultados

5.3. Secuenciación y análisis bioinformático de *StEP*.

Una vez obtenida la secuencia del cDNA de *StEP* de *N. rastroensis*, se observó que consta de 649 nucleótidos (Figura 16), siendo coherente con un resultado positivo, debido a la cercanía en tamaño esperado, con *NaStEP*. Para saber si esta secuencia es ortóloga a *NaStEP*, fue necesario realizar un alineamiento.

```
1  CACTTCCACC AATCCCATTG TCCTTCCCAC TACTACTGAT GATGACAACG ATTTATCTGT
61  ACTTTCCGAA GTGCTAGACA CAAACGGCAA ACCGCTCCAG ATTGGCGAAG AGTACCACAT
121 TATCTCCGCT ATCTTGGGAA TCGGCGGCGG CGGGGTATAC TTAACCAATC TTACAAACAC
181 CAAATGTCCA AACGACGTCG TCCAACACTG GCAAGGCTCC AAAGACGGCA TGCCTGTGAA
241 ATTCCTTACG ATGGACCCCG AGGTCGCACC TTCTAGTGTC GTACGTGAAA CTAATGACAT
301 TAATATTATG TTCTCTGTTC CAACTACAAA ACTCTGTGTT AATGAAACTG TTTGGAAAAGT
361 TGGTGATCCC GACTCAACAG AACAGGGGGT TAGGTTTGTG GTAACCGGTG GAACCCTAGG
421 ATATCCAGGA CCCATAACAA TAAAGAGCTG GTTTAAGATT GAGAAAGTAA CAAAAACAGC
481 ACCTTTCTAC AAGTTAAGGT ATTGTCCTGA TAGATTTTGT TGTCCAATGT GCTACGTTGG
541 TTGTTGAGAT GTGGGCTTAA CTGCCGATGT CGTCGGAGAC AGGCGTCTGG CTCTCAACGA
601 CAAGCCTTTT TGGGTTGTCT TCGAGAAATT CCAGAAGACT GATGCATTA
```

Figura 16. Secuencia de nucleótidos para el cDNA de *StEP* en *N. rastroensis*, dentro del rectángulo el codón de término; no se muestra el codón de inicio ya que los oligonucleótidos usados amplifican dentro de la secuencia de *StEP*.

5.4. Evaluación de la homología entre la secuencia de *StEP* de *N. rastroensis* y *NaStEP* de *N. alata*.

Al realizar un alineamiento, entre la secuencia obtenida para el cDNA proveniente de *N. rastroensis* y la secuencia del gen *StEP* de *N. alata*, se determinó que existe un porcentaje del 87 % de identidad a nivel de nucleótidos, en la cual al parecer se encuentran seis (6) deleciones que no afectan su marco de lectura, diez (10) sustituciones de nucleótidos y una inserción de tres (3) nucleótidos por lo que no existe un corrimiento en el marco de lectura (Figura 17).

Resultados

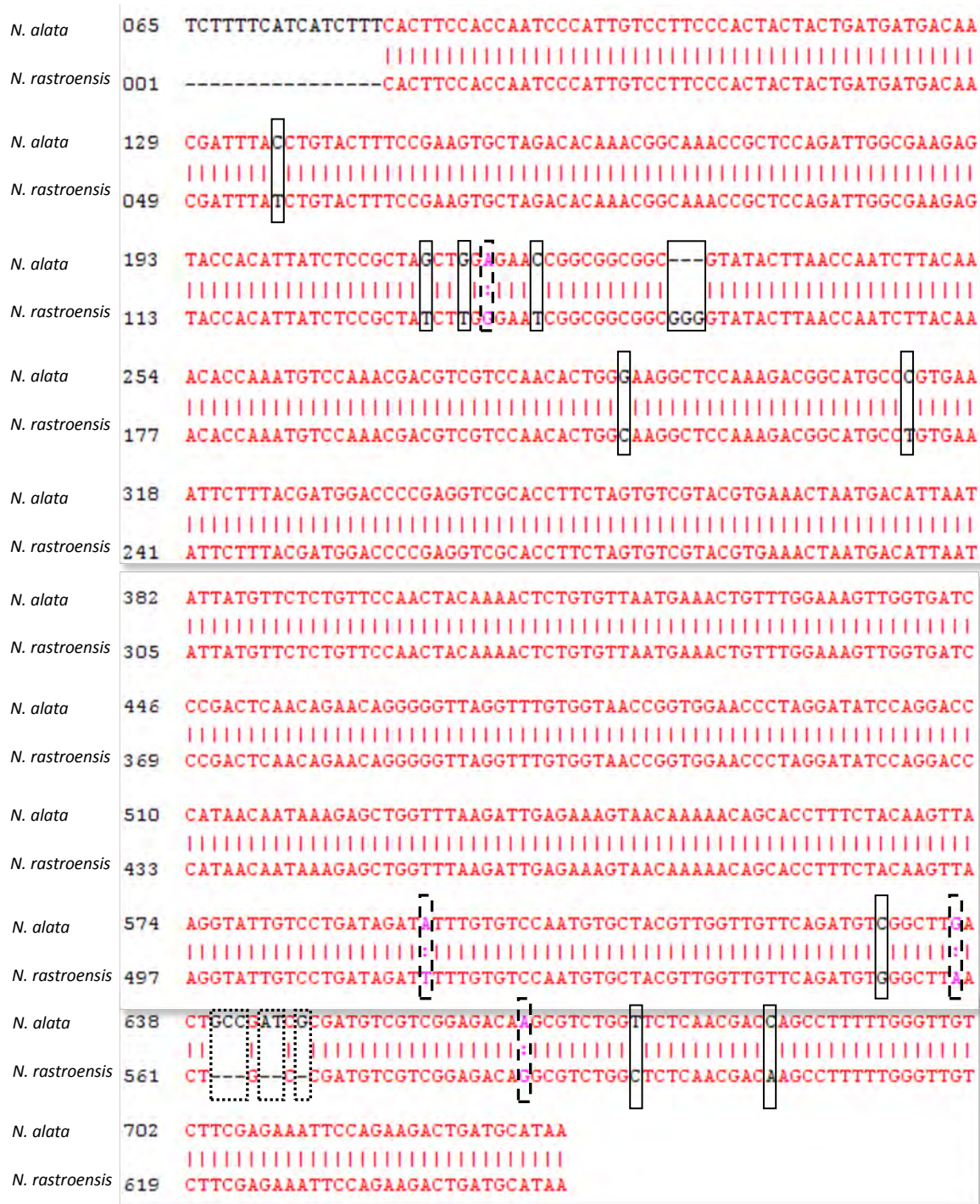


Figura 17. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos para el gen *StEP* de *N. rastroensis* y *N. alata*. Las cajas con línea continua indican cambios que afectan a nivel de mutaciones puntuales, mientras que las líneas semi-continuas son mutaciones que repercuten en cambios por aminoácidos similares a nivel de proteína. Finalmente las líneas punteadas son nucleótidos que no se encuentran en la secuencia de *N. rastroensis*.

Resultados

Así mismo, se realizó un alineamiento a nivel de aminoácidos para conocer la similitud entre ambas proteínas (Figura 18).

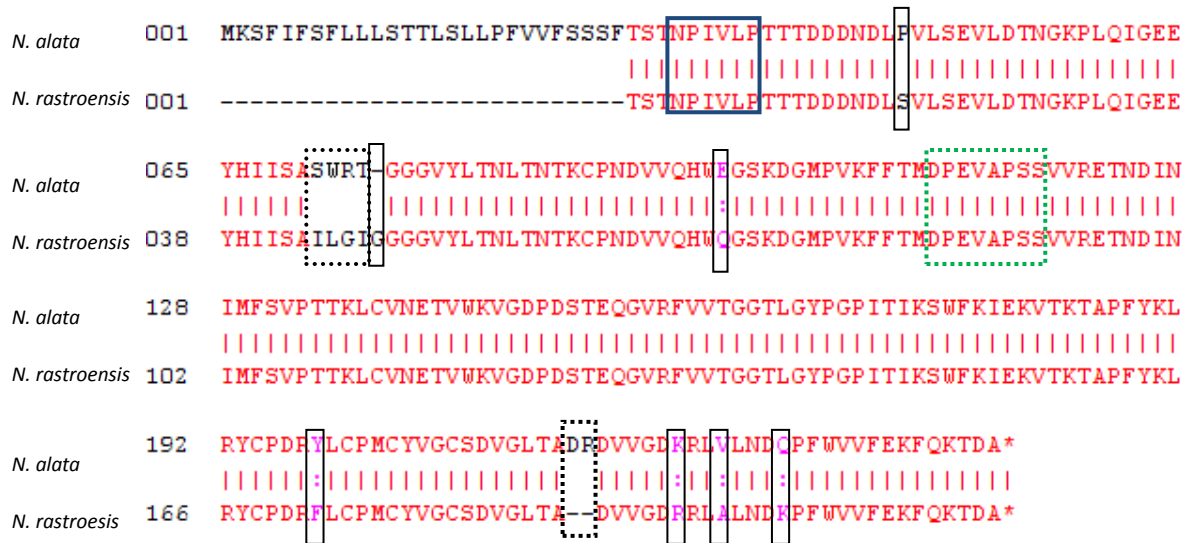


Figura 18. Alineamiento de las secuencias de aminoácido para el gen *StEP* de *N. raströensis* y *N. alata*, en cuadro azul se muestra la señal de destino vacuolar, en verde el posible sitio reactivo. Las cajas con líneas continuas indican los cambios entre nucleótidos similares. Las líneas punteadas son deleciones y mutaciones puntuales.

En el resultado de este último alineamiento se encontró que la similitud entre las proteínas *StEP* de *N. alata* y de *N. raströensis*, es de un 86 %, y en sus secuencias se encuentran variando solo 5 aminoácidos de forma puntual; concentrándose la mayor parte de los cambios en la región amino terminal.

Tabla 1.

Variaciones alélicas para <i>StEP</i> comparado con <i>NaStEP</i> de <i>N. alata</i>.		
<i>N. alata</i>	Posición	<i>N. raströensis</i>
Prolina (P)	46	Serina (S)
Serina (S)	71	Isoleucina (I)
Triptofano (W)	72	Leucina (L)
Arginina (R)	73	Glicina (G)
Treonina (T)	74	Isoleucina (I)

Resultados

Asimismo, en la tabla 1, se observa la presencia de una glicina insertada en la posición 75, y dos aminoácidos deletados, el ácido aspártico 215 (D) y una arginina (R) 216.

Por otro lado, en la región carboxilo, se encuentran intercambiados tres aminoácidos por unos que son similares, algunos en estructura y otros en hidrofobicidad, teniendo así:

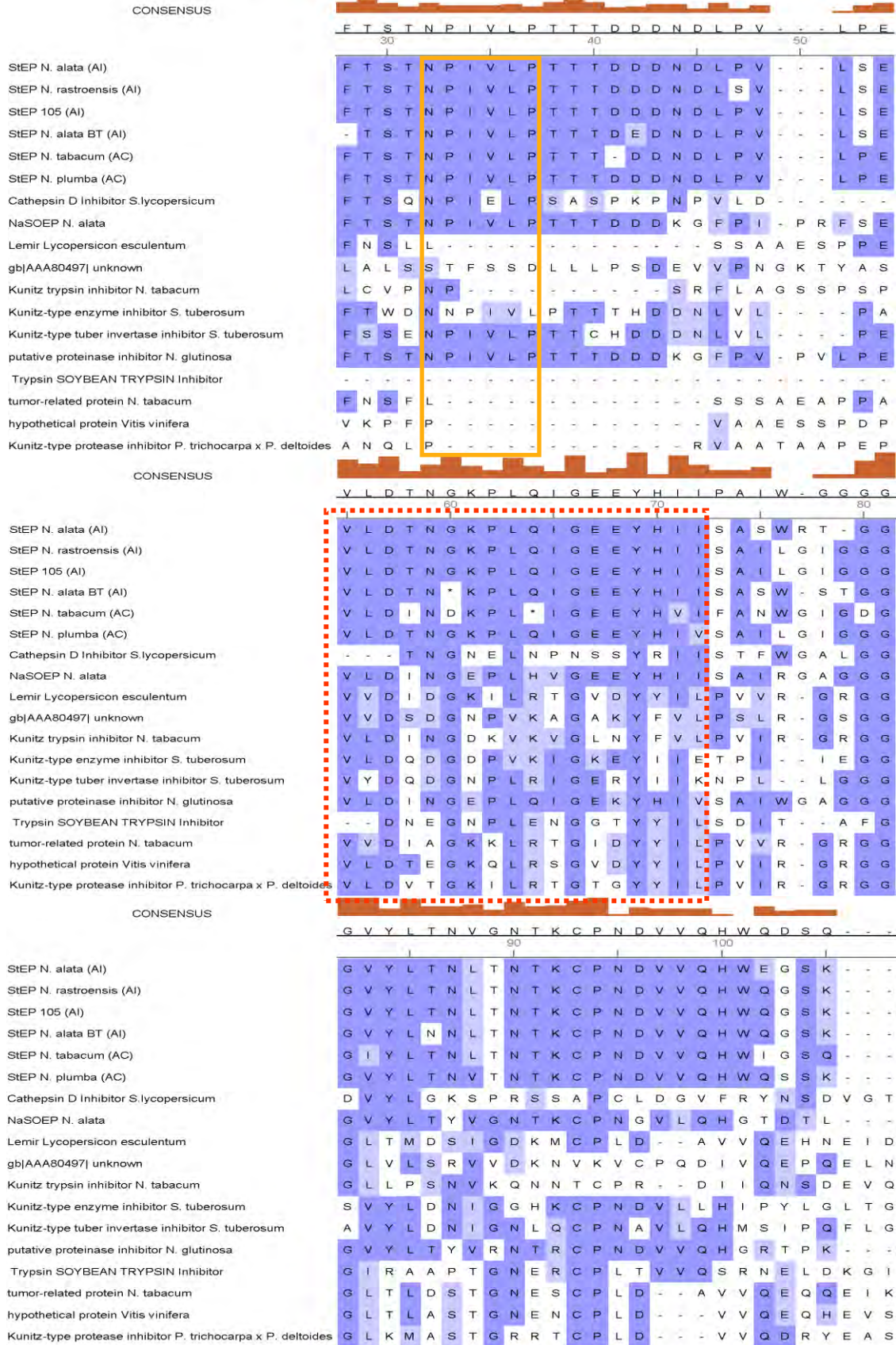
- Acido glutámico (E) 97 por glutamina (Q), ambos con una estructura muy parecida en la que se intercambia un (-OH) por (-NH₂) respectivamente.
- Tirosina (Y) 198 por fenilalanina (F), en donde existe una diferencia de un hidroxilo en posición para del anillo benzoico.
- Glutamina (Q) 229 por lisina (K), ambos polares y con un índice de hidrofobicidad cercano a -3.5.

También observamos un cambio conservado entre los aminoácidos lisina (K) 222 por arginina (R), ambos polares y con carga positiva.

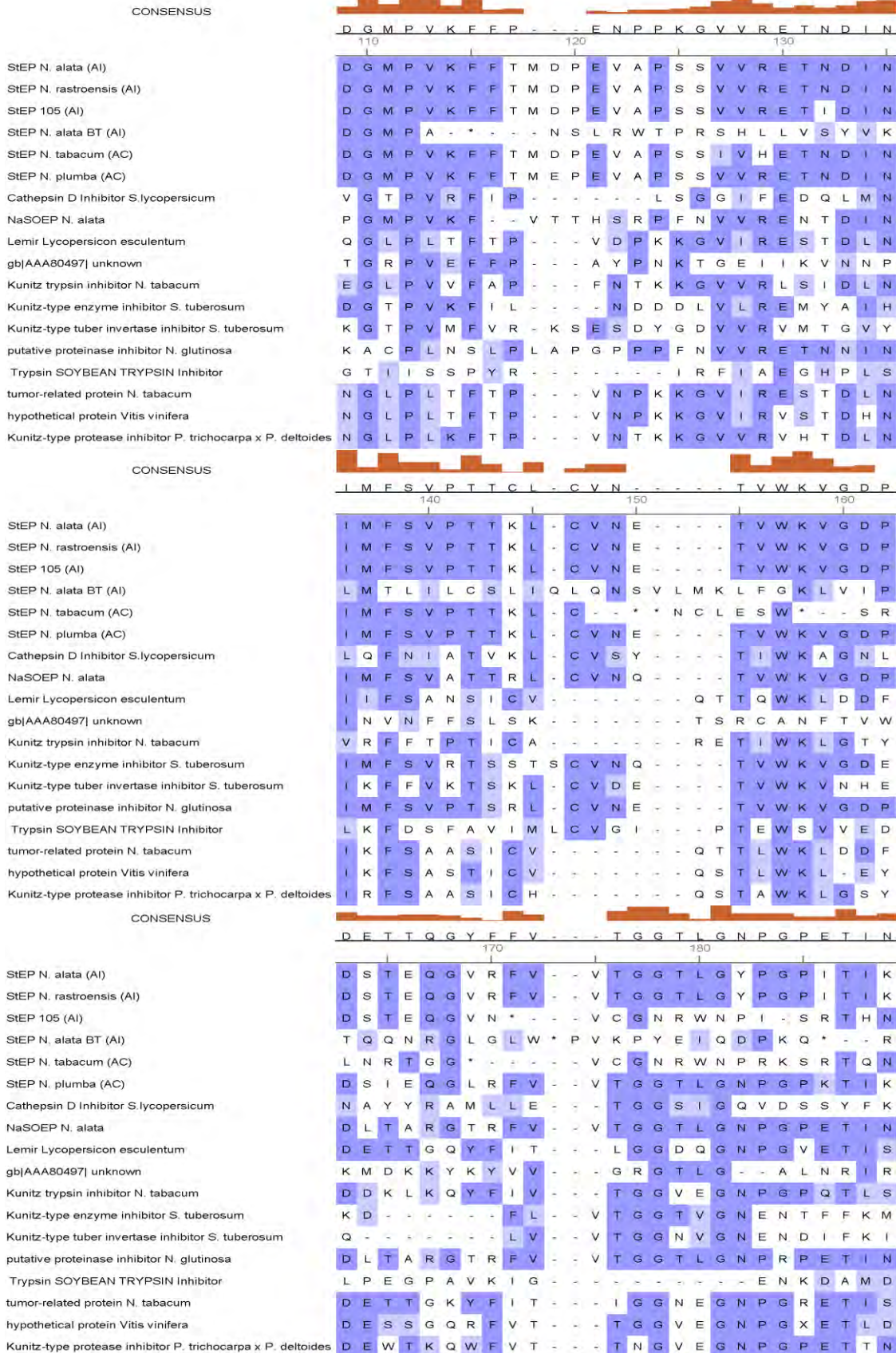
5.5 StEP de *N. rastroensis* pertenece a la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz.

NaStEP fue reportado como un miembro de la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz (Busot-González *et al.*, 2008), por lo cual al tener la secuencia nucleotídica de *StEP* de *N. rastroensis*, se obtuvo la secuencia en aminoácidos con lo que se realizó un múltiple alineamiento y la construcción de árboles filogenéticos para demostrar que se conservaba esta propiedad.

Resultados



Resultados



Resultados

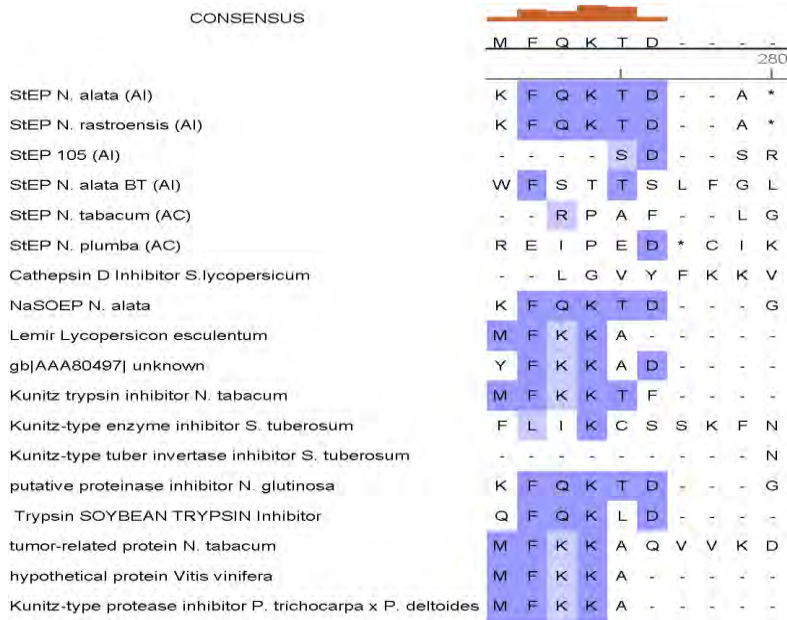


Figura 19. Alineamiento múltiple de StEP de *N. rastroensis* con otras secuencias de inhibidores de plantas. En el cuadro dorado se encuentra la señal de destino vacuolar y en línea punteada naranja el sitio reactivo de la proteína. Los aminoácidos que aparecen dentro de recuadros azules son las que se encuentran mas conservados en las especies analizadas. La secuencia consenso aparece en la parte superior.

Para analizar la filogenia de StEP se construyeron los siguientes árboles filogenéticos a partir de las secuencias anteriormente alineadas

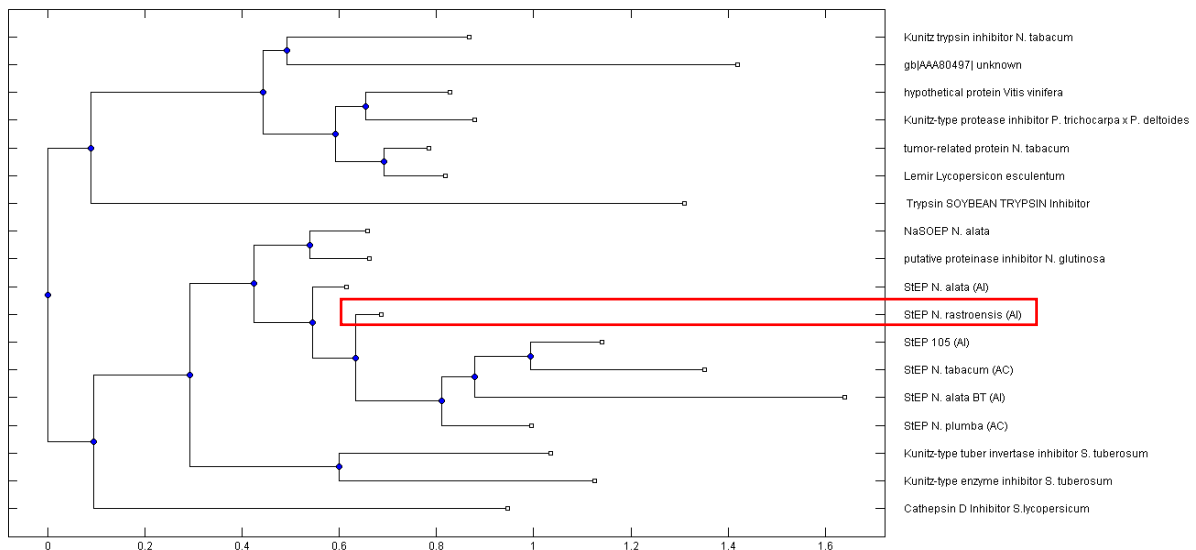


Figura 20. A) Árbol filogenético de secuencias proteicas de inhibidores de proteasas en plantas. Se observa que StEP de *N. rastroensis* se asocia con las proteínas *NaStEP* y otras ortólogas de especies incompatibles de *Nicotiana*.

Resultados

Como se observa en la Figura 19 existe un amplio rango de similitud entre la secuencia de StEP en relación con otras proteínas tipo Kunitz. Por ejemplo, en la región donde se encuentra la señal de destino vacuolar (NPIVLP) y en la zona donde está el sitio reactivo de estas proteínas (DPEVAPSS), lo que nos da una confirmación de la relación que guarda esta proteína con las demás integrantes de la familia Kunitz. Lo anterior se puede corroborar al observar el árbol filogenético, ya que, la ubicación de *StEP* de *N. rastroensis* (Figura 20), está en el grupo de los inhibidores de proteasas donde *NaStEP* de *N. alata* se ubica. Además, cabe señalar que StEP de *N. rastroensis* guarda una similitud cercana con aquellas proteínas StEP de especies incompatibles de *Nicotiana*.

5.6 Identificación de la localización de StEP en *N. rastroensis*.

Para conocer la localización de la proteína de StEP en diferentes órganos de *N. rastroensis*, se prepararon extractos de proteína total de hoja, tallo, sépalo, pétalo, antera, ovario, estilo, estigma y uno con la mezcla de los dos últimos. Las proteínas fueron separadas electroforéticamente por SDS-PAGE al 12% (Figura 21A), e inmunoanalizadas por ensayos tipo Western-Blot. En la inmunodetección se utilizó un anticuerpo monoespecífico policlonal diseñado contra StEP de *N. alata*, el cual reconoce los aminoácidos **WEGSKDGMPVKFFT** de la proteína, los cuales se conservan en la secuencia de StEP de *N. rastroensis*. La localización de StEP se detectó de forma específica en el estigma y en el extracto proteico de estigma con estilo (Figura 21 B). Sin embargo, al realizar otro ensayo tipo Western Blot bajo las mismas condiciones y separando el estilo del estigma bajo diferentes diluciones (Figura 21C), se detectó una pequeña cantidad de StEP en el estilo, lo cual es 30 veces menor de lo que existe en el estigma (Figura 21D).

Resultados

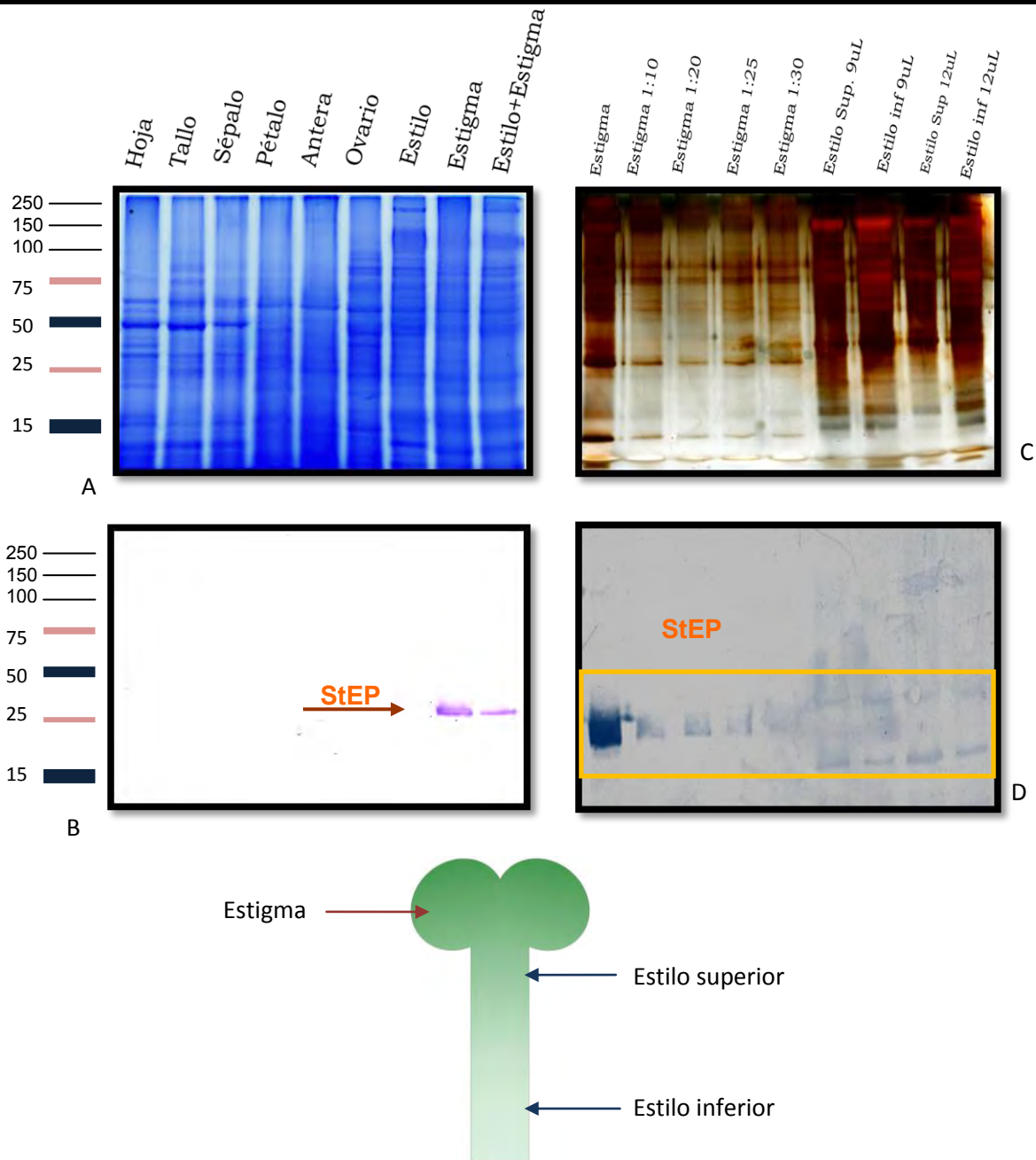


Figura 21. Localización de StEP en diferentes órganos de *N. rastroensis*. A) Electroforesis de los extractos proteicos de los diferentes tejidos de la planta. B) Western Blot, la cual muestra señal en el extracto de estigma y estilo con estigma. C) Extractos analizados electroforéticamente de diferentes diluciones de estigma y secciones del estilo. El gel fue teñido con Azul de Coomassie. D) Inmunodetección de StEP en diferentes diluciones del estigma en comparación con la señal obtenida en distintas partes del estilo.

Resultados

5.7 Identificación de la localización de StEP en *Solanum sp.*

Se realizó una búsqueda de homólogos de StEP en otra especie diferente a *Nicotiana sp.*, al analizar una especie de *Solanum* denominada, *Solanum lycopersicum*, (jitomate), del cual se prepararon extractos de proteína total de diferentes órganos vegetales (hoja y tallo) y de tejidos florales (sépalos, pétalos, antera, ovario, estilo, estigma y uno con la suma de los dos últimos). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 12% (Figura 22 A), e igualmente que en el experimento anterior la inmunodetección de StEP fue llevada a cabo mediante el uso del anticuerpo heterólogo contra StEP de *N. alata*.

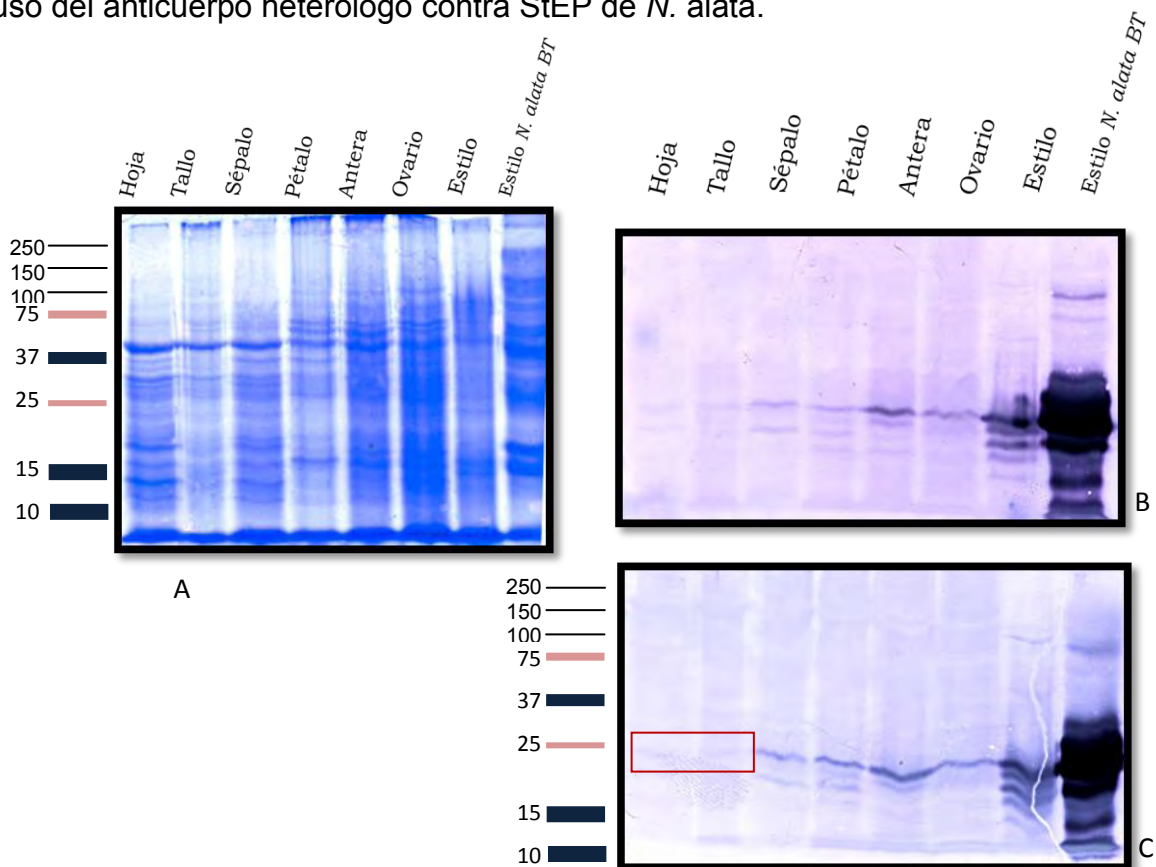


Figura 22. A) Proteínas teñidas con azul de coomassie que muestra los diferentes extractos de proteína de *S. lycopersicum* analizados. B) Inmunodetección por Western Blot con lavados habituales, en la cual una proteína homóloga a StEP aparece en diferentes tejidos de la flor. C) Inmunodetección por Western Blot que fue sometida a un lavado adicional del primer anticuerpo en NaCl 1M y Tween 20 al 1% para eliminar interacciones inespecíficas del anticuerpo anti StEP.

Resultados

El resultado mostró que en *S. lycopersicum* existe una proteína o proteínas homólogas a StEP que presentaron una reacción inmunogénica al anticuerpo anti StEP de *N. alata*, en los distintos tejidos evaluados (Figura 22 B). Al analizar el resultado anterior, surgió la posibilidad de que al detectar el anticuerpo varias proteínas, pudiera deberse a interacciones inespecíficas. Para descartar esta posibilidad se repitió el inmunoanálisis, pero en este caso después de la incubación con el primer anticuerpo (anti StEP), se hicieron lavados a la membrana con NaCl 1M en PBS y Tween 20 al 1%.

Después de este tratamiento las señales observadas tanto en hoja como en tallo desaparecieron, mientras que las del resto de los tejidos prevalecieron. (Figura 21 C). Estos resultados hacen suponer que en *S. lycopersicum* existen proteínas ortólogas a StEP, que conservan al menos la región antigénica **WEGSKDGMPVKFFT** de StEP de *N. alata*.

5.8 Identificación de la presencia de StEP en diferentes etapas de desarrollo del pistilo de *N. rastroensis*.

Una vez conocida la distribución de StEP en los diferentes tejidos de *N. rastroensis*, resultó importante conocer su expresión temporal durante el desarrollo de los pistilos. Para el desarrollo de este experimento se seleccionaron cuatro diferentes etapas del desarrollo del pistilo en base a su longitud las cuales fueron: 0.8 cm, 1.0 cm, 2.0 cm y 3.0 cm. Cabe señalar que todas estas etapas se encuentran dentro de la pre-antesis (Figura 23A). Todos los extractos proteicos fueron separados electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 12% y transferidos a membranas para el inmunoanálisis de StEP (Figura 23B); para analizar y comparar los distintos niveles de expresión en función del tiempo de desarrollo, se inmunodetectaron a las proteínas estilares Sc10-RNasa y HT-B, proteínas que incrementan su expresión conforme el estilo madura (McClure *et al.*, 1999) (Figura 23D y Figura 23E).

Resultados

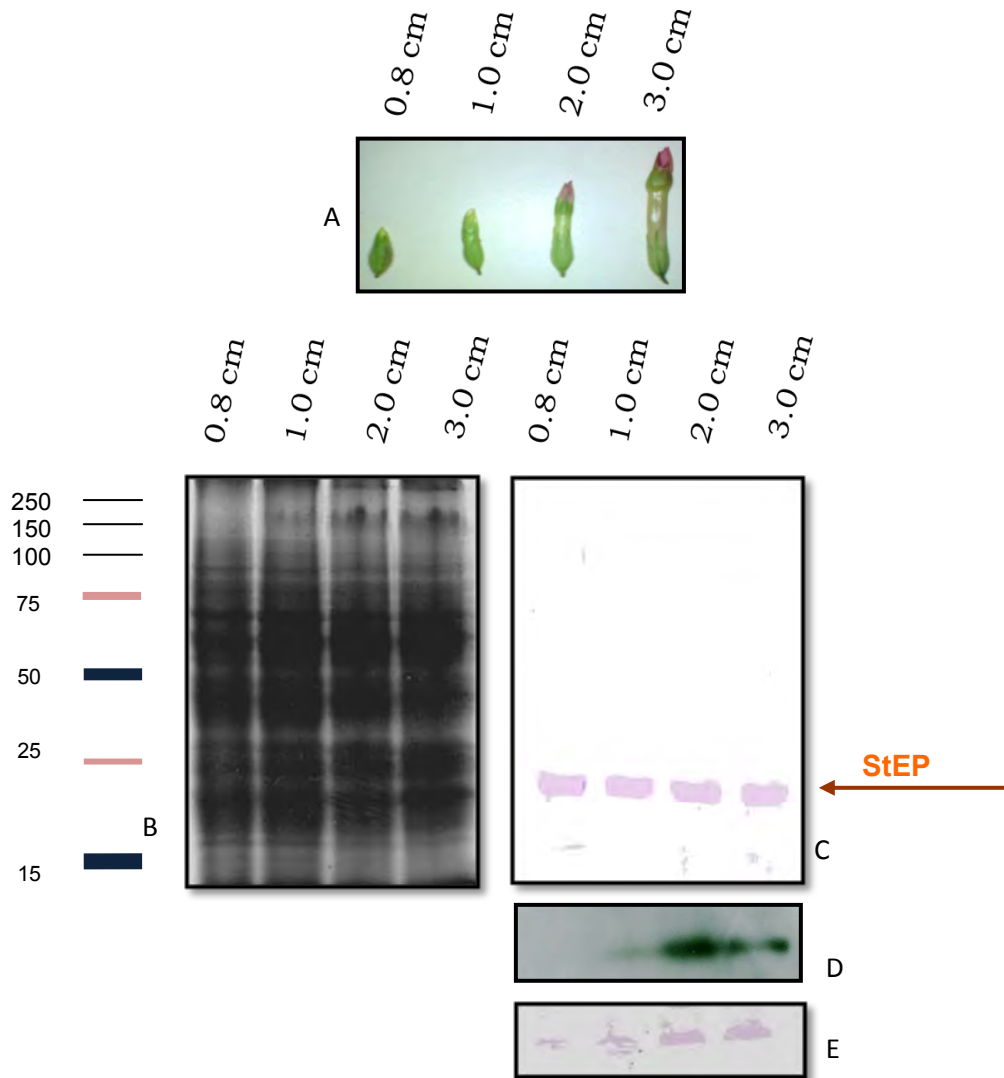


Figura 23. Expresión de StEP en diferentes etapas de desarrollo del estilo de *N. rastroensis*.

A) Etapas del desarrollo de la flor seleccionadas para el análisis. B) Gel donde los extractos proteicos analizados fueron separados en SDS-PAGE y teñidos con azul de Coomassie. C) Inmunodetección de StEP en diferentes etapas del desarrollo de la flor. D) Patrón de expresión de la S_{C10} -RNasa en diferentes etapas de desarrollo del estilo. E) Patrón de expresión de HT-B en diferentes etapas del desarrollo del estilo.

Resultados

El resultado del experimento anterior mostró que StEP se expresa aparentemente con los mismos niveles desde etapas muy tempranas del desarrollo del estilo hasta etapas maduras en *N. rastroensis* (Figura 23C). En el caso de la S_{C10}-RNasa (Figura 23D) se observa que su nivel de expresión se incrementa al final de desarrollo del pistilo, al igual que la proteína HT-B (Figura 23E).

5.9 Identificación celular de StEP

Después de haber ubicado macroscópicamente el lugar donde se expresa StEP en *N. rastroensis* se deseó conocer su localización subcelular en el estigma. Para esto, se realizaron detecciones inmunohistoquímicas a través del uso de cortes celulares de 8 µm de estigmas de flores emasculadas (sin anteras) en pre-antesis. Estos tejidos fueron incubados con el anticuerpo contra StEP, el cual fue reconocido con un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo que emite luz a una longitud de onda 488 nm y que se puede observar a través del microscopio confocal de fluorescencia.

Las imágenes muestran que StEP se localiza abundantemente en el estigma de *N. rastroensis*, principalmente en las células del tejido de transmisión a nivel del estigma (flecha azul) (Figura 24A). De igual forma se observó una clara señal de StEP en las células papilares del estigma (flechas amarillas) (Figura 24B y C).

En una inmunodetección en la parte superior del estilo, se muestra que el anticuerpo anti-StEP detecta una ligera señal positiva (flecha rosa) (Figura 24D), indicando la presencia de StEP en el estilo, lo cual concuerda con su detección por Western Blot (Figura 21D).

Resultados

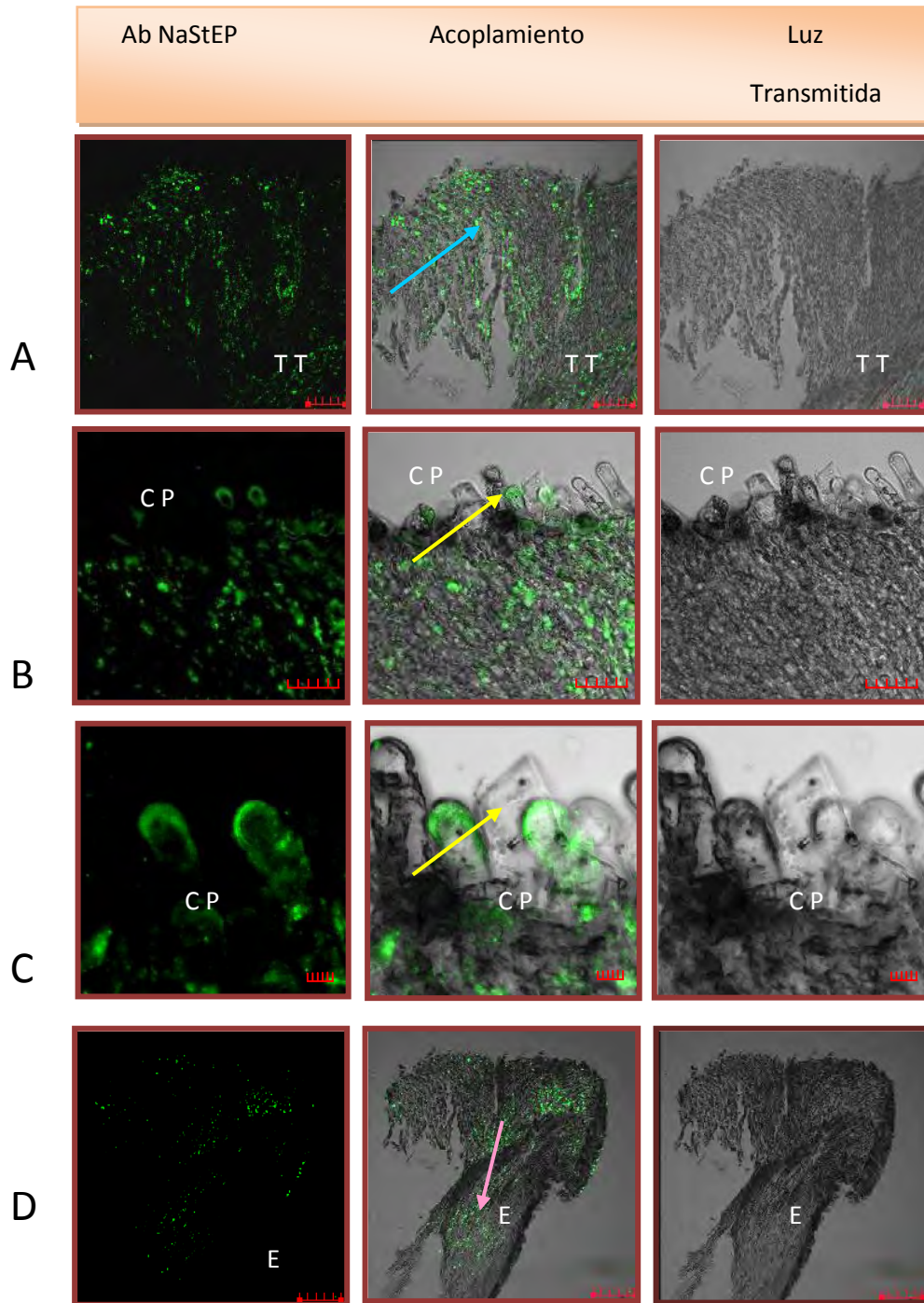


Figura 24. Inmunolocalización de StEP en el estigma de *N. rastroensis*. A) Cortes longitudinales de pistilos de *N. rastroensis*, StEP (verde) situado específicamente en la parte superior del estigma (flecha azul). B) y C) Se observa StEP dentro de las papilas estigmáticas (flechas amarillas). D) StEP a lo largo de la parte superior del estilo (flecha rosa) La barra en A equivale a 30 μ m, B equivale a 30 μ m, en C a 5 μ m y en D equivale a 100 μ m. TT (tejido de transmisión), CP (Células papilares), E (estigma).

DISCUSIÓN

6. Discusión.

El mecanismo de autoincompatibilidad (AI), ha contribuido de manera importante a lo largo de la evolución a promover la diversidad genética en las plantas, como ocurre en las Solanaceae, el grupo al que pertenecen *Nicotiana glauca* y *Solanum lycopersicum*. La AI ha sido objeto de numerosos estudios por parte de diferentes grupos de investigación alrededor del mundo, que han descubierto como actores principales tanto a la S-RNasa como la determinante femenina en el pistilo y a SLF/SFB como la determinante masculina en el polen. Sin embargo, a pesar de los grandes avances, el mecanismo de la AI no se ha podido dilucidar totalmente, ya que la interacción entre las determinantes, sólo es el principio que desencadena una respuesta de rechazo del polen cuando existe una coincidencia de haplotipos S. Esto sucede porque otros factores no codificados en el locus-S llamados genes modificadores (GM), como *120k* (Hancock *et al.*, 2005), *HT-B* (McClure *et al.*, 1999) y *NaStEP* (Jimenez-Duran *et al.*, comunicación personal), tienen un papel esencial en la vía bioquímica del rechazo del polen incompatible.

Debido a que el gen *NaStEP* fue clonado y evaluada su función en la AI en nuestro grupo de investigación, el propósito del presente estudio se enfocó a la caracterización de *StEP* en *N. glauca* y en *S. lycopersicum*.

La importancia de este estudio radica en que si el gen *StEP*, de las especies arriba mencionadas, posee patrones de expresión similares a los encontrados en *N. glauca* (Busot *et al.*, 2008), sería muy probable, que también se comportará como un GM esencial del pistilo en la respuesta del rechazo del polen.

De esta manera, el primer paso fue clonar el cDNA ortólogo de *NaStEP* a partir de un cDNA de estilos de *N. glauca*. Por medio de RT-PCR se amplificó un cDNA de un tamaño aproximado de 659 pb, el cual en comparación con el gen de *N. glauca* no presentó diferencias significativas a nivel de secuencia que afectaran su marco de lectura, ya que sólo se observaron 10 cambios de nucleótidos y 6

Discusión

delecciones lo que hace que tenga un porcentaje de identidad del 87% con *NaStEP*.

En cuanto a la secuencia de aminoácidos, se conserva la relación con la de nucleótidos, ya que se encontraron 5 variaciones alélicas cercanas a la región amino terminal y cuatro cambios similares en la región carboxilo terminal. Así, se encontró que entre la secuencia de *N. raströensis* y la correspondiente a *N. alata* para la proteína StEP existe un 86% de similitud.

Después de realizar un análisis bioinformático, se observó que la región del centro para las proteínas agrupadas en la Figura 19 tiende a ser más conservada, debido a que en esta zona se encuentran la señal de destino vacuolar **NPIVLP**, la cual es importante para la localización subcelular de la proteína (Busot *et al.*, 2008). Un análisis bioinformático de dominios conservados dentro de la página del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), señaló de manera notable, que todas las especies de *Nicotiana* analizadas, incluyeron en sus secuencias aminoacídicas el motivo **DPEVAPSS**, un dominio que se propone como el sitio reactivo de algunos inhibidores de proteasa como el de la subtilisina (Page y Cera., 2007).

También se observó a través de un análisis de RNA, que *StEP* se expresa en plantas autoincompatibles de *Nicotiana sp.*, como son *N. alata*, *N. raströensis*, *N. glauca*, *N. alata* BT, pero no en plantas autocompatibles como *N. tabacum* y *N. plumbaginifolia*, ya que estas dos últimas no acumulan el mRNA correspondiente a *StEP*, de igual manera a *NaStEP* en *N. alata* (Busot *et al.*, 2008). Este hecho hace suponer que en las especies compatibles de *Nicotiana*, *StEP* pudo haber acumulado mutaciones en su región promotora que afectaran la expresión de este gen o, mutaciones en la región codificadora. En este sentido, en nuestro grupo tenemos datos que demuestran que el gen *StEP* está presente en el genoma de especies compatibles como *N. tabacum* y *N. plumbaginifolia*. Notablemente, la secuencia de su región codificadora indica que se acumulan mutaciones que generan codones de término prematuros (F.C.G., comunicación personal), los que probablemente afectan la estabilidad de su RNAm. Aunque, como no se ha

Discusión

analizado la región promotora de StEP no podemos descartar que también haya mutaciones que afecten su expresión en las especies compatibles de *Nicotiana*.

La proteína NaStEP se expresa mayoritariamente en el estigma de *N. alata*; sin embargo, en este estudio, se observó la presencia de StEP en distintos segmentos del estilo, a través de un ensayo tipo Wester-Blot, donde aparecieron bandas de diferente peso molecular, las cuales podrían corresponder a estados diferentes de glicosilación de la proteína, como ocurre en *N. alata* (Busot et al., 2008). Con lo que se puede intuir que al encontrarse tanto en estilo como el estigma, StEP podría estar entrando al tubo polínico, a diferentes niveles de desarrollo del tubo polínico durante su viaje hacia el ovario.

Un dato interesante de este estudio es que, en el inmunoanálisis para detectar ortólogos de StEP en *Solanum lycopersicum* se encontró que esta especie tiene proteínas que comparten un epítotope con StEP, ya que además de detectar una señal en el estigma, también se observó en distintos órganos como pétalos, sépalos ovario y estilo. Esto podría estar indicando la participación de esta proteína en diversas actividades en tejidos diferentes al estigma y el estilo. Lo que correlaciona con la localización ubicua de otros inhibidores de proteasas en plantas, los cuales están relacionados con acciones de protección contra insectos que atacan plantas (Benítez, 2005);

Nuestros datos también indican que a diferencia de NaStEP en *N. alata*, la proteína StEP en *N. rastroensis* se sintetiza desde el inicio del desarrollo del pistilo. Esto sugiere que quizá al principio de la formación del estigma, StEP de *N. rastroensis* (NrStEP), se requiera para otras funciones distintas a la polinización de la flor, dentro de las cuales, bien puede ser la regulación del metabolismo de la planta, ya que como su nombre lo dice, los inhibidores de proteasas bloquean la acción de rompimiento de proteínas (Barret y Neil., 2007).

Finalmente, el análisis inmunohistoquímico indica que la ubicación subcelular de StEP es en las papilas estigmáticas de *N. rastroensis*, lo que concuerda con los resultados para NaStEP en *N. alata* (Busot et al., 2008).

Discusión

De manera concluyente y con fin de proponer una función para StEP dentro del mecanismo de AI, a continuación se propone el posible escenario de cómo podría estar actuando en el rechazo del polen.

¿Cómo funciona NaStEP/StEP en el rechazo del polen?

El modelo de la compartimentalización de la S-RNasa propuesto por Goldtaji *et al.* (2006), sugiere que las S-RNasas entran al tubo polínico (TP) por endocitosis y son almacenadas en una vacuola donde si la cruz es incompatible la vacuola se rompe liberando a las ribonucleasas S al citosol del TP, donde degradarán su RNA, provocando la inhibición de su crecimiento. Sin embargo, si la cruz es compatible las vacuolas con las S-RNasas permanecerán intactas, permitiendo que el tubo polínico se desarrolle y crezca hasta el ovario. En este modelo se plantea además que la ruptura de la vacuola se desencadena por acción directa o indirecta de la proteína estilar HT-B, que también se transportó por endocitosis al TP. En una cruz compatible la proteína HT-B se degrada en el interior del TP (Goldraj *et al.*, 2006), lo que pone de manifiesto que la estabilidad de esta proteína depende de la interacción S-específica en el citosol del tubo polínico, entre la determinante masculina SLF y la femenina, la S-RNasa. De esta manera, se postula que la formación de complejos S-RNasa-SLF S-específicos provocaría que se active una proteasa (hasta el momento desconocida) que degradara a la proteína HT-B.

Siguiendo el razonamiento anterior y si la proteína NaStEP/StEP tuviera actividad de inhibidor de proteasas, proponemos que NaStEP/StEP es un regulador positivo de la vía del rechazo del polen en *Nicotiana*. Bajo esta hipótesis, y dado que la proteína NaStEP/StEP es muy abundante en el estigma, los tubos polínicos incorporarían a NaStEP/StEP a su citoplasma desde el inicio de su crecimiento. Una vez en el TP esta proteína sería confinada a una vacuola, donde se almacenaría junto con proteínas como 120K, HT-B y las S-RNasas. Ahí NaStEP/StEP inhibiría a la (s) proteasa(s) que degrade (n) a HT-B, dejando activa a esta proteína para que actúe en eventos tardíos de la polinización donde se define la respuesta del rechazo del polen. Si HT-B se degradará en la vacuola de

Discusión

manera prematura, todas las cruzas serían compatibles independientemente de si coincide el haplotipo S del polen con el del estilo. En nuestro grupo tenemos datos que son consistentes con esta hipótesis, ya que cuando *NaStEP* está silenciado en plantas transgénicas de *Nicotiana*, la proteína HT-B se degrada tanto en tubos polínicos compatibles como en incompatibles, ocasionando que todos los TP independientemente de su haplotipo S, alcancen el ovario (Jiménez-Durán *et al.*, comunicación personal), un hecho totalmente diferente a lo que ocurre en cruzas incompatibles donde la proteína HT-B permanece estable en los TP, provocando que la liberación de la SRNasa al citoplasma .

Por el contrario, en cruzas compatibles, la inhibición es sobre StEP, por lo cual suponemos que, debe existir una proteasa para StEP y que se active mediante una cascada de señalización mediada por la interacción S-específica SRNasa-SLF y así ocasionar la degradación de HT-B y la estabilización de la vacuola que contiene a la S-RNasa.

En la Figura 25, mostramos un diagrama del mecanismo anteriormente descrito donde StEP interactúa en el mecanismo de incompatibilidad de *Nicotiana*.

Discusión

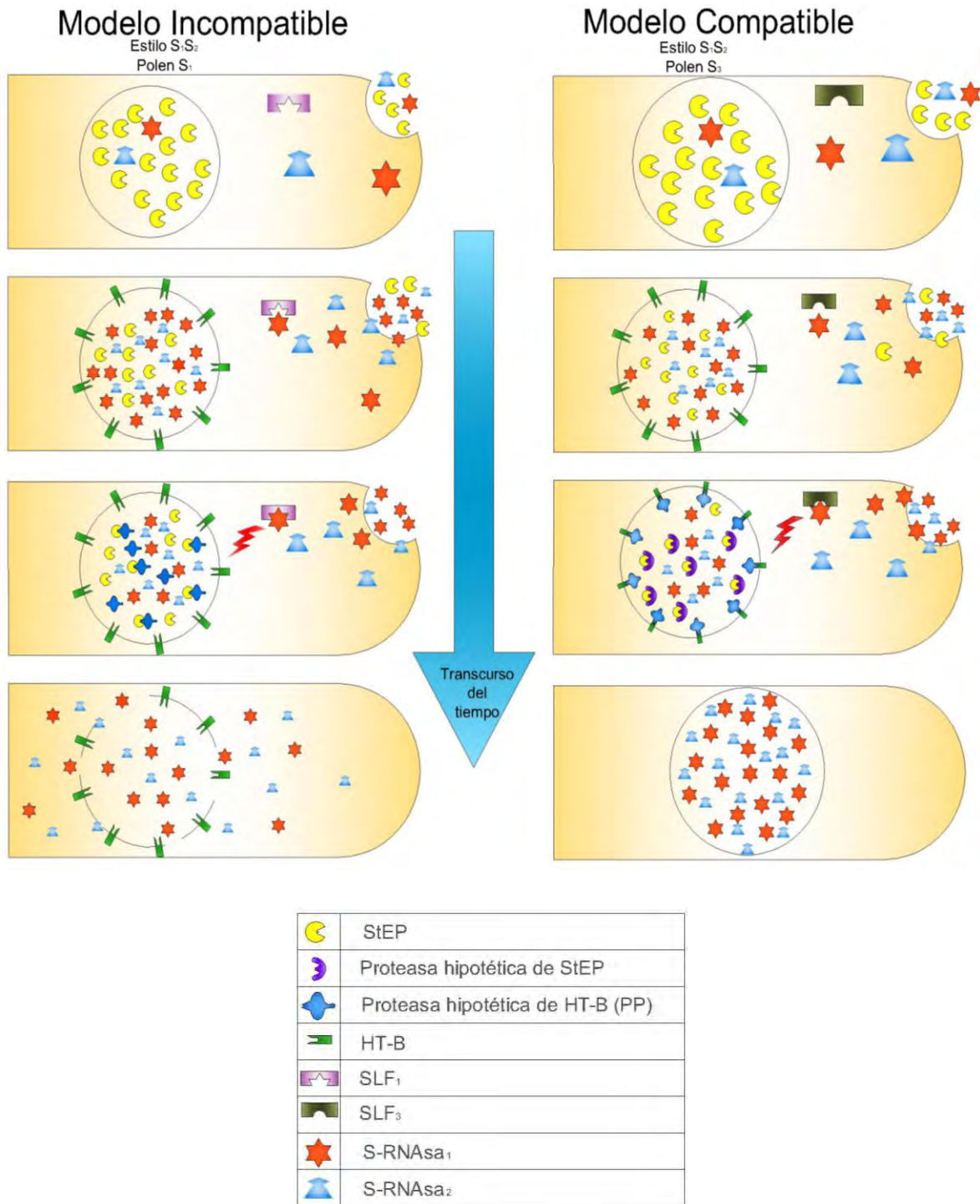


Figura 25. Mecanismo de acción para StEP en la familia *Nicotiana*. Desde que sucede la polinización StEP se introduce tanto en el tubo polínico compatible como en incompatible. Dependiendo de la interacción entre la S-RNAsa y SLF, se desencadena una serie de reacciones, las cuales puede llevar a una destrucción del tubo polínico (Modelo Incompatible) a través de la degradación de la proteasa de HT-B por parte de StEP; por el otro lado en el Modelo Compatible, existe una proteasa hipotética que degrada a StEP dejando actuar libremente a la proteasa de HT-B, con lo que la integridad de la vacuola donde se almacenan las S-RNAsas permanece intacta.

CONCLUSIONES

Conclusiones

7. Conclusión.

Los resultados de esta investigación indican que *N. rastroensis* expresa una proteína ortóloga de NaStEP de manera muy abundante en las células del estigma, adicionalmente una baja cantidad de StEP es detectada en los estilos (30 veces menor que en el estigma).

La proteína StEP pertenece a la familia de inhibidores de proteasa tipo Kunitz.

Finalmente se puede concluir que en otros miembros de la familia Solanaceae, como *Solanum lycopersicum*, anticuerpos policlonales monoespecíficos, reaccionan con proteínas que poseen el epítipo para NaStEP. Estas proteínas StEP-homólogas se expresan en diferentes tejidos de *S. lycopersicum*, incluyendo el estilo y estigma donde se encontró originalmente en *N. alata*.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía:

1. **Barret., J Alan y Neil D. Rawlings** (2007). Protease. Encyclopedia of Life Sciences.
2. **Benítez B. Antonio** (2005). Avances recientes en biotecnología vegetal e Ingeniería genética de plantas. Ed. Reverté. Pag. 110.
3. **Bosch M.** (2002). A functional study of pistil-specific proline-rich glycoproteins. PhD Thesis. Catholic University of Nijmegen, The Netherlands.
4. **Buitink, J., O. Leprince, M.A. Hemminga, y F.A. Hoekstra.** (2000). The effects of moisture and temperature on the ageing kinetics of pollen: Interpretation based on cytoplasmic mobility. *Plant Cell Environ.* **23**: 967–974.
5. **Busot G. Y., McClure B., Ibarra-Sánchez P. C., Jiménez-Durán K., Vázquez-Santana S. y Cruz-García F.** (2008). Pollination in *Nicotiana alata* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *J. Exp. Bot.* **59**: 3187-3201.
6. **Chase W. M.** (2001). Angiosperms. Encyclopedia of Life Sciences.
7. **Cheung A. Y., y H. Wu.** (2008). Structural and Signaling Networks for the Polar Cell Growth Machinery in Pollen Tubes. *Annual Reviews. Plant Biology.* **59**:547-572.
8. **Cheung, A.Y., Wang, H., y Wu. H.-m.** (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth *Cell* **82**, 383-393
9. **Clarke A., P. Gleeson, S. Harrison, y B. Knox.** (1979). Pollen-stigma interactions: Identification and characterization of surface components with recognition potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: No 7, pp 3358-3362. *Cell Biology.*
10. **Cruz- Garcia. F. Hancock F. McClure B.** (2003). S-RNase complexes and pollen rejection. *J. Exp. Bot* **54**: 123-30

Bibliografía

11. **de Graaf, B.H.J., B.A. Knuiman, J. Derksen y C. Mariani.** (2003). Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.* **54**: 55-63.
12. **de Nettancourt D.** (2001) *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag. 322 pp. 2nd ed.
13. **Dickinson, H.** (1995). Dry stigmas, water and self-incompatibility in Brassica. *Sex. Plant Reprod.* **8**: 1–10.
14. **Dixit, R., C. Rizzo, M. Nasrallah, y J. Nasrallah.** (2001). The Brassica MIP-MOD gene encodes a functional water channel that is expressed in the stigma epidermis. *Plant Mol. Biol.* **45**: 51–62.
15. **Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A., y Mitchison, G.** (1998). *Biological Sequence Analysis* (Cambridge University Press).
16. **Edlund A. F., Swanson R. y Preuss D.** (2004). Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *The Plant Cell.* **16**: S84-S97.
17. **Elleman, C.J., V. Franklin-Tong, y H.G. Dickinson.** (1992). Pollination in species with dry stigmas: The nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytol.* **121**: 413–424.
18. **Elleman, C.J., y H.G. Dickinson.** (1986). Pollen-stigma interactions in Brassica. IV. Structural reorganization in the pollen grains during hydration. *J. Cell Sci.* **80**: 141–157.
19. **Franklin-Tong V. y C. Franklin.** (2007). Self-incompatibility. *Encyclopedia of life Sciences*.
20. **Franklin-Tong VE, F.C. Franklin.** (2003). Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci.* **8**: 598–605
21. **Franklin-Tong VE, Holdaway-Clarke TL, Straatman KR, Kunkel JG, Hepler PK.** (2002). Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *Plant J.* **29**:333–45

Bibliografía

22. **Geitmann A, B.N. Snowman, A.M.C. Eons, V.E. Franklin-Tong.** (2000). Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell* **12**:1239-52.
23. **Gibbon, B.C., Kovar, D.R., y C.J. Staiger.** 1999. Latrunculin B has different effects on maize pollen germination and tube growth. *Plant Cell* **11**, 2349-2363.
24. **Goldraj, A., K. Kondo, C.B. Lee, C.N. Hancock, M. Sivaguru, S. Vazquez-Santana, S. Kim, T.E. Phillips, F. Cruz-Garcia y B. McClure.** (2006). Compartmentalization of S-RNase and HTB degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*. **439**: 805–810.
25. **Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias DD, Goring DR.** 1998. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:382–87
26. **Hancock CN, L. Kent. B.A. McClure.** (2005). The 120kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J* **43**: 716-723
27. **Hernández-Navarro A., Y. Cruz-Zamora, C. Ibarra-Sánchez y F. Cruz-García.** (2009). Molecular mechanisms on plant. 1-36
28. **Heslop-Harrison J.** (1979). An interpretation of the hydrodynamics of pollen. *Am. J. Bot.* **66**: 737–743.
29. **Heslop-Harrison, Y., and Heslop-Harrison, J.** (1992). Germination of monocolpate angiosperm pollen evolution of the actin cytoskeleton and wall during hydration activation and tube emergence. *Ann. Bot.* **69**: 385–394.
30. **Hua Z.-H, A. Fields y T.-H. Kao.** (2008), Biochemical Models for S-RNase-Based Self-Incompatibility. *Molecular Plant.* **4**: 575-585.
31. **Ida K, Norioka S, Yamamoto M, Kumasaka T, Yamashita E, et al.** 2001. The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* SF11-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* **314**:103–12
32. **Ingrouille M.** (2002), *Flowers*. Encyclopedia of Life Sciences.
33. **Juárez-Díaz, J. A., B. McClure, S. Vázquez-Santana, A. P. Guevara-García. J. León-Mejía. J. Márquez-Guzmán y F. Cruz-García.** (2006). A

Bibliografía

- Novel Thioredoxin h Is Secreted in *Nicotiana alata* and Reduces S-RNase in Vitro. *J. Biol. Chem.* **281**: 3418-3424.
34. **Kao, T.-h., y A.G. McCubbin.** (1996). *How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding.* *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **93**: 12059–12065.
35. **Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, et al.** (2002). An F-box gene linked to the selfincompatibility (*S*) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* 50:29–42
36. **Lalonde, B.A., M.E. Nasrallah, K.G. Dwyer, C.H. Chen, B. Barlow y J.B. Nasrallah.** (1989). A highly conserved Brassica gene with Pollen and Stigma Structure and Function S95 homology to the S-locus-specific glycoprotein structural gene. *Plant Cell* **1**: 249–258.
37. **Lee C. B., N. Kirby, Swatek, y B. McClure.** (2008b). Pollen Proteins Bind to the C-terminal Domain of *Nicotiana alata* pistil arabinogalactan proteins. *JBC.* **283**: 26965–26973
38. **Lee C. B., S. Kim. y B. McClure.** (2008a). A pollen protein, NaPCCP, That binds pistil arabinogalactan proteins also binds phosphatidylinositol 3-phosphate and associates with the pollen tube endomembrane system. *Plant Physiol.* **149**: 171-802.
39. **Lee H-S, Huang S, Kao T-h.** (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 367:560–63
40. **Lind, J. L., A. Bacic, A.E. Clarke y M.A. Anderson.** (1994). A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant J.* **6**: 491–502.
41. **Lind, J. L., I. Böning, A.E. Clarke, y M.A. Anderson.** (1996). A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana alata* in vivo. *Sex. Plant Reprod.* **9**: 75–86
42. **Lush, W.M., F. Grieser, y M. Wolters-Arts.** (1998). Directional guidance of *Nicotiana alata* pollen tubes in vitro and on the stigma. *Plant Physiol.* **118**: 733–741.

Bibliografía

43. **Luu, D.T., D. Marty-Mazars, M. Trick, C. Dumas, y P. Heizmann.** (1999). Pollen-stigma adhesion in *Brassica* spp involves SLG and SLR1 glycoproteins. *Plant Cell* **11**: 251–262.
44. **Luu, D.-T., X. Qin, D. Morse, y M. Cappadocia.** (2000). S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*. **407**: 649-551.
45. **Matsuura T, Sakai H, Unno M, Ida K, Sato M, et al.** (2001). Crystal structure at 1.5-°A resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *J. Biol. Chem.* 276:45261–69
46. **Matton DP, Luu DT, Xike Q, Laublin G, O'Brien M, et al.** (1999). Production of an S RNase with dual specificity suggests a novel hypothesis for the generation of new *S* alleles. *Plant Cell* 11:2087–97
47. **Matton DP, Maes O, Laublin G, Xike Q, Bertrand C, et al.** (1997). Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell* 9:1757–66
48. **McClure B.** (2006). New views of S-RNase-based self incompatibility. *Curr. Opin. Pnat Biol.* **9**: 639-646.
49. **McClure B. A. y V. Franklin-Tong.** (2006). Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *J Plant Biol.* **2**: 222-245
50. **McClure BA, Gray JE, Anderson MA y Clarke AE.** (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* 347: 757–760.
51. **McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, et al.** (1989). Style selfincompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342:955–57
52. **McClure, B. A., B. Mou, S. Canevascini y R. Bernatzky.** (1999). A small asparagines-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**: 13548—13553.

Bibliografía

53. **McCubbin AG, Kao T-h.** (2000). Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:333–64
54. **Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA.** (1994). S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* 367:563–66.
55. **Muzzurco M, Sulaman W, Elina H, Cock JM, Goring DR.** (2001). Further analysis of the interactions between the *Brassica* S receptor kinase and three interacting proteins (ARC1, THL1 and THL2) in the yeast two-hybrid system. *Plant Mol. Biol.* 45:365–76.
56. **Nasrallah JB, Kao T-h, Chen C-H, Goldberg ML, Nasrallah ME.** (1987). Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the S locus of *Brassica oleracea*. *Nature* 326:617–19.
57. **Newbigin, E., Anderson, M.A., y Clarke, A.E.** (1993). Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* 5, 1315-1324.
58. **O'Brien, M. C. Kapfer, G. Major, M. Laurin, C. Bertrand, K. Kondo, Y. Kowyama y D.P. Matton.** (2002). Molecular analysis of the stilar-expressed *Solanum chacoense* asparagine-rich protein family related to the HT modifier of Gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J.* 32, 1–12.
59. **Page J. M. y Cera Di E.** (2007). Serine Proteases. *Encyclopedia of Life Sciences*.
60. **Poulter, N. S., Vatovec, S., y Franklin-Tong, V.E.** 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 2265.
61. **Qiao, H., Wang, L. Zhao, J. Zhou, J. Huang, Y. Zhang y Y. Xue.** (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.
62. **Rudd J.J. y V.E. Franklin-Tong.** (2003). Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*. *J. Exp. Bot.* 54:141–48

Bibliografía

63. **Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** (1999). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286:1697–700
64. **Sijacic P, X. Wang, A.L. Skirpan, Y. Wang, P.E. Dowd, A.G. McCubbin, S. Huang y T.-H. Kao.** (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*. **429**: 302–305.
65. **Silva NF, Stone SL, Christie LN, Sulaman W, Nazarian KAP, et al.** (2001). Expression of the S receptor kinase in self-compatible *Brassica napus* cv. Westar leads to the allelespecific rejection of self-incompatible *Brassica napus* pollen. *Mol. Genet. Genomics* 265:552–59
66. **Sims, T. y M. Ordanic.** (2001) Identification of a S-ribonuclease-binding protein in Petunia hybrid. *Plant Mol. Biol.* **47**: 771-783
67. **Sims, T. L.,** (1993) Genetic regulation of self-incompatibility *Crit. Rev. Plant Sci.* **12** 129-167.
68. **Snowman, B.N., Kovar, D.R., Shevchenko, G., Franklin-Tong, V.E. y C.J. Staiger.** (2002). Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *Plant Cell* 14, 2613-2626.
69. **Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB.** (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8816–20.
70. **Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR.** (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell* 15:885–98
71. **Stone SL, Arnoldo M, Goring DR.** (1999). A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* 286:1729–31
72. **Suzuki T, Kusaba M, Matsushita M, Okazaki K, Nishio T.** (2000). Characterization of *Brassica* S-haplotypes lacking S-locus glycoprotein. *FEBS Lett.* 482:102–8
73. **Takayama S y A. Isogai.** (2005). Self-incompatibility in plants. *Annual Reviews of Plant Biology* **56**: 467-489.

Bibliografía

74. **Takayama S, Isogai A, Tsukamoto C, Ueda Y, Hinata K, et al.** (1987). Sequences of Sglycoproteins, products of *Brassica campestris* self-incompatibility locus. *Nature* 326:102–5.
75. **Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F-S, et al.** (2000). The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1920–25
76. **Takayama, S., H. Shiba, M. Iwano, K. Asano, M. Hara, F.S. Che, M. Watanabe, K. Hinata, y A. Isogai.** (2000). Isolation and characterization of pollen coat proteins of *Brassica campestris* that interact with S locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3765–3770.
77. **Taylor, L. P. y P.K. Hepler.** (1997). Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 461–491.
78. **Thompson, R.D., y H.-H. Kirch.** (1992). The S-locus of flowering plants: when self-rejection is self interest. *Trends Genet.* **8**: 383–387.
79. **Tiwari, S.C., y V.S. Polito.** (1988). Organization of the cytoskeleton in pollen tubes of *Pyrus communis*: A study employing conventional and freeze-substitution electron microscopy, immunofluorescence and rhodamine-phalloidin. *Protoplasma* **147**: 100–112.
80. **Twell D.** (2001). Pollen: Structure, Development and Function. *Encyclopedia of Life Sciences.*
81. **Wang, H.-Y., y Y.-B. Xue.** (2005). Subcellular localization of the S-locus F-box protein AhSLF2 in pollen and pollen tubes of self-incompatible *Antirrhinum*. *J. Integrat. Plant Biol.* **47**: 76-83.
82. **Wheeler MJ, de Graaf BHJ, Hadjosif N, Perry RM, Poulter NS, Osman K, Vatovec S, Harper A, Franklin FCH, Franklin-Tong VE.** (2009). Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature* 459, 992–995.
83. **Wheeler, M.J., V.E. Franklin y F.C.H. Franklin.** (2001). The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytol.* **151**: 565-584.

Bibliografía

84. **Wolters-Arts, M., W.M. Lush y C. Mariani.** (1998). Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* **392**: 818–821.
85. **Wu, H.-m., E. Wong, J. Ogdahl y A.Y. Cheung.** (2000). A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant J.* **22**: 165-176
86. **Wu, H-M. Wang H. y A.Y. Cheung.** (1995). A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* **82**: 395-403.
87. **Zhang Y., Z. Zhao y Y. Xue.** (2009). Roles of Proteolysis in Plant Self-Incompatibility. *Plant Biol.* 2009. **60**:21–42
88. **Zinkl G. M.** (2002). Plant Reproduction. *Encyclopedia of life Sciences.*

Consultas en Internet

1. (Julio-2009) <http://regularsolamente.blogspot.com/>

APÉNDICE

Apéndice

9. Apéndice.

a) Agua DEPC

- Agua desionizada
- 0.05 % Dietil pirocarbonato (DEPC)
- Agitar por toda la noche y esterilizar 1.5 h a 121 °C, 1.1 atm.

b) Amortiguador de Fosfatasas.

- Tris HCl 1.21 %
- Cloruro de sodio 0.6%
- Cloruro de magnesio 0.1%
- Ajustar a pH 9.5

c) Amortiguador de carga 2.5%

- SDS (Lauril Sulfato de Sodio) 7.5%
- DTT 0.1M
- EDTA 10 mM
- Sacarosa 30%
- Azul de bromofenol 0.25 mg/mL
- Tris HCl 0.3 M
- Ajustar pH 6.8

d) Medio LB

- Extracto de levadura 0.5 %
- Cloruro de sodio 0.5%
- Bacto triptona 1.0 %
- Agar 1.5%

Apéndice

e) Medio SOC

- Medio LB + 0.02 M de glucosa

f) PBS 10x

- Cloruro de sodio 8.0 %
- Cloruro de potasio 0.2%
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 %
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 %
- Ajustar a pH 7.3

g) Solución de bloqueo para Western Blot.

- Leche en PBS 1x 5%
- Tween 20 0.1%

h) Solución de bloqueo para análisis inmunohistoquímico 10%.

- 100 μL Suero bovino
- PBS 1x