



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INTERACTORES PROTEICOS DE NASTEP EN EL POLEN/ TUBO
POLÍNICO DE *NICOTIANA RASTROENSIS*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Liliana Elizabeth García Valencia

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Felipe Cruz García
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Alejandra A. Covarrubias Robles, Instituto de Biotecnología, UNAM
Rogelio Rodríguez Sotres, Facultad de Química, UNAM

MÉXICO, D.F. Mayo, 2013



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.

Reconocimientos

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García en el Laboratorio 104, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

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

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT 81968 y DGAPA-IN 210312. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado del Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Mario Rocha Sosa	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez	Instituto de Ecología, UNAM
Vocal	Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Patricia León Mejía	Instituto de Biotecnología, UNAM

Índice

	Página
Índice General	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	IV
Abreviaturas	V
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Generalidades de la flor	3
1.2. Polinización, germinación y crecimiento del tubo polínico	3
1.3. Sistema de incompatibilidad homomórfico	6
1.3.1. Sistema de autoincompatibilidad esporofítico	9
1.3.2. Sistema de autoincompatibilidad gametofítico	11
1.3.3. Sistema de autoincompatibilidad en Papaveraceae	12
1.3.4. Sistema de autoincompatibilidad en la familia Solanaceae	14
1.3.5. <i>S-RNasa</i>	15
1.3.6. <i>S-Locus F box</i>	17
1.3.7. Genes modificadores	18
<i>HT-B</i>	19
<i>120K</i>	20
<i>NaStEP</i>	20
1.3.8. Modelos de rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasas	21
Modelo de la degradación de la S-RNasa	22
Modelo del secuestro de la S-RNasa	22
¿Qué se conoce hasta ahora?	23
2. Planteamiento del problema	26
3. Hipótesis	27
4. Objetivos	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos particulares	28
5. Metodología	29
5.1. Construcción de la proteína carnada (<i>NaStEP</i>)	30
5.1.1. Clonación de <i>NaStEP</i> en el vector pGBKT7	30
5.1.2. Determinación de toxicidad y autoactivación de <i>NaStEP</i> /pGBKT7	32
5.2. Construcción de la biblioteca de cDNA en pGADT7-Rec	32
5.2.1. Purificación de RNA mensajero	32
5.2.2. Síntesis de cDNA de doble cadena	32
5.3. Búsqueda de interacciones proteína- proteína	33
5.3.1. Purificación de DNA plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	

y transformación de <i>E. coli</i>	34
5.4. Ensayos confirmatorios de las interacciones proteína- proteína	34
5.5. Análisis de la acumulación del transcrito <i>C1-21</i> mediante northern blot	35
5.6. Interacción de NaStEP y HT-B	35
6. Resultados	38
6.1. Construcción de la proteína carnada (NaStEP)	38
6.1.1. Clonación de <i>NaStEP</i> en el vector pGBKT7	38
6.1.2. Determinación de autoactivación y toxicidad de NaStEP/pGBKT7	38
6.2. Biblioteca de cDNA de polen/ TP	39
6.3. Búsqueda de interacciones proteína- proteína	40
6.4. Confirmación de interacciones positivas	43
6.5. Análisis de la acumulación del transcrito <i>C1-21</i> mediante northern-blot	44
6.6. Interacción física entre NaStEP con HT-B	45
7. Discusión	47
8. Conclusiones	53
9. Perspectivas	54
10. Bibliografía	55
11. Apéndice	68
11.1. Extracción de RNA total	68
11.2. Síntesis de cDNA	68
11.3. Purificación de DNA de gel de agarosa	68
11.4. Células competentes de <i>E. coli</i>	69
11.5. Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico	69
11.6. Purificación de plásmido de <i>E. coli</i>	70
11.7. Células competentes de <i>S. cerevisiae</i>	70
11.8. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	71
11.9. Purificación de RNA mensajero	71
11.10. Construcción de la biblioteca de cDNA con los adaptadores SMARTIII, CDSIII, CDSIII/6	72
11.11. Purificación de plásmido de <i>S. cerevisiae</i>	74
11.12. Germinación de TP <i>in vitro</i>	75
11.13. Análisis por PCR de las colonias de la biblioteca	75
11.14. Marcaje radiactivo <i>Random Primers DNA Labeling System</i>	75
11.15. Soluciones y medios	76

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Esquema de los diferentes órganos de la flor	3
Figura 2. Gradiente de Ca^{+2} intracelular en el TP	5
Figura 3. Esquema de la doble fecundación	6
Figura 4. Sistema de AI heteromórfico	9
Figura 5. Rechazo del polen en sistemas de AI esporofítica	10
Figura 6. Rechazo del polen en sistemas de AI gametofítica	12
Figura 7. Modelo de rechazo del polen en <i>Papaver</i>	14
Figura 8. Estructura tridimensional de la S_{F11} -RNasa de <i>N. alata</i>	16
Figura 9. NaStEP de algunas especies AI de <i>Nicotiana</i>	21
Figura 10. Modelo de compartimentalización de S-RNasa	23
Figura 11. Esquema de los hechos conocidos en la AI dependiente de S-RNasa	25
Figura 12. Esquema del doble híbrido	30
Figura 13. Amplificación de cDNA de <i>NaStEP</i> de <i>N. rastroensis</i> por PCR	38
Figura 14. Pruebas de toxicidad y autoactivación de NaStEP	39
Figura 15. Construcción de una biblioteca de cDNA de polen/TP	39
Figura 16. Interacción proteína-proteína (NaStEP y Biblioteca polen/TP)	41
Figura 17. Histograma de clonas analizadas de la biblioteca polen/TP	41
Figura 18. Alineamiento de la clona C1-12	42
Figura 19. Alineamiento de la clona C1-21	42
Figura 20. Corroboración de la interacción entre las clonas candidatas de la biblioteca y NaStEP	43
Figura 21. Expresión tejido específico del RNAm de <i>C1-21</i>	44
Figura 22. Niveles del RNAm de <i>C1-21</i> en diferentes etapas de desarrollo de la antera de <i>N. alata</i>	45
Figura 23. Interacción de NaStEP y HT-B	46
Figura 24. Alineamiento de diferentes porinas con C1-21	51

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Componentes para realizar PCR de <i>NaStEP</i>	30
Tabla 2. Digestión del vector pGBKT7 y <i>NaStEP</i>	31
Tabla 3. Ligación de <i>NaStEP</i> y el vector pGBKT7	31
Tabla 4. Digestión de productos de PCR de la biblioteca	34
Tabla 5. Componentes para realizar PCR de <i>HT-B</i>	36
Tabla 6. Digestión del vector pACT2-1 y HT-B	36
Tabla 7. Ligación de <i>HT-B</i> y el vector pACT2-1	36
Tabla 8. Determinación de la toxicidad de NaStEP/pGBKT7	39
Tabla 9. Cuantificación de RNAm de polen y TP de <i>N. rastroensis</i>	40
Tabla 10. Componentes de la solución amortiguadora 5X <i>Fermentas</i>	76
Tabla 11. Componentes de la solución amortiguadora <i>cDNA Advantage Pol 10X</i>	76
Tabla 12. Componentes de la solución amortiguadora NE de <i>EcoRI 10X</i>	76
Tabla 13. Componentes de la solución amortiguadora NE 4 10X	77
Tabla 14. Componentes de la solución amortiguadora de <i>Promega 2X</i>	77
Tabla 15. Medio para germinar tubos polínicos de <i>N. rastroensis</i>	79

Abreviaturas

AbA	Aureobasidina A
AC	Autocompatibilidad
AI	Autoincompatibilidad
ATPe	ATP extracelular
DA	Dominio de activación
DDO	Medio sintético sin triptófano y leucina (SD/-Trp/-Leu)
DU	Dominio de unión a DNA
GM	Genes modificadores
min	minutos
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PTPM	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
QDO	Medio sintético sin triptófano, leucina, adenina e histidina (SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His)
RNAi	RNA interferente
RNA _m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SA-PMP	Partículas paramagnéticas de estreptavidina
seg	segundos
TFM	Transportador de fosfatos mitocondrial
TP	Tubo polínico
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje

Resumen

Los sistemas de incompatibilidad evitan la auto-fecundación y están presentes en un gran número de familias de angiospermas, lo que permite que se genere mayor diversidad genética. En varias especies de *Nicotiana* el sistema de reconocimiento y rechazo del polen es gametofítico y está controlado genéticamente por el locus multialélico *S*. En el caso de la familia Solanaceae a la cual pertenece *Nicotiana*, en el locus *S* se encuentran los genes *S-RNasa* (determinante femenina) que se expresa en la parte femenina de la flor (pistilo) y *SLF* (*S-locus F-box protein*; determinante masculina), que se expresa en el grano de polen.

Aunque la especificidad del rechazo del polen depende de la interacción haplotipo *S*-específica, entre la *S-RNasa* y *SLF*, también se requiere de los productos de otros genes, que son conocidos como genes modificadores (*GM*). En *N. alata*, se han identificado hasta la fecha tres *GM* (*HT-B*, *120K* y *NaStEP*) que son esenciales en el rechazo del polen alelo *S* específico.

El gen *NaStEP* fue identificado en nuestro grupo y codifica una proteína ácida con actividad de inhibidor de subtilisina. Esta proteína es expresada específicamente en estigmas de especies autoincompatibles de *Nicotiana*. *NaStEP* esta presente en el exudado estigmático y se incorpora a los tubos polínicos (TP) en horas tempranas de la polinización. Mediante experimentos de pérdida de función, en plantas transgénicas de *Nicotiana* se demostró que cuando *NaStEP* está suprimido se pierde la capacidad de rechazar el polen de manera haplotipo *S* específica, lo cual indica sin duda que *NaStEP* es un gen esencial en la vía genética de rechazo del polen en *Nicotiana*.

A pesar de la evidencia anterior, se desconoce cual es el papel de *NaStEP* en este mecanismo, por lo que se propone que la función de *NaStEP* depende de su interacción física con otras proteínas del TP. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo consistió en identificar interacciones físicas entre *NaStEP* y proteínas del polen o del TP de *Nicotiana*.

Para identificar las proteínas con potencial de interacción con *NaStEP*, se realizó un ensayo de doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando una biblioteca de cDNA de polen/TP, que se tamizó con la proteína *NaStEP* como carnada. El ensayo reveló que la proteína *NaStEP* interaccionó con diferentes proteínas del polen, pero

de manera específica con una proteína denominada C1-21 (caja 1- clona 21), la cual incluye una región que tiene homología con el extremo carboxilo de un transportador de fosfatos de plantas. Asimismo, se encontró que el transcrito de *C1-21* se acumula abundantemente en el polen y en etapas maduras de desarrollo de la antera. Este resultado de la interacción física entre NaStEP y C1-21 nos permite hipotetizar que NaStEP funciona en el rechazo del polen a través de su interacción física con la proteína C1-21.

1. Introducción

1.1. Generalidades de la flor

La flor está compuesta principalmente por cuatro órganos (Figura 1): sépalos, pétalos, androceo (estambres) y gineceo (pistilo), todos determinados por características genéticas de cada especie (Scott *et al.*, 2004).

Los órganos estériles son los sépalos y los pétalos. Los sépalos cubren el botón antes de que abra, los pétalos son de color brillante y sirven para atraer a los polinizadores. El órgano sexual masculino o androceo son los estambres (producen el polen), están constituidos por la antera y el filamento, mientras que el órgano femenino es el pistilo constituido por el estigma, estilo y ovario (Scott *et al.*, 2004). El estigma se encuentra en la parte superior del estilo y esta conformado por células papilares que estimulan la germinación de los granos de polen. El estilo promueve el crecimiento direccional de los tubos polínicos (TP) a través del tejido de transmisión hasta alcanzar el ovario, donde se encuentran los óvulos, los cuales por megagametogénesis forman el saco embrionario (gametofito femenino) (Cheung, 1995).

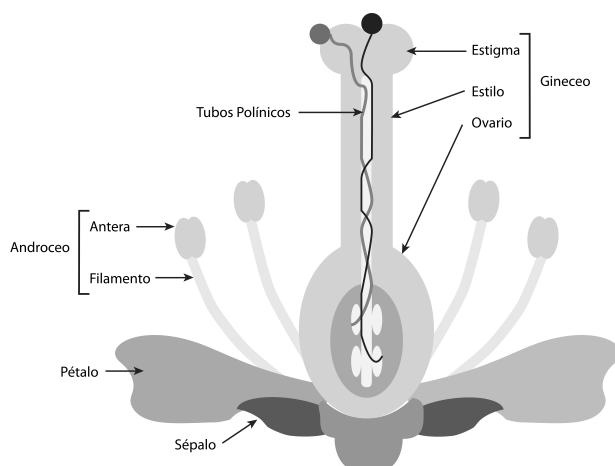


Figura 1. Esquema de los diferentes órganos de la flor. Las flechas indican los pétalos, sépalos, pistilo o gineceo (compuesto por estigma, estilo y ovario) y los estambres o androceo (compuestos por anteras y filamentos). En esta imagen también se observa el crecimiento de tubos polínicos a través del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

1.2. Polinización, germinación y crecimiento del tubo polínico (TP)

La fecundación en plantas requiere interacciones complejas entre el gametofito femenino y el masculino (el saco embrionario y el grano de polen, respectivamente), pero en general se requieren 6 etapas principales (Hiscock y Allen, 2008):

- a. Captura del polen y adhesión del mismo.
- b. Hidratación del polen.
- c. Germinación del polen y formación del TP.
- d. Penetración del TP en el estigma.
- e. Crecimiento del TP a través del estilo.
- f. Entrada del TP en el óvulo y la descarga de las células espermáticas que provoca la doble fecundación y con ello la generación del cigoto y del endospermo.

Durante la polinización los granos de polen son liberados de las anteras, posteriormente, son transportados por factores bióticos o abióticos y depositados en el estigma, donde son hidratados (Lord y Russell, 2002; Edlund *et al.*, 2004), la hidratación es acompañada por la activación del proceso metabólico y la síntesis de proteínas. En especies con estigmas húmedos, como *Nicotiana*, la hidratación de los granos de polen es pasiva y desregulada, debido a que el agua está disponible en las secreciones superficiales del estigma (Hiscock y Allen, 2008). No obstante, en algunas especies con estigmas secos como *Brassica*, el proceso de hidratación es altamente regulado por el sistema de autoincompatibilidad, debido a que solo algunos granos de polen son hidratados y germinan formando un TP (Chapman y Goring, 2010).

En los TP en crecimiento se observa un gradiente de calcio (Ca^{+2}), el cual disminuye del ápice a la región subapical (Figura 2). Durante el crecimiento del TP se han detectado concentraciones de Ca^{+2} que van desde 1800 nM hasta 150 nM (Cárdenas *et al.*, 2008; Hepler *et al.*, 2012). Brewbaker y Kwack (1963) demostraron que el Ca^{+2} es esencial para el crecimiento del TP, el cual tienen un crecimiento polarizado que involucra la biosíntesis y organización de componentes celulares de la pared del mismo, entre ellos pectina, celulosa, hemicelulosa y calosa (Hepler *et al.*, 2001).

En los TP en crecimiento se forman tapones de calosa, con los cuales aíslan las partes viejas del TP, manteniendo solamente el citoplasma cerca del ápice en crecimiento (Franklin-Tong, 1999). La deposición de tapones de calosa ha sido correlacionada con la tasa de crecimiento, es decir, el número de tapones de calosa es empleado como un indicador del crecimiento del TP (Snow y Spira, 1991^a).

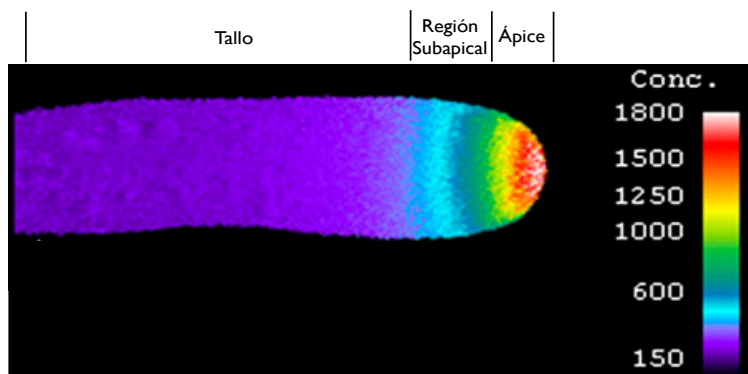


Figura 2. Gradiente de Ca^{+2} intracelular en el TP (Modificado Cárdenas *et al.*, 2008). Para visualizar el gradiente de Ca^{+2} el TP fue inyectado con 500 μM de fura-2-dextran y excitado a una longitud de onda de 340- 380 nm. Las líneas indican las diferentes regiones del TP (ápice, región subapical y tallo). En la escala de colores se muestran las diferentes concentraciones de Ca^{+2} intracelular que van desde 1800 nM (rojo) hasta 150 nM (morado).

Después de la germinación del polen, el siguiente paso es la penetración del TP en la superficie estigmática, donde continua su crecimiento a través de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo (Gaude y McCormick, 1999; Chapman y Goring, 2010). En *Nicotiana*, la matriz extracelular del tejido de transmisión es rica en glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Sommer-Knudsen *et al.*, 1996; Lind *et al.*, 1994), que proveen señales direccionales para el crecimiento del TP hacia el ovario. Dentro de estas glicoproteínas, se encuentran proteínas tejido-específico como TTS (Transmitting Tissue Specific; Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995; 2000), glicoproteínas de 120 kDa como 120K (Lind *et al.*, 1996) y proteínas clase III específicas del tejido de transmisión del pistilo semejantes a extensinas (PELP III; Bosch *et al.*, 2003; de Graaf *et al.*, 2003). Asimismo, la matriz extracelular contiene proteínas involucradas en el reconocimiento y rechazo del polen, además de inhibidores de proteasas, que pueden proteger el pistilo de patógenos invasores (McClure y Franklin-Tong, 2006).

El TP crece a través de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo y es guiado por el gametofito femenino, el cual esta constituido por dos células sinérgidas, una célula huevo y una célula central (Hamamura *et al.*, 2012). Como se observa en la figura 3, el TP contiene dos células espermáticas, que son liberadas dentro del gametofito femenino para llevar a cabo la doble fecundación, es decir, un proceso en el que una célula espermática fecunda a la célula huevo para generar el cigoto y la otra célula espermática se fusiona con la célula central para formar el

endospermo, el cual es un tejido que provee los nutrimentos necesarios para el desarrollo del embrión (Hunter, 2009; Chae y Lord , 2010; Sprunck, 2010).

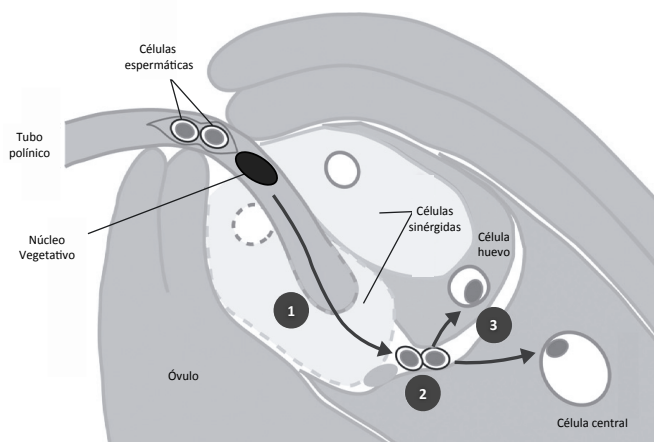


Figura 3. Esquema de la doble fecundación (Modificado Hamamura *et al.*, 2012). El paso 1 es conocido como fase de descarga del TP, en el cual, la célula sinérgida receptiva se rompe después de la descarga de las células espermáticas en el gametofito femenino. En el paso 2 o fase de inmovilidad las células espermáticas, conocida así porque las células espermáticas permanecen en la región fronteriza entre la célula huevo y la célula central. El paso 3 es la fase de la doble fecundación, una de las células espermáticas fecunda al huevo para formar al cigoto, mientras que la otra se fusiona con la célula central para formar el endospermo.

1.3. Sistema de autoincompatibilidad homomórfico

La mayoría de las angiospermas producen flores hermafroditas, las cuales pueden ser polinizadas con su propio polen (autopolinización), o por polen de diferentes individuos o especies (polinización cruzada). Algunas angiospermas tienen ambos órganos sexuales muy cercanos, lo cual incrementa la probabilidad de la autopolinización (de Nettancourt, 2001). Los efectos de la endogamia fueron por primera vez documentados por Charles Darwin (1876), quien fue motivado por el deseo de explicar porque la reproducción cruzada prevalece en la naturaleza; los experimentos que Darwin realizó en 57 especies de plantas que se autopolinizan y en aquellas con polinización cruzada entre individuos no relacionados, confirman la hipótesis de que la autopolinización es perjudicial para la progenie producida, debido a que se presenta una disminución del vigor y de la fertilidad en la mayoría de las especies estudiadas (Charlesworth y Willis, 2009; Barret, 2010; Fobis-Loisy y Gaude, 2010). Debido a esto, algunas especies desarrollaron adaptaciones morfológicas, fisiológicas y genéticas para evitar la progenie con individuos cercanamente relacionados o incompatibles y mantener la diversidad genética en las generaciones subsecuentes (de Nettancourt, 2001; Goring y Silva, 2001). Algunas de

las barreras para prevenir la autopolinización que han desarrollado las angiospermas son la dicogamia y la hercogamia:

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

Sin embargo, estos sistemas no son del todo eficientes, porque la restricción del flujo de polen entre individuos de la misma progenie o con los padres (endogamia), es limitada. Para sobreponerse a este problema, algunas especies desarrollaron un mecanismo genético de reconocimiento del polen, conocido como autoincompatibilidad (AI), que involucra una interacción célula-célula, en donde el pistilo reconoce y rechaza su propio polen, previniendo la autofecundación y promoviendo la polinización cruzada (Takayama e Isogai, 2005; Wright y Barret, 2010). La AI se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización y puede presentarse a nivel del estigma, en el tercer segmento superior del estilo o en el ovario (de Nettancourt, 2001).

La AI es el principal mecanismo que promueve la cruce entre individuos no emparentados y previene la endogamia, por lo que se ha sugerido que la AI es uno de los mayores progresos evolutivos para gran radiación de las angiospermas (Franklin-Tong, 2008; Hunter, 2009). Más de la mitad de las aproximadamente 250,000 especies de angiospermas presentan alguna forma de AI, lo cual muestra

una presión considerable para prevenir la autopolinización e incrementar la diversidad genética (Franklin-Tong, 2008; Roldan *et al.*, 2010).

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

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

El sistema de AI está controlado genéticamente por un locus multialélico conocido como locus *S*, el cual determina la especificidad del reconocimiento o rechazo del polen. En el locus *S* se encuentran al menos dos genes estrechamente ligados, uno de ellos es expresado en el polen (determinante masculina) y otro es expresado en el pistilo (determinante femenina), los productos de estos genes interaccionan para determinar si el polen es compatible o incompatible (de Nettancourt, 2001). La ubicación del locus *S* es cercana al centrómero y la proximidad de las dos determinantes provoca que no haya recombinación entre ambos genes, lo que promueve su herencia como una unidad mendeliana, también conocido como haplotipo *S* (Cruz-García y McClure, 2001). El número de alelos *S* presentes en una población puede ser muy grande y variar de especie a especie (Dickinson *et al.*, 1992).

A pesar de que la especificidad de la respuesta de AI esta dictada por el locus *S*, el rechazo del polen se realiza por diversos mecanismos que han evolucionado de manera independiente (de Nettancourt, 2001). En algunas familias como Brassicacea y Papaveracea, el reconocimiento de las determinantes está dado por un mecanismo de ligando-receptor (Takayama e Isogai, 2005). En Solanáceas, la determinante

femenina tiene un papel citotóxico que degrada el RNA del TP, abatiendo su crecimiento (Newbigin *et al.*, 1993).

La AI puede clasificarse de acuerdo a los polimorfismos florales en dos tipos: homomórfica y heteromórfica (de Nettancourt, 2001). La existencia de diferentes morfos florales dentro de individuos que pertenecen a una población fue analizada por primera vez por Darwin (1877), quien usó el término heteromórfico para nombrar a las especies conformadas por plantas que tienen diferente longitud en el pistilo y los estambres (Figura 4). En el tipo homomórfico las flores de la misma especie tienen el mismo morfo floral mientras que en el tipo heteromórfico, las flores presentan dos o tres morfos diferentes (de Nettancourt, 2001; Hiscock y Allen, 2008). El control genético en los sistemas de AI homomórficos se dividen en dos clases principales: la AI gametofítica y la esporofítica (de Nettancourt, 2001).

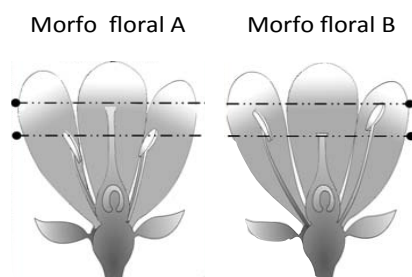


Figura 4. Sistema de AI heteromórfico (Modificado Ferrer y Good, 2012). Este tipo de AI está asociada con la heterostilia (variación morfológica en la longitud del pistilo y los estambres). En esta imagen se muestran dos morfos florales presentes en la misma especie.

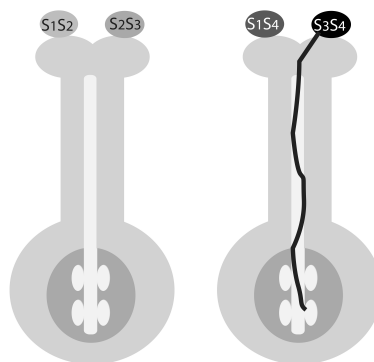
1.3.1. Sistema de autoincompatibilidad esporofítico

En la AI esporofítica el fenotipo *S* del polen está determinado por el genotipo diploide de la antera donde se desarrolló (tapete), el cual, es un tejido que provee nutrimentos y materiales para la formación de la pared celular de los granos de polen (Scott *et al.*, 2004).

En este tipo de AI las proteínas *S* son expresadas en las células tapetales de la antera y antes de que finalice la meiosis de las células madres del polen, son secretadas a la cubierta del grano de polen (Takayama *et al.*, 2000).

En la figura 5, se muestra que en la AI esporofítica, los alelos *S* del polen son expresados en la cubierta del polen, la cual tendrá dos proteínas *S*. El polen será rechazado si alguna de las dos proteínas *S* en la cubierta coinciden con una de las proteínas *S* expresadas en el pistilo (Nasrallah y Nasrallah, 1993). Una característica

común de las plantas con AI esporofítica es que la inhibición del polen propio es muy rápida y ocurre en la interfase del polen-estigma, el rechazo del polen resulta en la anulación de la hidratación del mismo (Nasrallah y Nasrallah, 1993).



Pistilo S_1S_2

Figura 5. Rechazo del polen en sistemas de AI esporofítica. La AI esporofítica es determinada por el haplotipo S del genotipo diploide, en este caso S_1S_2 , S_2S_3 , S_1S_4 y S_3S_4 . El polen será rechazado en la superficie del estigma, si algunas de las dos proteínas S en la cubierta (S_1S_2 , S_2S_3) coinciden con una de las proteínas S expresadas en el pistilo (S_1S_2) (izquierda). Si no existe coincidencia alélica de ninguna proteína S de la cubierta (S_3S_4), el polen podrá germinar y ser aceptado para fecundar un óvulo (derecha).

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

La determinante femenina es un receptor de cinasa, conocida como SRK (S -locus Receptor Kinase) y se localiza en la membrana plasmática de las células papilares del estigma. Experimentos de ganancia de función muestran que SRK determina la S especificidad en el estigma; sin embargo, la capacidad del estigma para rechazar el polen incompatible es potenciada por la presencia de un segundo gen S estigmático (S -locus Glycoprotein o SLG; Takasaki *et al.*, 2000). Existe evidencia que sugiere que SLG contribuye con la estabilización de SRK y con su acumulación en el estigma (Dixit *et al.*, 2000).

La determinante masculina es una proteína del polen rica en cisteínas, denominada SCR (S -locus Cysteine Rich protein), la cual es sintetizada y secretada por las células

tapetales de la antera para ser incorporada a la cubierta del polen maduro (Iwano *et al.*, 2003). Experimentos de pérdida y ganancia de función demostraron que SCR determina la S especificidad en el polen (Schopfer *et al.*, 1999).

La expresión de SRK, SCR y SLG es casi indetectable en botones florales y alcanzan su máxima expresión antes de la antesis (apertura de la flor), cuando las flores son AI (Hiscock y McInnis, 2003).

SRK y SCR forman un complejo ligando-receptor, lo que provoca la autofosforilación de SRK de manera alelo S específica y desencadena una cascada de señalización que involucra a otras proteínas como:

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

Esta cascada de señalización tiene como fin inhibir la germinación del grano de polen en una cruz incompatible, sin embargo se desconoce el mecanismo exacto.

1.3.2. Sistema de autoincompatibilidad gametofítico

En la AI gametofítica, el fenotipo S del polen está determinado por su genotipo haploide, por lo que el polen es rechazado cuando el haplotipo S del polen coincide con alguno de los dos haplotipos S del pistilo diploide, en caso contrario el polen es aceptado (Figura 6) (Franklin-Tong, 2008).

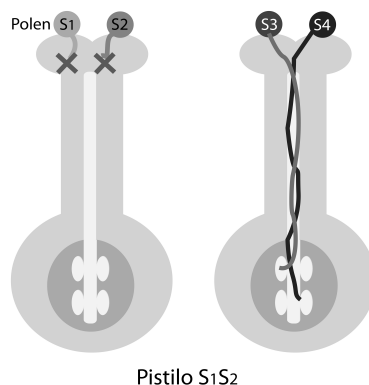


Figura 6. Rechazo del polen en sistemas de AI gametofítica. La AI gametofítica es determinada por el haplotipo S del genoma haploide del polen, el polen que tenga los haplotipos S₁ o S₂ serán rechazados (izquierda), mientras que el polen S₃ y S₄ podrán germinar y ser aceptados para fertilizar la planta S₁S₂ (derecha).

Existen dos principales sistemas de AI gametofítica, uno de ellos es dependiente de S-RNasas (presente en las familias Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae) y el otro no, este último está presente en la familia Papaveraceae (Takayama e Isogai, 2005).

En las familias con sistemas de AI gametofítica dependiente de S-RNasas, los granos de polen germinan independientemente de su haplotipo S y producen un TP. En una cruz compatible (no existe coincidencia entre el haplotipo S del polen con el del pistilo) el TP crecerá a lo largo del estilo hasta llegar al ovario. Sin embargo, en cruzas incompatibles, el TP es inhibido en el tercer segmento superior del estilo y no logra alcanzar el ovario. Mientras que en la familia Papaveraceae la inhibición se produce en el estigma (de Nettancourt, 2001).

1.3.3. Sistema de autoincompatibilidad en Papaveraceae

La especie más estudiada de este género es *Papaver rhoeas*, y mantiene un control genético del rechazo del polen gametofítico. La reacción de rechazo del polen ocurre en la superficie estigmática del pistilo. A diferencia de los sistemas de AI gametofítica dependientes de S-RNasas, en esta familia no se requiere ningún componente adicional no ligado al locus S (McClure y Franklin-Tong, 2006).

La determinante femenina es una proteína de 15 kDa y debido a que no tiene ninguna homología con proteínas de función conocida, es denominada PrsS (*Papaver rhoeas* stigma S determinant). Las proteínas PrsS son altamente polimórficas y comparten un 51.3 % -63.7 % de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos (Franklin-Tong, 2008; Poulter *et al.*, 2011). Bajo condiciones *in vitro*, las proteínas PrsS recombinantes producidas en *Escherichia coli* inhiben la germinación del polen

de una manera alelo *S* específica, de esta forma se concluyó que PrsS es la determinante femenina (Foote *et al.*, 1994; Franklin-Tong, 2008).

En cuanto a la determinante masculina PrpS (*Papaver rhoeas* pollen *S* determinant) se predice que es un receptor que interacciona con PrsS de manera *S* específica; sin embargo, no se ha identificado su función. El análisis de la secuencia predice que PrpS es una proteína muy hidrofóbica con cruces transmembranales y existe evidencia experimental que respalda esta predicción (Wheeler *et al.*, 2010). PrpS tiene un pequeño dominio extracelular que interacciona con PrsS y que esta involucrado en el mecanismo de AI (Poulter *et al.*, 2011).

Como se muestra en la figura 7, el reconocimiento alelo *S* específico entre las determinantes (PrpS y PrsS) causa un rápido incremento en el Ca^{+2} intracelular en el TP, el cual funciona como segundo mensajero para iniciar una serie de eventos en el TP incompatible. Dentro de los primeros 90 segundos, dos pirofosfatasas inorgánicas solubles o sPPasas (Pr-p26.1a y Pr-p26.1b) son fosforiladas de manera dependiente de Ca^{+2} intracelular (Rudd *et al.*, 1996), la fosforilación de estas proteínas reducen la actividad de pirofosfatasas, es decir, la catálisis de pirofosfato a fosfato (esencial en el anabolismo celular) (de Graaf *et al.*, 2006).

Otro blanco en la reacción de AI involucra el citoesqueleto de actina, el cual tiene un papel crítico en la regulación del crecimiento del TP (Gibbon *et al.*, 1999). La AI induce alteraciones rápidas (aproximadamente 1 min) en la organización de los filamentos de actina (despolimerización) (Snowman *et al.*, 2002), la proteína PrABP80 (*P. Rhoeas* Actin-Binding Protein 80) con propiedades de gelsolina dependiente de Ca^{+2} , se ha propuesto como candidata para mediar la despolimerización de actina inducida por la AI (Huang *et al.*, 2004). La AI además produce la despolimerización de microtúbulos (Poulter *et al.*, 2008).

Una MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), llamada p56, es activada por la respuesta de AI. La cascada de MAPK actúa como una red universal de transducción de señales que conecta diversas cascadas de señalización. La activación de p56-MAPK se da después de 10 minutos de la respuesta de AI (Poulter *et al.*, 2011). Estos eventos contribuyen a la muerte celular programada (PCD) (Franklin-Tong, 2008). En la AI, la PCD es una estrategia para destruir específicamente el polen no deseado (Takayama e Isogai, 2005). La respuesta de AI se encuentra acompañada por la

despolarización de la membrana mitocondrial, conduciendo a la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol, lo cual activa a proteínas tipo caspasas (DEVDasa/ tipo caspasa-3), que son proteasas que median la ruptura de numerosos sustratos, dentro de los que se encuentran inhibidores de nucleasas (Thomas y Franklin-Tong, 2004; Bosch y Franklin-Tong, 2008), lo que provoca la fragmentación del DNA nuclear (Jordan *et al.*, 2000). Finalmente, todos estos eventos conducen a la muerte del TP incompatible en *Papaver rhoeas*.

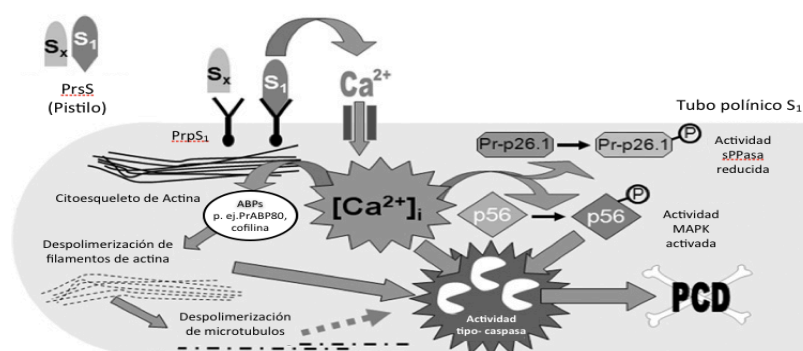


Figura 7. Modelo de rechazo del polen en *Papaver* (modificada Poulter *et al.*, 2011). Cuando las proteínas PrsS secretadas por el estigma interaccionan de forma S específica con la determinante masculina PrpS, se desencadena la cascada de AI, la cual es mediada por el Ca^{2+} intracelular, primero las pirofosfatasa Pr-p26.1a/b son fosforiladas, inhibiendo su actividad y disminuyendo la capacidad biosintética del polen, posteriormente se despolimerizan los filamentos de actina y microtubulos, este proceso es mediado por proteínas de unión a actina (profilina y PrABP80). Una MAPK, p56, es activada, así como la actividad de proteínas tipo caspasa, provocado PCD en el TP, asegurando que la fecundación no ocurra en cruza AI.

1.3.4. Sistema de autoincompatibilidad en la familia Solanaceae

La respuesta de AI en la familia Solanaceae es uno de los principales sistemas de control genético del rechazo del polen propio en las angiospermas. En esta familia la respuesta de AI se caracteriza porque tanto los granos de polen compatibles como los incompatibles son hidratados y tienen una germinación normal. Sin embargo, el crecimiento de los TP incompatibles es inhibido en el tercer segmento superior del estilo. La inhibición es caracterizada por la deposición anormal de calosa en la pared del TP, engrosamiento de la pared celular, hinchazón del TP y la consecuente ruptura de su punta (Goring y Silva, 2001; Hancock *et al.*, 2005; Franklin-Tong, 2008).

El sistema AI gametofítico en la familia Solanaceae, está controlado por el locus multialélico S, el cual codifica y expresa tanto la determinante femenina (S-RNasa) como a la masculina (SLF). La interacción entre las determinantes establece si una

cruza es compatible o incompatible (de Nettancourt, 2001; McClure y Franklin-Tong, 2006).

1.3.5. S-RNasa

En 1981 Bredimeijer y Blaas identificaron en *N. alata* glicoproteínas específicas del pistilo, las cuales cosegregaban con un haplotipo S. Estas proteínas mostraron actividad de ribonucleasa, por lo que fueron nombradas S-RNasas (McClure *et al.*, 1989). Las S-RNasas son glicoproteínas básicas con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa y un punto isoeléctrico en el rango de pH 7.6 a 9.5. Estas ribonucleasas se expresan exclusivamente en el pistilo y se localizan abundantemente en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, sitio donde se lleva a cabo la inhibición del crecimiento del TP (Newbiggin *et al.*, 1993). Las S-RNasas tienen su máxima expresión en la antesis, que es el momento en el que la flor abre y expone su estigma para recibir el polen (Bernatzky, 1993; Murfett *et al.*, 1994).

Experimentos de pérdida y ganancia de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* y *Petunia* demuestran que las S-RNasas determinan la respuesta de AI en el pistilo (Huang *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994). Por ejemplo, la transformación de los híbridos de *N. langsdorffii* x *N. alata* S₁₀₅S₁₀₅ que expresan los transgenes que codifican a la S₂-RNasa o a la S_{C10}-RNasa, rechazan el polen S_{A2} o S_{C10}, un fenotipo que las plantas sin transformar no presentan (Murfett *et al.*, 1994; 1996).

Mediante experimentos de inmunolocalización se demostró que las S-RNasas entran a los TP tanto en cruzas compatibles como incompatibles y son almacenadas en vacuolas. En cruzas incompatibles, se observa la ruptura de la vacuola liberando su contenido en el citoplasma del TP, donde las S-RNasas degradan el RNA e inhiben su crecimiento, mientras que en una craza compatible este compartimento se mantiene estable permitiéndole al TP alcanzar el ovario (Goldraij *et al.*, 2006).

Las S-RNasas son proteínas altamente divergentes, tienen un rango de similitud de secuencia de 38-98 %. A pesar de esta amplia diversidad en su secuencia, estas proteínas contienen cinco regiones conservadas (C1-C5) y dos dominios hipervariables (HVa y HVb) (Ioerger *et al.*, 1991). Las regiones C1, C4 y C5 estabilizan

el centro catalítico de la proteína, debido a que comparten de 7 a 10 residuos de cisteínas que están relacionados con la formación de cuatro puentes disulfuro (Ida *et al.*, 2001). Las regiones C2 y C3 comparten un alto grado de similitud con las correspondientes regiones de la RNasa T2 y de otras RNasas. En estas regiones se encuentran dos histidinas conservadas (His 32 e His 90). Para demostrar que estas His participan en la catálisis, Huang *et al.* (1994) las reemplazaron por mutagénesis dirigida, lo que provocó que las plantas transgénicas con esta S-RNasa mutada fueran incapaces de rechazar su propio polen, debido a la incapacidad de la S-RNasa para degradar el RNA del TP. Esta fue una evidencia sólida de que la actividad de ribonucleasa era necesaria en la respuesta de AI (Huang *et al.*, 1994).

En la figura 8, se muestra una representación de la estructura tridimensional de la S_{F11} -RNasa de *N. alata*, la cual está conformada por 8 α hélices y 7 β plegadas. La S-RNasa tiene dominios hipervariables (HVa y HVb), los cuales están formados por “loops” cargados positivamente seguidos de una α hélice y una pequeña región cargada negativamente. Se sugiere que las regiones HV juegan un papel importante en la interacción haplotipo S específico con SLF (Ida *et al.*, 2001). En la figura 8 también se muestran los N-glicanos, los cuales no son requeridos para la función de la S-RNasa, por lo que la especificidad para el alelo S está en la secuencia aminoacídica (Karunanandaa *et al.*, 1994).

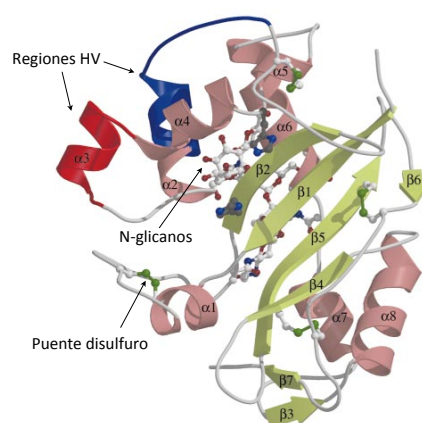


Figura 8. Estructura tridimensional de la S_{F11} -RNasa de *N. alata* (Modificado Ida *et al.*, 2001). En este imagen se muestran las 8 α -hélices y 7 β -plegadas, los 4 puentes disulfuro (verde) formados por las Cys16-Cys21, Cys46-Cys94, Cys153-Cys186 y Cys169-Cys180 y en el modelo “stick and balls” los N-glicanos que conforman a la S-RNasas.

1.3.6 *S-Locus F box (SLF)*

Estudios moleculares recientes revelaron que la determinante masculina del locus *S* en sistemas de AI basados en *S*-RNasa es *SLF*, el cual es un gen de aproximadamente 1,4 kb que es expresado en la antera y abundantemente en los granos de polen. *SLF* codifica una proteína que tienen un dominio con una caja F en su extremo amino terminal (Sijacic *et al.*, 2004).

La mayoría de las proteínas con caja F, están involucradas en la degradación de proteínas mediada por ubiquitina y el proteosoma 26S (Ciechanover, 2005). Las proteínas con caja F usualmente sirven como un adaptador que une a proteínas sustrato específico al complejo SCF E3 ligasa de ubiquitina, es por ello que se asume que *SLF* podría participar en un complejo SCF (SKP1/Culina/Caja F) (Zhang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). En experimentos de doble híbrido en levaduras se encontró que *SLF* de *Antirrhinum hispanicum* (AhSLF-S₂) interacciona con proteínas involucradas en la formación del complejo SCF, como un homólogo de SKP1, denominado SSK1 (SLF-interacting SKP1-like 1), lo cual sugiere que SSK1 podría funcionar como un adaptador que conecte a *SLF* y una proteína tipo Culina (Zhang *et al.*, 2009).

En base a ensayos *in vitro* y de doble híbrido en levaduras Hua y Kao (2006) encontraron que las interacciones físicas entre la *S*-RNasa y *SLF* con un haplotipo *S* diferente eran más fuertes que las interacciones entre la *S*-RNasa y *SLF* con un haplotipo *S* idéntico. Posteriormente, identificaron tres regiones específicas (FD 1-3) de *SLF* y analizaron la contribución de cada dominio a la unión de la *S*-RNasa. Los resultados sugieren que el dominio FD2 es suficiente para que exista una interacción general con alta afinidad por la *S*-RNasa, mientras que los dominios FD1 y FD3 presentan una interacción más débil con la *S*-RNasa. Debido a que los dominios FD1 y FD3 contienen las regiones variables de *SLF*, es probable que estas regiones sean suficientes para conferir la especificidad (Hua *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009).

Lo anterior permite suponer que en una cruce compatible *SLF* podría interactuar con alta afinidad con las *S*-RNasas no específicas y mediar su degradación mediante ubiquitilación y el proteosoma 26S, mientras que en una cruce incompatible la interacción *S* específica entre *SLF* y *S*-RNasa sería más débil y por lo tanto no ocurriría la ubiquitilación (Hua *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Aunque también

existe la posibilidad de que tanto las S-RNasas *S* específicas como las no *S* específicas sean ubiquitiladas, pero con diferentes grados (mono y poliubiquitilación), lo cual podría contribuir para transportarlas a diferentes destinos celulares (Zhang *et al.*, 2009).

Mediante estudios de inmunocitoquímica se detectó que SLF se localiza en el citoplasma del TP y en la periferia del retículo endoplásmico. Diferentes experimentos han demostrado que la cara citosólica de las membranas del retículo endoplásmico es el mayor sitio de degradación proteosomal, lo cual es consistente con la propuesta de ubiquitilación de las S-RNasas (Wang y Xue, 2005).

Sin embargo, SLF muestra una menor diversidad alélica que las S-RNasas (97 % de identidad), de ahí la cuestión de como SLF puede reconocer un gran repertorio de S-RNasas altamente divergentes. En especies AI de Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae se ha observado que en el locus *S* existe una sola copia del gen de la S-RNasa y múltiples genes tipo SLF. Wheeler y Newbiggin (2007) y Kubo *et al.*, (2010) reportaron que en *N. alata* y *Petunia inflata*, respectivamente, hay varios genes tipo *SLF* ligados al locus *S* y cada una de estas variantes interactúan con un subconjunto de S-RNasas con diferente haplotipo *S*. Estos datos llevaron a proponer el modelo de colaboración de SLF, el cual plantea que las isoformas de SLF podrían funcionar en un momento dado como la determinante masculina, dependiendo de con cual S-RNasa interactúen. Por ejemplo, en una cruce con un TP *S*₁, el TP tendría las isoformas SLF_{1a}, SLF_{1b}, SLF_{1c}, todas estas isoformas podrían interactuar fuerte o débilmente con la *S*_x-RNasa y ubiquitilarla para que sea degradada en el proteosoma 26S, permitiendo el crecimiento del TP. Este modelo, permitiría compensar la poca diversidad alélica de SLF comparado con la de las S-RNasas, mediante variación alélica del producto de la suma de las isoformas del SLF.

1.3.7. Genes modificadores

A pesar de que la especificidad del rechazo del polen depende de la interacción haplotipo *S* específica entre SLF y S-RNasa, otros genes fuera del locus *S* también son esenciales para el rechazo del polen en la mayoría de las especies con sistemas de incompatibilidad basados en S-RNasa (Murfett *et al.*, 1996, Murfett y McClure, 1998;

Goldraij *et al.*, 2006). Estos factores son conocidos como genes modificadores (GM) y se clasifican en tres grupos (McClure *et al.*, 2000):

- El grupo I que está integrado por factores que afectan directamente la expresión de las determinantes de especificidad (*S-RNasa* y *SLF*).
- El grupo II está compuesto por factores que interaccionan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad sin afectar su expresión, por lo tanto, son factores que se requieren específicamente para el rechazo del polen. Un ejemplo de GM pertenecientes a este grupo son *HT-B* (*High Top-Band*), *120K* y *NaStEP* (*N. alata Stigma Expressed Protein*) (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005; Jiménez-Durán *et al.*, 2013).
- El grupo III incluye genes que participan tanto en la respuesta de AI como en procesos generales de la polinización y la interacción polen-pistilo. En este grupo podrían clasificarse a las proteínas TTS, PELPIII, NaTrxh, SBP1 y NaPEPII (Cheung *et al.*, 1995, de Graaf *et al.*, 2003, O'Brien *et al.*, 2004; Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Hua y Kao, 2006; Bravo-Alberto y Cruz-García, no publicado).

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

HT-B

HT-B fue identificada por su expresión diferencial en estilos maduros de *N. alata* (especie AI) pero no en aquellos de *N. plumbaginifolia* (especie AC) (McClure *et al.*, 1999) y se ha descrito en tres géneros de la familia Solanaceae: *Solanum*, *Nicotiana* y *Petunia* (McClure *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002, O'Brien *et al.*, 2002; Sassa e Hirano, 2006). Kondo *et al.*, (2002) determinaron que aunque *HT-B* también esta presente en especies AC, su secuencia contiene codones de paro prematuros, por lo que no es posible sintetizar una proteína funcional.

HT-B es una proteína de 8,6 kDa, con un dominio constituido de 20 residuos de asparagina y ácido aspártico hacia el extremo carboxilo (Kondo y McClure, 2008). Experimentos de inmunolocalización en *Nicotiana* demuestran que *HT-B* ingresa tanto a los TP compatibles como incompatibles, pero en las cruza compatibles esta proteína es degradada en el interior del TP (Goldraij *et al.*, 2006).

Experimentos para suprimir la expresión de HT-B mostraron que las plantas transgénicas de *Solanum*, *Nicotiana* y *Petunia*, fueron incapaces de rechazar su propio polen (McClure *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002, O'Brien *et al.* 2002; Sassa e Hirano, 2006; Puerta *et al.*, 2009).

120K

120K es una arabinogalactoproteína de 120 kDa, es por ello que se conoce así, se localiza en el pistilo de especies autocompatibles e incompatibles de *Nicotiana* (Hancock *et al.*, 2005). Mediante estudios de inmunolocalización se determinó que 120K al igual que la S-RNasa, se incorpora desde la matriz extracelular del estilo a las vacuolas de los TP en crecimiento (Goldraij *et al.*, 2006).

La función de 120K fue probada mediante su supresión por RNAi (RNA interferente). El fenotipo observado en las plantas transgénicas fue la incapacidad de rechazar el polen con el mismo haplotipo S que el pistilo receptor, poniendo de manifiesto la participación de 120K en la AI (Hancock *et al.*, 2005).

NaStEP

El transcrito y la proteína correspondiente se expresan únicamente en pistilos maduros (abundantemente en los estigmas) de especies AI de *Nicotiana*, como *N. glauca* y *N. glauca* (Busot *et al.*, 2008). En estas especies NaStEP se encuentra altamente conservado (94% identidad). NaStEP tiene un posible péptido señal (aminoácidos 24 y 25, Figura 9) en el extremo amino terminal, el cual conduce a la proteína al retículo endoplásmico para generar una proteína madura, posteriormente es enviada a las vacuolas de las células estigmáticas, donde es almacenada. Inmediatamente después de la polinización NaStEP es liberada de las vacuolas y se relocaliza en el exudado estigmático (Busot *et al.*, 2008). Una vez que NaStEP se encuentra en el exudado estigmático, esta proteína entra a los TP sin importar su haplotipo S, aunque hasta el momento se desconoce con precisión la localización de NaStEP dentro del TP (Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

NaStEP es una proteína que pertenece a los inhibidores de proteasa tipo Kunitz (Busot *et al.*, 2008), los cuales forman parte de la familia de inhibidores de serina-proteasa (Oliva *et al.*, 2010). En la figura 9 se muestra el probable sitio reactivo de NaStEP. En congruencia con esto, recientemente se demostró la función de NaStEP

como un inhibidor de la proteasa subtilisina (Jiménez-Durán *et al.*, 2013); sin embargo, se desconoce si la actividad de inhibidor de proteasa es requerida en el mecanismo de rechazo del polen.

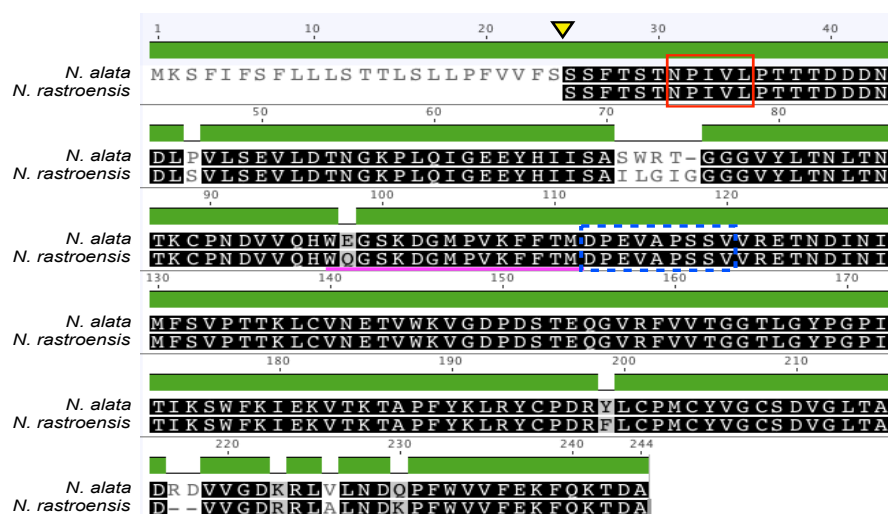


Figura 9. NaStEP de algunas especies AI de *Nicotiana*. Alineamiento a nivel de aminoácidos de la proteína NaStEP de *N. alata* y de *N. glauca*. La punta de flecha amarilla indica el sitio potencial de corte del péptido señal (probabilidad: 0.99). En el recuadro rojo se muestra la posible señal de destino vacuolar, en el recuadro azul con líneas punteadas se muestra el probable sitio reactivo y subrayada en rosa la región antigénica contra la cual se diseñó un anticuerpo policlonal. Resaltados en color negro se muestran los aminoácidos que son idénticos en ambas secuencias, en gris los aminoácidos similares y en blanco a los aminoácidos no conservados.

Experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* demostraron que cuando *NaStEP* se encuentra silenciado por un RNAi, se pierde la capacidad de reconocer y rechazar el polen con el mismo haplotipo *S* que el pistilo, lo que indica claramente que *NaStEP* es un gen estigmático esencial en el rechazo del polen en *Nicotiana* (Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

Además, en un entorno genético con *NaStEP* silenciado, la proteína HT-B se degrada en los TP incompatibles y compatibles (Jiménez-Durán *et al.*, 2013), un hecho contrario a lo que ocurre en plantas silvestres AI de *N. alata*, donde HT-B solo se degrada en TP compatibles (Goldraij *et al.*, 2006). Este dato es relevante, ya que permite proponer a NaStEP como un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en el TP durante la respuesta de AI en *Nicotiana*.

1.3.8 Modelos de rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasas

La interacción *S* específica entre la S-RNasa y SLF desencadena la cascada bioquímica que conduce al rechazo o aceptación del polen. Las S-RNasas actúan como citotoxinas para degradar el RNA del TP con el mismo haplotipo *S*, de esta forma se

impide el crecimiento del TP. Sin embargo, el mecanismo exacto de cómo se lleva a cabo el rechazo del polen propio o con el mismo haplotipo *S* aún es desconocido. Para explicar lo anterior se han propuesto diferentes modelos, los principales son:

Modelo de la degradación de la S-RNasa

Este modelo se basa fundamentalmente en la potencialidad que tiene SLF por su caja F, de participar en la vía de degradación de proteínas por el proteosoma 26S. Muchas proteínas con caja F se caracterizan por ser componentes del complejo SCF, compuesto por SKP1, Culina-1, una proteína con caja F y Rbx1. El complejo SCF está involucrado en la ubiquitilación específica y degradación de proteínas blanco mediante el proteosoma 26S. De tal forma que SLF podría ser parte de un complejo SCF (Moon *et al.*, 2004).

Basado en lo anterior Hua y Kao (2006) propusieron el modelo de la degradación de las S-RNasas. Para describir este modelo supondremos que un estilo S_1S_2 es polinizado con polen S_1 . En este ejemplo, tanto la S_1 como la S_2 -RNasa producidas por el estilo son transportadas al interior del TP. En este caso la determinante masculina en el TP es SLF_1 , la cual mediará específicamente la ubiquitilación y la degradación de la S_2 -RNasa por el proteosoma 26S, pero no de la S_1 -RNasa, permitiendo que esta ribonucleasa ejerza su efecto citotóxico e inhiba el crecimiento del TP S_1 .

Modelo del secuestro de la S-RNasa

Como se muestra en la figura 10, este modelo descrito por Goldraij *et al.* (2006) se basa en el hecho de que las S-RNasas se introducen desde la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo al TP por endocitosis no importando su haplotipo *S*. En el citosol del TP estas ribonucleasas junto con la proteína 120K son transportadas a un compartimento vacuolar del TP. HT-B también es incorporada al TP, aunque se desconoce si esta proteína también se dirige a una vacuola del TP, se hipotetiza que sí.

Bajo este modelo, HT-B juega un papel importante en el rechazo del polen, ya que se propone que como consecuencia de la interacción *S* inespecífica entre la S-RNasa-SLF, HT-B es degradada por una proteasa hipotética del polen durante una cruce

compatible; sin embargo, si la cruz es incompatible el complejo S-RNasa-SLF es específico, promoviendo directa o indirectamente la estabilización de HT-B, posiblemente por la degradación de la proteasa hipotética del polen, lo que suscitará que la membrana vacuolar (donde se encuentran las S-RNasas) sea degradada, liberando a las S-RNasas al citoplasma del TP, en donde ejecutarán su acción citotóxica inhibiendo el crecimiento del TP.

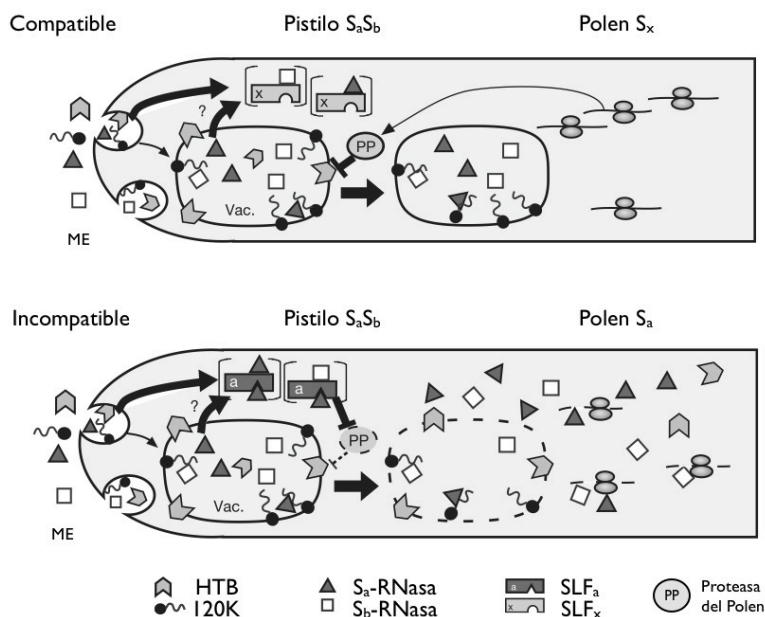


Figura 10. Modelo de compartimentalización de S-RNasa (Modificado de Goldraij *et al.*, 2006). Arriba se observa una cruz compatible, las S-RNasas entran al TP por endocitosis y se almacenan en un compartimento vacuolar, junto con HT-B y 120K. También se muestra la degradación de HT-B por una proteasa hipotética del polen (PP) y el mantenimiento de la vacuola, donde se encuentran confinadas las S-RNasas. Abajo se representa una cruz incompatible, donde se observa el ingreso de las S-RNasas por endocitosis y su almacenamiento en la vacuola; sin embargo, a diferencia de una cruz compatible, HT-B no se degrada, posiblemente por la degradación de la proteasa hipotética del polen y existe la liberación de las S-RNasas al citoplasma del TP y por ende la degradación de RNA.

¿Qué se conoce hasta ahora?

Sin duda estos modelos dejan a la vista diversas preguntas por contestar, por ejemplo, en el modelo de Goldraij *et al.* (2006) no es claro como se podría dar la interacción entre S-RNasa y SLF, ni como este complejo controla la ruptura de la vacuola y como afecta la estabilidad de HT-B, además se propone que una proteasa hipotética del polen es la encargada de regular la estabilidad de HT-B, dicha proteasa no ha sido identificada. Por otro lado, el modelo de la degradación de las S-RNasas parece no darle importancia a la participación de los genes modificadores *HT-B*, *NaStEP* y *120K*, ni a la compartimentalización de las S-RNasas, hechos que han sido demostrados.

Debido a las interrogantes que existen en estos modelos, la figura 11 incorpora los sucesos que hasta el momento se conocen en el mecanismo de rechazo del polen.

En este esquema se propone que los granos de polen llegan al estigma, germinan sin importar su haplotipo *S* y sus TP se dirigen al ovario a través del tejido de transmisión del estilo. Durante esta jornada los TP van incorporando a su citoplasma, probablemente por endocitosis, proteínas como la *S*-RNasa, 120K, HT-B, y NaStEP (Goldraij *et al.*, 2006; Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Algunas proteínas como las *S*-RNasas y 120K son compartimentalizadas en una de las vacuolas de los TP (Goldraij *et al.*, 2006).

Además, se propone que la interacción *S* específica entre la *S*-RNasa y SLF en una cruce incompatible estabiliza a la proteína HT-B, la que directa o indirectamente ocasionaría la liberación masiva de las *S*-RNasas al citoplasma del TP, por la ruptura de la vacuola que las contiene, lo cual es precedido por desorganización de los filamentos de actina (Roldán *et al.*, 2012). Una vez en el citoplasma del TP las *S*-RNasas actúan como citotoxinas degradando su RNA y ocasionando eventualmente su muerte. Por lo contrario, en una cruce compatible, HT-B es degradada en el TP y la vacuola que contiene a las *S*-RNasas permanece intacta permitiendo que el TP alcance el ovario (Goldraij *et al.*, 2006). Bajo este escenario, la proteína NaStEP juega un papel muy importante protegiendo de la degradación a HT-B, debido a que en plantas transgénicas de *Nicotiana* con *NaStEP* suprimido, la proteína HT-B es degradada tanto en cruces compatibles como incompatibles, ocasionando que los TP alcancen los ovarios en ambos tipos de cruces (Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

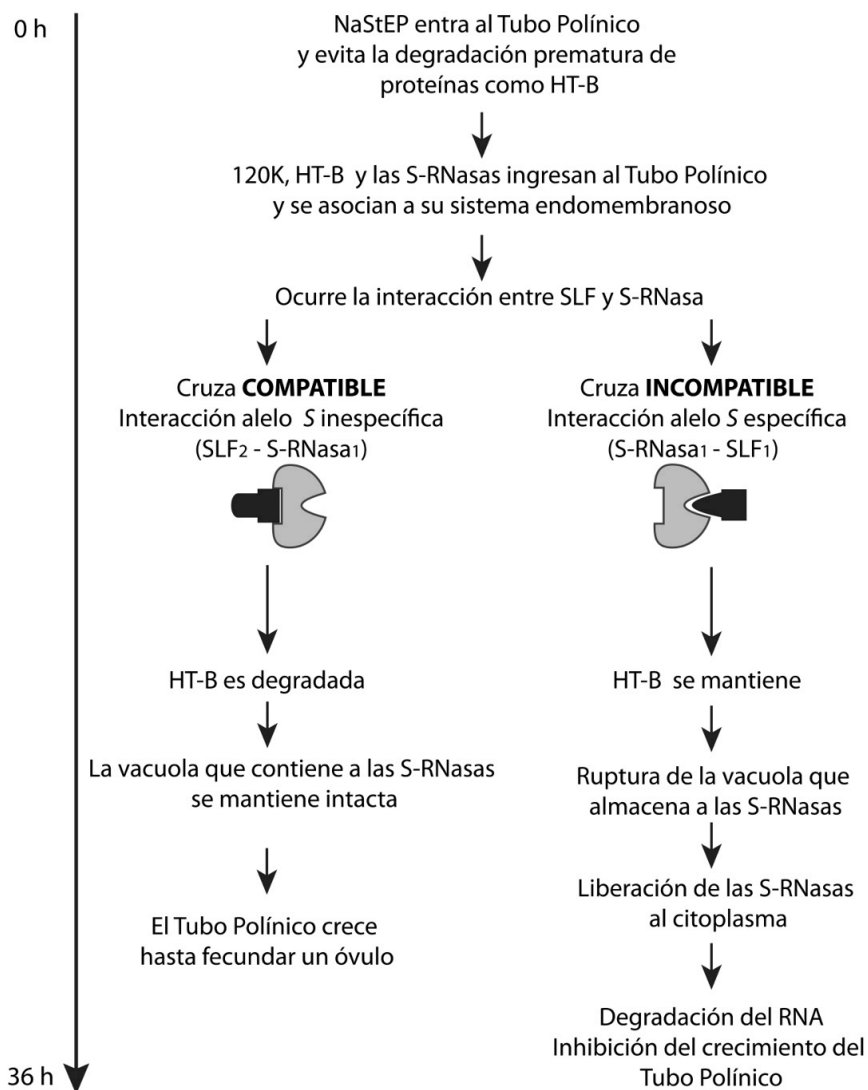


Figura 11. Esquema de los hechos conocidos en la AI dependiente de S-RNasa. Se indica una línea de tiempo de 0 a 36 horas posteriores a la polinización y los diferentes eventos que han sido demostrados tanto en polinizaciones compatibles como en incompatibles.

2. Planteamiento del problema

A pesar de las evidencias genéticas y de biología celular sobre el papel de NaStEP en el rechazo del polen, su función bioquímica aún es desconocida. Sin embargo, dado que NaStEP es un miembro de la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz, se propone que su papel podría ser inhibiendo las proteasas putativas que degradan a HT-B en el TP. Alternativamente, NaStEP podría tener otra función diferente a la de inhibidor de proteasas, ya que algunas proteínas que presentan homología con inhibidores de proteasas tipo Kunitz, como las dendrotoxinas, son capaces de bloquear canales de K^+ de la célula. Se ha demostrado la amplia diversidad en la secuencia entre estas proteínas, concluyendo que su acción como bloqueadores es debida principalmente a la estructura tridimensional de la proteína (González *et al.*, 2009).

Dada la información anterior, el enfoque del presente trabajo está dirigido a determinar si NaStEP interacciona físicamente con alguna proteína del polen o TP y posteriormente determinar si esta interacción es requerida en la respuesta de AI. Sin embargo, se utilizará la proteína NaStEP de *N. rastroensis* ya que *N. alata* presenta algunos problemas en experimentos de transgénesis, principalmente en regeneración de tejidos transformados por *Agrobacterium tumefaciens*, pensando en experimentos futuros. En *N. rastroensis*, tanto el transcrito como la proteína de NaStEP siguen un patrón de expresión similar al de *N. alata*. Es decir, esta proteína se acumula mayoritariamente en las vacuolas de las células papilares del estigma maduro, siendo liberada después de la polinización, sin importar si es compatible o incompatible (Cisneros, 2010).

3. Hipótesis

Debido a que NaStEP es una proteína estigmática esencial en el rechazo del polen en *Nicotiana* y a que ingresa al citosol del TP, se propone que su función en este proceso podría ser mediante la interacción con proteínas del TP.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Identificar proteínas del polen/ tubo polínico de *Nicotiana* que interaccionen físicamente con NaStEP mediante el sistema de doble híbrido en levadura.

4.2. Objetivos particulares

- Fusionar *NaStEP* al dominio de unión de *Gal4*.
- Construir una biblioteca estable de cDNA de polen/ tubos polínicos fusionada al dominio de activación de *Gal4*.
- Determinar si existen interacciones entre NaStEP y las proteínas del polen/ tubo polínico en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Identificar los cDNAs de las proteínas que interaccionan con NaStEP.
- Evaluar la expresión espacio-temporal de los cDNAs del polen de las proteínas que interactúan con NaStEP.

5. Metodología

Los métodos experimentales para la búsqueda de interacciones proteína-proteína están basados en un principio común, similar al principio de la pesca; debido a que se requiere una proteína anzuelo o carnada, es decir una proteína conocida, que es empleada para “atrapar” e identificar a una o más proteínas con las cuales interacciona (proteínas presa) (Ivanov *et al.*, 2011).

El sistema de doble híbrido es el método de elección para la detección de nuevas interacciones proteína-proteína, debido a su simplicidad y su alto rendimiento (Ivanov *et al.*, 2011). Este sistema, es un método genético *in vivo* que permite identificar interacciones entre dos proteínas y está basado en la capacidad de los factores transcripcionales para estar separados en dos partes, un dominio de unión (DU) y un dominio de activación (DA). Los residuos del amino terminal (Gal₄₁₋₁₄₇) de Gal4 codifican el dominio de unión a DNA de la proteína, mientras que los últimos 114 residuos (Gal₄₇₆₈₋₈₈₁) abarcan el DA (Figura 12). Chien y colaboradores (1991) demostraron que los dominios separados de la proteína Gal4 pueden estimular la transcripción en un promotor que contiene elementos en *cis* (secuencias activadoras río arriba) si estos dominios están unidos a dos proteínas que interactúan físicamente. El factor transcripcional más comúnmente usado es Gal4 y generalmente se emplean genes reporteros que permiten el crecimiento en medio selectivos (Lemmens *et al.*, 2010).

Para realizar el ensayo de doble híbrido se requiere un vector que codifique el DU a DNA, como pGBKT7, donde se clonó *NaStEP* sin péptido señal (Figura 9). De igual manera fue necesario contar con una biblioteca de cDNA de polen/TP, la cual se construyó en el vector pGADT7-Rec. La biblioteca expresa las proteínas codificantes de cDNAs del polen/TP fusionados al DA de Gal4. La selección de interacciones positivas fue auxotrófica, colorimétrica y con resistencia al fungicida Aureobasidina A (AbA), es decir, se evaluó la capacidad de crecer en medios mínimos, generando colonias azules y en presencia de AbA, debido a que las interacciones positivas activan los genes reporteros *HIS3*, *ADE1*, *MEL1* y *AUR1-C*.

A pesar de que no es posible eliminar por completo los falsos positivos, han sido minimizados, mediante el empleo de diferentes genes reporteros. En este caso se empleó la cepa Y2HGold de *S. cerevisiae*, la cual tiene cuatro construcciones de

genes reporteros, *ADE2*, *HIS3*, *MEL1*, y *AUR1-C*, dichos genes solo son expresados en presencia de las interacciones proteicas basadas en Gal4. Dos de estos son reporteros nutricionales (*ADE2*, *HIS3*), permiten el crecimiento en un medio mínimo que no contiene los aminoácidos adenina e histidina, el gen *MEL1* codifica para la α -galactosidasa que hidroliza a la molécula X- α -gal presente en el medio y el gen *AUR1-C* confiere resistencia a AbA. Es decir la cepa Y2HGold es auxótrofa a adenina e histidina y sensible a AbA.

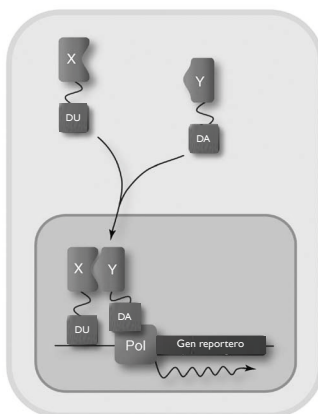


Figura 12. Esquema del doble híbrido (Modificado Lievens *et al.*, 2009). Se muestra la modularidad de los factores transcripcionales eucarióticos, el dominio de unión (DU) y el dominio de activación (DA) se encuentran fusionados a dos proteínas de interés (X e Y), cuando existe interacción física entre estas proteínas se reconstituye al factor de transcripción, lo cual permite la unión simultánea del DU a la región promotora y el DA con la RNA polimerasa II (Pol) activando la transcripción del gen reportero.

5.1. Construcción de la proteína carnada (NaStEP)

5.1.1. Clonación de *NaStEP* en el vector pGBKT7

Se realizó la amplificación por PCR de la región codificante de *NaStEP*, a partir de cDNA de pistilos de *N. rastroensis* (Apéndice 11.1 y 11.2), con los oligonucleótidos pGBKT7 StEP F y pGBKT7 StEP R. Las condiciones y componentes de la reacción de PCR fueron las siguientes:

Tabla 1. Componentes para realizar PCR de *NaStEP*

Componente	Volumen (μ l)
cDNA <i>N. rastroensis</i>	0.5
Buffer cDNA Advantage Pol 10X	1.0
dNTPs 10 mM	1.0
Oligo pGBKT7 StEP F 10 μ M	0.5
Oligo pGBKT7 StEP R 10 μ M	0.5
Taq Pol cDNA Advantage Clontech 50X	0.3
H ₂ O	6.2

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 94°C durante 1 min, 30 ciclos que incluyen: 94°C por 30 seg, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final de 72°C por 5 min. Los componentes de las soluciones utilizadas son nombrados en el Apéndice 11.15.

Posteriormente se realizó el análisis electroforético en un gel de agarosa al 1 % (m/v) para corroborar el producto de PCR de *NaStEP* (~700 pb) y la posterior purificación del gel con el sistema *Zymoclean Gel DNA Recovery* (Apéndice 11.3).

Para clonar el cDNA de *NaStEP* en el vector pGBKT7, primero fue necesario digerir el vector pGBKT7 y *NaStEP* con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* bajo las siguientes condiciones (dos horas a 37 °C):

Tabla 2. Digestión del vector pGBKT7 y *NaStEP*

Componente	Volumen (μl)
pGBKT7	6.0
NE Buffer <i>EcoRI</i> 10 X	1.0
<i>EcoRI</i> 20000 u/μl	0.5
<i>PstI</i> 20000 u/μl	0.5
BSA 10 X	1.0
H ₂ O	1.0

Se realizó el análisis electroforético en un gel de agarosa al 1 % (m/v) para purificar a *NaStEP* y pGBKT7 digeridos con el sistema *Zymoclean Gel DNA Recovery* (Apéndice 11.3). Posteriormente se realizó la reacción de ligado de *NaStEP* y el vector pGBKT7 bajo las siguientes condiciones (16 horas a 4 °C):

Tabla 3. Ligación de *NaStEP* y el vector pGBKT7

Componente	Volumen (μl)
<i>NaStEP EcoRI/ PstI</i>	3.0
pGBKT7 <i>EcoRI/ PstI</i>	1.0
T4 DNA ligasa 3 u/μl	1.0
Solución amortiguadora Promega 2 X	5.0

Con 3 μl de la reacción de ligado se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* DH5α mediante choque térmico (Apéndice 11.4 y 11.5). Se purificó el DNA plasmídico de las clonas recombinantes (Apéndice 11.6) y se mandó secuenciar para corroborar la secuencia nucleotídica.

Finalmente se transformó *S. cerevisiae* (cepa Y2HGold) con la construcción *NaStEP/pGBKT7* mediante el protocolo *Yeastmaker Yeast Transformation System 2* (Apéndice 11.7 y 11.8) y se sembraron diluciones 1:10 y 1:100 de las células transformantes en medio sintético sin triptófano (SD/-Trp). Como control de transformación se empleó el vector pGBT9 suplementado por el kit y como control negativo se sembraron células sin plásmido en cajas SD/-Trp.

5.1.2. Determinación de toxicidad y autoactivación de *NaStEP/pGBKT7*

Para descartar la autoactivación de *NaStEP/pGBKT7*, se evaluó el crecimiento de las células de *S. cerevisiae* (cepa Y2HGold) transformadas con la construcción *NaStEP/pGBKT7* en medio mínimo carente de triptófano, leucina, histidina y adenina (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade) o QDO. También se realizó el procedimiento anterior con células de *S. cerevisiae* (cepa Y2HGold) transformadas con el plásmido pGBKT7 vacío. Para determinar si la construcción *NaStEP/pGBKT7* era tóxica para *S. cerevisiae*, se inocularon 2 µl de las diluciones 1:10 de las levaduras transformadas con pGBKT7 y *NaStEP/pGBKT7* en medio mínimo SD/-Trp y se determinó la absorbancia de cada uno a 600 nm. Se considera que la construcción es tóxica si se observa una disminución en el tamaño de las colonias del vector vacío (pGBKT7) y del vector con inserto (*NaStEP/pGBKT7*) y en la absorbancia en medio líquido.

5.2. Construcción de la biblioteca de cDNA en pGADT7-Rec (DA-proteínas del polen/TP)

5.2.1. Purificación de RNA mensajero

La obtención de RNA poli A⁺ o RNA mensajero (RNA_m) de polen y TP de *N. rastroensis* (Apéndice 11.9) se realizó mediante el sistema *poly Attract mRNA Isolation System IV* (Apéndice 11.10).

5.2.2. Síntesis de cDNA de doble cadena

La síntesis de cDNA a partir del RNA_m obtenido en el paso anterior, se realizó con el kit *Make Your Own Mate & Plate Library System*. Posteriormente, se procedió a realizar la síntesis de cDNA de doble cadena, el cual incluyó en su extremo 3' un sitio CDS III y en el extremo 5' un sitio SMART III que son secuencias idénticas a los extremos del plásmido linealizado pGADT7-Rec (Apéndice 11.10). Se transformó *S.*

cerevisiae (cepa Y187) con el cDNA doble cadena y el plásmido pGADT7-Rec (para producir moléculas de DNA covalentemente cerradas que conformaron la biblioteca de cDNA), mediante el protocolo *Yeastmaker Yeast Transformation System 2* (Apéndice 11.7 y 11.8). Se sembraron 150 µl de las células transformantes en cajas de 150 mm con medio mínimo carente de leucina (SD/-Leu). Se calculó la eficiencia de transformación con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{ufc} \times \text{Vol. de suspensión (ml)}}{\text{Vol. de plaqueado (ml)} \times \text{cantidad de DNA (}\mu\text{g)}}$$

Se recuperaron las células transformadas con medio para congelar (Apéndice 11.15) y se realizaron alícuotas de 1 ml y de 50 ml, las cuales se guardaron a – 80 °C.

5.3. Búsqueda de interacciones proteína- proteína

Las pruebas de interacción proteína-proteína se llevaron a cabo mediante el apareamiento de la cepa Y2HGold de *S. cerevisiae* transformada con la construcción *NaStEP/pGBKT7* (anzuelo o carnada) y la cepa Y187 con la biblioteca cDNA/pGADT7-Rec (presa). Lo cual se realizó mediante la inoculación en un matraz de dos litros que contenía 45 ml de medio 2X YPDA, 1 ml de la biblioteca y 4 ml de DU-NaStEP, el cual se incubó a 30°C por 20 horas a 40 rpm y se verificó la formación de cigotos. Posteriormente, se centrifugaron y se resuspendieron las células en 10 ml de NaCl 0.9 %. Para evaluar la eficiencia del apareamiento se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000 en medio SD/-Trp, SD/-Leu y SD/-Trp/-Leu (DDO).

El remanente se sembró en cajas de 150 mm que contenían medio QDO/X-α-Gal (SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X-α-Gal), para recuperar únicamente las colonias que contenían ambos plásmidos y cuyas proteínas de fusión interaccionan. Se seleccionaron solo las colonias azules.

Las colonias azules fueron resembradas en el medio QDO/X-α-Gal/AbA para confirmar la activación de los genes reporteros, este procedimiento se realizó un total de tres veces. Solo las colonias que crecieron en la resiembra final fueron analizadas por PCR de colonia con el kit *Matchmaker Insert Check PCR Mix 2* (Apéndice 11.13), para determinar clonas duplicadas. Posteriormente los productos de PCR fueron comparados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%

(m/v). Cuando se observaron productos de PCR de tamaños similares, se procedió a digerir el producto con una enzima de corte frecuente como *HaeIII* (para identificar duplicados potenciales), bajo las siguientes condiciones:

Tabla 4. Digestión de productos de PCR de la biblioteca

Componente	Volumen (μ l)
Producto de PCR	8.8
NE Buffer 4 10 X	1.0
<i>HaeIII</i> 10000 u/ μ l	0.2

5.3.1. Purificación de DNA plasmídico de *S. cerevisiae* y transformación de *E. coli*

Una vez analizados los patrones de digestión, se purificó el DNA plasmídico de las colonias de levaduras proveniente de las clonas de interacción, mediante el kit *Easy Yeast Plasmid Isolation* (Apéndice 11.11) y después se transformaron células de *E. coli* con el DNA plasmídico (Apéndice 11.5).

Las células transformadas de *E. coli* con cDNA/pGADT7-Rec, se crecieron en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y se purificó el DNA plasmídico, el cDNA insertado en el plásmido se mandó secuenciar.

Finalmente se analizaron los cDNAs de clonas positivas para determinar si existían secuencias homólogas en las diferentes bases de datos.

5.4. Ensayos confirmatorios de las interacciones proteína- proteína

Para probar la interacción de NaStEP con la proteína candidata del polen/TP, se realizó un ensayo de doble híbrido “sencillo”, mediante la cotransformación de *S. cerevisiae* (Y2HGGold y Y187 respectivamente) con estas construcciones, se sembró en medio QDO/X- α -Gal/AbA.

Para descartar que la proteína candidata de la biblioteca era un falso positivo, se realizó la cotransformación de la proteína candidata con el vector pGBKT7 vacío y se sembró en medio DDO y QDO/ X- α -Gal/AbA.

Si la proteína candidata interacciona específicamente con NaStEP, no se observa crecimiento de las levaduras cotransformadas con la proteína candidata y pGBKT7 vacío en el medio QDO/ X- α -Gal/AbA.

5.5. Análisis de la acumulación del transcrito *C1-21* mediante northern blot

Se determinó la expresión del transcrito *C1-21*, empleando como sonda el cDNA de *C1-21* obtenido de la biblioteca de polen/TP. Se extrajo RNA total de diferentes tejidos de *N. rastroensis* (Apéndice 11.1), entre ellos pétalos, sépalos, polen y pistilos. El RNA se separó en geles de agarosa al 1 % (m/v) y se transfirió a una membrana Hybond N⁺ y se fijó el RNA covalentemente a la membrana con luz UV (700000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) por 70 segundos. Se tiñó la membrana con azul de metileno para corroborar cantidades iguales de cargado. La membrana fue bloqueada con solución de hibridación (Apéndice 11.15), por al menos una hora a 60 °C y con agitación suave.

Para el marcaje radiactivo del cDNA de *C1-21* empleado como sonda, se utilizó el kit de marcaje radioactivo por *Random Primer DNA Labeling System* (Apéndice 11.14), siguiendo las instrucciones indicadas en el manual y se purificó la sonda con columna *Quick Spin Oligo Columns*. La membrana fue incubada con la sonda toda la noche a 60°C con agitación suave. Con el objetivo de eliminar hibridaciones inespecíficas, la membrana se lavó con solución de hibridación por 10 minutos tres veces a 60°C. Posteriormente se colocó en un cassette y fue expuesta con una película por 12 horas a -80°C. Finalmente la película fue revelada.

También se extrajo RNA total (Apéndice 11.1) de diferentes etapas de desarrollo de la antera de *N. alata*, para lo cual se colectaron botones de diferente longitud y fueron agrupados en las siguientes etapas:

Etapa 1 (0.5- 2.0 cm), etapa 2 (2.0- 3.5 cm), etapa 3 (3.5- 5.0 cm) y etapa 4 (5.0-6.0 cm). Con el RNA total obtenido de cada etapa se realizó el ensayo de northern blot como se describió anteriormente, usando como sonda el cDNA de *C1-21*.

5.6. Interacción de NaStEP y HT-B

Se realizó la amplificación por PCR de la región codificante de *HT-B* sin péptido señal, a partir del cDNA de pistilos (Apéndice 11.2), con los oligonucleótidos pACT HTB F y pACT HTB R. Los componentes de la reacción de PCR fueron las siguientes:

Tabla 5. Componentes para realizar PCR de *HT-B*

Componente	Volumen (μ l)
HT-B/pGEM	0.3
Buffer cDNA Advantage Pol 10X	1.0
dNTPs 10 mM	1.0
Oligo pACT HTB F 10 μ M	0.5
Oligo pACT HTB R 10 μ M	0.5
Taq Pol cDNA Advantage Clontech 50X	0.3
H ₂ O	6.4

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 94°C durante 1 min, 30 ciclos que incluyen: 94°C por 30 seg, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final de 72°C por 5 min. Se realizó el análisis electroforético en un gel de agarosa al 1 % (m/v) para corroborar el producto de PCR de HT-B (~240 pb) y la posterior purificación del gel con el sistema *Zymoclean Gel DNA Recovery* (Apéndice 11.3).

Para la clonación de *HT-B* en el vector pACT2-1, primero fue necesario digerir al vector y a *HT-B* con las enzimas de restricción *NcoI* y *EcoRI* bajo las siguientes condiciones (dos horas a 37 °C):

Tabla 6. Digestión del vector pACT2-1 y *HT-B*

Componente	Volumen (μ l)
pACT2-1	6.0
NE Buffer <i>EcoRI</i> 10 X	1.0
<i>EcoRI</i> 20000 u/ μ l	0.5
<i>NcoI</i> 10000 u/ μ l	0.5
BSA 10 X	1.0
H ₂ O	1.0

Se purificó a *HT-B* y pACT2-1 digeridos, con el sistema *Zymoclean Gel DNA Recovery* (Apéndice 11.3). Posteriormente se realizó la reacción de ligado de *HT-B* y el vector pACT2-1 bajo las siguientes condiciones:

Tabla 7. Ligación de *HT-B* y el vector pACT2-1

Componente	Volumen (μ l)
<i>HT-B EcoRI/ NcoI</i>	3.0
pACT2-1 <i>EcoRI/ NcoI</i>	1.0
T4 DNA ligasa 3 u/ μ l	1.0
Solución amortiguadora Promega 2 X	5.0

Con 3 μ l de la reacción de ligado se realizó la transformación de células de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico (Apéndice 11.4 y 11.5) y se purificó el DNA plasmídico de las clonas recombinantes (Apéndice 11.6). Finalmente se mandó secuenciar para corroborar la secuencia.

Posteriormente se transformó *S. cerevisiae* (cepa Y187) con la construcción *HT-B/pACT2-1* mediante el protocolo *Yeastmaker Yeast Transformation System 2* (Apéndice 11.7 y 11.8) y se sembraron diluciones 1:10 y 1:100 de las células transformantes en medio SD/-Leu. Como control de transformación se empleó el vector pGBT9 suplementado por el kit y como control negativo se sembraron células sin plásmido en cajas SD/-Leu.

También se evaluó la autoactivación de la construcción *HT-B/pACT2-1*, mediante el crecimiento de las células de *S. cerevisiae* (cepa Y187) transformadas con *HT-B/pACT2-1* en medio QDO.

Para determinar la interacción entre las proteínas NaStEP y HT-B, se realizó un ensayo de apareamiento a pequeña escala, es decir, se mezcló una colonia de levaduras con la construcción *NaStEP/pGBKT7* (cepa Y2HGold) y otra colonia con la construcción *HT-B/pACT2-1* (cepa Y187) en un tubo de 1.5 ml, el cual contenía 0.5 ml de medio YPDA 2X (Apéndice 11.8). El tubo se incubó a 200 rpm, a 30°C durante una noche.

Posteriormente se realizaron diluciones 1:10 y 1:100, de las cuales se sembraron 100 μ l en medio DDO, en medio QDO y en medio QDO/X- α -Gal/AbA.

6. Resultados

6.1. Construcción de la proteína carnada (NaStEP)

6.1.1. Clonación de *NaStEP* en el vector pGBKT7

La secuencia codificante para el dominio de unión (DU) de *Gal4* se encontraba en el vector pGBKT7, por lo que se fusionó a la secuencia codificante de *NaStEP*, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos basados en la secuencia del cDNA de *N. rastroensis*, que permitieran amplificar el cDNA de *NaStEP* con los sitios *Pst*I y *Eco*RI. Los iniciadores flanquearon solamente la región de cDNA codificante para la proteína NaStEP madura, es decir sin el péptido señal potencial (Figura 9). El producto de PCR obtenido fue de aproximadamente 700 pb, lo que correspondió al tamaño esperado (Figura 13).

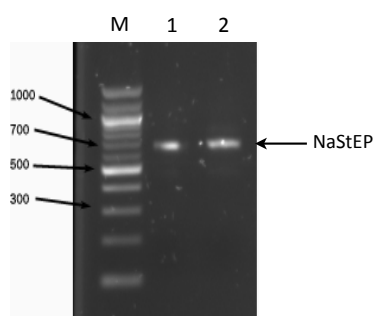


Figura 13. Amplificación de cDNA de *NaStEP* de *N. rastroensis* por PCR. Análisis electroforético del producto de PCR para verificar la construcción de *NaStEP/pGBKT7*. M: Marcador 1Kb New England Biolabs, 1 y 2 plásmido purificado de diferentes colonias transformadas de *E.coli*.

6.1.2. Determinación de autoactivación y toxicidad de NaStEP

Para determinar si la proteína NaStEP era tóxica para *S. cerevisiae*, se transformó la levadura con la construcción *NaStEP/pGBKT7*. Los resultados en la figura 14 indican que NaStEP no fue tóxica, debido a que no se observó una disminución apreciable en el tamaño de la colonia con respecto a la transformación con el vector vacío pGBKT7. Esto se confirmó con el crecimiento de las levaduras en medio líquido SD/-Trp, en donde se determinó la densidad óptica (Tabla 8). Por lo cual no fue necesario cambiar a un vector con menor expresión o de bajo número de copias.

Las pruebas de autoactivación fueron realizadas para asegurar que la proteína de fusión no activara la transcripción de los genes reporteros (*ADE2*, *HIS3*, *MEL1* y *AUR1-C*), lo cual se confirmó creciendo a *S. cerevisiae* en medio DDO (Figura 14).

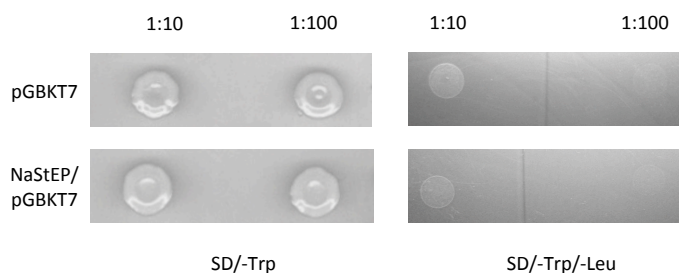


Figura 14. Pruebas de toxicidad y autoactivación de NaStEP. Diluciones 1:10 y 1:100 de células de *S. cerevisiae* transformadas con pGBKT7 vacío y *NaStEP/pGBKT7*, inoculadas en medio SD/-Trp y SD/-Trp/-Leu o DDO.

Tabla 8. Determinación de la toxicidad de NaStEP/pGBKT7

Muestra	Absorbancia
NaStEP/pGBKT7	0.918
pGBKT7	0.922

6.2. Biblioteca de cDNA de polen/ TP

En la figura 15A se observa el RNA total de polen y TP, este resultado verifica la calidad e integridad del RNA, ya que se observan las dos bandas de los RNA ribosomales (18S y 28S). A partir de este RNA total se purificó RNAm tanto de polen como de TP. Posteriormente, se realizó una mezcla en proporción 1:1 en concentración de RNAm de polen: RNAm de TP. Con esta mezcla se sintetizó cDNA doble cadena (Figura 15B). Este cDNA se separó en una cromatografía de exclusión molecular, en donde se descartaron cDNAs con un longitud menor a 400 pb, para garantizar que la biblioteca se encontrara enriquecida preferentemente de cDNAs con un marco de lectura abierto completo.

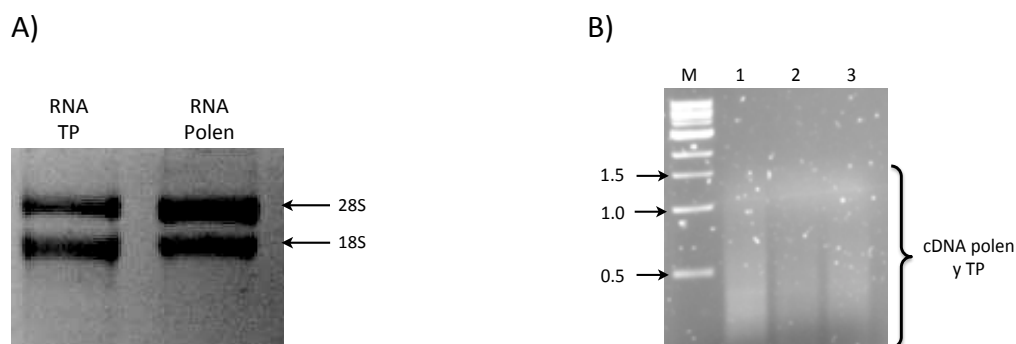


Figura 15. Construcción de una biblioteca de cDNA de polen/TP. A) Análisis electroforético de RNA total, a la izquierda RNA total de TP y a la derecha RNA total de polen de *N. rastroensis*. B) Análisis electroforético de cDNA doble cadena de polen/TP. M: Marcador 1Kb New EnglandBiolabs, 1: Control positivo, 2 y 3: cDNA dc de polen/TP.

Tabla 9. Cuantificación de RNAm de polen y TP de *N.rastroensis*

Muestra	[ng/ μ l]	260/280	260/230	[μ g _{totales}]
RNAm TP	5.9	1.5	1.6	1.3
RNAm Polen	10.9	1.8	1.7	2.5

Se cotransformó *S. cerevisiae* con el cDNA total fraccionado y el vector pGADT7-Rec. Los resultados mostraron que la eficiencia de transformación obtenida (2.5×10^5) fue cercana a la recomendada ($\sim 3 \times 10^5$), por lo que se cumplió con lo requerido en el protocolo de transformación de levaduras. Con esta biblioteca se procedió a realizar el ensayo de doble híbrido.

6.3 Búsqueda de interacciones proteína-proteína

En la figura 16A se observa el crecimiento de diferentes clonas de la biblioteca (cDNA/pGADT7-Rec) que están cotransformadas con *NaStEP*/pGBKT7, en medio QDO/X- α -Gal, el cual permitió discriminar entre falsos positivos (colonias rosas) y las verdaderas interacciones, mediante el crecimiento y la coloración azul de las colonias (activación de los genes reporteros *ADE2*, *HIS3* y *MEL1*). En este medio se obtuvieron aproximadamente 800 colonias azules. Debido al gran número de clonas obtenidas, se tomó una muestra del 10 % de las clonas y se seleccionaron 80 al azar para evaluar la capacidad de activar todos los genes reporteros (*ADE2*, *HIS3*, *MEL1* y *AUR1-C*); es decir, que lograran crecer en el medio QDO/X- α -Gal/AbA, durante tres resiembras. Tan solo 21 clonas de las 80 seleccionadas (26 %) mantuvo la capacidad de crecer en el medio QDO/X- α -Gal/AbA en las tres resiembras, el resto fue descartado.

Se realizó PCR de colonia de las clonas positivas (26 % que creció en medio QDO/X- α -Gal/AbA) para conocer el tamaño del inserto de cDNA que portaban (Figura 16B). Posteriormente, los productos de PCR se digirieron con una enzima de corte frecuente (*HaeIII*) y finalmente se analizó su patrón de digestión (Figura 16B). En la figura 16B se observa un ejemplo de tres clonas que aparentemente tienen el mismo producto de PCR (carril 5, 9 y 13); sin embargo, al observar el patrón de digestión de cada una es diferente (carril 6, 10 y 14), por lo tanto no se pueden considerar clonas duplicadas.

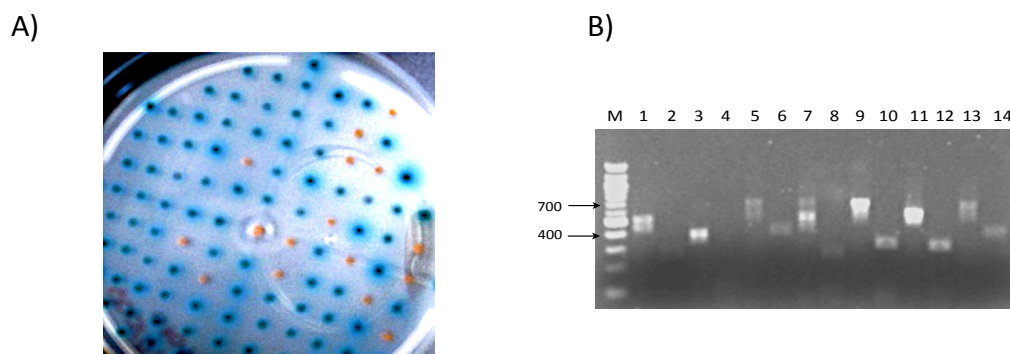


Figura 16. Interacción proteína-proteína (NaStEP y Biblioteca polen/TP). A) Colonias de la interacción de NaStEP con la biblioteca sembradas en medio QDO /X- α -Gal. B) Análisis de PCR de colonia y de patrones de digestión con *HaeIII*, M: Marcador de 100 pb, 1: C1-1 sin digerir (SD), 2: C1-1 digerida (D), 3: C1-2 SD, 4: C1-2 D, 5: C1-3 SD, 6: C1-3 D, 7: C1-4 SD, 8: C1-4 D, 9: C1-5 SD, 10: C1-5 D, 11: C1-6 SD, 12: C1-6 D, 13: C1-7 SD, 14: C1-7 D.

Continuando con el análisis de las clonas positivas (21 clonas), se procedió a purificar el plásmido de cada una y se secuenciaron los insertos de cDNA.

En la figura 17 se observa un resumen del análisis de las 80 clonas muestreadas (100 %), en color rojo se encuentran las clonas que no fueron capaces de crecer durante las tres resiembras en medio QDO/X- α -Gal/AbA (73 %), en morado las clonas que al ser secuenciadas mostraron un desfase de su marco de lectura, es decir que codificaron para péptidos aberrantes (21 %), en verde se observan las clonas consideradas contaminación, debido a que su secuencia pertenece a DNA genómico de *S. cerevisiae* (4 %) y finalmente en color amarillo se muestran las dos clonas (C1-12 y C1-21) que se encuentran en marco y con las cuales se procedió a corroborar la interacción con NaStEP.

Histograma de clonas analizadas de la biblioteca de polen/ TP

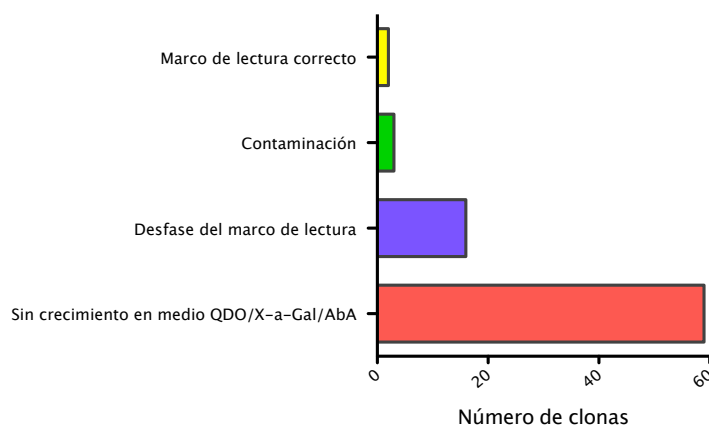


Figura 17. Histograma de clonas analizadas de la biblioteca de polen/TP. El histograma muestra 80 clonas analizadas, de las cuales 58 (rojo) no fueron capaces de crecer en el medio de selección QDO/X- α -Gal/AbA, 17 (morado) son péptidos originados por un desfase del marco de lectura, tres (verde) son contaminación con DNA genómico de *S. cerevisiae* y dos (amarillo) se encuentran en el marco de lectura correcto.

De las dos clonas (C1-12 y C1-21) que se encontraban en marco de lectura, se muestra el alineamiento. En la figura 18 se observa el alineamiento de C1-12 con el extremo carboxilo de la proteína NTP303, la cual pertenece a una familia compuesta por las proteínas NTP101, NTP201, NTP302, NTP303 y NTP805 (Groot *et al.*, 2004). Los transcritos de esta familia se acumulan abundantemente en el polen maduro (Weterings *et al.*, 1992). No obstante, en esta etapa no se detecta a las proteínas, pero cuando el grano de polen es rehidratado y germina, estas proteínas se acumulan masivamente, principalmente en la pared celular y en menor proporción en los tapones de calosa del TP (Wittink *et al.*, 1999). El polen y TP provenientes de plantas de *N. tabacum* con *NTP303* silenciado, son completamente normales *in vitro*; sin embargo, los TP germinados *in vivo* tienen una menor velocidad de crecimiento, son inhibidos a nivel del estilo y no pueden fecundar el ovario (Groot *et al.*, 2004).

Por otra parte, la proteína C1-21 tiene homología con el extremo carboxilo de un transportador de fosfatos mitocondrial (TFM) (Figura 19). Los TFM son responsables del transporte de fosfato dentro de la matriz mitocondrial, donde es utilizado para la fosforilación oxidativa de ADP a ATP. Particularmente, el TFM cataliza el transporte simporte de Pi^-/H^+ o el transporte antiporte Pi^-/OH^- (Nakamori *et al.*, 2002).

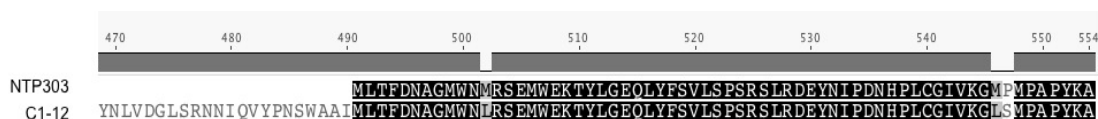


Figura 18. Alineamiento de la clona C1-12. Alineamiento de la clona C1-12 con el extremo carboxilo de la proteína NTP303 de *N. tabacum*. C1-12 es una proteína que interacciona con NaStEP (obtenida en el ensayo de doble híbrido en levaduras). Resaltados en color negro se muestran los aminoácidos que son idénticos en ambas secuencias, en gris los aminoácidos similares y en blanco los aminoácidos no conservados.



Figura 19. Alineamiento de la clona C1-21. Alineamiento de la clona C1-21 con el extremo carboxilo de un TFM (Transportador de Fosfato Mitocondrial) putativo de *Ricinus communis*. C1-21 es una proteína que interacciona con NaStEP (obtenida en el ensayo de doble híbrido en levaduras). Resaltados en color negro se muestran los aminoácidos que son idénticos en ambas secuencias, en gris los aminoácidos similares y en blanco los aminoácidos no conservados.

6.4 Confirmación de interacciones positivas

El objetivo es analizar la interacción específica de las clonas candidatas de la biblioteca (C1-12 y C1-21) con NaStEP, para lo cual se cotransformó *S. cerevisiae* con las clonas candidatas de la biblioteca y el vector vacío pGBKT7. El resultado esperado consistía en que las levaduras cotransformadas pudieran activar los cuatro genes reporteros (*ADE2*, *HIS3*, *MEL1* y *AUR1-C*) únicamente en presencia de NaStEP. En el panel de la izquierda de la figura 20, se muestra que las levaduras (cepa *Y2HGold*) cotransformadas pueden crecer en el medio DDO, lo que indicó que contienen los dos plásmidos, pGBKT7 y pGADT7-Rec, es decir fueron cotransformadas. En el panel de la derecha se observa el crecimiento en el medio QDO/X- α -Gal/AbA (125 ng/ml). La proteína codificada por el cDNA *C1-12* interactuó tanto con el vector vacío pGBKT7 así como con la construcción *NaStEP/pGBKT7*, lo que sin duda sugirió que es una interacción falsa positiva, por lo que esta interacción fue descartada.

Por otro lado, la proteína del polen/TP codificada en la clona C1-21 únicamente activó la expresión de los genes reporteros cuando las levaduras fueron cotransformadas con el plásmido *NaStEP/pGBKT7*, lo cual indicó que para que ocurra la interacción entre C1-21 y NaStEP no se requirió de ninguna otra proteína del polen ni de la levadura. Sin embargo, cabía la posibilidad de que la proteína C1-21 no se hubiera generado de un cDNA sino de su versión genómica amplificada por PCR. Para descartar esto, se procedió a evaluar la presencia del RNA_m de *C1-21* en el polen maduro.

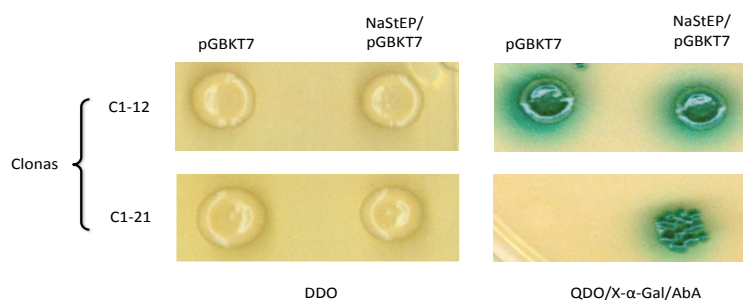


Figura 20. Corroboración de la interacción entre clonas candidatas de la biblioteca y NaStEP (Dilución 1:10). En la parte superior de la figura se observa la cotransformación de *S.cerevisiae* con NaStEP y C1-12, así como del vector pGBKT7 vacío con C1-12. En la parte inferior se observa la cotransformación de *S.cerevisiae* con NaStEP y C1-21, así como del vector pGBKT7 vacío con C1-21. Ambas cotransformaciones en medio DDO y en medio QDO/X- α -Gal/AbA.

6.5. Análisis de la acumulación del transcrito *C1-21* mediante northern-blot

Se realizó un experimento de hibridación de DNA-RNA tipo northern-blot, empleando como sonda el cDNA de *C1-21* y RNA total de diferentes tejidos de *N. rastroensis*. Los resultados son mostrados en la figura 21, donde se observa que el RNAm de *C1-21* es acumulado abundante y exclusivamente en el polen maduro. Confirmando que el DNA que codifica a la proteína *C1-21* que interactúa con *NaStEP* proviene de un RNAm. Asimismo, se observa que el transcrito de *NaStEP* se acumula únicamente en estigmas; es decir, la parte superior del pistilo, lugar donde se estimula y germinan los granos de polen (Busot *et al.*, 2008).

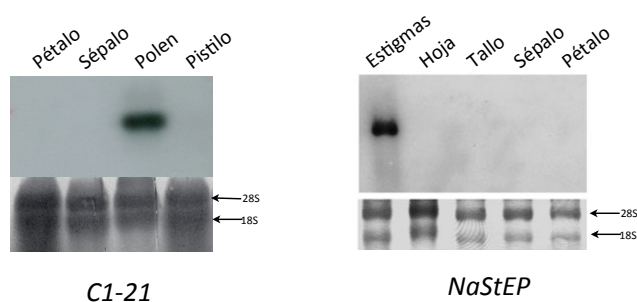


Figura 21. Expresión tejido específico del RNAm de *C1-21*. El RNA total de cada tejido fue separado en un gel de agarosa desnaturalizante y transferido a una membrana Hybond N⁺ e hibridada con la sonda de *C1-21* marcada con P³² (arriba). Para asegurar un cargado igual de RNA se tiñeron las membranas con azul de metileno (abajo). Se muestra la membrana hibridada después de un día de exposición. También se observa la acumulación del RNAm de *NaStEP* en diferentes tejidos y únicamente es detectado en estigmas (parte superior del pistilo) (Modificado Busot *et al.*, 2008).

Debido a que el transcrito de *C1-21* es expresado preferencialmente en polen, se determinaron sus niveles en diferentes etapas de desarrollo de la antera. Como se muestra en la figura 22, existe una acumulación del transcrito en las etapas 3, 4 y en el polen; en la etapa 4 se encuentran las anteras maduras, esta etapa es nombrada antesis (antes de la apertura de la flor). Esta expresión podría ser un indicador de que el producto de *C1-21* es requerido en eventos de la polinización. Como una comparación de los patrones de expresión de otros genes esenciales en la incompatibilidad, en la parte inferior de la figura 22, se muestra el patrón de expresión del RNAm de *HT-B*, *S₁₀-RNasa* y *NaStEP* (la *S₁₀-RNasa* codifica para la determinante femenina, *HT-B* y *NaStEP* son GM tipo II). Aquí se observa que sus transcritos se acumulan en la antesis (McClure *et al.*, 1999 y Busot *et al.*, 2008), una etapa en la que el pistilo es totalmente competente para rechazar el polen de manera alelo S específica.

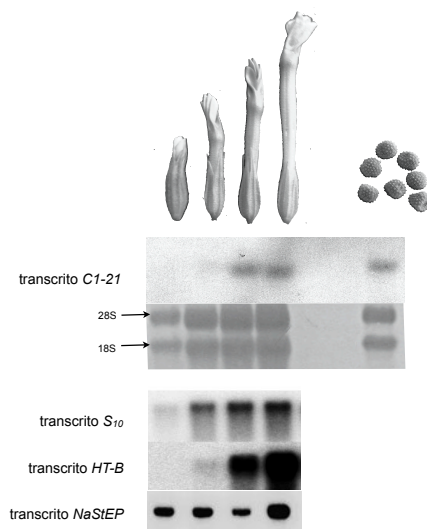


Figura 22. Niveles del RNA_m de *C1-21* en diferentes etapas de desarrollo de la antera de *N. alata*. En la parte de arriba se muestra una imagen de los botones florales que representan las diferentes etapas analizadas. Etapa 1 (0.5-2.0 cm), etapa 2 (2.0-3.5 cm), etapa 3 (3.5-5.0 cm), etapa 4 (5.0-6.0 cm) y granos de polen maduro. Posteriormente, se observa el RNA total de cada etapa que fue hibridado con las sonda de *C1-21* marcadas con P³², para asegurar un cargado igual las membranas con el RNA total se tiñeron con azul de metileno. La membrana fue revelada después de un día de exposición. En la parte inferior de la imagen se observa el patrón de expresión de los genes *S₁₀-RNasa*, *HT-B* y *NaStEP* en diferentes etapas de desarrollo del pistilo (McClure *et al.*, 1999; Busot *et al.*, 2008).

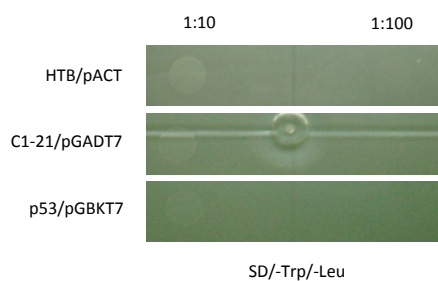
6.6. Interacción física entre NaStEP y HT-B

Como se mencionó anteriormente en plantas con un entorno genético de *NaStEP* silenciado, la proteína HT-B es degradada tanto en TP compatibles como incompatibles (Jiménez-Durán *et al.*, 2013), un hecho contrario a lo que ocurre en plantas silvestres AI de *N. alata* (Goldraij *et al.*, 2006). Este dato es relevante, ya que indica que existe un interacción genética entre *NaStEP* y *HT-B*. Sin embargo, se desconoce si esta interacción ocurre también a nivel de proteína, por lo que se decidió explorar esta posibilidad.

Para abordar esto, primero se realizaron pruebas de autoactivación, es decir, se determinó que ninguna de estas proteínas pudiera activar por si sola a los reporteros nutricionales, se emplearon como control las proteínas C1-21 y p53 (Figura 23A). En la figura 23B se observa que cuando las levaduras son cotransformadas con *NaStEP* y *HT-B*, son capaces de crecer en el medio QDO. Sin embargo, se considera que la interacción de HT-B con NaStEP no es tan fuerte, ya que no se observa un crecimiento en el medio QDO/X-α-Gal/AbA, donde la concentración de AbA es de 125 ng/ml. Al utilizar concentraciones menores de AbA (25 y 75 ng/ml), la interacción entre HT-B y NaStEP si ocurre (Figura 23B).

Como control negativo de interacción proteína- proteína, se emplearon las proteínas p53 y HT-B, donde se observó que las levaduras cotransformadas con p53 y HT-B no pueden crecer en el medio QDO/X- α -Gal/AbA (Figura 23B).

A)



B)

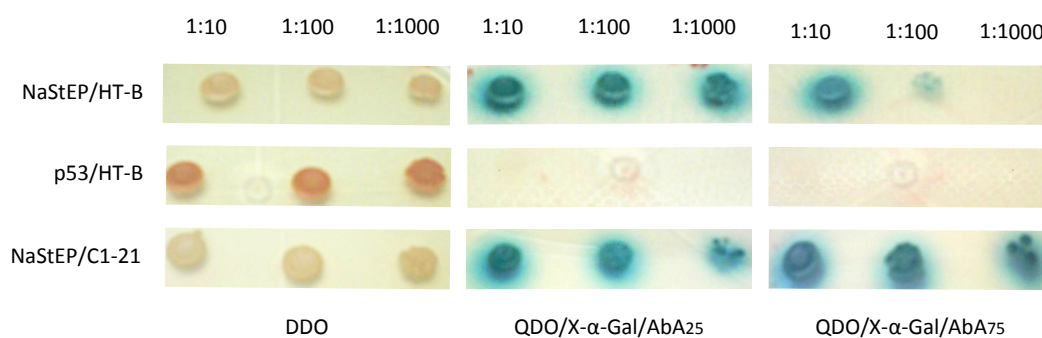


Figura 23. Interacción física de NaStEP y HT-B. A) Prueba de autoactivación de HT-B, C1-21 y p53 en medio DDO. B) Interacción de NaStEP y HTB, de p53 y HTB y NaStEP y C1-21 en medio DDO y en medio QDO/X- α -Gal/AbA en diferentes concentraciones de aureobasidina A, AbA25 (25 ng/ml) y AbA75 (ng/ml).

7. Discusión

El mecanismo de AI en la familia Solanaceae es desencadenado por la interacción S específica entre SLF (determinante masculina) y la S-RNasa (determinante femenina); sin embargo, existen otros factores, conocidos como genes modificadores (GM), cuyos productos son parte de la vía bioquímica del rechazo del polen. Hasta el momento se conocen tres: *120K*, *HT-B* y *NaStEP*.

NaStEP es una proteína específica de especies AI de *Nicotiana* y con actividad de inhibidor de proteasas. Su participación en el rechazo del polen es esencial, como lo demuestran los experimentos de pérdida de función en *Nicotiana*. Además, se propone que es un regulador positivo de la estabilidad de la proteína HT-B en los TP. No obstante, se desconoce su función bioquímica en la incompatibilidad, la cual podría ser a través de la interacción con proteínas del polen o del TP. Es por ello que en esta investigación se decidió buscar proteínas del polen o de TP que interaccionen con *NaStEP*, lo cual se realizó mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras.

El ensayo de doble híbrido es una de las primeras opciones para la búsqueda de nuevas interacciones proteína-proteína; sin embargo, esta técnica puede generar una gran cantidad de falsos positivos. Una ventaja del sistema utilizado aquí (*Yeast Two Hybrid*, Clontech) es el uso de genes reporteros no auxotróficos, *MEL1* y *AUR1-C*. El primero de ellos codifica para la α -galactosidasa, una enzima que hidroliza a la molécula X- α -gal presente en el medio y provoca una coloración azul en las colonias y *AUR1-C* confiere resistencia a AbA, el cual, es un fungicida cíclico que inhibe a la inositol-fosforilceramida sintasa, codificada por el gen *AUR1* (enzima clave en la biosíntesis de esfingolípidos). Debido a que *S. cerevisiae* es sensible a bajas concentraciones AbA, estos dos genes reporteros son muy útiles para discriminar los falsos positivos.

Como producto del análisis realizado a una muestra de la biblioteca, se encontraron dos proteínas interactoras (C1-12 y C1-21); sin embargo, C1-12 no interaccionó específicamente con *NaStEP*, debido a que también se observó la activación de todos los genes reporteros cuando se encuentra C1-12 y el plásmido vacío pGBKT7, el cual codifica para el dominio de unión a DNA. Sin embargo, la interacción de C1-21 es específica con *NaStEP*.

La secuencia de la proteína derivada de la clona C1-21 tiene homología con el extremo carboxilo de un transportador de fosfatos mitocondrial (TFM), tanto a nivel de DNA como de proteína (Figura 19). Durante la revisión de esta tesis se obtuvo el cDNA completo de C1-21, el cual fue usado como sonda en experimentos de northern-blot y se detectó el RNAm de C1-21 únicamente en polen de especies AI de *Nicotiana*, lo cual sugiere que su función está involucrada en el rechazo del polen alelo S específico. Asimismo, se realizó una búsqueda en BLASTp con la proteína codificante de C1-21 y se obtuvo un 88 % identidad con una proteína tipo- TFM de *Solanum lycopersicum*.

Los TFM son responsables del transporte de fosfato inorgánico dentro de la matriz mitocondrial. El fosfato es empleado en la síntesis de ATP. La importancia del ATP es bien conocida como “moneda energética” en la célula y su papel en el metabolismo celular. Sin embargo, se ha descrito un papel del ATP extracelular (ATPe) como una molécula señalizadora intra- y extracelular (Roux y Steinebrunner, 2007). En las células de las plantas, el ATP es sintetizado en mitocondrias y cloroplastos y permanece en los bordes de la membrana plasmática, pero se ha observado el movimiento de ATP citoplásmico hacia la matriz extracelular, mediante tres mecanismos:

1. Abraham *et al.* (1993) documentaron la existencia de transportadores multifármacos-resistentes (MDR) que facilitan la salida del ATP de las células.
2. Sauer *et al.* (2000) encontraron que el estrés osmótico y la mecanoestimulación favorecen la liberación de ATP de las células animales. También Jeter *et al.* (2004) documentó este fenómeno en plantas.
3. La tercer forma de liberar el ATP es a través de vesículas secretoras, las cuales usualmente contienen concentraciones superiores al orden mM. En este mecanismo, la liberación del ATP es asociado a regiones con una gran actividad secretora (Kim *et al.*, 2006). Wu *et al.* (2007) demostraron que los TP liberan ATP mientras crecen. Además, Demidchik *et al.* (2003) y Jeter *et al.* (2004), demostraron que el ATPe induce un incremento en los niveles de Ca^{+2} intracelular. Kim *et al.* (2006) observaron que la presencia de ATPe desencadena la formación de especies reactivas de oxígeno en el ápice de los pelos radiculares y Foreman *et al.* (2003) demostraron que la producción de especies reactivas de oxígeno es crítica para el

crecimiento polarizado de los pelos radiculares, lo cual correlaciona con la presencia del gradiente de Ca^{+2} (Wymer *et al.*, 1997).

Se ha propuesto al Ca^{+2} como un elemento central en la transducción de señales en plantas. La concentración de Ca^{+2} citoplasmático puede ser generado por la entrada del ion desde el espacio extracelular o por la liberación de los compartimentos intracelulares, como el retículo endoplásmico, la mitocondria, los cloroplastos o la vacuola (Peiter, 2011). En los TP en desarrollo es esencial la existencia del gradiente de Ca^{+2} para continuar con el crecimiento.

Estos datos sugieren que la presencia de un transportador de fosfato podría ser necesario para la síntesis de ATP, el cual podría actuar de manera indirecta en el mantenimiento del gradiente de Ca^{+2} en el ápice del TP. En *Papaver rhoeas* se ha reportado la pérdida del gradiente de Ca^{+2} en el ápice, como respuesta del rechazo del polen alelo S específico, por lo que no es descabellado pensar que C1-21 este involucrada en la respuesta de AI en *Nicotiana*.

Además, se ha mostrado evidencia de que el TFM juega un papel importante en la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial o PTPM (Leung *et al.*, 2008), el cual, es un poro no selectivo que se abre en respuesta a concentraciones altas de Ca^{+2} , y esta respuesta es potenciada por el estrés oxidativo y la depleción de fosfato y el nucleótido adenina (Bernardi *et al.*, 2006; Crompton, 1999; Halestrap, 2009). La apertura de PTPM provoca el hinchamiento de la mitocondria, la cual no puede mantener los niveles de ATP, generando la muerte celular por necrosis (Halestrap, 2006).

NaStEP forma parte de la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz, los cuales además de tener la función de inhibidores de proteasas, también pueden actuar como bloqueadores de canales, lo cual es relevante, ya que posiblemente NaStEP podría funcionar bloqueando al transportador C1-21, disminuyendo la síntesis de ATP, la cual es estrictamente dependiente de la importación de fosfato. Debido al patrón de expresión de *NaStEP* y *C1-21*, es decir, solo en especies AI de *Nicotiana* y que la acumulación de *C1-21* es mayoritaria en el polen maduro, le hace un buen candidato para participar en el rechazo de polen alelo S específico.

A pesar de que C1-21 tiene homología con un transportador de fosfatos mitocondrial, es posible que su localización no sea en la mitocondria, debido a que

se han descubierto diferentes transportadores tipo- mitocondrial que tienen una localización en peroxisomas, glioxisomas (Arai *et al.*, 2008; Linka *et al.*, 2008) y en el retículo endoplásmico (Leroch *et al.*, 2008), posiblemente como respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico (Haferkamp y Schmitz-Esser, 2012).

En la figura 24, se muestra un alineamiento del extremo carboxilo de TFM, canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) y C1-21, debido a que el extremo carboxilo de esta proteína es característico de las porinas, es decir, se observan aminoácidos similares entre ambas proteínas. Las proteínas VDAC son componentes abundantes de la membrana externa mitocondrial y están involucradas en la regulación del transporte metabólico entre la mitocondria y el citoplasma (Kusano *et al.*, 2009).

La proteína VDAC forma parte del poro de transición, el cual se asocia a la muerte celular apoptótica en células de mamíferos. Es decir, la apertura de poro de transición, provoca la pérdida del potencial de la membrana interna de la mitocondria y consecuentemente la desorganización de la membrana externa mitocondrial, lo cual causa la liberación de proteínas mitocondriales, como el citocromo c que puede desencadenar la activación de caspasas y con ello la muerte celular programada (Kusano *et al.*, 2009).

En mamíferos se conocen tres isoformas de VDAC, los cuales mediante experimentos de pérdida de función se ha revelado su participación en la reproducción masculina, el sistema nervioso central y la homeostasis de glucosa (Kusano *et al.*, 2009).

Ratones *knock-out* machos para *Vdac 3*, mostraron defectos en la motilidad del espermatozoide, azoospermia obstructiva e infertilidad, la mayoría de los defectos en el axonema del espermatozoide (Craigie y Graham, 2008).

Sin embargo, no todos los VDAC son localizados exclusivamente en la mitocondria, en *Lotus japonicus* por ejemplo, algunas isoformas de VDAC se han localizado en pequeñas vesículas en la periferia celular (Nakamori *et al.*, 2002). En mamíferos algunos VDAC también se han localizado en la membrana plasmática o en el retículo endoplásmico, de cara a la mitocondria y están involucrados en el transporte de Ca^{+2} , ATP y otros metabolitos (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2004; Shoshan-Barmatz e Israelson, 2005; de Pinto *et al.*, 2010).

Además se han localizado algunos VDAC en dominios caveolares de la membrana plasmática (Lisanti *et al.*, 1994; Bathori *et al.*, 1999; Buettner *et al.*, 2000). Los dominios caveolares son microdominios que forman compartimentos endocíticos y exocíticos en la superficie celular, los cuales son capaces de importar moléculas y liberarlas en lugares específicos dentro de la célula y exportar moléculas al espacio extracelular (Anderson, 1998). En plantas, las proteínas VDAC también pueden ser localizadas en las membranas de glioxisomas (Corpas *et al.*, 2000).

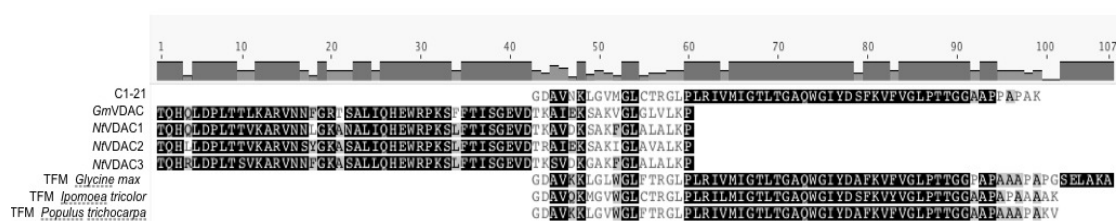


Figura 24. Alineamiento de diferentes porinas con C1-21, entre ellas se encuentran secuencias de diferentes TFM (transportador de fosfato mitocondrial), de C1-21 y diferentes VDAC (Canal aniónico dependiente de voltaje), en este caso Nt es una abreviatura de *Nicotiana tabacum* y Gm de *Glycine max*. Resaltados en color negro se muestran los aminoácidos que son idénticos en ambas secuencias, en gris los aminoácidos similares y en blanco los aminoácidos no conservados.

Interacción NaStEP y HT-B

La cotransformación de *S. cerevisiae* con NaStEP y HT-B, activa a los genes reporteros *HIS3*, *ADE1*, *AUR1-C* y *MEL1* (Figura 23B). Pero cuando las levaduras expresan solo a una proteína no pueden activar estos genes reporteros (Figura 23A).

A pesar de que las proteínas NaStEP y HT-B interactúan, se considera que no es una interacción fuerte, debido a que las levaduras que expresan ambas proteínas no pueden crecer en un medio con una concentración de AbA de 125 ng/ml (concentración usada para el análisis de la biblioteca), pero si se observa crecimiento cuando la concentración de AbA se encuentra en el rango de 25- 75 ng/ml.

La interacción entre HT-B y NaStEP es notable, porque en un entorno donde *NaStEP* se encuentra silenciado, la proteína HT-B se degrada en los TP de cruza compatibles e incompatibles (Jiménez Durán *et al.*, 2013). Una situación que no ocurre en plantas silvestres de *N. alata* AI, donde HT-B solo se degrada en los TP compatibles (Goldraij *et al.*, 2006). De esta manera, estos datos de interacción, estarían sugiriendo que además de la relación que existe entre NaStEP y HT-B (NaStEP media la estabilidad directa o indirectamente de HT-B), también podría existir una interacción proteína-proteína durante la polinización y el rechazo del polen en *Nicotiana*.

Basado en nuestros resultados es interesante pensar que HT-B y C1-21 podrían formar parte de un poro en una membrana del TP, debido a que algunos experimentos han demostrado que HT-B es una proteína asociada al sistema endomembranoso del TP (Kondo y McClure, 2008). Además, mediante un análisis de la secuencia de HT-B con CSS-Palm, se predice que esta proteína tiene una modificación lipídica de palmitoilación, esta modificación es comúnmente encontrada en las proteínas transmembranales (Resh 1999; 2004) y ha sido asociada principalmente con proteínas localizadas en balsas lipídicas (Chakrabandhu *et al.*, 2007).

Posiblemente la interacción de NaStEP con este poro membranal es para regularlo y mediar el rechazo del polen en *Nicotiana* de manera alelo *S* específica.

8. Conclusiones

La proteína NaStEP interacciona físicamente con la región carboxilo terminal de la proteína C1-21, en el fondo genético de *Saccharomyces cerevisiae*.

El extremo carboxilo terminal de la proteína C1-21 tiene homología con transportadores de fosfato mitocondriales.

El RNAm de *C1-21* se acumula abundantemente y de manera específica en etapas maduras del polen.

NaStEP interacciona físicamente con la proteína estilar *HT-B* en el entorno genético de *S. cerevisiae*. Este resultado es relevante debido a que además de esta asociación física, NaStEP es un factor que estabiliza a HT-B en tubos polínicos de *Nicotiana*.

9. Perspectivas

Para verificar los datos de las interacciones de las proteínas C1-21 y HT-B con NaStEP, se requiere corroborar estas interacciones por otros métodos. Uno de estos, podría ser la complementación bimolecular de la fluorescencia, en la cual se fusionan las dos proteínas de interés a diferentes dominios de una proteína fluorescente, como GFP o YFP. Cuando existe interacción física entre estas proteínas la fluorescencia se restablece.

Sin embargo, un punto importante es determinar si estas interacciones ocurren *in planta* durante la respuesta del rechazo del polen.

Finalmente, sería muy conveniente evaluar en experimentos de pérdida de función si C1-21 es esencial para la incompatibilidad en *Nicotiana*.

10. Bibliografía

- Abraham E, *et al.*, (1993). **The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 312-316.
- Anderson R (1998). **The caveolae membrane system.** *Annu. Rev. Biochem.* 67: 199-225.
- Arai Y, Hayashi M, Nishimura M (2008). **Proteomic identification and characterization of a novel peroxisomal adenine nucleotide transporter supplying ATP for fatty acid beta-oxidation in soybean and *Arabidopsis*.** *Plant Cell.* 20 (12): 3227-3240.
- Barret S (2010). **Darwin's legacy: the forms, function and sexual diversity of flowers.** *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365 (1539): 351-368.
- Bathori G, *et al.*, (1999). **Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains.** *J. Biol. Chem.* 274 (42): 29607-29612.
- Bechsgaard J, Castric V, Charlesworth D, Vekemans X, Schierup M (2006). **The transition to self-compatibility in *Arabidopsis thaliana* and evolution within S-haplotypes over 10 Myr.** *Mol. Biol. Evol.* 23(9): 1741-1750.
- Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, BlalchyDyson E, DiLisa F, Forte M (2006). **The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target.** *FEBS J.* 273(10): 2077- 2099.
- Bernatzky R (1993). **Genetic mapping and protein product diversity of the self-incompatibility locus in wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*).** *Biochem. Genet.* 31 (3-4): 173-184.
- Bosch M, Derksen J, Mariani C (2003). **A functional study of stylar hydroxyproline-rich glycoproteins during pollen tube growth.** *Sex. Plant Reprod.* 16 (2): 87-98.
- Bosch M y Franklin-Tong V (2008). **Self-incompatibility in *Papaver*: signalling to trigger PCD in incompatible pollen.** *J. Exp. Bot.* 59(3): 481-490.
- Bredimeijer G y Blaas J (1981). **S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*.** *Theor. Appl. Genet.* 59 (3): 185-190.

- Brewbaker J, Kwack B (1963). **The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth.** *Am. J. Bot.* 50 (9): 859-865.
- Buettner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray D, Dermietzel R (2000). **Evidence for secretory pathway localization of voltage-dependent anion channel isoform.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (7):3201-3206.
- Busot G, McClure B, Ibarra C, Jiménez D, Santana S, 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 (11): 3187-3201.
- Cabrillac D, Cock J, Dumas C, Gaude T (2001). **The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat protein.** *Nature.* 410 (6825): 220-223.
- Cárdenas L, Lovy-Wheeler A, Kunkel J, Hepler P (2008). **Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization.** *Plant Physiol.* 146 (4): 1611-1621.
- Chae K y Lord E (2010). **Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins.** *Ann. Bot.* 108 (4): 627-636.
- Chakrabandhu K et al., (2007). **Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling.** *EMBO J.* 26 (1): 209- 220.
- Chapman L y Goring D (2010). **Pollen-pistil interactions regulating successful fertilization in the Brassicaceae.** *J. Exp. Bot.* 61(7): 1987-1999.
- Charlesworth D y Willis J (2009). **The genetics of inbreeding depression.** *Nat. Rev. Genet.* 10 (11): 783- 796.
- Chen G, Zhang B, Liu L, Li Q, Zhang Y, Xie Q, Xue Y (2012). **Identification of a ubiquitin-binding structure in the S-Locus F-Box protein controlling S-RNase-based self-incompatibility.** *J. Genet. Genomics.* 39 (2): 93-102.
- Cheung A (1995). **Pollen-pistil interactions in compatible pollination.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (8): 3077-3080.
- Cheung A, Wang H, Wu H (1995). **A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth.** *Cell.* 82 (3): 383-393.

- Chien C, Bartel P, Sternglanz R, Fields S (1991). **The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (21): 9578-9582.
- Ciechanover A (2005). **Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (1): 79-87.
- Cisneros (2010). **Clonación y caracterización molecular de StEP de *Nicotiana glauca* y *Solanum sp.*** Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Corpas F, Sandalio L, Brown M, del Rio L, Trelease R (2000). **Identification of porin-like polypeptide(s) in the boundary membrane oilseed glyoxysomes.** *Plant Cell Physiol.* 41 (11): 1218-1228.
- Craigen W y Graham B (2008). **Genetic strategies for dissecting mammalian and *Drosophila* voltage-dependent anion channels functions.** *J. Bioenerg. Biomembr.* 40 (3): 207-212.
- Crompton M, 1999. **The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.** *Biochem. J.* 341 (2): 233-249.
- Cruz-García, F. y McClure, B. in **Current Trends in the Embryology of Angiosperms** (ed. Bhojwani, S.S. & Soh, W.Y.) 167-196 (Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2001).
- Darwin, C. **The Effect of cross and self-fertilization in the Vegetable Kingdom.** (John Murray, London, 1876).
- Darwin, C. **The different forms of flowers and plants of the same species.** (John Murray, London, 1877).
- de Graaf B, Knuiman B, Derksen J, Mariani C (2003). **Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of *Nicotiana tabacum*.** *J. Exp. Bot.* 54 (380): 55-63.
- de Graaf B, Rudd J, Wheeler M, Perry R, Bell E, Osman K, Franklin-Tong V (2006). **Self-incompatibility in *Papaver* targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen.** *Nature.* 444 (7118): 490-493.
- Demidchik V, Nichols C, Oliynyk M, Dark A, Glover B, Davies J (2003). **Is ATP a signaling agent in plants?** *Plant Physiol.* 133 (2): 456-461.

- de Nettancourt, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**, (Heidelberg Springer, New York, 2001).
- de Pinto V, Messina A, Lane D, Lawen A (2010). **Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane**. *FEBS Lett.* 584 (9): 1793-1799.
- Dickinson H, Crabbe M, Gaude T (1992). **Sporophytic self-incompatibility systems: S gene products**. *Int. Rev. Cytol.* 140: 525-561.
- Dixit R, Nasrallah M, Nasrallah J (2000). **Post-transcriptional maturation of the S receptor kinase of *Brassica* correlates with co-expression of the S-locus glycoprotein in the stigmas of two *Brassica* strains and in transgenic tobacco plants**. *Plant Physiol.* 124 (1): 297-311.
- Edlund A, Swanson R, Preuss D (2004). **Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination**. *Plant Cell.* 16: S84-S97
- Ferrer M y Good S (2012). **Self-sterility in flowering plants: preventing self-fertilization increases family diversification rates**. *Ann. Bot.* 110 (3): 535-553.
- Fobis-Loisy I y Gaude T (2010). **Control of fertilization by self-incompatibility mechanisms**. *Biol. Aujourd'hui.* 204 (1): 33-42.
- Foote H, Ride J, Franklin-Tong V, Walker E, Lawrence M, Franklin F (1994). **Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(6): 2265-2269.
- Foreman J, *et al.*, (2003). **Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth**. *Nature.* 422 (6930): 442-446.
- Franklin-Tong V (1999). **Signaling and the modulation of pollen tube growth**. *Plant Cell.* 11 (4): 727-738.
- Franklin-Tong. **Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity and mechanism**. (Heidelberg Springer, New York, 2008).
- Gaude T y McCormick (1999). **Signaling in pollen-pistil interactions**. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10 (2): 139-147.
- Gibbon B, Kovar D, Staiger C (1999). **Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth**. *Plant Cell.* 11 (12): 2349-2363.

- Goldberg E, Kohn J, Lande R, Robertson A, Smith S, Igic B (2010). **Species selection maintains self-incompatibility.** *Science* 330 (6003): 493-495.
- Goldraij A, *et al.*, (2006). **Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*.** *Nature*. 439 (7078): 805-810.
- González S, *et al.*, (2009). **A family of diverse Kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* potentially involved in host-parasite cross talk.** *PLoS ONE* 4 (9): e70009.
- Goring R y Silva N (2001). **Mechanism of self-incompatibility in flowering plants.** *Cell Mol. Life Sci.* 58 (14): 1988-2007.
- Groot P, *et al.*, (2004). **Silencing of the pollen-specific gene *NTP303* and its family members in tobacco affects *in vivo* pollen tube growth and results in male sterile plants.** *Plant Mol. Biol.* 55 (5): 715-726.
- Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias D, Goring D (1998). **Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (1): 382-387.
- Haferkamp I y Schmitz-Esser S (2012). **The plant mitochondrial carrier family: functional and evolutionary aspects.** *Front. Plant Sci.* 3 (2): 1-19.
- Halestrap A (2006). **Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die.** *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2): 232-237.
- Halestrap A (2009). **What is the mitochondrial permeability transition pore?** *J. Mol. Cell Cardiol.* 46 (6): 821-831.
- Hamamura Y, Nagahara S, Higashiyama T (2012). **Double fertilization on the move.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 15 (1): 70-77.
- Hancock C, Kent L, McClure B (2005). **The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*.** *Plant J.* 43 (5): 716-723.
- Hepler P, Vidali L, Cheung A (2001). **Polarized cell growth in higher plants.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 159-187.
- Hepler P, Kunkel J, Rounds C, Winship L (2012). **Calcium entry into pollen tubes.** *Trends. Plant Sci.* 17 (1): 32-38.

- Hiscock S y McInnis S (2003). **Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond.** *Trends Plant Sci.* 8 (12): 606-613.
- Hiscock S y Allen A (2008). **Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus.** *New Phytol.* 179 (2): 286-317.
- Hua Z y Kao T (2006). **Identification and characterization of components of a putative *Petunia* S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility.** *Plant Cell.* 18 (10): 2531-2553.
- Huang S, Lee H, Karunanandaa B, Kao T (1994). **Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen.** *Plant Cell.* 6 (7): 1021-1028.
- Huang S, Blanchoin L, Chaidhry F, Franklin-Tong V, Staiger C (2004). **A gelosin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium-regulated severing and depolymerization of actin filaments.** *J. Biol. Chem.* 279 (22): 23364-23375.
- Hunter P (2009). **Me, myself and I. The genetics and molecular biology behind self-incompatibility and the avoidance of inbreeding in plants.** *EMBO Rep.* 10 (12): 1297-1300.
- Ida K, *et al.*, (2001). **The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* S_{F11}-RNase associated with gametophytic self-incompatibility.** *J. Mol. Biol.* 314 (1): 103- 112.
- Ioerger T, Gohlke J, Xu B, Kao T (1991). **Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae.** *Sex. Plant Reprod.* 4 (2): 81-87.
- Ivanov R, Fobis-Loisy I, Gaude T (2010). **When no means no: guide to Brassicaceae self-incompatibility.** *Trends Plant Sci.* 15 (7): 387-394.
- Ivanov S, Zgoda V, Archakov A (2011). **Protein interactomics technologies.** *Bioorg. Khim.* 37 (1): 8-21.
- Iwano M, Shiba H, Funato M, Shimosato H, Takayama S, Isogai A (2003). **Immunohistochemical studies on translocation of pollen S-haplotype**

determinant in self-incompatibility of *Brassica rapa*. *Plant Cell Physiol.* 44 (4): 428-436.

- Jeter C, Tang W, Henaff E, Butterfield T, Roux S (2004). **Evidence of a novel cell-signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*.** *Plant Cell.* 16 (10): 2652-2664.
- Jiménez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, Cruz-García F (2013). **NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of the HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes.** *Plant Physiol.* 161 (1): 97-107.
- Jordan N, Franklin F, Franklin-Tong V (2000). **Evidence for DNA fragmentation triggered in the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*.** *Plant J.* 23 (4): 471-479.
- Juárez-Díaz J, McClure B, Vázquez-Santana S, Guevara-García A, León-Mejía P, Márquez-Guzmán J, Cruz-García F (2006). **A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase *in vitro*.** *J. Biol. Chem.* 281 (6): 3418-3424.
- Karunanandaa B, Huang S, Kao T (1994). **Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S3 protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil.** *Plant Cell.* 6 (12): 1993-1940.
- Kim S, Sivaguru M, Stacey G (2006). **Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling.** *Plant Physiol.* 142 (3): 984-992.
- Kondo K, *et al.*, (2002). **Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stilar function of self-incompatibility.** *Plant J.* 29 (5): 627-636.
- Kondo K y McClure B (2008). **New microsome-associated HT-family proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family.** *Mol. Plant.* 1(4): 634-644.
- Kubo K, *et al.*, (2010). **Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility.** *Science.* 330 (6005): 796-799.

- Kusano T, Tateda C, Berberich T, Takahashi Y (2009). **Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death.** *Plant Cell Rep.* 28 (9): 1301-1308.
- Lee H, Huang S, Kao T (1994). **S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*.** *Nature.* 367 (6463): 560-563.
- Lemmens I, Lievens S, Tavernier J (2010). **Strategies towards high-quality binary protein interactome maps.** *J. Proteomics.* 73 (8): 1415-1420.
- Leroch M, Neuhaus H, Kirchberger S, Zimmermann S, Melzer M, Gerhold J, Tjaden J (2008). **Identification of a novel adenine nucleotide transporter in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*.** *Plant Cell.* 20 (2): 438-451.
- Leung A, Varanyuwatana P, Halestrap A (2008). **The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition.** *J. Biol. Chem.* 283 (39): 26312-26323.
- Lievens S, Lemmens I, Tavernier J (2009). **Mammalian two-hybrids come of age.** *Trends. Biochem. Sci.* 34 (11): 579-588.
- Lind J, Bacic A, Clarke A, Anderson M (1994). **A style-specific hydroxiprolin-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins.** *Plant J.* 6 (4): 491-502.
- Lind J, Böning I, Clarke A, Anderson M (1996). **A style-specific 120-kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo.** *Sex. Plant Reprod.* 9 (2): 75-86.
- Linka N, Theodoulou F, Haslam R, Linka M, Napier J, Neuhaus H, Weber A (2008). **Peroxisomal ATP import is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell.* 20 (12): 3241-3257.
- Lisanti M, *et al.*, (1994). **Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease.** *J. Cell Biol.* 126 (1): 111-126.
- Lord W y Russell S (2002). **The mechanism of pollination and fertilization in plants.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 81-105.

- McClure B, Haring V, Ebert P, Anderson M, Simpson R, Sakiyama F, Clarke A (1989). **Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases.** *Nature*. 342 (6252): 955-957.
- McClure B, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R (1999). **A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 96 (23): 13548-13553.
- McClure B, Cruz-García F, Beecher B, Sulaman W (2000). **Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*.** *Ann. Bot.* 85 (S1): 113-123.
- McClure B, Franklin-Tong V (2006). **Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanism involved in “self” pollen tube inhibition.** *Planta*. 224 (2): 233-245.
- Moon J, Parry G, Estelle M (2004). **The ubiquitin-proteasome pathway and plant development.** *Plant Cell*. 16 (12): 3181-3195.
- Murase K, Shilba H, Iwano M, Che F, Watanabe M, Isogai A, Takayama S (2004). **A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling.** *Science*. 303 (5663): 1516-1519.
- Murfett J, Atherton T, Mou B, Gasser C, McClure B (1994). **S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection.** *Nature*. 367 (6463): 563-566.
- Murfett J, Strabala T, Zurek D, Mou B, Beecher B, McClure B (1996). **S-RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: Multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species.** *Plant. Cell*. 8 (6): 943- 958.
- Murfett J y McClure B (1998). **Expressing foreign genes in the pistil: a comparison of S-RNase constructs in different *Nicotiana* backgrounds.** *Plant Mol. Biol.* 37 (3): 561-569.
- Nakamori K, Takabatake R, Umehara Y, Kouchi H, Izui K, Hata S (2002). **Cloning, functional expression, and mutational analysis of a cDNA for**

***Lotus japonicus* mitochondrial phosphate transporter.** *Plant Cell Physiol.* 43 (10): 1250- 1253.

- Nasrallah J y Nasrallah M (1993). **Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response.** *Plant Cell.* 5 (10): 1325-1335.
- Newbigin E, Anderson M, Clarke A (1993). **Gametophytic self-incompatibility systems.** *Plant Cell.* 5 (10): 1315-1324.
- O'Brien M, *et al.*, (2002). **Molecular analysis of the stilar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*.** *Plant J.* 32 (6): 985-996.
- O'Brien M, Major G, Chantha S, Matton D (2004). **Isolation of a S-RNase protein from *Solanum chacoense*: identification of an SBP1 (Ring finger protein) ortholog.** *Sex. Plant Reprod.* 17: 81-87.
- Oliva M, Silva M, Sallai R, Brito M, Sampaio M (2010). **A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds.** *Biochimie.* 92 (11): 1667-1673.
- Peiter E (2011). **The plant vacuole: emitter and receiver of calcium signals.** *Cell Calcium.* 50 (2): 120-128.
- Poulter N, Vavotec S, Franklin-Tong V (2008). **Microtubules are target for self-incompatibility signaling in *Papaver* pollen.** *Plant Physiol.* 146 (3): 1358-1367.
- Poulter N, Bosch M, Franklin-Tong V (2011). **Proteins implicated in mediating self-incompatibility-induced alterations to the actin cytoskeleton of *Papaver* pollen.** *Ann. Bot.* 108 (4): 659-675.
- Puerta A, Ushijima K, Koba T, Sassa, H (2009). **Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*.** *J. Exp. Bot.* 60: 1309–1318.
- Resh M (1999). **Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1451 (1): 1-16.

- Resh M (2004). **Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins.** *Subcell. Biochem.* 37: 217-232.
- Roldán J, Rojas H, Goldraij A (2012). **Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the *in vivo* self-incompatibility response in *Nicotiana glauca*.** *Ann. Bot.* 110 (4): 787-795.
- Roux S y Steinebrunner I (2007). **Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants.** *Trends Plant Sci.* 12 (11): 522-527.
- Rudd J, Franklin F, Lord J, Franklin-Tong V (1996). **Increased phosphorylation of a 26-kD pollen protein is induced by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*.** *Plant Cell.* 8 (4): 713-724.
- Sassa H e Hirano H (2006). **Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from the self-incompatibility factor HT.** *Mol. Genet. Genomics.* 275 (1): 97-104.
- Sauer H *et al.*, (2000). **A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance.** *Plant Cell.* 12 (4): 519-533.
- Schopfer C, Nasrallah M, Nasrallah J (1999). **The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*.** *Science.* 286 (5445): 1697-1700.
- Scott R, Spielman M, Dickinson H (2004). **Stamen structure and function.** *Plant Cell.* 16: S46-S60.
- Shoshan-Barmatz V, Zalk R, Gincel D, Vardi N (2004). **Cellular and subcellular localization of VDAC in cerebellum and its function in ER-mitochondria cross-talk.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1657: 105-114.
- Shoshan-Barmatz V e Israelson A (2005). **The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function.** *J. Membr. Biol.* 204 (2): 57-66.
- Sijacic P, *et al.*, (2004). **Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility.** *Nature.* 429 (6989): 302- 305.

- Snow A y Spira T (1991)^a. **Differential pollen tube growth rates and nonrandom fertilization in *Hibiscus moscheutos***. *Am. J. Bot.* 78 (10): 1419-1426.
- Snow A y Spira T (1991)^b. **Pollen vigour and the potential for sexual selection in plants**. *Nature*. 352 (29): 796-797.
- Snowman B, Kovar D, Schevchenko G, Franklin-Tong V, Staiger C (2002). **Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response**. *Plant Cell*. 14 (10): 2613-2626.
- Sommer-Knudsen J, Clarke A, Bacic A (1996). **A galactose-rich, cell-wall glycoprotein from styles of *Nicotiana glauca***. *Plant J.* 9 (1): 71-83.
- Sprunck S (2010). **Let's get physical: gamete interaction in flowering plants**. *Biochem. Soc. Trans.* 38 (2): 635- 640.
- Stone S, Arnold M, Goring D (1999). **A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in *ARC1* antisense transgenic plants**. *Science*. 286 (5445): 1729-1731.
- Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K (2000). **The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma**. *Nature*. 403 (6772): 913-916.
- Takayama S, et al., (2000). **The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris***. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97 (4): 1920-1925.
- Takayama S e Isogai A (2005). **Self-incompatibility in plants**. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 467-487.
- Thomas S y Franklin-Tong V (2004). **Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen**. *Nature*. 429: 305-309.
- Wang H y Xue Y (2005). **Subcellular localization of the S locus F-box protein AhSLF-S₂ in pollen and pollen tubes of self- incompatible *Antirrhinum***. *J. Integr. Plant Biol.* 47 (1): 76-83.
- Watanabe M, Suwabe K, Suzuki G (2012). **Molecular genetics, physiology and biology of self-incompatibility in Brassicaceae**. *Proc. Jpn. Acad.Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 88 (10): 519-535.

- Weterings K, *et al.*, (1992). **Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Nicotiana tabacum* expressed during microgametogenesis and germination.** *Plant Mol. Biol.* 18 (6): 1101- 1111.
- Wheeler D y Newbiggin E (2007). **Expression of 10 S-class *SLF*-like genes in *Nicotiana alata* pollen and its implications for understanding the pollen factor of the S-locus.** *Genetics.* 177 (4): 2171-2180.
- Wheeler M, Vatovec S, Franklin-Tong V (2010). **The pollen S-determinant in *Papaver*: comparisons with known plant receptors and protein ligand partners.** *J. Exp. Bot.* 61 (7): 2015-2025.
- Willi Y, Määttänen K (2010). **Evolutionary dynamics of mating system shifts in *Arabidopsis lyrata*.** *J. Evol. Biol.* 23 (10): 2123-2131.
- Wittink F, Knuiman B, Derksen J, Capková V, Twell D, Schrauwen J, Wullems G (1999). **The pollen-specific gene *Ntp303* encodes a 69-kDa glycoprotein associated with the vegetative membranes and the cell wall.** *Sex. Plant Reprod.* 12: 276-284.
- Wright S y Barret S (2010). **Evolution. The long-term benefits of self-rejection.** *Science.* 330 (6003): 459-460.
- Wu H, Wang H, Cheung A (1995). **A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower.** *Cell.* 82 (3): 395-403.
- Wu H, Wong E, Ogdahl J, Cheung A (2000). **A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana alata* is similar to the tobacco TTS protein.** *Plant J.* 22 (2): 165-176.
- Wu J *et al.*, (2007). **Apyrases (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolases) play a key role in growth control in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol.* 144: 961-975.
- Wymer C, Bibikova T, Gilroy S (1997). **Cytoplasmic free calcium distribution during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*.** *Plant J.* 12: 427-439.
- Zhang Y, Zhao Z, Xue Y (2009). **Roles of proteolysis in plant self-incompatibility.** *Annu. Rev. Plant. Biol.* 60: 21-42.

11. Apéndice

11.1. Extracción de RNA total

- Homogeneizar 100 mg de la muestra con N₂, adicionar 1 ml de TRIzol e incubar a 30 °C durante 5 min.
- Adicionar 200 µl de cloroformo y agitar vigorosamente con la mano durante 15 seg e incubar tres minutos a 30 °C.
- Centrifugar a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Se observan tres fases, la fase superior es incolora y es la fase acuosa (donde se encuentra el RNA).
- Remover la fase acuosa cuidando de contaminarla con la interfase y colocarla en un nuevo tubo de 1.5 ml.
- Adicionar 500 µl de isopropanol al 100 % e incubar 10 min a 30 °C.
- Centrifugar a 12000 g durante 10 min a 4 °C.
- Remover el sobrenadante, dejando únicamente el botón de RNA.
- Adicionar 1 ml de etanol al 75 % y mezclar brevemente.
- Centrifugar a 7500 g durante 5 min a 4 °C.
- Desechar el sobrenadante y secar el botón de RNA a 30 °C durante aproximadamente 10 min.
- Resuspender el botón de RNA en agua libre de RNasas y guardar a – 70 °C.

11.2. Síntesis de cDNA

- Mezclar en un tubo para PCR:

1 µl Mezcla de dNTPs 10 mM

1 µl oligo dT 10 mM

3 µl RNA

5 µl H₂O libre de RNasas

- Incubar 10 min a 70 °C.
- Colocar los tubos en hielo y adicionar:

4 µl Solución amortiguadora 5X *Fermentas*

1 µl M-MLV-Reverse Transcriptase *Fermentas* (20 u/µl)

7 µl H₂O

- Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Incubar 50 min a 37 °C.
- Calentar 10 min a 85 °C.

11.3. Purificación de DNA de gel de agarosa (*Zymoclean*)

Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 14000 rpm.

- Cortar el fragmento del gel que contiene el DNA.
- Pesar el fragmento del gel y colocarlo en un tubo de 1.5 ml.

- Añadir tres volúmenes de la solución amortiguadora ADB por cada volumen del gel e incubar a 55 °C durante 5- 10 min.
- Colocar una columna *Zymo-spin* en un tubo colector y agregar la solución del punto anterior.
- Centrifugar 30 seg y desechar el sobrenadante.
- Adicionar 200 µl de la solución de lavado (Wash buffer) a la columna y centrifugar 30 seg. Repetir el lavado.
- Colocar la columna *Zymo-spin* en un nuevo tubo colector y adicionar directamente en el centro de la columna de 6- 10 µl de agua y centrifugar para eluir el DNA.

El kit provee las columnas y las soluciones, es por ello que no se menciona la composición de las mismas.

11.4. Células competentes de *E. coli*

- Crecer una colonia de *E.coli* en 10 ml de LB en un matraz de 125 ml, a 37 °C y 250 rpm, durante toda la noche.
- Transferir 2 ml del cultivo a 200 ml de LB contenidos en un matraz de 1 L.
- Incubar a 37 °C con agitación constante (250 rpm) hasta que el cultivo alcance una $DO_{590} = 0.375$.
- Transferir el cultivo a cuatro tubos de 50 ml estériles y mantenerlos en hielo durante 10 min.
- Centrifugar a 3000 rpm a 4 °C por 7 min.
- Resuspender cada botón en 10 ml de una solución fría de $CaCl_2$ 60 mM.
- Centrifugar a 3000 rpm a 4 °C por 5 min.
- Resuspender cada botón en 10 ml de una solución fría de $CaCl_2$ 60 mM. Mantener las células en hielo durante 30 min (agitar suavemente cada 10 min), puede mezclarse el contenido de cada tubo.
- Centrifugar a 3000 rpm a 4 °C por 7 min.
- Resuspender el botón en 2.5 ml de una solución fría de $CaCl_2$ 60 mM.
- Repartir en alícuotas de 100 µl en tubos de 1.5 ml.
- Congelar las alícuotas en N_2 y almacenar a -80 °C.

11.5. Transformación de *E. coli* por choque térmico

- Descongelar 100 µl de células competentes en hielo.
- Adicionar 100-200 ng de plásmido y dejar el hielo durante 30 min.
- Colocar las células en un baño a 42 °C por 45 seg.
- Agregar 400 µl de medio SOC.
- Incubar a 37 °C /250 rpm durante dos horas.
- Centrifugar las células a 400 g por un minuto.
- Resuspender las células en 100 µl de medio LB.

- Sembrarlas en el medio de selección correspondiente a 37 °C toda la noche.

11.6. Purificación de plásmido de *E. coli*

- Centrifugar 5 ml de un cultivo de una noche de bacterias de *E. coli* transformadas y desechar el sobrenadante.
- Resuspender el botón celular en 200 µl de Solución de Resuspensión.
- Adicionar 200 µl de Solución de Lisis e invertir suavemente.
- Incubar cinco minutos a temperatura ambiente y adicionar 350 µl de Solución de Neutralización (S3) e invertir suavemente de 4- 6 veces.
- Centrifugar 10 min a 14000 rpm a temperatura ambiente.
- Colocar una columna en un tubo colector de 2 ml y adicionar 500 µl de la Solución de Preparación de la Columna.
- Centrifugar a 14000 rpm durante un minuto y desechar el sobrenadante.
- Adicionar a la columna el lisado celular y centrifugar un minuto a 14000 rpm. Desechar el sobrenadante.
- Agregar 750 µl de la Solución de Lavado a la columna y centrifugar un minuto a 14000 rpm. Desechar el sobrenadante .
- Centrifugar un minuto a 14000 rpm.
- Transferir la columna a un nuevo tubo colector y adicionar 100 µl de la Solución de Elución y centrifugar un minuto a 14000 rpm.

El kit provee las columnas y las soluciones, es por ello que no se menciona la composición de las mismas.

11.7. Células competentes de *S. cerevisiae*

- Estriar en un placa con medio YPDA la cepa Y2HGold o Y187 e incubarla a 30 °C por tres días.
- Inocular una colonia en un tubo de 15 ml con 3 ml de medio YPDA líquido e incubar a 30 °C/ 240 rpm por 8 horas.
- Adicionar 5 µl del cultivo anterior en un matraz de 250 ml conteniendo 50 ml de medio YPDA .
- Incubar a 30 °C con agitación constante (230- 250 rpm) por 16-20 horas, hasta llegar a una $DO_{600} = 0.15- 0.3$.
- Centrifugar las células a 700 g por 5 min a temperatura ambiente.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 3 ml de una solución 1.1X TE/LiAc.
- Separar en dos fracciones de 1.5 ml cada una y centrifugar cada tubo a 1300 g por 30 segundos.
- Descartar el sobrenadante y resuspender cada botón con 600 µl de 1.1 X TE/LiAc.

11.8. Transformación de *S. cerevisiae*

Existen dos protocolos para transformar *S. cerevisiae*, uno de ellos es a pequeña escala y el otro es escala biblioteca.

- Preparar células competentes (Apéndice 11.7) y continuar con el siguiente protocolo.

	Pequeña Escala	Escala Biblioteca
Mezclar en un tubo estéril y frío:	Tubo de 1.5 ml	Tubo de 15 ml
DNA plasmídico	100 ng	5-15 µg
Yeastmaker Carrier DNA desnaturalizado (calentar a 95-100 °C durante 5 min e inmediatamente enfriar en un baño de hielo, repetir una vez más justo antes de usar)	5 µl	20 µl
Adicionar células competentes y mezclar suavemente	50 µl	600 µl
Agregar PEG/LiAc y mezclar	500 µl	2.5 ml
Incubar a 30 °C		
(para la escala pequeña mezclar cada 10 min y para la escala biblioteca mezclar cada 15 min)	30 min	45 min
Adicionar DMSO	20 µl	160 µl
Colocar el tubo en un baño a 42 °C (para la pequeña escala mezclar suavemente las células cada 5 min y para la escala biblioteca cada 10 min)	15 min	20 min
Centrifugar las células	14000rpm, 15 seg	700 g, 5 min
Remover el sobrenadante y resuspender en medio YPD plus	1 ml	3 ml
Incubar a 30 °C con agitación	90 min	90 min
Centrifugar las células	14000rpm, 15 seg	700 g, 5 min
Desechar el sobrenadante y resuspender en una solución de NaCl 0.9 % (m/v)	1 ml	15 ml

Sembrar diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 en el medio de selección apropiado. Todas las soluciones fueron usadas del kit *Yeastmaker Yeast Transformation System 2*.

11.9 Purificación de RNA mensajero

Para aislar el RNA_m del RNA total del polen/TP fue a través del sistema *PolyAttract mRNA Isolation Systems* de Promega.

Preparación del RNA_m

- Colocar 0.1- 1.0 mg de RNA total en un tubo de 1.5 ml.
- Aforar a 500 µl con agua libre de RNasas.
- Incubar a una temperatura de 65 °C por 10 min.
- Adicionar 3 µl de oligo dT biotinilado y 13 µl de una solución SSC 20X.
- Mezclar cuidadosamente e incubar a temperatura ambiente hasta que se enfríe completamente.

Mientras se enfría completamente el RNA se lavan las partículas paramagnéticas de estreptavidina (SA-PMPs).

- Agitar manualmente el tubo que contiene SA-PMPs hasta dispersarlas completamente.
- Colocar el tubo en el magneto (*Magnetic Stand*) hasta que las SA-PMPs se sitúen en un extremo del tubo, aproximadamente 30 seg.
- Desechar el sobrenadante. Quitar el tubo del magneto y lavar las SA-PMPs con 300 μ l de SSC 0.5X. Repetir el lavado dos veces más.
- Resuspender las SA-PMPs en 100 μ l de la solución SSC 0.5X.

11.10. Construcción de la biblioteca de cDNA con adaptadores SMARTIII, CDSIII y CDSIII/6

Síntesis de cDNA de cadena sencilla

- En un tubo para PCR mezclar:

2 μ l de RNAm (o lo equivalente a 0.5- 1.0 μ g de RNAm)

1 μ l CDS III

2 μ l CDS III/6 Primer

- Incubar a 72 °C por dos min, enfriar en hielo por dos min y centrifugar 10 seg a 14000 g.
- Agregar a la mezcla:

2 μ l 5X First- Strand Buffer

1 μ l DTT (100 mM)

1 μ l dNTP Mix (10 mM)

1 μ l SMART M-MLV Reverse Transcriptase

- Incubar a 25 °C por 10 min.
- Incubar a 42 °C por 10 min.
- Adicionar 1 μ l de oligo SMART III modificado, mezclar e incubar a 42 °C por 1 hora.
- Incubar a 75 °C por 10 min.
- Enfriar a temperatura ambiente y adicionar 1 μ l de RNasa H (2 unidades).
- Incubar a 37 °C durante 20 min.

El kit provee las soluciones, es por ello que no se menciona la composición de las mismas.

Amplificación de cDNA mediante LD-PCR (Long Distance-PCR)

Realizar dos reacciones de PCR de 100 μ l cada una mezclando lo siguiente:

2 μ l de cDNA de cadena sencilla (Procedimiento anterior)

70 μ l de H₂O desionizada

10 μ l 10X Advantage 2 PCR Buffer
 2 μ l 50X dNTP Mix
 2 μ l 5' PCR Primer
 2 μ l 3' PCR Primer
 10 μ l 10X Melting Solution
 2 μ l 50X Advantage 2 Polymerase Mix

- Colocar el tubo en el termociclador y llevar a cabo el siguiente programa: 1 ciclo de 95 °C por 30 seg, 20 ciclos que incluyen: 95 °C por 10 seg, 68 °C por 6 min^a y un ciclo de 68 °C.

^a: Programar el termociclador para que incremente el tiempo de extensión 5 seg con cada ciclo. Por ejemplo en el segundo ciclo, la extensión debe de ser de 6 min y 5 seg.

- Analizar una alícuota de 7 μ l del producto de PCR (cDNA doble cadena) en un gel de agarosa al 1.2 %.

Los reactivos utilizados fueron del kit *Make Your Own "Mate and Plate" Library* y todas las incubaciones se realizaron en el termociclador. El kit provee las soluciones, es por ello que no se menciona la composición de las mismas.

Purificación de cDNA doble cadena con las columnas CHROMA SPIN TE-400

- Invertir la columna para resuspender la matriz hasta homogeneidad. Remover la tapa superior e inferior y colocar en un tubo de 2 ml.
- Centrifugar a 700 g por 5 min (Usar un rotor basculante)
- Colocar la columna en un nuevo tubo colector y adicionar 93 μ l del producto de LD-PCR (dos muestras) en el centro de la matriz.
- Mezclar las dos muestras de LD-PCR purificadas en un tubo de 600 μ l y adicionar:

1:10 volúmenes de acetato de sodio 3 M

2.5 volúmenes de etanol (95-100%) frío

- Dejar a -20 °C durante 4 horas.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
- Secar el botón obtenido durante 10 min.
- Resuspender el cDNA doble cadena en 21 μ l y cuantificar.

Construcción de la biblioteca

- Preparar células competentes Y187 (Apéndice 11.7) y seguir el protocolo de transformación escala biblioteca (Apéndice 11.8) bajo las siguientes condiciones:

20 μ l de cDNA doble cadena (5 μ g)

6 μ l de pGADT-Rec (0.5 μ g/ μ l)

- Como se especifica en el Apéndice 11.8, las células transformadas se resuspenden en 15 ml de NaCl 0.9 % (m/v).
- Sembrar diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 en un medio SD/-Leu e incubar a 30 °C durante 3-4 días y determinar el número de clones independientes.
- Sembrar el remanente en cajas de 150 mm que contengan SD/-Leu (aproximadamente 150 μ l por caja), por lo que se utilizan aproximadamente 100 cajas. Incubar a 30 °C durante 3- 4 días.
- Colocar las cajas de 150 mm a 4 °C durante 4 horas.
- Adicionar 5 ml de medio para congelar y usar perlas de vidrio estériles para colectar las colonias de cada caja.
- Mezclar todas las colonias resuspendidas en medio para congelar (Apéndice 11.15).
- Estimar la densidad celular usando un hemocitómetro. Si la densidad celular es $< 2 \times 10^7$ por ml, reducir el volumen de suspensión por centrifugación.
- Realizar varias alícuotas de 1 ml de la biblioteca y algunas alícuotas de 50 ml (almacenamiento prolongado) y congelar a -80 °C. Este tipo de almacenamiento es realizado porque no es recomendable congelar y descongelar la biblioteca, debido a una disminución de la viabilidad de las células.

11.11. Purificación de plásmido de *S. cerevisiae*

Se siguieron las instrucciones del *kit Easy Yeast Plasmid Isolation*, el cual se detalla a continuación:

- Aislar colonias de levaduras transformadas en un medio selectivo e inocular una colonia en un medio selectivo de agar fresco para crear un cuadrado de 1 cm x 1 cm e incubar durante tres días a 30 °C.
- Con una punta de pipeta estéril colectar la mitad de las células del cuadrado (no más de 10 mg de células) y resuspenderlas en un tubo de 1.5 ml que contenga 500 μ l EDTA 10 mM.
- Centrifugar durante 1 minuto a 11000 g y desechar el sobrenadante.
- Resuspender el botón de levaduras en 200 μ l de la solución amortiguadora ZYM.
- Adicionar 20 μ l de la suspensión de Zimolasa (invertir la suspensión dos o tres veces antes de usar, para asegurar que la suspensión sea uniforme) y mezclar suavemente.
- Incubar durante 1 hora a 30 °C con agitación suave (colocar el tubo de 1.5 ml en el fondo de un matraz Erlenmeyer de 250 ml e incubar).
- Centrifugar los esferoplastos durante 10 minutos a 2000 g y desechar el sobrenadante.

- Resuspender los esferoplastos en 250 µl del amortiguador Y1 y agregar 250 µl de la solución de lisis Y2 y mezclar invirtiendo el tubo de 6-8 veces e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
- Adicionar 300 µl de la Solución de Neutralización Y3 y mezclar por inversión de 6-8 veces.
- Centrifugar durante 5 min a 11000 g y transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml y repetir la centrifugación.
- Transferir el sobrenadante a una columna *Yeast Plasmid Spin* y centrifugar durante 1 min a 11000 g y desechar el sobrenadante.
- Agregar 450 µl del amortiguador Y4 para el lavado de la columna y centrifugar tres min. Desechar el sobrenadante y repetir la centrifugación.
- Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml y agregar 50 µl de la solución de elución YE y centrifugar durante 1 min para eluir el plásmido.

El kit provee la suspensión de Zimolasa, las columnas y las soluciones, es por ello que no se menciona la composición de las mismas.

11.12. Germinación de TP *in vitro*

- Mezclar 0.015-0.020 g de polen con 6 ml de medio para TP y colocar la suspensión en cajas de 100 ml de vidrio estériles.
- Incubar 16 horas a 30 °C.
- Verificar la germinación de los TP en el microscopio.
- Colectar los TP mediante filtración al vacío.

11.13. Análisis por PCR de las colonias de la biblioteca (*Matchmaker Insert Check PCR Mix 2*)

- Con una punta de un pipeta estéril tocar ligeramente un colonia, para obtener una pequeña porción de levaduras. Mezclar con 25 µl de H₂O para PCR (Si se enturbia el H₂O realizar una dilución, debido a que una gran concentración de levaduras puede inhibir la reacción de PCR).
- Adicionar 25 µl de la mezcla *Matchmaker Insert Check PCR Mix* y pipetear de 3- 5 veces.
- Colocar el tubo en el termociclador y llevar a cabo el siguiente programa: un ciclo de 94 °C por 1 min, 30 ciclos que incluyen: 98 °C por 10 seg, 68 °C por 3 min y un ciclo de 68 °C por 3 min.
- Analizar 5 µl de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 0.8 %.

11.14. Marcaje radiactivo *Random Primers DNA Labeling System de Invitrogen*

- Desnaturalizar 25 ng de DNA disueltos en H₂O destilada (volumen máximo 20 µl), lo cual es realizado calentando el DNA durante 5 minutos en un baño de agua en ebullición y posteriormente colocándolo en hielo

- Adicionar los siguientes reactivos (en hielo):

2 μ l dATP 0.5 mM

2 μ l dGTP 0.5 mM

2 μ l dTTP 0.5 mM

15 μ l Random Primers Buffer Mixture

5 μ l [α -³²P] dCTP 3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l

H₂O destilada requerida para obtener un volumen final de 49 μ l

- Mezclar brevemente y adicionar 1 μ l de Fragmento Klenow, mezclar suavemente y centrifugar brevemente.
- Incubar dos horas a 25 °C.
- Adicionar 5 μ l de Stop Buffer.
- Colocar la sonda en el centro de una columna *Quick Spin Oligo*, centrifugar durante dos minutos a 3000 g.
- Adicionar a la columna 100 μ l de solución de hibridación (Apéndice 11.15) y mezclar con la sonda.
- Desnaturalizar la sonda mezclándola con 3 ml de solución de hibridación (calentar durante tres minutos en un baño de agua en ebullición) y adicionar inmediatamente a la membrana previamente incubada con solución de hibridación (Apéndice 11.15).

11.15. Soluciones y medios

Tabla 10. Componentes de la solución amortiguadora 5X *Fermentas*

Componente	Concentración
Tris-HCl (pH 8.3)	50 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	4 mM
DTT	10 mM

Tabla 11. Componentes de la solución amortiguadora *cDNA Advantage Pol 10X*

Componente	Concentración
Tricina-KOH (pH 9.2)	40 mM
Acetato de potasio	15 mM
Acetato de magnesio	3.5 mM
Albumina de suero	3.75 μ g/ml

Tabla 12. Componentes de la solución amortiguadora NE de *EcoRI 10X*

Componente	Concentración
NaCl	50 mM
Tris-HCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Tritón X-100	0.025 %

Tabla 13. Componentes de la solución amortiguadora NE 4 10X

Componente	Concentración
DTT	1 mM
Tris-Acetato	20 mM
Acetato de magnesio	10 mM
Acetato de potasio	50 mM

Tabla 14. Componentes de la solución amortiguadora de *Promega* 2X

Componente	Concentración
Tris-HCl	30 mM
DTT	10 mM
MgCl ₂	10 mM
ATP	1 mM
PEG	5 %

- Medio LB

10 g de Triptona

5 g de Extracto de levadura

10 g NaCl

15 g de agar

Aforar a 1 L con H₂O destilada

- Medio SOC

Medio LB

Glucosa 0.02 M (Concentración final)

- Medio YPDA

25 g de medio YPD

Adenina (0.003 %)

- TAE 50X

242 g Tris- HCl

57.1 ml Ácido acético glacial

100 ml EDTA 0.5 M pH 8

Aforar a 1 L con agua destilada

- Gel de agarosa 1 %

300 mg de agarosa

30 ml de amortiguador TAE 1X

Calentar hasta disolver y agregar 1.5 μ l de bromuro de etidio (0.5 mg/ ml)

- Gel de agarosa para RNA

Para 30 ml

0.6 g agarosa

1.5 ml MAE 20X

2.4 ml Formaldehido 37 %

26.1 ml H₂O DEPC

0.5 μ l Bromuro de etidio (0.5 mg/ ml)

- Solución 1.1X TE/LiAc

1.1 ml de TE 10X

1.1 ml de LiAc 1M

Aforar a 10 ml con H₂O

- SSC 20X

NaCl 3M

Citrato de sodio 0.3M

pH= 7.0 \pm 0.5

- PEG/LiAc (Polietilenglicol 4000/ acetato de litio)

8 ml de PEG al 50 %

1 ml de TE 10X

1 ml de LiAc 1M

Preparar justo antes de usar

- SSC 0.5X

Para preparar 1.2 ml, se mezclan 30 μ l de la solución SSC 20X con 1.17 ml de agua libre de RNasas en un tubo estéril también libre de RNasas.

- SSC 0.1X

Para preparar 1.4 ml, se mezclan 7 μ l de la solución SSC 20X con 1.393 ml de agua libre de RNasas en un tubo estéril también libre de RNasas.

- Medio para congelar

75 % YPDA

25 % Glicerol

- SD/-Trp, SD/-Leu, DDO y QDO

Minimal SD Base (Clontech)

-Leu, -Trp, DDO y QDO Supplement (*Clontech*)

- Medio para germinar Tubos Polínicos

Mezclar cada una de los componentes de la tabla 15 y aforar a 200 ml con agua desionizada y filtrar con vacío (filtro de 45 μ m).

Tabla 15. Medio para germinar tubos polínicos de *N. rastroensis*

Componente	Concentración
H ₃ BO ₃	1.6 mM
MgSO ₄	0.81 mM
CaCl ₂	1 mM
MES (pH 6.0)	0.015 mM
KCl	1 mM
CuSO ₄	0.03 mM
Sacarosa	5 %

- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2

28 ml NaH₂PO₄ 0.2 M

72 ml Na₂HPO₄ 0.2 M

Aforar a 200 ml con agua DEPC

- Solución de hibridación

9 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2

10.5 ml SDS 10 %

60 μ l EDTA 0.5 M

10.5 ml H₂O DEPC