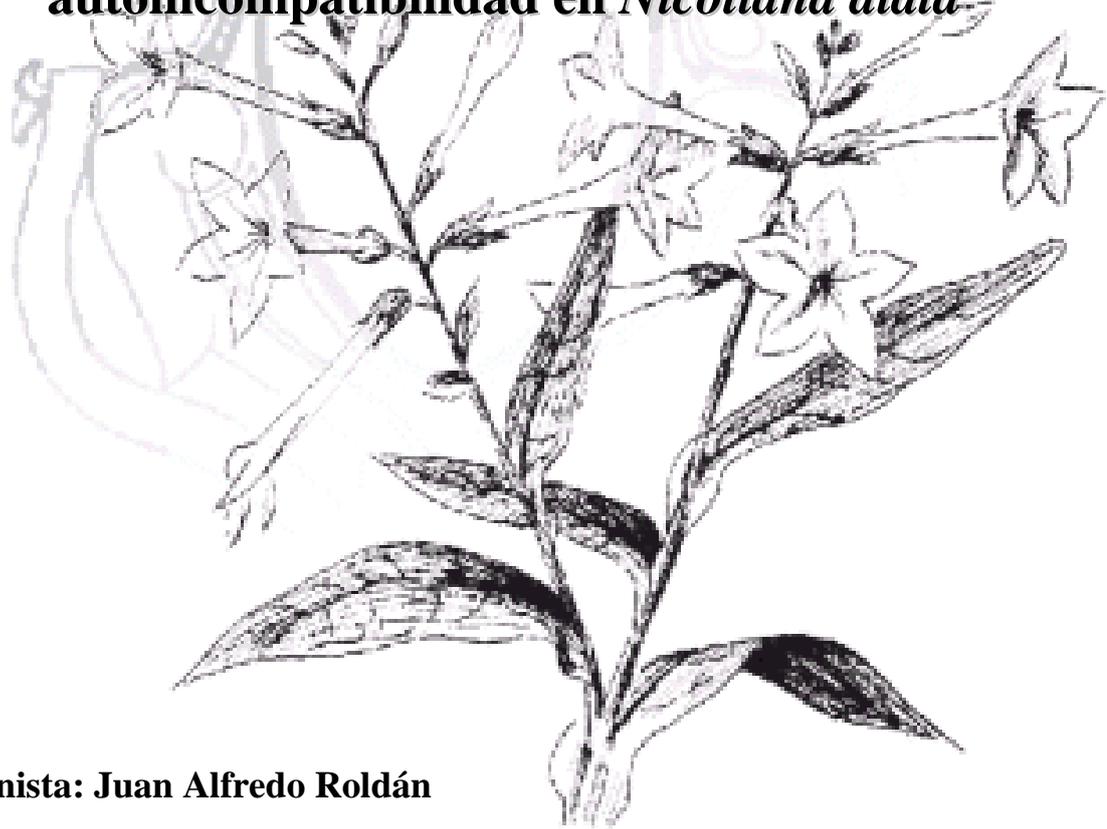


UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,
FÍSICAS Y NATURALES***

Carrera de Ciencias Biológicas

“Desarrollo de un sistema experimental para el estudio *in vitro* de la reacción de autoincompatibilidad en *Nicotiana alata*”



Tesinista: Juan Alfredo Roldán

Director: Ariel Goldraj

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica - CIQUIBIC. *FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS*



ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Plantas y condiciones de crecimiento	8
Búsqueda y recolección de plantas de una población natural de <i>Nicotiana alata</i>	8
Extracción de ADN genómico	9
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	9
Aplastados de pistilos (<i>Style squash</i>)	9
Cultivo de polen	9
Cultivo de polen en presencia de extractos de pistilos	10
Cultivos de polen en presencia de FM4-64FX	10
Polinización con tubos polínicos pregerminados	10
Inmunocitoquímica	10
RESULTADOS	13
Establecimiento de una población para el estudio de la autoincompatibilidad en <i>Nicotiana alata</i>	13
Identificación de los alelos de <i>S-RNasa</i> en la generación segregante F2 de la población UM de <i>Nicotiana alata</i> .	13
Caracterización del fenotipo de autoincompatibilidad en una población natural de <i>Nicotiana alata</i>	14
Desarrollo de un sistema experimental para el estudio <i>in vitro</i> de la reacción de autoincompatibilidad en <i>Nicotiana alata</i>	17
Condiciones óptimas para el cultivo de polen	17
Cultivos en presencia de pistilos incompatibles muestran un efecto inhibitorio en el crecimiento	18
Dinámica de la marcación de endomembranas en tubos polínicos de <i>Nicotiana alata</i>	24
Marcación de tubos polínicos cultivados <i>in vitro</i>	24
Diseño experimental para el estudio del tráfico de membranas <i>in planta</i>	25
DISCUSIÓN y PERSPECTIVAS	29
BIBLIOGRAFÍA	33



RESUMEN

Se estudia la reacción de autoincompatibilidad en Solanáceas tomando como modelo la especie *Nicotiana alata*. Mediante ensayos de polinización se estudió el fenotipo de compatibilidad en 8 individuos de una población natural, analizando la migración de los tubos polínicos en el estilo y la producción de frutos. Todos los individuos de la población resultaron ser autoincompatibles y compatibles entre sí. A través de ensayos de PCR, se analizó la posible presencia de 3 alelos de *S-RNasa* a los fines de iniciar la caracterización genotípica del locus *S* de la población en estudio.

Se desarrolló un sistema experimental para investigar el posible rechazo del polen cultivado *in vitro* en presencia de extractos de pistilos incompatibles. En cultivos de polen proveniente de 2 plantas distintas, la longitud del tubo polínico en presencia de extractos de pistilos propios fue aproximadamente 50% menor respecto a la longitud alcanzada en presencia de pistilos compatibles. Tras 4 h de incubación, los cultivos desafiados con pistilos incompatibles mostraban 70% de tubos polínicos muertos y 23% de tubos con anomalías morfológicas o escaso movimiento de vesículas citoplasmáticas. En contraste, en el polen cultivado en presencia de pistilos compatibles, el 61% de las células mostraba movimiento vesicular y morfología normales. Aproximadamente en el 80% de los cruzamientos compatibles analizados la longitud promedio del tubo polínico fue mayor que 168 μm , el valor medio de longitud de los tubos polínicos incompatibles.

La dinámica del tráfico de endomembranas en tubos polínicos fue estudiada utilizando un marcador fluorescente de la ruta endocítica. Los tubos polínicos “rechazados” *in vitro* mostraron alteraciones en el patrón de marcación de membranas respecto a los tubos polínicos normales, siendo notable en los primeros la ausencia de la “zona clara” en el ápice del tubo y la acumulación de fluorescencia en el citoplasma, en la zona subapical del tubo. Estos cambios resultan consistentes con el menor crecimiento y la alteración en el movimiento vesicular observada en los tubos polínicos cultivados con pistilos propios.



INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies de angiospermas producen flores perfectas que contienen las estructuras reproductivas femenina (pistilo) y masculina (estambres) en estrecha cercanía. Por este motivo, estas flores poseen una gran tendencia a la autofecundación. Sin embargo, las plantas han desarrollado diferentes estrategias que promueven la reproducción sexual cruzada entre distintos individuos de la misma especie. De esta manera se evita la endocría y se generan nuevas combinaciones que contribuyen a una mayor variabilidad genética. Estas estrategias pueden consistir en barreras morfológicas a la autofecundación como la dicogamia (maduración de los órganos reproductivos en diferentes tiempos) y la hercogamia (separación espacial de los órganos reproductivos) (Newbigin & Uyenoyama, 2005). Otro tipo de barreras ampliamente difundidas en el reino vegetal son los sistemas de **autoincompatibilidad**, basados en el reconocimiento y rechazo en el pistilo del propio polen o estrechamente relacionado (Kao & Tsukamoto, 2004).

La autoincompatibilidad está controlada a nivel genético por una región altamente polimórfica denominada **locus S**. Este locus posee dos genes ligados, *S-RNasa* y *SLF*, que codifican los factores que confieren especificidad al pistilo y al polen, respectivamente (Kao & Tsukamoto, 2004). Ambos genes son multialélicos y sus diferentes variantes alélicas definen los haplotipos del locus *S*, designados *S1*, *S2*, *S3*...*Sn*. (figura 1 A).

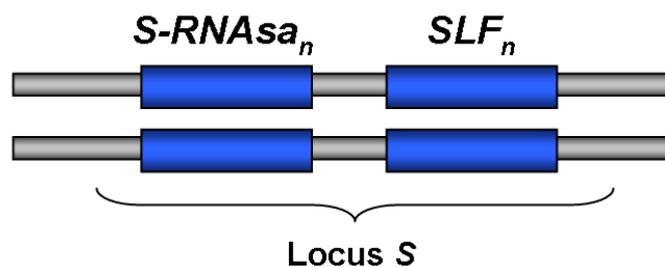


Figura 1: Esquema del locus S. El locus *S* posee dos genes ligados, *S-RNasa* y *SLF*, determinantes de la especificidad del pistilo y el polen respectivamente. Los distintos pares alélicos del locus *S* definen los haplotipos *S₁*, *S₂*, *S₃*...*S_n*.

Estudios de genética clásica revelaron que existen dos grandes sistemas de autoincompatibilidad: **autoincompatibilidad esporofítica** y **autoincompatibilidad gametofítica**. En la primera, presente en *Brassicáceas*, *Asteráceas* y *Cariofiláceas* (Gauze & McCormick, 1999), el fenotipo de autoincompatibilidad del polen (polen aceptado o



polen rechazado) está determinado por el genotipo diploide del esporófito. En este sistema el rechazo ocurre por bloqueo directo del desarrollo del tubo polínico en la superficie del estigma (Takayama & Isogai, 2005). Los determinantes específicos del reconocimiento en la autoincompatibilidad esporofítica son el receptor de quinasa *S*, *SRK* (*S* receptor *k*inase) expresado en la superficie del estigma, y la proteína rica en cisteína del locus *S* *SCR* (*S*-locus *c*ysteine-*r*ich protein) expresada en el polen, también conocida como SP11. Ambos factores son codificados por el locus *S* (Fujimoto *et al.*, 2006) existiendo complejas relaciones de dominancia y recesividad que condicionan la expresión de los diferentes alelos y determinan la aceptación o rechazo del tubo polínico (Takayama & Isogai, 2005; Shiba *et al.*, 2006).

La autoincompatibilidad gametofítica está descrita en más de 60 familias y estudiada principalmente en Solanáceas, Rosáceas, Escrofulariáceas y Papaveráceas. En este sistema, el fenotipo del polen depende de su propio genoma haploide. El rechazo del polen ocurre en el estigma o en el estilo toda vez que el haplotipo del mismo coincide con cualquiera de los dos haplotipos expresados en el pistilo (figura 2, de Nettancourt, 2001).

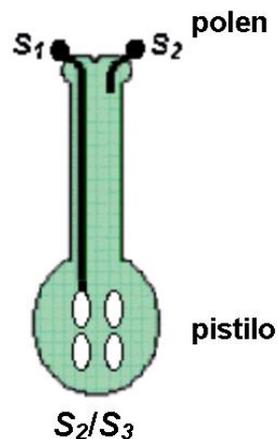


Figura 2: Autoincompatibilidad gametofítica. El polen es rechazado cuando su haplotipo es coincidente con cualquiera de los haplotipos expresados en el pistilo.

En este trabajo, nos referiremos a la autoincompatibilidad gametofítica, tomando como modelo la especie *Nicotiana glauca* de la familia Solanáceas. En esta familia, y también en Rosáceas y Escrofulariáceas, el determinante de especificidad del pistilo es una glicoproteína de aproximadamente 30 kDa que posee actividad ribonucleasa, denominada por ende **S-RNasa**. Además del reconocimiento, S-RNasa también participa en el mecanismo de rechazo del polen, degradando el ARN del tubo polínico incompatible (McClure & Franklin-Tong, 2006). A nivel molecular, la S-RNasa se ha caracterizado en los géneros *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum* (Solanáceas), *Antirrhinum* (Escrofulariáceas) y



Prunus (Rosáceas) (Cruz-García *et al.*, 2003). La secuencia de amino ácidos de la S-RNasa posee cinco regiones conservadas (C1-C5) y dos regiones hipervariables (HVa y HVb) que definen los distintos haplotipos (Ioerger *et al.*, 1991). La S-RNasa es secretada a la matriz extracelular del tejido de transmisión del pistilo e internalizada por el tubo polínico en su trayecto hacia el ovario (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006).

El factor de especificidad del polen, la proteína **SLF** (*S*-locus *F*-Box), ha sido recientemente identificado en Solanáceas, en la especie *Petunia inflata* (Sijacic *et al.*, 2004). SLF posee un dominio de tipo F-box, característico de proteínas que forman complejos involucrados en la señalización con ubiquitina. Las proteínas ubiquitinadas son reconocidas y degradadas en la célula por el proteosoma 26S (Hua & Kao, 2006). Como se menciona más adelante, es posible que el dominio F-box de SLF juegue un rol clave en el mecanismo de rechazo del polen en el sistema de autoincompatibilidad gametofítica. SLF ha sido también estudiado en otras especies como *Antirrhinum hispanicum* (Qiao *et al.*, 2004) y varias especies del género *Prunus* (Takayama & Isogai, 2005).

Existen amplias evidencias de que la expresión de S-RNasa y de SLF en el pistilo y polen respectivamente, no son suficientes para la manifestación de la autoincompatibilidad. Otros factores expresados en el pistilo, no ligados al locus *S* ni relacionados con la especificidad en el reconocimiento polen-pistilo, resultan indispensables para el rechazo del polen (McClure & Franklin-Tong, 2006). En *Nicotiana glauca*, se conocen al menos tres factores, **HT-B**, **120k** y **4936**, cuya función específica es desconocida hasta el momento. La supresión de la expresión de HT-B y 120k o una mutación natural en el factor 4936 producen una falla en el sistema de autoincompatibilidad cuya consecuencia es que el polen resulta siempre compatible, independientemente de su haplotipo. (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005; Goldraij *et al.*, 2006).

Modelos de autoincompatibilidad

Dado que la S-RNasa ingresa al interior del tubo polínico, tanto en polinizaciones compatibles o incompatibles (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006), resulta necesario explicar la forma en que el polen compatible evade el efecto citotóxico promovido por la S-RNasa que produce su rechazo. Existen dos modelos que explican el control ejercido sobre la S-RNasa en las polinizaciones compatibles. **El modelo de degradación de S-RNasa** postula que en un cruzamiento compatible, la interacción entre proteínas S-RNasa y SLF de distinto haplotipo (interacción inespecífica) produce la ubiquitinación de la S-



RNasa y su posterior degradación por el proteosoma 26S en el citoplasma del polen (Ushijima *et al.*, 2003). De esta manera el polen conserva estable el ARN y progresa hasta el ovario. Por el contrario, en los cruzamientos incompatibles la interacción entre proteínas SLF y S-RNasa del mismo haplotipo (interacción específica) previene la ubiquitinación; consecuentemente las S-RNasas permanecen estables y activas para degradar el ARN del polen y rechazarlo. Las principales evidencias que apoyan este modelo son la interacción *in vitro* entre SLF y S-RNasa de *Antirrhinum* (Qiao *et al.*, 2004), demostrada en ensayos de coprecipitación y a través del sistema de doble híbrido, y la interacción entre SLF y proteínas que integran la maquinaria de ubiquitinación (Hua & Kao, 2006). Sin embargo, aún no se han demostrado evidencias de la degradación de S-RNasa en cruzamientos de tipo compatible, lo que constituye una premisa básica del modelo (Goldraij *et al.*, 2006). Este modelo tampoco explica cómo se integran los factores no ligados al locus *S* a la maquinaria de autoincompatibilidad.

El modelo de compartimentalización se basa en hallazgos recientes donde se muestra, mediante experimentos de inmunocitoquímica, que la S-RNasa internalizada por el tubo polínico es almacenada en vacuolas (Goldraij *et al.*, 2006). En las polinizaciones compatibles la vacuola conserva su integridad durante todo el trayecto del tubo polínico hacia el ovario. De esta manera, la compartimentalización sería un mecanismo eficaz para proteger al ARN del tubo polínico de la acción de la S-RNasa. Por el contrario, en las polinizaciones incompatibles la vacuola pierde su integridad, liberando la S-RNasa al citoplasma donde se produciría la degradación del ARN y el consecuente rechazo del polen. Al menos dos factores no ligados al locus *S*, 120k y HT-B, también son captados por el tubo polínico; 120k se asocia al tonoplasto y permanece estable en las polinizaciones compatibles pero no en las incompatibles. Contrariamente, HT-B permanece estable sólo en polinizaciones incompatibles, y posiblemente actúa mediando la desorganización del tonoplasto en el polen rechazado (Goldraij *et al.*, 2006). Este modelo pone de manifiesto la importancia de un aspecto estudiado con poco detalle hasta el momento como es el rol de la ruta endocítica en la reacción de autoincompatibilidad.

El **objetivo general** de este trabajo es desarrollar un sistema experimental *in vitro* que contribuya al estudio del fenómeno de autoincompatibilidad en *Nicotiana glauca*.

En este marco, se establecen los siguientes **objetivos específicos**:

a) Caracterizar el haplotipo del locus *S* en una población F₂ conteniendo los alelos de S-RNasa *S*_{A2}, *S*_{C10} y *S*_{I05} y seleccionar los segregantes homocigotas de esta población.



b) Desarrollar un sistema apropiado para el cultivo de polen y posteriormente intentar reproducir *in vitro* la respuesta de autoincompatibilidad. Un sistema de éstas características aún no ha sido descrito en *Nicotiana glauca*.

c) Estudiar la dinámica del tráfico de membranas en tubos polínicos cultivados *in vitro* y comparar dicho tráfico en tubos polínicos compatibles e incompatibles.



MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas y condiciones de crecimiento: Se utilizaron plantas de *Nicotiana glauca* de la población de laboratorio UM, provenientes de la *University of Missouri-Columbia* (Missouri, Estados Unidos) o de la población natural NaM, proveniente de Puerto Iguazú, Provincia de Misiones, Argentina. Las plantas fueron crecidas en el invernáculo del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET) en la Ciudad Universitaria de Córdoba, durante el período Noviembre 2006-Abril 2007, bajo luz natural y un rango aproximado de temperatura de 25°-35°C. Durante Junio a Noviembre de 2006, plantas de la población UM fueron crecidas en cuartos iluminados con luz artificial a temperatura ambiente.

Búsqueda y recolección de plantas de una población natural de *Nicotiana glauca*: A fines de Noviembre de 2006, se realizó un viaje a la Ciudad de Puerto Iguazú, Pcia de Misiones, Argentina. El objetivo era coleccionar especies de Solanáceas utilizadas como modelo en el estudio de la autoincompatibilidad, principalmente *Nicotiana glauca*. Para orientar la búsqueda de estas especies se consultó al Dr Andrea Cocucci y la Dra Gloria Barboza del IMBIV y bibliografía específica del género *Nicotiana* (Cocucci & Hunziker, 2005; Goodspeed, 1954) y *Petunia* (Ando *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2002). Otras fuentes importantes de información fueron la página electrónica del Instituto de Botánica Darwinion-CONICET (www.darwin.edu.ar), el Director del Centro de Investigaciones Ecológicas Subtropicales (CIES, Parque Nacional Iguazú) Sr Justo Herrera, y el Guardaparques Ricardo Melzew.

Se encontró una población natural de *Nicotiana glauca* situada a orillas del Río Paraná, aproximadamente 200 mts al sur del Hito Argentino en la Ciudad de Puerto Iguazú, coleccionándose plantas y semillas de varios individuos de esta especie. Durante el mismo viaje se recolectaron también las especies autoincompatibles *Petunia inflata* (Ruta Nacional 101, aproximadamente 200 mts al Oeste del arroyo Ñandú Grande (Parque Nacional Iguazú) y *Nicotiana langsdorfii* (inmediaciones del acceso a los Paseos Superior e Inferior, Parque Nacional Iguazú) que no fueron utilizadas en este estudio. Muestras herborizadas de todas las especies recolectadas fueron identificadas por el Dr Andrea Cocucci (IMBIV-CONICET) e incorporadas a la colección del Museo Botánico de la FCEFyN, Universidad Nacional de Córdoba.



Extracción de ADN genómico: Aproximadamente 130 mg de hojas frescas de plantas jóvenes de *Nicotiana alata* fueron cortadas, congeladas inmediatamente con aire líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso. El ADN fue aislado de acuerdo a protocolos establecidos (Dellaporta *et al.*, 1983). Las estimaciones de pureza y concentración del ADN fueron realizadas en geles de agarosa 0,8%. Previo a los ensayos de PCR, el ADN fue digerido con 0,5 μl de Eco RI (10 U/ μl) durante 12-15 hs a 37°C .

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Se utilizaron oligonucleótidos homólogos a las regiones hipervariables de los alelos SA2 (5'AAAGTACCATCGCGACTTCG3' y 5'TGTGAAGTTATTCATGGTGGG3'), *Sc10* (5'GACCTAACCACCGCAGAAAC3' y 5'CATCGAGTCGAAACATATGCC3') y *S105* (5'TGACCTCCACCGAAGAGGATTGTAAAG3' y 5'GCTGTGTAGTTTTCCCAATGCCAGG3'). Como control positivo se emplearon oligonucleótidos basados en la enzima Rubisco (5'AGGCCTGGATCCGTATTATTG3' y 5'GGTCTCATAACTTGGTAGGAA3'). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf, utilizando 0,1-1 ng de ADN templado bajo las siguientes condiciones: 1 min a 94°C (1 ciclo); 45 seg a 94°C , 1 min a $60,5^{\circ}\text{C}$, 2 min a 72°C (40 ciclos); 2 min a 72°C (1 ciclo). Los productos amplificados fueron analizados en geles de 1,2% agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV.

Aplastados de pistilos (*Style squash*): Las flores fueron emasculadas 2 días antes de la antesis y polinizadas en horario vespertino. 65 h luego de la polinización los pistilos fueron fijados en etanol-acético 3:1 durante 1 h, autoclavados (1,5 bar; 15 min) en presencia de 10% Na_2SO_3 y sumergidos durante 1h en 0,1% azul de anilina preparada en 0,1 M K_2HPO_4 , pH 9,5. El aplastado de los pistilos se llevó a cabo en un portaobjetos con 0,1% de azul de anilina en 50% de glicerol. Los preparados fueron observados en un microscopio óptico Axiovert 200 con un objetivo 10X utilizando un filtro para Dapi (405 nm).

Cultivo de polen: Polen de *Nicotiana alata* fue cultivado (70 cél/ μl) en medio mineral (1,6 mM H_3BO_3 ; 1 mM KCl; 1mM CaCl_2 ; 1 mM NH_4Cl ; 0,8 mM MgCl_2 ; 15 mM MES pH: 5,9 y 7,5% PEG 4000) conteniendo 2%, 5% o 10% de sacarosa. Los cultivos se incubaron a 20° , 24° y 28°C con agitación (120 rpm) o sin agitación por tiempos variables según el experimento. Los tubos polínicos fueron observados en microscopio óptico Axiovert 200, con un objetivo 10X. Para la medición de la longitud del tubo polínico se



usó el programa Image J. La estimación del porcentaje de germinación se realizó mediante un conteo sistemático de granos luego de 20 hs de cultivo en un portaobjetos graduado.

Cultivo de polen en presencia de extractos de pistilos: Pistilos de *Nicotiana glauca* de la población NaM fueron molidos en aire líquido y extraídos con medio de cultivo (250 mg peso fresco/ml) conteniendo 5% sacarosa durante 30 min en hielo, con agitación por inversión cada 5 min. La suspensión fue centrifugada (13.000 rpm, 4°C, 10 min) y el sobrenadante se utilizó como medio de cultivo. Los cultivos fueron incubados a 24°C, en agitación (120 rpm) por tiempos variables. La observación de los tubos polínicos se realizó en microscopio óptico Axiovert 200, con un objetivo 10X. Para la estimación de la vitalidad se utilizó un objetivo 100X.

Cultivos de polen en presencia de FM4-64FX: El polen fue cultivado en un medio con 5% de sacarosa en presencia de 4 o 12 μM de FM4-64 FX a 24 °C y 120 rpm. La observación se realizó en microscopio confocal (LSM Pascal, Carl Zeiss) en un objetivo 100X utilizando un filtro para rodamina y un láser de excitación de 543 nm.

Polinización con tubos polínicos pregerminados: Flores frescas de *N. tabacum* y *N. glauca* fueron cortadas y polinizadas con un cultivo de polen (1000 cél/ μl) preincubado o no con 4 μM de FM4-64FX. Luego de 6 h de cultivo los tubos polínicos fueron centrifugados (4000 rpm, 2 min) y la masa de tubos obtenida se utilizó para polinizar las flores en cámara húmeda durante 48 hs. Los pistilos polinizados fueron procesados según la técnica de aplastado de estilos y observados en un microscopio confocal Pascal con filtros para rodamina (543 nm) y DAPI (405 nm). En otra serie de experimentos los pistilos polinizados fueron fijados por 90 min en PBS conteniendo 4% formaldehído, lavados en PBS y posteriormente embebidos en parafina y cortados en secciones de 10 μm en el IMBIV.

Inmunocitoquímica: Secciones de pistilos de *N. tabacum* embebidas en parafina fueron desparafinadas y rehidratadas con PBS 1X. Las secciones fueron teñidas con 0,1% azul de anilina en 0,1M K_2HPO_4 durante dos horas o tratados sucesivamente con 5% de albúmina y anticuerpo anti calosa (1/1000) durante 2 h. Luego de lavadas, las secciones se trataron



con anticuerpo anti ratón conjugados al fluorescente Alexa 488, lavadas nuevamente y montadas para su observación en microscopio confocal.



RESULTADOS

a) Establecimiento de una población para el estudio de la autoincompatibilidad en *Nicotiana alata*

Identificación de los alelos de *S-RNasa* en la generación segregante F2 de la población UM de *Nicotiana alata*.

El objetivo de este ensayo fue obtener plantas F2 de genotipos S_{A2}/S_{A2} , S_{C10}/S_{C10} y S_{105}/S_{105} en el locus *S*, para contar de esta manera con una población en la cual fuese posible realizar cruzamientos enteramente compatibles e incompatibles. Las plantas F2 fueron originadas a partir de plantas F1 S_{A2}/S_{105} , S_{A2}/S_{C10} y S_{C10}/S_{105} autopolinizadas en estadíos inmaduros de desarrollo del botón floral, cuando los componentes de la maquinaria de autoincompatibilidad no están completamente expresados (McClure *et al.*, 1999). En estas condiciones, es posible obtener semillas por autofecundación (Raghavan, 1997). Siguiendo este procedimiento, se obtuvieron semillas F2 a partir de plantas con genotipos S_{A2}/S_{105} y S_{A2}/S_{C10} .

Para caracterizar los alelos de *S-RNasa* del locus *S*, se realizaron ensayos de PCR a partir de ADN genómico, utilizando oligonucleótidos basados en secuencias específicas de la región hipervariable de los alelos S_{A2} , S_{105} , y S_{C10} (Ioerger *et al.*, 1991). Las condiciones apropiadas para la amplificación fueron establecidas en plantas control F1 de genotipo conocido (figura 3). Los fragmentos amplificados confirmaron que los oligonucleótidos empleados son adecuados para el reconocimiento específico de cada alelo. El tamaño de cada producto fue consistente con el esperado en cada alelo, de acuerdo a la secuencia comprendida entre los pares de oligonucleótidos de cada alelo (412 pb para S_{A2} , 312 pb para S_{C10} y 199 pb para S_{105}).

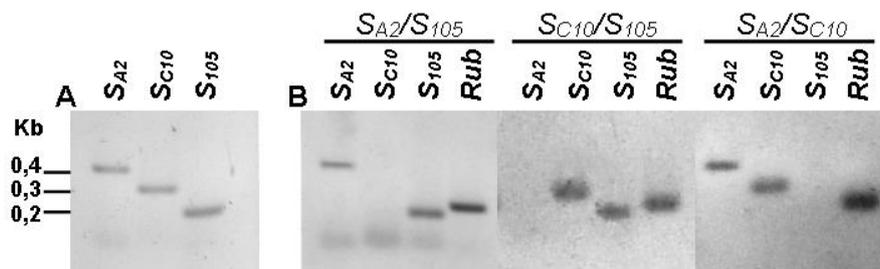


Figura 3: Especificidad para la amplificación por PCR de distintos alelos de *S-RNasa* del locus *S*. A, fragmentos amplificados por PCR de los alelos S_{A2} , S_{C10} y S_{105} . B, fragmentos amplificados por PCR para identificar los mismos alelos en plantas F1 de genotipos conocidos. *Rub*, fragmento amplificado a partir de la enzima Rubisco (ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa), utilizada como control positivo de PCR.



Plantas de la población F2 fueron analizadas para identificar los segregantes homocigotas (figura 4). Seis plantas exhibieron un único producto de amplificación, consistente con un genotipo homocigota para el alelo de *S-RNasa* S_{A2} (plantas 8, 9, 13, 15 y 16) y para el alelo S_{C10} (planta 1). Estos individuos presumiblemente homocigotas fueron seleccionados y crecidos con el objetivo de confirmar el genotipo a través de ensayos de polinización. Sin embargo, las plantas derivadas de la población UM exhibieron serios inconvenientes que dificultaron su mantenimiento: fase vegetativa persistente, floración escasa o ausencia de floración, flores con polen abortado, marchitamiento súbito (presumiblemente por asfixia de raíces), susceptibilidad al ataque de plagas, principalmente ácaros y mosca blanca. Estos problemas llevaron a descartar la población de plantas UM y buscar un nuevo material de trabajo para continuar con los estudios propuestos.

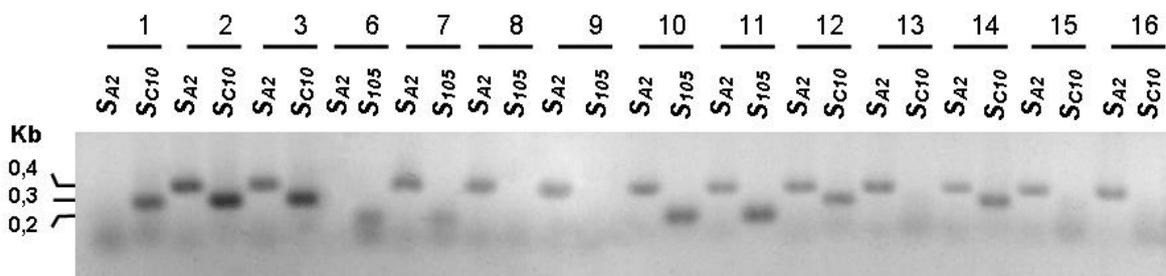


Figura 4: Determinación del genotipo en el locus *S* de plantas segregantes F2. Plantas F2, obtenidas por autofecundación del botón floral inmaduro de la generación F1, fueron ensayadas por PCR con oligonucleótidos correspondientes a los alelos presentes en los parentales. Se identificó un homocigota S_{C10}/S_{C10} (planta 1), homocigotas S_{A2}/S_{A2} (plantas 8, 9, 13, 15 y 16). El resto de las plantas son heterocigotas. El genotipo de las plantas 6 y 7 es S_{A2}/S_{A2} (resultado no mostrado). El genotipo de las plantas 4 y 5 aún no ha sido establecido.

Caracterización del fenotipo de autoincompatibilidad en una población natural de *Nicotiana alata*

Nicotiana alata es una especie propia de regiones subtropicales que crece como nativa en el Noreste de Argentina, y en zonas vecinas a esta región de Brasil, Paraguay y Uruguay. La planta se desarrolla en suelos pedregosos y húmedos, cerca de las orillas de los ríos (Cocucci & Hunziker, 2005; Goodspeed, 1954). Con el objetivo de coleccionar semillas y establecer una nueva población modelo para el estudio de la autoincompatibilidad, se realizó un viaje a Puerto Iguazú, Provincia de Misiones. Una población de *Nicotiana alata* fue encontrada a orillas del río Paraná, aproximadamente 200



mts al sur del Hito Argentino en la Ciudad de Puerto Iguazú. Las semillas colectadas fueron cultivadas en el invernáculo del IMBIV de la Ciudad Universitaria, Córdoba, exhibiendo un crecimiento vigoroso y rápida y abundante floración, por lo que resultó un material adecuado para la continuidad del trabajo. La población de plantas colectada en Misiones fue denominada NaM.

El fenotipo de autoincompatibilidad fue estudiado en ocho plantas de la población NaM que fueron autopolinizadas y cruzadas entre sí. Estas polinizaciones fueron analizadas por la formación de frutos y mediante la técnica de *style squash* que permite la observación de tubos polínicos migrando a través del estilo. Tanto las cruza como las autopolinizaciones exhibieron un alto número de tubos desarrollados en el estigma (figura 5). Sin embargo, sólo en los cruzamientos fue posible detectar tubos de polen alcanzando la zona del ovario, confirmando así la autoincompatibilidad de esta población. En todas las autopolinizaciones, los tubos de polen sólo crecieron hasta el primer tercio de la longitud total del pistilo. Los resultados generales de este ensayo se resumen en la Tabla I. La conclusión de este ensayo es que las 8 plantas ensayadas son autoincompatibles y que cada una de las plantas resulta compatible con las demás.

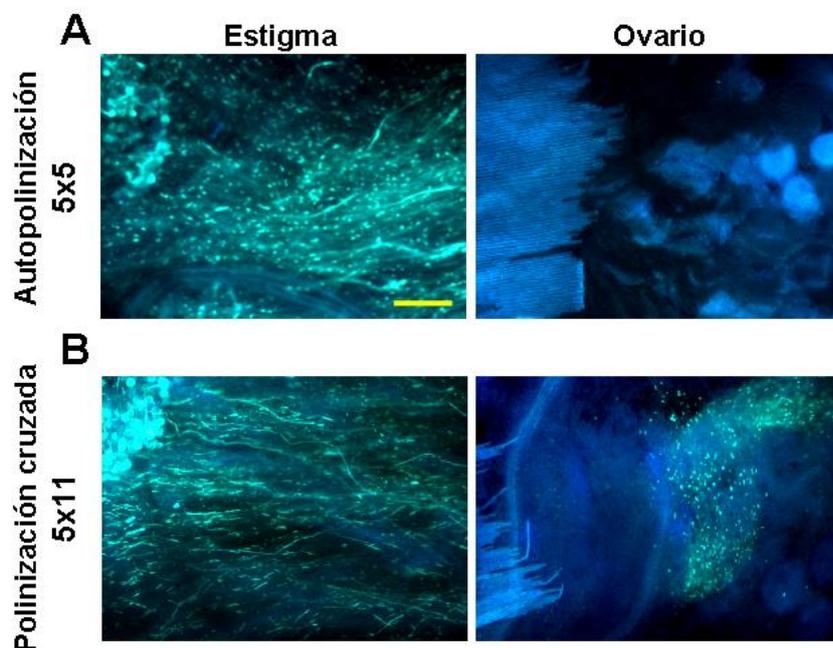


Figura 5: Penetración de tubos polínicos en plantas de la población NaM. Tubos polínicos de la planta 5 teñidos con azul de anilina (celeste) en el estigma y ovario de una autopolinización (A) y polinización cruzada (B). Esta tinción es representativa de todas las autopolinizaciones y los cruzamientos ensayados en 8 plantas de la población NaM. La barra representa 0,2 mm.



		Polen							
		1	2	4	5	7	8	10	11
Pistilo	1	I	C	C	C	C	C	C	C
	2	C	I	C	C	C	C	C	C
	4	C	C	I	C	C	C	C	C
	5	C	C	C	I	C	C	C	C
	7	C	C	C	C	I	C	C	C
	8	C	C	C	C	C	I	C	C
	10	C	C	C	C	C	C	I	C
	11	C	C	C	C	C	C	C	I

C, compatible; I, incompatible. La clasificación de cada combinación entre polen y pistilo se estableció en base a la migración de los tubos polínicos y a la formación de frutos.

Un examen preliminar para estudiar la identidad de los alelos de *S-RNasa* presentes en la población NaM fue realizado mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos basados en la secuencia de los alelos S_{A2} , S_{105} y S_{C10} . El resultado de este examen muestra que el alelo S_{C10} también está presente en la población NaM, siendo la planta 2 portadora de dicho alelo (figura 6).

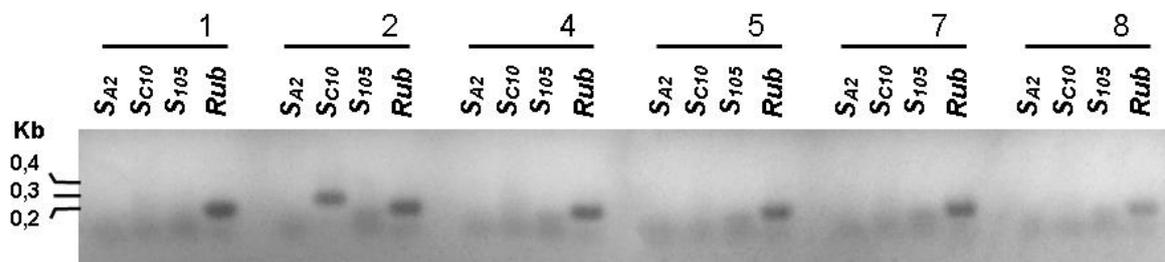


Figura 6: Análisis del genotipo en el locus *S* de una población natural de *Nicotiana glauca*. Plantas de la población NaM fueron ensayadas por PCR con oligonucleótidos correspondientes a los alelos S_{A2} , S_{C10} y S_{105} . La planta 2 es portadora del alelo S_{C10} .



b) Desarrollo de un sistema experimental para el estudio *in vitro* de la reacción de autoincompatibilidad en *Nicotiana alata*

Condiciones óptimas para el cultivo de polen

Para desarrollar un sistema experimental *in vitro* que permita estudiar el fenómeno del rechazo del polen en *Nicotiana alata* resultó necesario establecer en primer lugar las condiciones apropiadas para el cultivo del polen de esta especie. Para ello, se ensayó un medio de germinación con tres concentraciones de sacarosa diferentes y en distintas condiciones de temperatura y agitación. Los parámetros escogidos para evaluar los cultivos fueron el porcentaje de germinación de los granos de polen y la longitud y morfología de los tubos polínicos.

En general, la germinación del polen fue favorecida con el aumento de la concentración de sacarosa, una ligera agitación del cultivo (120 rpm) y temperatura de 24 °C (Tabla II).

	Sin agitación			Con agitación (120 rpm)		
	Temperatura (°C)					
	20	24	28	20	24	28
Sacarosa (%)						
2	43,0 ± 1,4	54,5 ± 4,9	48,0 ± 0,0	44,5 ± 3,5	54,5 ± 4,9	54,5 ± 3,5
5	48,5 ± 0,7	65,0 ± 5,7	57,5 ± 2,1	61,0 ± 2,8	71,0 ± 1,4	63,0 ± 1,4
10	53,5 ± 9,2	69,0 ± 5,7	62,0 ± 5,7	63,0 ± 0,0	80,0 ± 1,4	67,5 ± 4,9

* Los valores representan el promedio y la desviación estándar de 2 experimentos independientes.

Con respecto al desarrollo de los tubos polínicos, el medio conteniendo 5% de sacarosa, 24 °C de temperatura y con agitación fue el más adecuado para el crecimiento (figura 7). En cuanto a la morfología, los tubos polínicos incubados a 24°C mostraron puntas normales y abundante movimiento de vesículas en el citoplasma (figura 7 C). En cambio, a 20 y 28 °C hubo mayor frecuencia de anomalías caracterizadas por la presencia de puntas hinchadas, vesículas con movimiento lento o sin movimiento y formación de agregados en la región apical y subapical del tubo (figura 7 D y E). De acuerdo a estos resultados, las condiciones más efectivas para el cultivo de polen se verificaron en un

medio de germinación conteniendo 5% de sacarosa, a una temperatura de 24°C y con un suave movimiento de agitación. En estas condiciones, tras 20 horas de cultivo, el porcentaje de germinación fue superior al 70% (Tabla II), la longitud promedio de los tubos polínicos alcanzó 708 μm y la mayoría de los tubos presentaban rasgos morfológicos normales y el característico movimiento de vesículas en la región apical y subapical (figuras 7 B y C). Estas condiciones fueron utilizadas para cultivar polen en presencia de extracto de pistilos y para estudiar la marcación de membranas en presencia del fluorescente FM4-64FX.

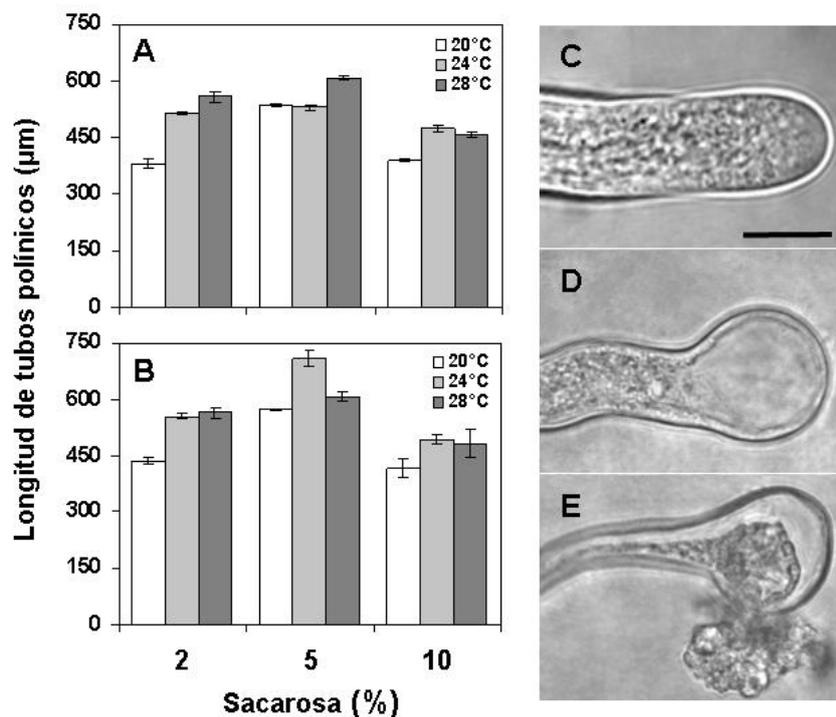


Figura 7: Condiciones óptimas de cultivo de polen de *Nicotiana alata*. La longitud de tubos polínicos fue medida en cultivos sin agitación (A), con agitación (B). Tubos polínicos de morfología normal cultivados a 24°C (C). Anomalías morfológicas más frecuentes en tubos polínicos cultivados a 20 y 28°C (D y E)

Cultivos en presencia de pistilos incompatibles muestran un efecto inhibitorio en el crecimiento

Para averiguar si el mecanismo de rechazo del polen en *Nicotiana alata* se manifiesta en tubos polínicos cultivados *in vitro*, polen proveniente de plantas de la población NaM fue cultivado en presencia de extractos de pistilos propios o de pistilos de otras plantas de la población en estudio. La disminución del crecimiento del polen fue



variable en los diferentes extractos de pistilo ensayados (figura 8 A-D). En polen proveniente de las plantas 8 y 5 (figura 8 A y B), el menor crecimiento se registró en presencia de pistilos de la misma planta. La disminución del crecimiento en presencia de pistilos propios osciló entre un 22% (8x8 vs 8x5) hasta un 81% (5x5 vs 5x2). En otras 2 muestras ensayadas (plantas 4 y 11), la longitud del polen desafiado con pistilos propios fue menor o similar a la longitud alcanzada en presencia de pistilos compatibles (figura 8 C y D).

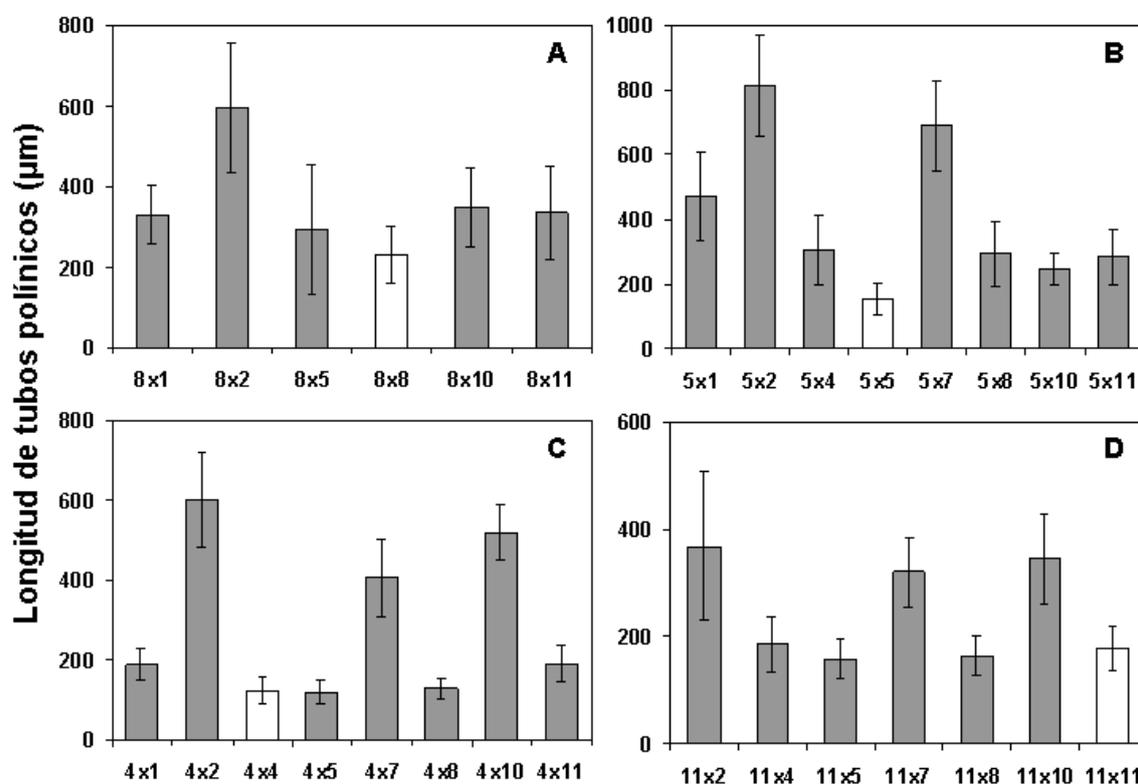


Figura 8: Crecimiento de tubos polínicos en presencia de extractos compatibles e incompatibles. Tubos polínicos de las plantas 8 (A), 5 (B), 4 (C) y 11 (D) fueron cultivados *in vitro* por 24 h en medio de germinación con el agregado de extracto de pistilo (250 µg peso fresco/µl) compatible (barras grises) e incompatible (barras blancas). Las barras representan el valor medio y la desviación estándar de la medición de 100 tubos polínicos.

La hipótesis de un efecto de autoincompatibilidad en el polen cultivado *in vitro* se estudió con más detalle utilizando polen de las plantas 8 y 5. En general, el agregado de los extractos de pistilos en el medio de cultivo produjo un retardo en el crecimiento de los tubos polínicos (figura 9). El crecimiento de tubos polínicos en presencia de extractos compatibles duplicó al alcanzado en presencia de extractos incompatibles.

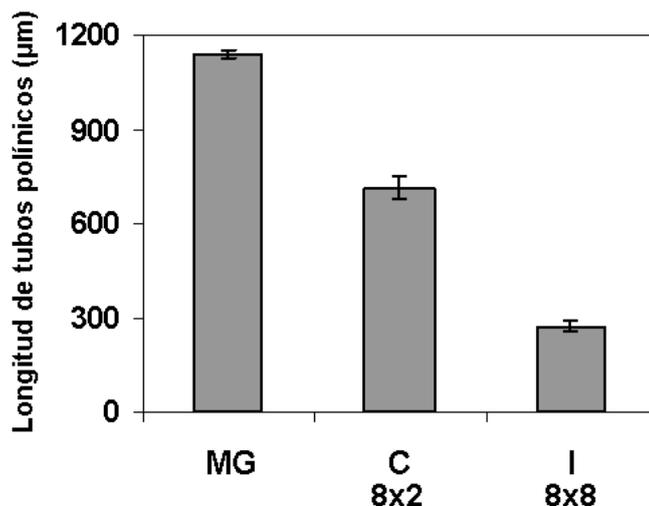


Figura 9: Efecto de extractos de pistilo en el crecimiento de tubos polínicos de *Nicotiana alata*. Tubos polínicos de la planta 8 fueron cultivados 24 h *in vitro*, en medio de germinación (MG), o en medio de germinación con el agregado de extracto de pistilo de la planta compatible 2 (C) o extracto de pistilo propio (I). Las barras representan las medias con la correspondiente desviación estándar de 3 o más experimentos. El extracto de pistilo (250 µg peso fresco/µl) se realizó en medio MG.

Cultivos realizados por tiempos más cortos muestran que el efecto de rechazo sobre el polen incompatible se manifiesta después de las 2 h de cultivo, siendo evidente a las 4 h donde el crecimiento del polen incompatible alcanza aproximadamente un 50 % respecto del compatible, similar a lo observado a 24 h (figura 10 A y B).

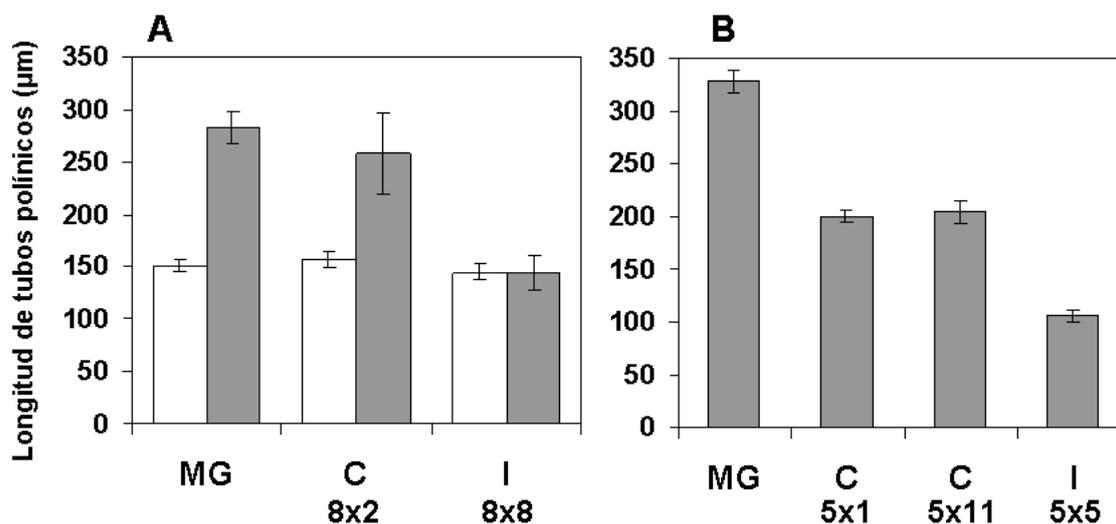


Figura 10: Efecto de extractos de pistilo en el crecimiento de tubos polínicos de *Nicotiana alata*. Tubos polínicos de la planta 8 (A) y la planta 5 (B) fueron cultivados *in vitro* durante 2 h (barras blancas) o 4 h (barras grises), en medio de germinación (MG) o en medio de germinación con el agregado de extracto de pistilo de plantas compatibles (C) o extracto de pistilo propio (I). Las barras representan las medias con la correspondiente desviación estándar de 2 o más experimentos. El extracto de pistilo (250 µg peso fresco/µl) se realizó en medio MG.



La vitalidad de los tubos polínicos se evaluó a 2 y 4 h de iniciado el cultivo, en base al movimiento vesicular observado en la zona apical y subapical del tubo. Los tubos fueron agrupados según exhibieran un tráfico normal de vesículas, tráfico restringido o ausencia de movimiento. A las 2 hs de cultivo, la mayoría de los tubos polínicos desafiados con extractos compatibles o incompatibles exhibían movimiento vesicular (figura 11 A). Sin embargo, en los cultivos en presencia de extracto compatible, el 80% de los tubos presentaba alta movilidad vesicular, propia de los tubos polínicos normales, en activo crecimiento. En contraste, en el medio de cultivo con extracto incompatible el 50% de los tubos polínicos presentaba un movimiento vesicular restringido y solo alrededor del 30% exhibía alto movimiento vesicular. Esta diferencia en el crecimiento de los tubos polínicos se acentuó a las 4 h de cultivo, donde menos del 8% de los tubos desafiados con el extracto incompatible presentaba movilidad normal de vesículas y el 70% mostraba ausencia total de movimiento (figura 11 B). La falta de movimiento fue acompañada de una alta frecuencia de tubos con puntas hinchadas y con presencia de agregados en la región apical y subapical (figura 12 B y C), lo que sugiere que los tubos incompatibles son rechazados en un proceso que culmina con la muerte celular. La tinción con el colorante Evans Blue, que se acumula en células muertas, revela también el fenómeno de muerte celular en los cultivos en presencia de extractos incompatibles (figura 13).

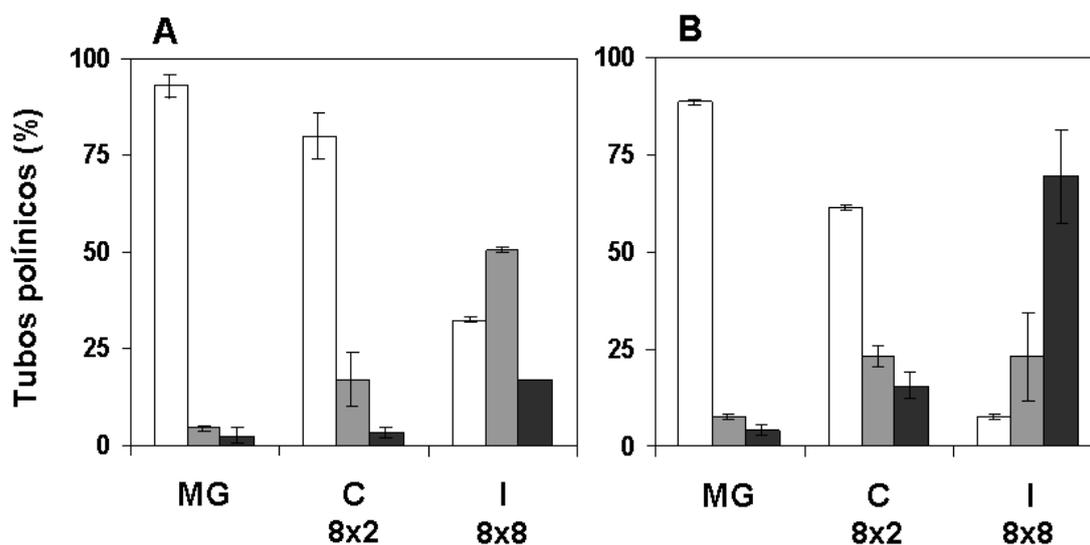


Figura 11: Vitalidad de tubos polínicos crecidos en presencia de extractos de pistilo. Tubos polínicos de la planta 8 fueron cultivados *in vitro* por 2 h (A) y 4 h (B), en medio de germinación (MG) o en MG con el agregado de extracto de pistilo (250 μ g peso fresco/ μ l) de la planta compatible 2 (C) o de pistilo de la planta 8 (I). 150 o más tubos polínicos fueron clasificados de acuerdo a la movilidad de vesículas en el extremo apical. Barras blancas, alta movilidad; barras grises movilidad restringida; barras negras, ausencia de movilidad.



Figura 12: Morfología de tubos polínicos cultivados en presencia de extractos de pistilo. Los tubos polínicos cultivados con extractos de pistilo (250 μg peso fresco/ μl) fueron clasificados de acuerdo a la morfología y el movimiento vesicular. A, tubos normales con alta movilidad de vesicular; B, tubos con anomalías morfológicas y movilidad vesicular restringida; C, tubos muertos con ausencia de movilidad vesicular y agregados en el citoplasma. La barra representa 10 μm .

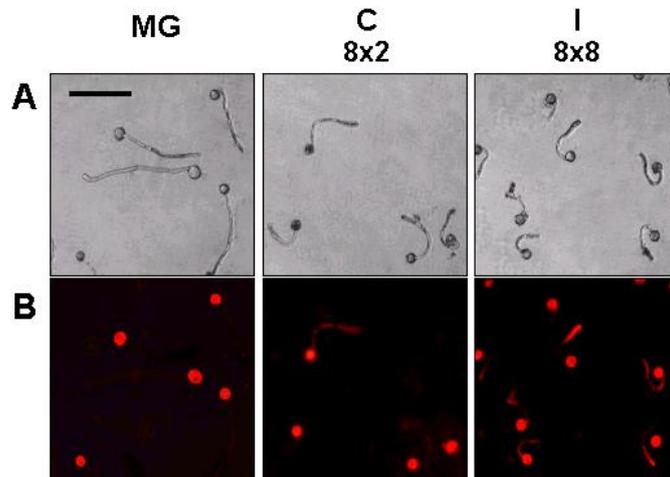


Figura 13: Vitalidad de tubos polínicos crecidos en presencia de extractos de pistilo. Tubos polínicos de la planta 8 fueron cultivados *in vitro* en medio de germinación (MG) o en MG con el agregado de extracto de pistilo (250 μg peso fresco/ μl) de la planta compatible 2 (C) o de pistilo de la planta 8 (I). A las 4 h de cultivo se agregó 0,05% Evans Blue durante 15 min. Los cultivos fueron lavados por centrifugación y observados en microscopio de fluorescencia con filtro para rodamina (543 nm). A, contraste de fase; B, fluorescencia. La barra representa 0,02 mm.

Utilizando el marcador de endocitosis fluorescente FM4-64FX (Bolte *et al.*, 2004) se estudió el patrón de marcación de membranas en tubos polínicos cultivados en presencia de extractos de pistilos. En presencia de extractos incompatibles, los tubos polínicos con escaso movimiento vesicular carecían de la “zona clara” y mostraban fuerte de acumulación de fluorescencia en zonas vecinas a la membrana celular (figura 14 A). En los tubos sin movimiento vesicular, la fluorescencia se acumuló masivamente en el citoplasma (figura 14 B). Estas alteraciones no se observaron en tubos polínicos que, aún en presencia de extracto incompatible, exhibían un movimiento vesicular normal (aproximadamente 5 % de los tubos figura 14 C) y eran similares en aspecto a los tubos polínicos cultivados en ausencia de extracto (ver más adelante figura 16 G). Los cambios respecto del patrón

normal de marcación sugieren que los tubos polínicos en presencia de extractos incompatibles, sufren una alteración del proceso endocítico que afecta el flujo normal de vesículas.

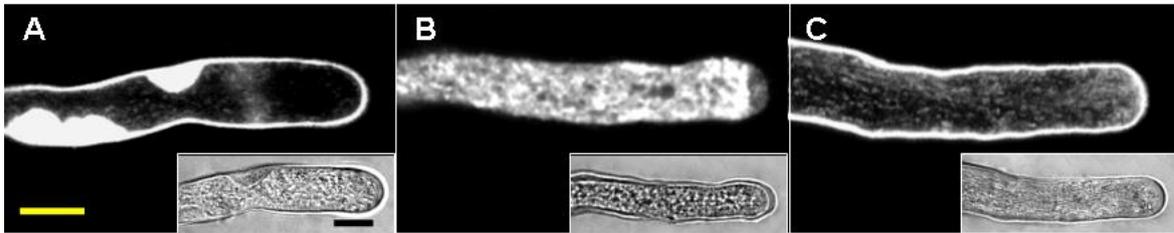


Figura 14: Alteración del tráfico de membranas en tubos polínicos cultivados con extractos de pistilo incompatible. Tubos polínicos de la planta 8 fueron cultivados 4 h en medio de germinación con extracto de pistilo incompatible. A, tubos polínicos con movimiento vesicular restringido; B, tubos polínicos sin movimiento vesicular; C tubos polínicos con movimiento normal de vesículas. El marcador endocítico FM4-64FX se agregó a las 2 h de iniciado el cultivo a concentración 12 μ M. La imagen en contraste de fase se muestra en el ángulo inferior derecho. Las barras representan 10 μ m.

Si bien el menor crecimiento del polen en presencia de extractos incompatibles se manifestó en la mayoría de las combinaciones polen-pistilo ensayadas, en algunos casos fue menos notable o bien el efecto no se manifestó (figura 8 C y D). Un caso particular fue el polen de la planta 2 cuya longitud en presencia de extractos de pistilos propios fue igual o mayor que la alcanzada frente a pistilos provenientes de otras plantas (figura 15).

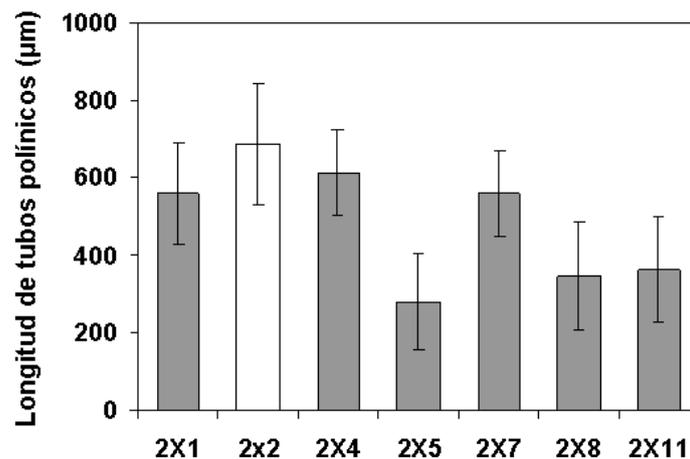


Figura 15: Crecimiento de tubos polínicos en presencia de extractos compatibles e incompatibles. Tubos polínicos de la planta 2 fueron cultivados *in vitro* por 24 h en medio de germinación con el agregado de extracto de pistilo (250 μ g peso fresco/ μ l) compatible (barras grises) e incompatible (barra blanca). Las barras representan el valor medio y la desviación estándar de la medición de 100 tubos polínicos.



c) Dinámica de la marcación de endomembranas tubos polínicos de *Nicotiana alata*

Marcación de tubos polínicos cultivados *in vitro*

Los tubos polínicos son células de rápido crecimiento que exhiben de manera característica un activo tráfico de endomembranas. Recientes experimentos en los que se ha demostrado la compartimentalización de S-RNAsas en vacuolas (Goldraj *et al.*, 2006) sugieren la importancia de la ruta endocítica en el sistema de autoincompatibilidad en *Nicotiana alata*. Como etapa previa a estudios de colocalización entre S-RNasa y el sistema de endomembranas, se utilizó el marcador de endocitosis fluorescente FM 4-64FX (FM) para estudiar la dinámica de marcación de membranas en tubos polínicos cultivados *in vitro*. El fluorescente agregado al medio de cultivo se asoció rápidamente con la membrana plasmática del tubo polínico, primeramente en la región subapical (figura 16 A) y luego en la región apical (figura 16 B), delimitando los bordes del tubo polínico. Entre los 6 y 10 min comenzó la internalización del fluorescente al interior del citoplasma, manifestándose como pequeños puntos discretos en la región subapical (figura 16 C). A partir de los 15 min el fluorescente comenzó a acumularse en el citoplasma de la región apical, siendo evidente a los 30 min una marcación muy intensa en forma de V invertida en la punta del tubo polínico (figura 16 D). Esta marca es coincidente con la región denominada “zona clara”, enriquecida en vesículas menores de 0,2 μm , cuya función es transportar materiales para la síntesis de membrana y pared celular del tubo polínico (Lancelle & Hepler, 1992). La zona clara del tubo polínico permaneció marcada al menos hasta 3 hs después de la incubación con el fluorescente (figura 16 E).

El patrón de marcación se estudió también a tiempos largos; entre 18 y 45 hs el fluorescente se acumuló en el citoplasma, en zonas más alejadas de la región subapical, en estructuras discretas de mayor tamaño (figura 16 F). La localización, el tamaño y el momento en que se hacen evidentes, sugieren que estos compartimentos representan cuerpos multivesiculares o vacuolas (Parton *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005). En la figura 16 G se destaca una proyección en los ejes x-z e y-z de la zona clara de un tubo polínico marcado con FM4-64FX.

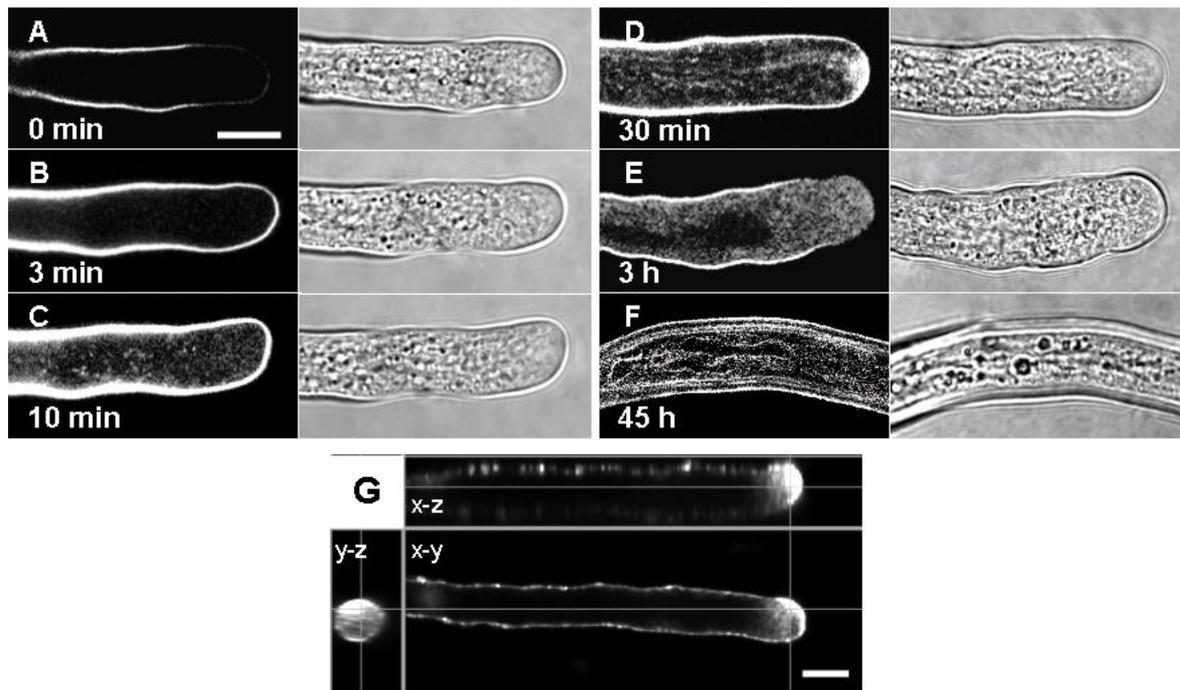


Figura 16: Dinámica de marcación de membranas en tubos polínicos de *Nicotiana alata* cultivados *in vitro*. Los tubos polínicos fueron cultivados durante 2 hs antes del agregado del fluorescente FM4-64 FX. La dinámica de marcación se estudió a partir de la detección de la fluorescencia (A) durante los tiempos indicados (B-G). (E), proyección de 15 secciones ópticas de 0,86 μm . En los márgenes se muestra la proyección de las secciones en los ejes y-z y x-z. Las barras representan 10 μm .

Diseño experimental para el estudio del tráfico de membranas *in planta*

Una estrategia experimental fue ensayada para estudiar la ruta endocítica en tubos polínicos en tránsito a través del estilo. Los tubos polínicos cultivados *in vitro* y marcados con el fluorescente FM4-64FX pueden utilizarse para polinizar pistilos, directamente en la planta o en flores aisladas de la planta. Este experimento permitiría visualizar el tráfico de membranas en el interior de tubos polínicos compatibles e incompatibles a medida que éstos migran a través del estilo. Antes de llevar a cabo este experimento, se realizaron una serie de ensayos preliminares. En primer lugar, y a los fines de ensayar la persistencia de la fluorescencia en el polen germinado, los tubos polínicos cultivados en presencia del marcador FM4-64FX, fueron centrifugados, lavados y cultivados nuevamente en ausencia del fluorescente. La localización de la marca fue seguida a intervalos de 1 h. En consistencia con el experimento de la figura 16, inicialmente la fluorescencia se localizó en la membrana celular del tubo polínico. Esta marcación se desplazó progresivamente hacia el interior del citoplasma y fue claramente detectable al menos hasta 6 hs posteriores al cultivo en ausencia de fluorescente (figura 17). Este resultado sugiere que, al menos



durante 6 hs, es posible estudiar la evolución de la fluorescencia en el interior de un tubo polínico viajando a través del estilo.

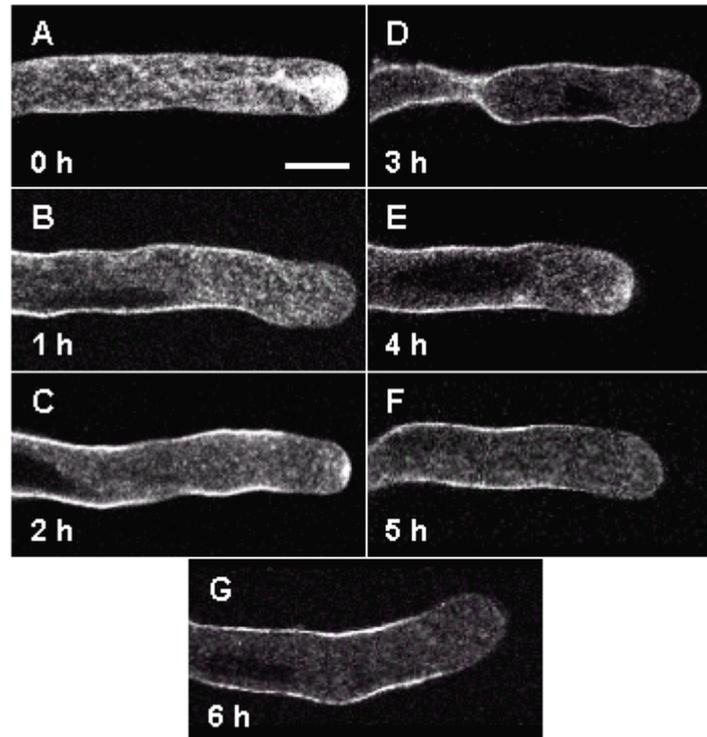


Figura 17: Dinámica de marcación de membranas en tubos polínicos de *Nicotiana alata* cultivados *in vitro*. Tubos polínicos cultivados durante 2 hs en presencia del fluorescente FM4-64 FX fueron centrifugados, lavados y cultivados nuevamente por distintos tiempos en ausencia del fluorescente (A-G). La barra representa 10 μ m.

En otro experimento preliminar, se evaluó la posibilidad de polinizar una flor con tubos polínicos pregerminados. Para este ensayo se utilizó inicialmente polen de la especie autocompatible *Nicotiana tabacum*, por ser más robusto y más fácil de manipular que el polen de *Nicotiana alata*. Flores de tabaco fueron polinizadas con una preparación concentrada de tubos polínicos cultivados por 6 horas. Una masa abundante de tubos progresó a través del estilo y alcanzó el ovario (figura 18 A). Sin embargo, el mismo procedimiento llevado a cabo en *Nicotiana alata*, empleando una combinación compatible de polen y pistilo, mostró muy escaso desarrollo de tubos polínicos germinados *in vitro* a través del estilo. En este caso, solo se detectaron algunos tubos aislados, en la región cercana al estigma y estilo (figura 18 B).

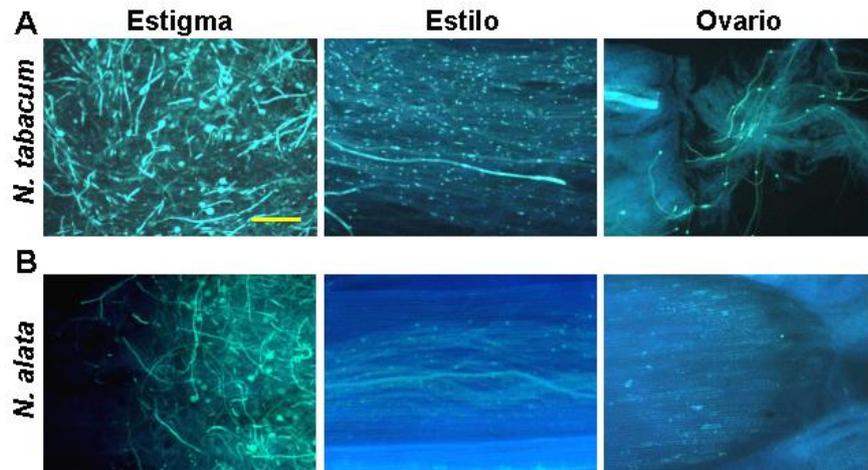


Figura 18: Penetración de tubos polínicos pregerminados en estilos de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana glauca*. Los tubos polínicos fueron cultivados 6 h, centrifugados y recuperados en una suspensión que fue empleada para polinizar las flores. La migración de los tubos polínicos fue analizada 48 h luego de la polinización mediante tinción con azul de anilina (celeste). La barra representa 0,2 mm.

De acuerdo a estos resultados, un experimento para estudiar la vía endocítica en tubos polínicos migrando a través del estilo se llevó a cabo utilizando flores de *Nicotiana glauca*. Pistilos polinizados con tubos polínicos marcados con FM4-64FX fueron procesados mediante la técnica de “*style squash*” y observados mediante microscopía de fluorescencia. Los tubos polínicos fueron identificados por tinción de la pared celular de calosa con azul de anilina (figura 19 A). El fluorescente FM4-64FX fue detectado en el borde de los tubos polínicos, siendo esta tinción parcialmente coincidente con el azul de anilina. FM4-64FX fue también visualizado en el interior del tubo polínico. Esta marca resultó ser específica ya que no fue detectada en experimentos control realizados con pistilos de tabaco polinizados y no polinizados (figura 19 B).

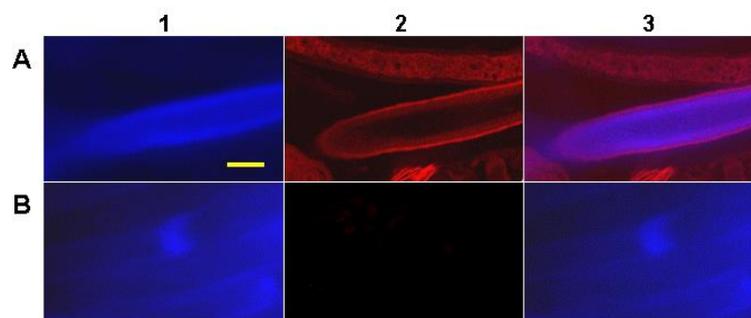


Figura 19: Tubos polínicos de *Nicotiana glauca* pregerminados en presencia de FM4-64FX. Los tubos polínicos fueron cultivados 6 h, centrifugados y recuperados en una suspensión que fue empleada para polinizar las flores. Los pistilos fueron procesados mediante la técnica de “*style squash*”. A, tubos polínicos pregerminados en presencia de FM4-64FX. B, tubos polínicos pregerminados en ausencia de FM4-64FX (control). 1, fluorescencia en el canal de DAPI (408 nm); 2, fluorescencia en el canal de rodamina (543 nm); 3, superposición de 1 y 2. La barra representa 10 μ m.



A partir de estos resultados, se realizó un experimento similar al anterior pero procurando conservar la integridad del tejido para observar con mayor detalle la marcación con FM4-64FX. Los pistilos polinizados fueron fijados en formaldehído, embebidos en parafina y cortados en secciones de 10 μm . Las secciones fueron luego desparafinadas e incubadas con un anticuerpo anti calosa para la visualización de los tubos polínicos. Sin embargo, en estas condiciones no fue posible detectar la marca del fluorescente (figura 20), la cual resultó posiblemente removida durante la remoción de la parafina, previo a la inmunocitoquímica.

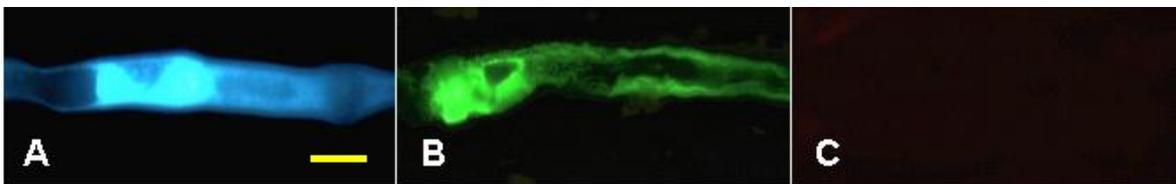


Figura 20: Tubos polínicos de *Nicotiana tabacum* pregerminados en presencia de FM4-64FX. Los tubos polínicos fueron cultivados 6 h, centrifugados y recuperados en una suspensión que fue empleada para polinizar las flores. Las tinciones se llevaron a cabo sobre secciones de pistilo de 10 μm A, tubos polínicos teñidos con azul de anilina. B, tubos polínicos detectados con anticuerpo contra calosa. C, FM4-64FX. La barra representa 10 μm .



DISCUSIÓN y PERSPECTIVAS

Establecimiento de una población de *Nicotiana alata* para el estudio del fenómeno de autoincompatibilidad

La estructura primaria de la molécula de S-RNasa presenta 5 dominios conservados (C1-C5) y dos dominios hipervariables (Hva y Hvb) situadas entre los dominios C2 y C3 (Ioerger *et al.*, 1991). Los dominios Hva y Hvb confieren la especificidad de cada alelo y la capacidad para el reconocimiento del polen, fundamento del fenómeno de autoincompatibilidad. La especificidad de estos dominios permiten la caracterización por PCR de los alelos de *S-RNasa* del locus *S*. Empleando esta técnica se logró identificar individuos homocigotas en la generación F2 de la población UM (figura 4). Para la caracterización definitiva del locus *S* es necesario realizar también ensayos de polinización que permitan conocer el fenotipo del polen y cotejar estos resultados con el análisis del genotipo por PCR. Debido a la escasa capacidad de adaptación de las plantas F1 y F2 de la población UM, aún en condiciones apropiadas para el crecimiento (suelos bien drenados, alta temperatura y humedad) el fenotipo del polen no pudo ser determinado en ensayos de polinización y la población tuvo que ser descartada.

Para poder continuar con los estudios propuestos, se realizó un viaje a la Ciudad de Puerto Iguazú en donde se recolectaron plantas de una población natural de *Nicotiana alata*. Por su crecimiento vigoroso y la rápida y abundante floración esta población constituye un excelente material para continuar el proyecto. Mediante ensayos de polinización efectuado sobre 8 plantas NaM, se determinó el fenotipo del polen en los distintos cruzamientos y autopolinizaciones (figura 5). Considerando que las plantas autoincompatibles son siempre heterocigotas en el locus *S*, esto supone la presencia de al menos 5 alelos diferentes presentes en las 8 plantas analizadas de la población NaM. Un ensayo genotípico preliminar del locus *S* muestra que el alelo de S_{C10} está presente en la planta 2. La caracterización genotípica del locus *S* de las 8 plantas en estudio se continuará mediante PCR, utilizando oligonucleótidos basados en las regiones conservadas C2 y C5 de las *S-RNAsas*. Los fragmentos amplificados incluirán las regiones hipervariables que definen la identidad de los alelos.



Estudio del efecto de autoincompatibilidad en polen de *Nicotiana alata* cultivado *in vitro*

La reproducción *in vitro* del efecto de autoincompatibilidad permitiría un estudio detallado a nivel celular y molecular de los fenómenos que ocurren en tubos polínicos compatibles e incompatibles. Por ejemplo en Papaveráceas, el cultivo *in vitro* de polen en presencia del factor de reconocimiento femenino del locus *S* reveló que el mecanismo de rechazo del polen procede por muerte celular programada (Thomas & Franklin-Tong, 2004). En Escrofulariáceas, donde el rechazo del polen también depende de la S-RNasa, el cultivo de polen en presencia de un extracto incompatible de pistilos produjo una disminución notable del tamaño del tubo polínico. Esta disminución del crecimiento resultó ser dependiente de la presencia de S-RNasa en el extracto (Qiao *et al.*, 2004). En *Nicotiana alata* los intentos de definir un sistema *in vitro* de autoincompatibilidad no reflejaron de manera consistente el rechazo del polen (Jahnen *et al.*, 1989). Sin embargo estos experimentos fueron llevados a cabo con S-RNasas extensivamente purificadas y no con extractos totales de pistilo, por lo que los factores no ligados al locus *S*, indispensables para la manifestación del rechazo (McClure y Franklin-Tong, 2006), no estaban incluidos en el medio de cultivo. Estos antecedentes alentaron la búsqueda de un sistema *in vitro* en *Nicotiana alata* capaz de manifestar el fenómeno de autoincompatibilidad.

En experimentos llevados a cabo con polen de las plantas 8 y 5 y pistilos de varias plantas de la población NaM, el efecto de rechazo del polen en presencia de extractos incompatibles fue evidente. Este rechazo se manifestó en la menor longitud (figuras 8, 9 y 10) y la detención del crecimiento y muerte (figura 11 A y B) del polen incompatible. La diferencia en el crecimiento del polen sugiere que el pistilo es capaz de reconocer el polen propio. Sin embargo en muchas combinaciones polen-pistilo compatibles, la longitud de los tubos polínicos cultivados resultó similar a la alcanzada por el polen incompatible (figura 8 C y D). Un caso particular fue el polen de la planta 2 cuyo desarrollo en presencia de pistilos incompatibles resultó mayor que el desarrollo alcanzado en varias polinizaciones compatibles (figura 8 A-D y figura 15).

A partir de estos resultados, no podemos afirmar concluyentemente que hay un efecto de rechazo del polen cultivado en presencia de pistilos incompatibles. Es posible que el efecto se manifieste en el polen cultivado con menor eficiencia que en la planta. El promedio de la longitud de los tubos polínicos incompatibles en la figura 8 es 168 μm . Resulta significativo que el 80% de los cruzamientos compatibles resultó de una longitud promedio significativamente mayor a dicho valor; en el 12% de las cruza compatibles la



longitud fue similar y sólo el 8 % registró un valor de longitud menor ($P < 0,01$, figura 8) . En este análisis se excluyó la planta 2 por presentar un comportamiento notoriamente diferente del resto de las plantas analizadas (figura 15).

Resulta necesario para la continuación de este estudio conocer los haplotipos del locus *S* de las plantas NaM. Dado que la eficiencia en el rechazo del polen es diferente en cada uno de los haplotipos, y también que algunos cruzamientos catalogados como compatibles pueden ser semicompatibles, el conocimiento de los haplotipos ayudará a interpretar los resultados obtenidos. Igualmente, resulta importante comparar la vitalidad de tubos polínicos compatibles e incompatibles de longitud similar. Es posible que los primeros manifiesten un retardo en el crecimiento pero tengan una sobrevivencia mayor que los tubos polínicos incompatibles.

Tráfico de endomembranas en tubos polínicos cultivados

La ruta de acceso al tubo polínico de S-RNasa y de los factores no ligados al locus *S* es probablemente la vía endocítica (McClure, 2006). S-RNasa ingresaría al tubo polínico en el interior de vesículas, separada del citoplasma para evitar la degradación del ARN del polen. En *Nicotiana alata*, tanto en cruzamientos compatibles como incompatibles, la S-RNasa se localiza en la vacuola del tubo polínico al menos hasta las 16 h posteriores a la polinización. Transcurridas 36 h luego de la polinización, la vacuola conserva su integridad en los cruzamientos compatibles, con la S-RNasa en su interior. En contraste, en tubos polínicos incompatibles, la vacuola aparece desorganizada, con la S-RNasa dispersa ocupando todo el citoplasma del tubo polínico (Goldraj *et al.*, 2006).

En base a éstos antecedentes, se realizaron una serie de experimentos para estudiar la marcación de membranas en tubos polínicos de *Nicotiana alata* con un marcador fluorescente de la vía endocítica (Bolte *et al.*, 2004) en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

En los tubos polínicos cultivados de *Nicotiana alata*, la dinámica de incorporación del fluorescente y su distribución en el interior del tubo (figura 16) fue similar a la exhibida por tubos polínicos de *Lilium* (Parton *et al.*, 2001) y *Picea* (Wang *et al.*, 2005). Entre 24 y 48 hs posteriores a la incubación con FM4-64FX, la fluorescencia fue detectada en compartimentos grandes, posiblemente vacuolas (Parton *et al.*, 2001).

El marcador FM4-64FX fue utilizado para observar el tráfico de membranas en tubos polínicos creciendo en presencia de extractos de pistilo incompatible (figura 14).



Aquellos tubos con movimiento restringido de vesículas mostraron cambios en el patrón normal de marcación del fluorescente. Este resultado sugiere una alteración del proceso endocítico y exocítico, paralela a la disminución del crecimiento del tubo. Los cambios más notables fueron la acumulación de fluorescencia en “sacos” en la región subapical y la ausencia de la “zona clara” en la región apical. Posiblemente las zonas de acumulación del fluorescente representan agregados de vesículas, fenómeno frecuentemente observado en tubos polínicos con alteraciones morfológicas o muertos. La ausencia de la zona clara es consistente con la disminución del crecimiento; esta región del ápice del tubo está enriquecida en vesículas exocíticas que transportan el material de membrana y pared celular para soportar el activo crecimiento del tubo (Cheung & Wu, 2007).

Estos resultados sugieren la posibilidad de realizar experimentos *in vitro* para estudiar el rechazo del polen. Por un lado, ensayos de inmunocitoquímica para estudiar la colocalización de la ruta endocítica con S-RNasa en tubos polínicos compatibles e incompatibles, podrían contribuir a establecer el momento y la forma en que la vacuola libera la S-RNasa para llevar a cabo el rechazo del polen. Por otro lado, dado que el rechazo del polen no es inmediato, el seguimiento *in vivo* de un tubo polínico marcado con el fluorescente FM4-64FX podría reflejar la evolución de los cambios operados a nivel celular en un tubo polínico incompatible.

Para obtener imágenes *in planta* del tráfico de membranas en el interior de tubos polínicos creciendo a través del estilo, tubos polínicos pregerminados en presencia de FM4-64FX se utilizaron para polinizar pistilos de tabaco. Nuestro diseño experimental permitió detectar el fluorescente en pistilos enteros (figura 19) pero no en microsecciones de pistilo (figura 20). Posiblemente el proceso de parafinación y/o deparafinación alteró o removió el fluorescente. En cualquier caso, los tubos polínicos pregerminados de *Nicotiana alata* no muestran la misma habilidad que los de *Nicotiana tabacum* para penetrar en el estilo (figura 18), por lo que en principio, no sería posible mediante esta técnica comparar las diferencias en el tráfico de membranas *in planta* entre tubos polínicos compatibles e incompatibles.



BIBLIOGRAFÍA

- Ando T, Ishikawa N, Watanabe H, Kokubun H, Yanagisawa Y, Hashimoto G, Marchest E, Suarez E (2005) *A morphological study of the Petunia integrifolia Complex (Solanaceae)*. Annals of Botany. 96:887-900.
- Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read. D. (2004) *FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells*. Journal of Microscopy 214:159-173.
- Cheung A, Wu H (2007) *Structural and functional compartmentalization in pollen tubes*. Journal of Experimental Botany. 58:75-82.
- Coccuci A, Hunziker A (2005) *Flora fanerogámica Argentina*. Fascículo 89. 256. Solanaceae, parte 15. Subtribu VIIa. Nicotianinae, parte B.
- Cruz-Garcia F, Hancock CN, McClure B. (2003) *S-RNase complexes and pollen rejection*. Journal of Experimental Botany 54:123-130.
- Dellaporta S, Wood J, Hicks J (1983) *A plant DNA miniprep: version II*. Plant Mol Biol Repr. 1:19-21.
- de Nettancourt D (2001) *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag 322 pp, 2nd ed.
- Fujimoto R, Okazaki K, Fukai E, Kusaba M, Nishio t (2006) *Comparison of the Genome Structure of the Self-Incompatibility (S) Locus in Interspecific Pairs of S Haplotypes*. Genetics. 173:1157–1167.
- Gaudet T, McCormick S (1999) *Signaling in pollen-pistil interactions*. CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY. 10:139-147.
- Goldraij A, Kondo K, Lee C, Hancock N, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips T, Cruz-Garcia F, McClure B (2006) *Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible Nicotiana*. Nature 439:805-810.
- Goodspeed T (1954) *The genus Nicotiana*. Chronica botanica company, Waltham, massachussets, pp. 1-36.
- Hancock C, Kent L, McClure B (2005) *The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in Nicotiana*. The Plant Journal. 43:716-723.
- Hua Z, Kao TH (2006) *Identification and Characterization of Components of a Putative Petunia S-locus F-Box-Containing E3 Ligase Complex Involved in S-Rnase-Based Self-Incompatibility* Plant Cell 18:2531-2553.
- Ioerger T, Gohlke J, Xu B, Kao T (1991) *Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae*. Sex Plant Reprod. 4:81-87.
- Jahnen W, Lush W, Clarke A (1989) *Inhibition of in Vitro Pollen Tube Growth by Isolated S-Glycoproteins of Nicotiana alata*. The Plant Cell. 1:501-551.
- Kao TH, Tsukamoto T (2004) *The Molecular and Genetic Bases of S-RNase-Based Self-Incompatibility*. The Plant Cell. 16, S72-S83.
- Lancelle S, Hepler P (1992) *Ultrastructure of freeze-substituted pollen tubes of Lilium longitlorum* Protoplasma. 167:215-230.



- Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M (2000) *S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility*. Nature. 407:649-651.
- McClure B, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R (1999) *A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in nicotiana*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 96. 13548-13553.
- McClure B, Frankling-Tong V (2006) *Gametophytic self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition*. Planta. 226:233-245.
- McClure B (2006) *News views of S-Rnase-based self-incompatibility*. Current Opinion in Plant Biology. 9:639-646.
- Newbigin E, Uyenoyama M (2005) *The evolutionary dynamics of self-incompatibility systems*. TRENDS in Genetics. 21:500-505.
- Parton R, Fischer-Parton S, Watahiki M, Trewavas A (2001) *Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes*. Journal of Cell Science. 114: 2685-2695.
- Qiao H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y, Xue Y (2004) *The F-Box Protein AhSLF-S2 Physically Interacts with S-RNases That May Be Inhibited by the Ubiquitin/26S Proteasome Pathway of Protein Degradation during Compatible Pollination in Antirrhinum*. The Plant Cell. 16:582-595.
- Raghavan V (1997) *Molecular embryology of flowering plants*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Shiba H, Kakizaki T, Iwano M, Tarutani Y, Watanabe M, Isogai A, Takayama S (2006) *Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation*. Nature Genetics. 38:297-299.
- Sijacic P, Wang X, Skirpan A, Huang I, Dowd P, McCubbin A, Huang S, Kao TH (2004) *Identification of the Pollen Determinant of S-RNase Mediated Self-Incompatibility*. Nature 429:302-305.
- Takayama S, Isogai A (2005) *Self-Incompatibility in Plants*. Annual Review of Plant Biology 56:467-489.
- Thomas SG, Franklin-Tong VE (2004) *Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen*. Nature. 429:305-309.
- Wang Q, Kong L, Hao H, Wang X, Lin J, Šamaj J, Baluška F (2005) *Effects of Brefeldin A on Pollen Germination and Tube Growth. Antagonistic Effects on Endocytosis and Secretion*. Plant Physiology. 139:1692-1703.
- Wang X, Hughes A, Tsukamoto T, Ando T, Kao T (2001) *Evidence That Intragenic Recombination Contributes to Allelic Diversity of the S-RNase Gene at the Self-Incompatibility (S) Locus in Petunia inflata*. Plant Physiology. 125: 1012-1022.