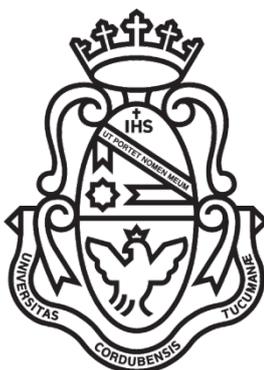


# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



Bases celulares y moleculares de la autoincompatibilidad en *Nicotiana*: Organización y dinámica del citoesqueleto de F-actina y del sistema de endomembranas del tubo polínico durante el rechazo del polen incompatible.

**Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas**

**Autor: Biólogo Juan Alfredo Roldán**

**Director: Dr. Ariel Goldraj**

**CIQUIBIC-CONICET**

**Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Córdoba, Argentina 2013**



**Director de Tesis:**

Dr. Ariel Goldraj

**Comisión de Tesis:**

Dr. José Luis Bocco

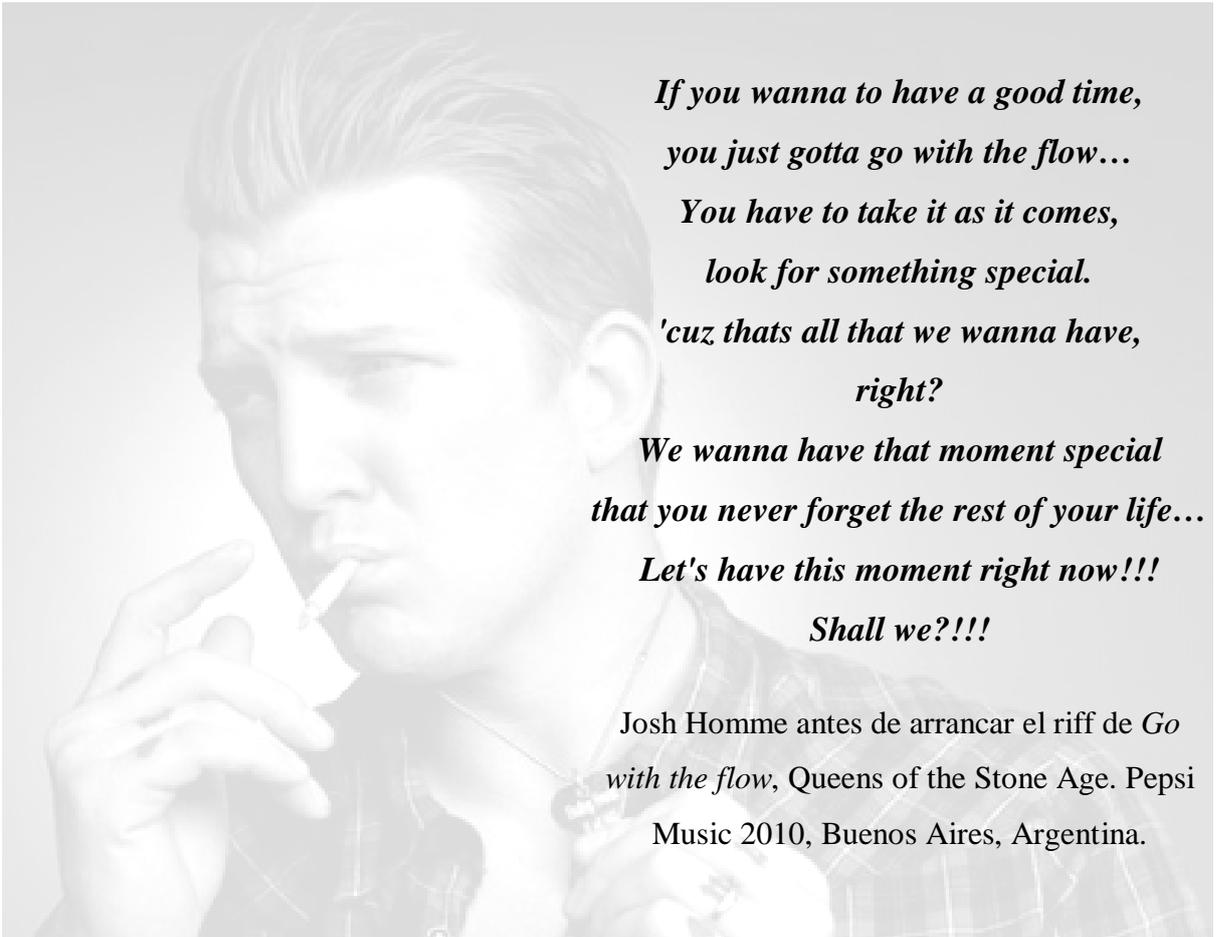
Dra. María Elena Alvarez

Dra. Gloria Estela Barboza

**Evaluador Externo:**

Dr. Jorge Muschietti





*If you wanna to have a good time,  
you just gotta go with the flow...*

*You have to take it as it comes,  
look for something special.*

*'cuz thats all that we wanna have,  
right?*

*We wanna have that moment special  
that you never forget the rest of your life...*

*Let's have this moment right now!!!*

*Shall we?!!!*

Josh Homme antes de arrancar el riff de *Go with the flow*, Queens of the Stone Age. Pepsi Music 2010, Buenos Aires, Argentina.

## **Agradecimientos (El orden del producto no altera el resultado!!!).**

Quiero agradecer a la FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS (UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA) por esta nueva etapa de mi formación profesional y humana. A las entidades FONCyT y CONICET por el aporte económico que me permitió realizar este Doctorado.

Quiero agradecerle a mi director Ariel Goldraij, por haberme permitido desarrollar mi Tesis en su laboratorio de investigación. Por tener siempre la mejor predisposición para enseñar y orientar, por su paciencia en mi formación científica y por fomentarme en todo momento un espíritu crítico hacia la investigación. Por bancarme en las buenas y en las malas. Por sus anécdotas políticas, históricas y artísticas. Todavía recuerdo cuando me comentaste de una banda de garaje llamada *Jethro Tull* y su *Thick as a Brick*, tema que aún no deja de deslumbrarme por su composición. Por último por asociar a la ciencia con un gusto en común, el fútbol...

Le doy gracias a mi tribunal de tesis (Malena, José Luis y Gloria) que siguieron mis avances académicos durante estos cinco años, siempre me aconsejaron muy bien y sus aportes enriquecieron mi conocimiento y mi formación, gracias porque estuvieron en el último momento de mi Tesis, cuando más los necesité. Quiero agradecer al Dr. Jorge Muschietti que aceptó la invitación para corregir y evaluar mi trabajo. Jorge, tu aporte y tus conocimientos fueron muy valiosos para mi formación.

Quiero agradecer especialmente a mis padres, Reyna y Alfredo, por el amor incondicional que siempre me demostraron, por confiar y creer en mí, por soltarme de la mano y dejar que hiciera lo que más me guste en la vida. Por estar siempre en mis momentos más difíciles. Por darme la vida... Quiero dar gracias a mis abuelos Miguel Arcangel y Petrona; a mis hermanos Laura, Pablo, Ester, Belén y Ezequiel. En estos últimos años, queridos hermanos, aprendí que la sangre es más espesa que el agua. A mis tíos, primos y sobrinos que son muchos.

Quiero agradecer al Departamento de Química Biológica y al CIQUIBIC por ser mi segundo hogar. Por los ciquibianos copados que conocí, conozco y conoceré, por compartir consejos y chismerío conmigo y por prestarme (a veces de manera indeterminada) reactivos y el equipamiento necesarios para realizar mis experimentos.

Quiero agradecer especialmente a Malena porque en nuestra formación como laboratorio siempre nos brindó desinteresadamente los reactivos y el material de plástico cuando no teníamos subsidio. Gracias Male por tus consejos sobre mis experimentos fuera de las reuniones de Tesis.

Gracias ciquibianos por el cariño y los afectos que siempre demostraron por mi persona. Quiero agradecer especialmente: a Mario (negro) Bibolini y Hernán (Oso) Rojas porque fueron mis hermanos de laboratorio, por estar siempre a mi lado, por aguantarme en todo momento. Negro siempre me tuviste en cuenta para todas tus aventuras; gracias por las noches de aguante en el lab. Oso, no me pudo haber tocado otro compañero de lab más genial que vos; siempre tuviste esa predisposición para reconciliarnos cada vez que nos peleábamos (muchas veces por pavadas, jaj). Gracias por los regalos de cumple!!!. Gracias Laurita (la flaca) Bertoldi y Lucía (lulubell) Rupil por ser mis asesoras de imagen, por el cariño que me demostraron, por aconsejarme en todo momento y por ofrecerme su amistad. Gracias por degustar conmigo el menú de la panchería. Gracias Nico (Nicky) Fernández Hurst también por tu amistad y por el último consejo que me diste; por acordarte de mí para los partidos de fútbol aunque ya esté retirado de las canchas, por formar “tribuna caliente” en el lab todos los Lunes después de los partidos de fin de semana. Gracias Natalí (Natus) Chanaday por tus conocimientos y por tu predisposición conmigo en todo momento, por tu amistad y por tu buena onda. Gracias Nati Baez, Flor Bonisconti y Sabri Gunput por su amistad. Gracias Alicia (Big mama) Degano por ser una gran amiga, por invitarme a tu casa en eventos especiales, por tus consejos y por traerme los discos de *Kyuss* que pensé nunca tener en mi vida. Gracias a mis hermanas Juli Sc y Dani V (Dani, vos también me trajiste discos muy copados como el *Bleach* de *Nirvana*), compartimos grandes momentos cuando estaban en el ciqui. Gracias Nahuel (Pocho) Peinetti por tu amistad y también por el aguante en el lab, cuando nos quedábamos hasta tarde. Gracias grupo de biofísica: Pablo (Yumi) Yunes, Ceci Gaggiotti, Fede Issoglio (en este grupo sos colado como Yo, jaj) Luisina De Tullio, Elisa Mariani y Vane Galassi por su buena onda y su amistad; por las juntadas y por los viajes copados que hemos realizado. Gracias Nati W por tu cariño y tu amistad, por el Rock... Por las zapas converse que me regalaste, me acompañan a todos lados. Gracias *team* de microscopía: Ceci S, Carlos M, Marce P y Pilar C por todos sus conocimientos, anécdotas, chismerío y cariño. Si el ciqui es mi segunda casa, microscopía es mi dormitorio... Gracias Nico M y Clara M, por su cariño y aprecio, gracias Clara por

tus consejos, gracias Nico por tu amistad, por prestar tu casa para los asados de los talibanes y por ser el DT del Ciqui FC (pronto formaremos la dupla DT y Ayudante de campo). Gracias grupo de “los vagos”: Marcos (Negro II) Carpio, Seba Dupraz, Gabi Ferrero, Dani Corona, Rodrigo Quiroga, Ricky Tano y Lucas Sosa (como se acopló la dupla en el último tiempo) por las juntadas compartidas y las salidas de pesca (en todo sentido). Gracias *team mate*: Virginia (viti) L y Alín (la turca) T por su buena onda y amistad. Gracias Flor N y Mariana M; chicas las conozco desde el cursillo, gracias a sus apuntes aprobé el 70% de la carrera de grado; gracias Flor por ser una valiosa consejera, gracias Mari por ayudarme con la notebook cuando tenía problemas. Gracias Geor F y Nico Cechi porque al comienzo de mi tesina fueron una valiosa ayuda para mi formación. Gracias Carolina C, María Helena C y María Ana C por sus notables conocimientos que me ayudaron a diseñar varios de los experimentos presentados aquí.

También quiero agradecer a las instituciones IMBIV, CIBICI y al departamento de Farmacología que fueron un sustento importante durante toda mi Tesis. Dentro del CIBICI, agradezco a todas esas personas que considero amigos que han compartido mucho conmigo.

Quisiera agradecerles a mis “hermanos por elección”: Jerónimo (Krapo) Krapovickas y Sebastián (el Pibe) Passarella, por haberse cruzado en mi camino y estar presente en todo momento, por nuestras aventuras, reuniones y afectos. Gracias por levantarme el ánimo cada vez que estaba mal personalmente. Gracias a mis queridos amigos (ojo, también hermanos): Nicolás (el chino) Nagahama, Gonzalo (el Gon) Molina, David Guglielmone y Emanuel Angeletti por su amistad y todos esos momentos compartidos, salidas, estudios, recitales. Gracias Lore H, Valeria L, Soledad F, por tenerme siempre presente. Ricky F y Claudia D, gracias por su amistad!!!

Quiero agradecer a toda la “camada de Biólogos” (no pongo nombres porque son todos!!!) que compartieron mucho conmigo, estudios, salidas, juntadas. Quiero agradecer a la “trigesimoséptima” del Renault porque conservo a muchos amigos valiosos del colegio y que no han cambiado.

Sé que muchos se me escapan, es que ya son muchos agradecimientos... Pero a TODOS les quiero decir...

***For those about to rock, I salute you...***

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>15</b>
1.1. Barreras reproductivas.....	21
1.2. Bases genéticas de los sistemas de autoincompatibilidad .....	23
1.3. Autoincompatibilidad esporofítica (AIE) .....	25
1.4. Autoincompatibilidad gametofítica: dos sistemas de AIG muy diferentes .....	29
1.4.1. AIG señalizada por Ca <sup>2+</sup> .....	29
1.4.1.1 La AI induce una cascada de señalización dependiente de Ca <sup>2+</sup> en el polen incompatible de <i>Papaver</i> .....	30
1.4.1.2 Dinámica del citoesqueleto de actina y su rol en la AI.....	31
1.4.2. AIG dependiente de S-RNasas.....	33
1.4.2.1. Sistema de AIG en Rosáceas.....	35
1.4.3. Los factores no ligados al locus S del sistema de AI dependiente de S-RNasas.....	35
1.5. Modelos de AI dependiente de S-RNasas .....	36
<b>2. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS .....</b>	<b>40</b>
2.1. Estudiar la diversidad alélica de las S-RNasas del locus S en una población natural de <i>Nicotiana glauca</i> .....	41
2.2. Estudiar la dinámica del citoesqueleto de F-actina en polinizaciones compatibles e incompatibles.....	42
2.3. Diseñar un sistema experimental para el estudio <i>in vitro</i> de la reacción de autoincompatibilidad.....	43
<b>3. OBJETIVO 1. Estudiar la diversidad alélica de las S-RNasas del locus S en una población natural de <i>Nicotiana glauca</i> .....</b>	<b>44</b>
3.1. Introducción.....	45
3.2. Resultados.....	50
3.2.1. Identificación de las S-RNasas de una población natural de <i>Nicotiana glauca</i> .....	51
3.2.2. Especificidad de la expresión de las S-RNasas.....	55
3.2.3. La funcionalidad de las nuevas S-RNasas .....	59
3.2.4. Análisis filogenético de las S-RNasas .....	63
3.3. Discusión .....	65
3.3.1. Identificación de las secuencias que codifican las S-RNasas de una población natural de <i>N. glauca</i> .....	66
3.3.2. La expresión y la funcionalidad de las S-RNasas del estilo de <i>N. glauca</i> .....	67
3.3.3. Ribonucleasas no funcionales en el sistema de AI.....	69
3.3.4. Genealogía de las S-RNasas .....	71
3.3.5. La importancia de las poblaciones naturales.....	74
3.4. Materiales y métodos .....	76
3.4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	77
3.4.2. Extracción de ácidos nucleicos .....	78
3.4.3. PCR, clonado y secuenciamiento de las potenciales S-RNasas. Análisis de la expresión espacial y temporal de los transcritos de S-RNasa.....	79

3.4.4. Ensayos de funcionalidad de las secuencias obtenidas.....	82
3.4.5. Alineación de proteínas y análisis filogenético.....	83
<b>4. OBJETIVO 2. Estudiar la dinámica del citoesqueleto de F-actina en polinizaciones compatibles e incompatibles .....</b>	<b>86</b>
4.1. Introducción.....	87
4.2. Resultados.....	91
4.2.1. Crecimiento de los tubos polínicos en polinizaciones compatibles e incompatibles .....	92
4.2.2. Organización de la F-actina en polinizaciones compatibles e incompatibles .....	93
4.2.3. La interrupción de los cables de F-actina y la desorganización del compartimento vacuolar .....	96
4.3. Discusión.....	100
4.3.1. El rol del citoesqueleto de F-actina en el crecimiento polar .....	101
4.3.2. La integridad del citoesqueleto de F-actina y del sistema de membranas vacuolares en polinizaciones compatibles e incompatibles.....	103
4.3.3. El posible rol del citoesqueleto de F-actina y la citotoxicidad de las S-RNasas.....	105
4.4. Materiales y métodos .....	108
4.4.1. Material vegetal, condiciones de crecimiento y cruzamientos.....	109
4.4.2. Tinción del frente de avance de los tubos polínicos mediante la técnica de <i>style squash</i> .....	109
4.4.3. Preparación de las muestras para marcación con fluorescentes .....	110
4.4.4. Microscopía de fluorescencia.....	111
<b>5. OBJETIVO 3. Diseñar un sistema experimental para el estudio <i>in vitro</i> de la reacción de autoincompatibilidad .....</b>	<b>112</b>
5.1. Introducción.....	113
5.2. Resultados.....	117
5.2.1. Efecto de los extractos de estilos en el crecimiento de los tubos polínicos cultivados <i>in vitro</i> .....	118
5.2.2. Efecto de los extractos de estilos en la dinámica del tráfico vesicular de los tubos polínicos cultivados <i>in vitro</i> .....	120
5.2.3. Efecto de los extractos de estilo en la integridad de la F-actina de los tubos polínicos .....	122
5.2.4. Colocalización de F-actina y el sistema de endomembranas en tubos polínicos cultivados <i>in vitro</i> .....	125
5.3. Discusión.....	128
5.3.1. Dinámica del crecimiento de los tubos polínicos en extractos de estilos compatibles e incompatibles.....	129
5.3.2. La dinámica del tráfico de vesículas de los tubos polínicos en presencia de extractos de estilos .....	130
5.3.3. La integridad del citoesqueleto de actina en tubos polínicos creciendo en extractos de estilos .....	131
5.3.4. La relación de la dinámica de la F-actina y el tráfico vesicular .....	131
5.4. Materiales y métodos .....	133
5.4.1. Material vegetal, condiciones de crecimiento y cruzamientos.....	134
5.4.2. Preparación de extractos de estigma-estilo .....	134
5.4.3. Cultivos de polen y/o de tubos polínicos en extractos de estilo.....	134
5.4.4. Análisis del crecimiento de los tubos polínicos .....	135
5.4.5. Cultivos de polen en presencia del marcador de membranas fluorescente FM 4-64FX.....	136
5.4.6. Cultivos de polen en presencia de Faloidina Alexa 488.....	136

5.4.7. Microscopía de fluorescencia.....	137
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL DEL MODELO PROPUESTO PARA EL MECANISMO DE AI EN <i>NICOTIANA ALATA</i> .....</b>	<b>139</b>
<b>7. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>145</b>

## **ABREVIATURAS.**

- AC:** autocompatibilidad, autocompatible, *Self-compatibility*
- AI:** autoincompatibilidad, autoincompatible, *Self-Incompatibility*
- AIE:** autoincompatibilidad esporofítica, *Sporophytic Self-incompatibility*
- AIG:** autoincompatibilidad gametofítica, *Gametophytic Self-incompatibility*
- ASB:** buffer estabilizante de actina, *actin-stabilizing buffer*
- BI:** análisis mediante Inferencia Bayesiana, *Bayesian inference*
- BT:** *Nicotiana alata* autocompatible, cultivar *Breakthrough*
- C:** regiones conservadas
- Ca<sup>2+</sup>:** Calcio libre citosólico
- DTT:** *Dithiothreitol*
- FM:** marcador de endomembranas FM<sup>®</sup> 4-64FX
- HAP:** polen heteroalélico, *Heteroallelic pollen*
- HV:** regiones hipervariables, *Hypervariable regions*
- Jasp:** Jasplaquinolida
- LatB:** Latrunculina B
- MAPKs:** proteínas quinasas activadas por mitógenos, *Mitogen-activated protein kinases*
- MCP:** muerte celular programada, *Programmed Cell Death*
- MG:** medio de germinación
- ML:** análisis mediante Máxima Verosimilitud, *Maximum-likelihood*
- NaM:** población *Nicotiana alata* de Misiones
- NnSR1:** *Nicotiana non S-RNase 1*
- NnSR2:** *Nicotiana non S-RNase 2*
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PrsS:** Factor S del stigma, *Papaver rhoeas stigma S determinant*
- PrpS:** Factor S del polen, *Papaver rhoeas pollen S determinant*
- ROS:** especies reactivas del oxígeno, *reactive oxygen species*
- RT-PCR:** Transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa
- rS-RNasas:** relictos de S-RNasas, *relic S-RNases*
- SCR:** proteína rica en cisteína del locus S, *S-locus cysteine-rich protein*
- SLF:** F-box del locus S, *S-Locus F-Box*
- rpS-RNasas:** ribonucleasas parecidas a las S-RNasas, *S-like RNases*
- sPPasas:** pirofosfatasa soluble inorgánica
- SRK:** receptor quinasa del locus S, *S-locus receptor kinase*
- S-RNasas:** ribonucleasas del locus S, *Self-RNases*

**TG:** linajes transgénicos, *Transgeneric S-lineage*

**THL1:** tiorredoxina, *Thioredoxin H-Like 1*

**TSE:** evolución transespecífica, *Trans-specific evolution*

**vPPasas:** pirofosfatasa vacuolares

## **RESUMEN.**

La autoincompatibilidad (AI) es un mecanismo presente en la mayoría de las Angiospermas que permite el reconocimiento y rechazo del polen propio o genéticamente relacionado. De esta manera las plantas mantienen una apropiada variabilidad genética y previenen la endocria, lo que redundaría en una mejor adaptación a las condiciones cambiantes del medio ambiente. En la mayoría de las especies autoincompatibles el reconocimiento entre el polen y el pistilo está regulado genéticamente por el locus *S*. En Solanáceas este locus codifica las ribonucleasas *S* (S-RNasas) que se expresan en el pistilo y confieren la especificidad para el reconocimiento del polen. La acción citotóxica de estas S-RNasas también promueve la inhibición del crecimiento de los tubos polínicos incompatibles antes de que estos alcancen el ovario.

La especie nativa *Nicotiana glauca* ha sido utilizada como modelo experimental para dilucidar las bases moleculares de la AI dependiente de S-RNasas. Sin embargo en esta especie no existen estudios de AI en poblaciones naturales y por lo tanto la diversidad estructural y funcional de los alelos de S-RNasa es conocida de manera limitada. En esta tesis se identificaron y caracterizaron a nivel molecular y funcional nuevas secuencias de S-RNasas, denominadas *S*<sub>27</sub>, *S*<sub>70</sub>, *S*<sub>75</sub>, *S*<sub>107</sub> y *S*<sub>210</sub>-RNasa, provenientes de una población natural de *N. glauca*. Las distintas variantes alélicas de S-RNasa se expresaron de manera específica en el estilo de cada individuo analizado. Mediante análisis de segregación se demostró que estos genes son funcionales en el mecanismo de AI y constituyen, por lo tanto, alelos del locus *S*. Otras dos secuencias identificadas resultaron ser estructuralmente similares a las S-RNasas pero no funcionales en el sistema de AI y por lo tanto fueron denominadas *NnSR1* y *NnSR2* (*Nicotiana non S-RNase*). *NnSR1* exhibió un patrón de expresión diferente a todos los alelos de S-RNasa y a *NnSR2* lo que sugiere que este gen experimentó una evolución funcional diferente. El análisis filogenético confirmó que los alelos de S-RNasa de *N. glauca* se encuentran distribuidos en varias líneas *S* transgénicas cuya diversidad es anterior al proceso de especiación en Solanáceas.

Un aspecto poco investigado en la AI dependiente de S-RNasas son los cambios a nivel subcelular que ocurren durante el rechazo del polen incompatible. En este trabajo de tesis se estudió mediante microscopía confocal de fluorescencia la estabilidad *in vivo* del citoesqueleto de F-actina y del sistema vacuolar de los tubos polínicos durante la respuesta de AI. En una fase temprana de la polinización, el 70% de los tubos polínicos compatibles e incompatibles mostraron un patrón organizado de F-actina consistente en largos filamentos paralelos al eje principal de la célula. Mientras que en las polinizaciones compatibles este patrón se mantuvo sin cambios durante todo el trayecto de los tubos polínicos hacia el ovario,

los tubos polínicos incompatibles sufrieron una progresiva desorganización de la F-actina. Experimentos de colocación de F-actina y el sistema vacuolar de membranas revelaron que al día 6 posterior a la polinización incompatible alrededor del 80% de los tubos polínicos incompatibles mostraron la F-actina fragmentada, en tanto que un porcentaje similar mantenía intactos los compartimentos vacuolares. Estos resultados indican que durante la respuesta de AI, la fragmentación del citoesqueleto de F-actina precede a la disrupción de las membranas vacuolares. De esta manera, los tubos polínicos incompatibles son sometidos a un proceso de desorganización secuencial de las principales estructuras subcelulares. Los resultados también indican que el *pool* mayoritario de S-RNAsas, endocitadas y almacenadas en las vacuolas de los tubos polínicos, serían liberadas al citoplasma en una fase tardía del rechazo del polen.

Los estudios de integridad del citoesqueleto de F-actina y el sistema de endomembranas mediante microscopía de fluorescencia fueron extendidos a tubos polínicos crecidos *in vitro* en presencia de extractos de estilo compatibles e incompatibles. El sistema *in vitro* permitió estudiar de manera específica los cambios ocurridos en la zona apical del tubo polínico, extremadamente difícil de localizar en estudios *in vivo*. El crecimiento de los tubos polínicos en presencia de extracto incompatible fue 55% menor que en extracto compatible. Este menor crecimiento fue consistente con la ausencia del patrón normal de vesículas y la franja de actina de F-actina en el extremo apical, esenciales en la maquinaria de crecimiento polar del tubo polínico. La región subapical exhibió los cables de F-actina distorsionados y fragmentados junto a notables áreas de agregados vesiculares próximos a la membrana celular. Estas alteraciones alcanzaron al 85% de los tubos polínicos cultivados por 3 horas en extracto incompatible. Considerando en conjunto los experimentos *in vivo* e *in vitro*, los resultados obtenidos sugieren que el rechazo del polen incompatible transcurre en dos etapas: 1) una etapa temprana en donde las alteraciones en el citoesqueleto de F-actina y el tráfico de membranas producen el arresto del crecimiento del tubo y 2) una etapa tardía en la cual la disrupción vacuolar libera la S-RNasa al citoplasma para la degradación masiva del ARN del polen.

Durante esta Tesis se publicaron los siguientes trabajos:

- **Roldán JA, Quiroga R, Goldraj A** (2010) Molecular and genetic characterization of novel S-RNases from a natural population of *Nicotiana alata*. *Plant Cell Reports* 29: 735-746.
- **Roldán JA, Rojas HJ, Goldraj A** (2012) Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the *in vivo* self-incompatibility response in *Nicotiana alata*. *Annals of Botany* 110 (4): 787-795.
- **Goldraj A, Roldán JA, Rojas HJ** (2012) Early F-actin disorganization may be signaling vacuole disruption in incompatible pollen tubes of *Nicotiana alata*. *Plant Signaling & Behavior* 7 (12): 1-3.
- **Rojas HJ, Roldán JA, Goldraj A** (2013) NnSR1, a class III non S-RNase constitutively expressed in styles, is induced in roots and stems to cope with phosphate starvation in *Nicotiana alata*. En revisión.

## **1. INTRODUCCIÓN GENERAL.**

Las Angiospermas conforman el grupo más numeroso dentro del Reino Plantae. Los individuos incluidos dentro de esta categoría se caracterizan por tener flores que producen, después de la fertilización, frutos con semillas. Son las únicas plantas que se han adaptado a vivir en todos los ecosistemas de la tierra ocupando prácticamente todos los nichos ecológicos posibles, salvo las regiones polares. Su diversidad es mucho más alta en regiones tropicales y húmedas donde dominan completamente el paisaje (el 60% de las especies son de zonas tropicales) y su número va disminuyendo hacia latitudes más altas, llegando a poseer una diversidad pobre en la flora de regiones más frías como la tundra (aún dominada por las coníferas, como los pinos). El término "Angiospermas" proviene del léxico griego: *αγγειον* (angión: vaso, ánfora) y *σπέρμα* (sperma: semilla); las palabras compuestas significan "semillas envasadas". Esto hace referencia a que sus óvulos (posteriormente semillas) están encerrados por el carpelo, una hoja transformada que forma el pistilo. De esta forma, para que el óvulo sea fecundado, el grano de polen debe hacer contacto con el estigma, una superficie del carpelo preparada especialmente para ello. Esta característica diferencia a las Angiospermas de las Gimnospermas, donde el polen cae directamente sobre el óvulo. Las Angiospermas poseen características que contribuyeron decisivamente a su dominancia, entre éstas se encuentra una rápida madurez reproductiva, la adaptación de los procesos de polinización a condiciones anhidras, la simbiosis con agentes polinizantes y la dispersión de las semillas mediada por factores bióticos como los animales o abióticos como el viento. Otras características morfológicas distintivas respecto a las Espermatófitas (plantas con semilla) son: i) un gametófito femenino reducido a sólo unas pocas células; ii) el proceso de doble fecundación que forma junto con la semilla un tejido triploide nutritivo denominado endosperma y iii) presencia de tejidos conductores (xilema y floema) más recientes en la evolución y más eficientes en muchos aspectos. Estas características posibilitaron la diversificación sorprendente que experimentaron las Angiospermas. Los registros fósiles muestran que este grupo de plantas apareció a principios del Cretácico, hace aproximadamente unos 130 millones de años atrás. Se descubrieron grandes cantidades de fósiles de muchas especies de ese período, indicando que su diversificación ocurrió de manera repentina. Darwin llamó a esta diversificación rápida y masiva un "abominable misterio" (Darwin & Seward, 1903). Aun hoy, cerca del 90% de las plantas terrestres pertenecen a este grupo que cuenta con unas 257.000 especies (Judd *et al.*, 2002) agrupadas en 12.500 géneros y aproximadamente 300 familias. Las Angiospermas son las responsables de la mayor parte de la diversidad dentro de las Espermatófitas.

En términos ecológicos y nutricionales, las Angiospermas sobrepasan a todos los otros grupos de plantas. Muchos miembros de esta división son la fuente de alimentos, materia prima y productos naturales que consume el hombre.

En todos los sistemas biológicos el control de la fertilización es un aspecto crítico. De la misma forma que ocurre en otros organismos, la reproducción sexual de las plantas requiere el encuentro entre las gametas masculina y femenina. En las Angiospermas, una reproducción sexual exitosa está dada por una serie importante de acontecimientos: i) la entrega de polen al estigma, ii) la hidratación del polen, iii) la germinación del polen, iv) el crecimiento del tubo polínico a través del estilo y del ovario, y finalmente v) la fertilización (McClure & Franklin-Tong, 2006). La polinización implica la integración de todos estos eventos. El grano de polen tiene que adherirse, hidratarse y germinar en la superficie del estigma. El tubo polínico es una célula que debe crecer de manera rápida a través del pistilo hacia el óvulo; este crecimiento polar requiere de un suministro continuo y preciso de vesículas secretorias hacia el ápice, transportando los materiales necesarios para la producción de nueva membrana plasmática y pared celular (de Graaf *et al.*, 2005). Como organismos sésiles, las plantas no pueden desplazarse para seleccionar un compañero sexual, por lo tanto, reciben pasivamente el polen transportado por agentes externos como el viento y los insectos. La mayoría de las especies de Angiospermas producen flores perfectas, es decir que contienen las estructuras reproductivas femenina (pistilo) y masculina (estambres) en estrecha cercanía (Fig. 1). Por lo tanto estas flores poseen una gran tendencia a la autopolinización, al depositarse el polen propio en el pistilo de la flor. Aunque en muchas circunstancias puede ser ventajosa, la **autopolinización** limita la variabilidad de la progenie y puede deprimir el vigor de la descendencia. Las plantas han desarrollado diversos mecanismos para reconocer y favorecer la germinación y el crecimiento del polen más apropiado para la supervivencia de la especie, evitando así la endocria y generando nuevas combinaciones genotípicas que contribuyen a una mayor diversidad genética dentro de la especie.

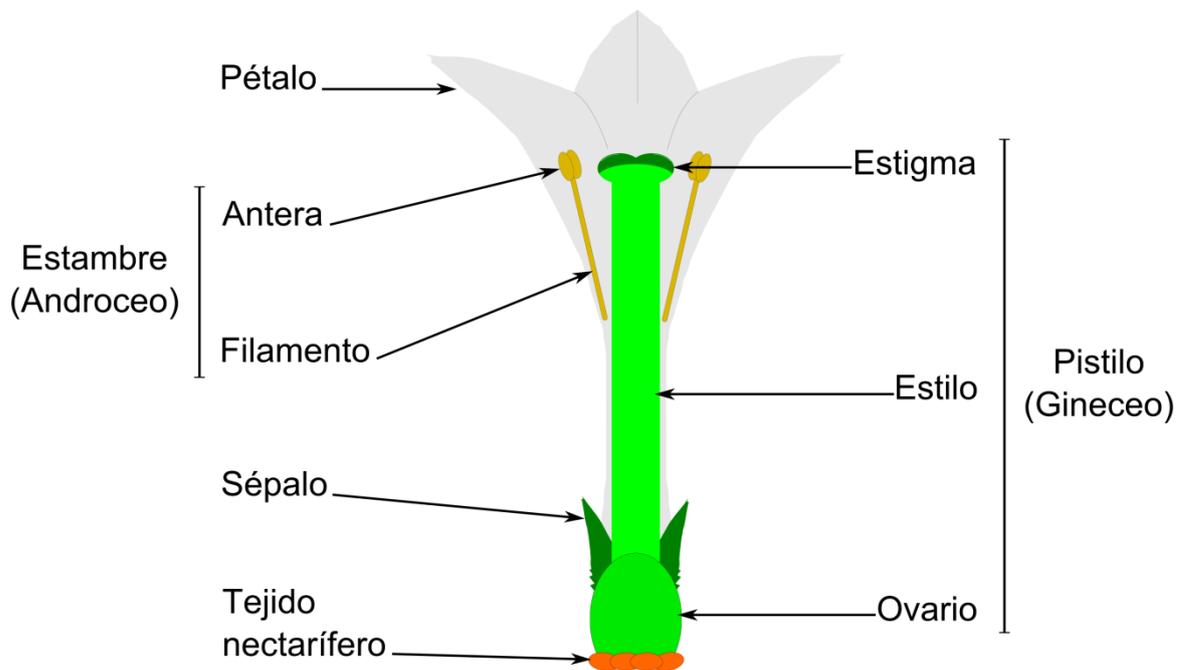


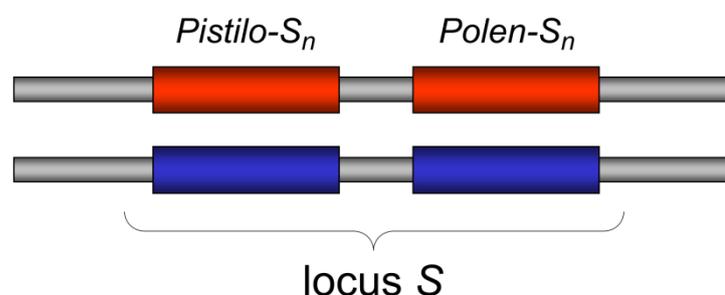
Figura 1. Representación esquemática de una flor en corte longitudinal de *Nicotiana glauca* de la familia Solanáceas.

### 1.1. Barreras reproductivas.

Existen varios mecanismos que operan como barreras para evitar la autofecundación en las flores hermafroditas. Aquellas especies con diferencias en la morfología floral, presentan barreras **heteromórficas** de autofecundación (Rea & Nasrallah, 2008). Muchas flores pueden tener como heteromorfismo, diferentes tiempos de maduración de sus órganos reproductivos. Por ejemplo, puede ocurrir que el pistilo madure antes que los estambres y viceversa, este tipo de barrera es conocida como **dicogamia**. Una flor con un pistilo maduro no puede recibir su propio polen si sus anteras están inmaduras, pero puede recibir polen de flores de otras plantas que tengan los estambres maduros, favoreciendo así la reproducción cruzada. Cuando las anteras de esta flor maduren, su pistilo ya estará polinizado y posiblemente su ovario fertilizado. Por otra parte, las flores pueden tener separados espacialmente sus órganos reproductivos, esta barrera se llama **hercogamia** (Newbigin & Uyenoyama, 2005). Las dos formas más comunes de hercogamia son: i) **Hercogamia de aproximación (pin)**, cuando el estigma está por encima del nivel de las anteras. Esta disposición hace que los visitantes florales tengan un primer contacto con el estigma antes de retirar polen de las anteras de más abajo. Se la considera la más común y está asociada a una gran variedad de polinizadores. ii) **Hercogamia invertida (thrum)**, cuando el estigma se

encuentra por debajo del nivel de las anteras. De esta manera, los visitantes florales tienen un primer contacto con el polen antes que con el estigma. Se cree que la hercogamia invertida favorece mucho más a la exportación del polen hacia otras flores que la hercogamia de aproximación. Este tipo de disposición se asocia con lepidópteros polinizadores como las polillas y las mariposas.

Otras barreras a la autofecundación son las denominadas **homomórficas**, donde las especies no poseen diferencias en la morfología floral. Dentro de estas barreras existen los sistemas de **autoincompatibilidad** que están ampliamente difundidos en el Reino Plantae y se basan en una interacción célula-célula que posibilita el reconocimiento y rechazo del polen propio o genéticamente relacionado (Kao & Tsukamoto, 2004). La autoincompatibilidad (AI; en inglés SI, *Self-incompatibility*) está controlada a nivel genético por una región altamente polimórfica denominada **locus S** (*Sterility*) (Fig. 2). Este locus codifica los factores proteicos capaces de interactuar entre sí, para reconocer y rechazar el polen incompatible. En su versión más sencilla, el locus *S* presenta las siguientes características: i) Es un locus complejo formado por dos genes estrechamente ligados que individualmente codifican los factores de reconocimiento que confieren la especificidad al pistilo y al polen (Sijacic *et al.*, 2004). Dentro de este locus, se han caracterizado los pares génicos que codifican distintos tipos de proteínas, en coincidencia con los distintos mecanismos de autoincompatibilidad descritos en diferentes familias (Rea & Nasrallah, 2008). ii) Ambos genes son multialélicos y cada variante del par génico del locus *S* constituye un haplotipo, designado como  $S_1, S_2, S_3...S_n$ . iii) En una planta AI, los factores de reconocimiento masculino y femenino tienen el mismo haplotipo. De este modo, el rechazo del polen por parte del pistilo ocurre toda vez que el haplotipo del polen es coincidente con cualquiera de los dos haplotipos presentes en el pistilo diploide (McClure & Franklin-Tong, 2006).



**Figura 2. Esquema del locus S.** En su versión más sencilla, el locus *S* posee dos genes ligados que codifican los factores del pistilo y del polen para el reconocimiento y rechazo del polen incompatible. Los distintos pares alélicos del locus *S* definen los haplotipos  $S_1, S_2, S_3...S_n$ . En el esquema, los colores rojo y azul hacen referencia a los dos haplotipos *S*, propios de un individuo autoincompatible.

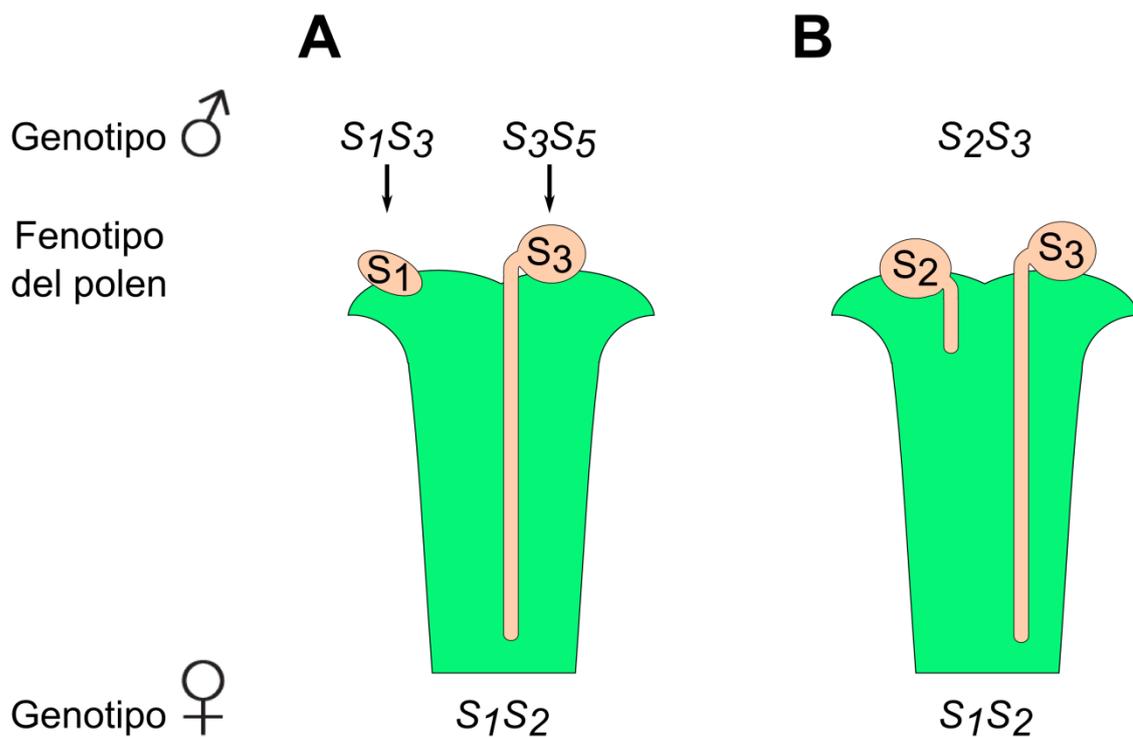
## 1.2. Bases genéticas de los sistemas de autoincompatibilidad.

Estudios de genética clásica durante la década del '50 revelaron la existencia de dos grandes sistemas de autoincompatibilidad: La **autoincompatibilidad esporofítica** (AIE; en inglés SSI, *Sporophytic Self-incompatibility*) presente en las familias Brasicáceas, Asteráceas y Cariofiláceas (Gauze & McCormick, 1999; Takayama & Isogai, 2005), Convolvuláceas, Betuláceas, Polemoniáceas y Malváceas (Hiscock & McInnis, 2003). En este sistema, el fenotipo de AI (polen aceptado o rechazado) está determinado por el genotipo diploide del esporófito parental; de esta forma la interacción célula-célula está dada entre el tapete del grano de polen de origen esporofítico y la célula de la papila estigmática. El polen rechazado (incompatible) no puede hidratarse y por ende, no puede germinar ni desarrollar el tubo polínico en la superficie del estigma (Fig. 3A; Takayama & Isogai, 2005). La **autoincompatibilidad gametofítica** (AIG; en inglés GSI, *Gametophytic Self-incompatibility*), descrita en más de 60 familias, ha sido estudiada principalmente en Solanáceas, Rosáceas, Plantagináceas y Papaveráceas. En este sistema, el fenotipo de AI depende del propio genoma haploide y la interacción célula-célula se da entre el tubo polínico y las células del tejido de transmisión del estigma-estilo. El rechazo del tubo polínico ocurre en el estigma (Papaveráceas) o dentro del estilo (Solanáceas) toda vez que el haplotipo del mismo coincida con cualquiera de los dos haplotipos expresados en el pistilo (Fig. 3B; de Nettancourt, 2001).

En el sistema de AIE existen complejas relaciones de dominancia y recesividad entre los distintos haplotipos (Fig. 3A; Takayama & Isogai, 2005; Shiba *et al.*, 2006). Experimentos de genética clásica han revelado cuatro tipos de dominancia: i) Co-dominancia de haplotipos, fenómeno que se presenta con más frecuencia que la dominancia/recesividad; ii) Dominancia/recesividad, observado más en los haplotipos del polen que en los del estigma; iii) Relaciones de dominancia que actúan de manera independiente en el polen y en el estigma; por último iv) Relaciones de dominancia no lineal, que se presentan más en el estigma que en el polen (Watanabe *et al.*, 2012). Dentro de la familia Brasicáceas, existen relaciones de dominancia/recesividad entre los distintos haplotipos que determinan el fenotipo del polen. En las plantas heterocigotas, las células del tapete de las anteras expresan el alelo *S* dominante el cual es posteriormente depositado en la cubierta del polen. En contraparte, la transcripción del alelo recesivo es suprimida debido a la presencia de un ARN de interferencia (ARNi) (producido por el alelo dominante) que actúa en *trans*, uniéndose a la región del promotor del alelo recesivo y promoviendo así su metilación (Tarutani *et al.*, 2010). De esta

manera, una planta heterocigota puede producir genotípicamente dos granos de polen, pero fenotípicamente se expresará un único alelo  $S$ , el dominante.

En la siguiente relación de dominancia  $S_1 > S_2 > S_3 > S_5$ , el polen  $S_3$  que proviene de una planta  $S_1S_3$  será rechazado en la planta  $S_1S_2$  debido a la expresión exclusiva en la superficie del polen del haplotipo dominante  $S_1$ . Sin embargo, el polen de genotipo  $S_3$  proveniente de la planta  $S_3S_5$  puede fertilizar a la planta  $S_1S_2$  (Fig. 3A). Esto hace a la AIE un sistema genéticamente más complejo, comparado con el sistema gametofítico. Por su parte, la AIG es el sistema más común de autoincompatibilidad y presenta relaciones de codominancia entre los alelos  $S$  (Fig 3B). Tiene una amplia distribución filogenética y es considerado como una condición ancestral en las Angiospermas. La AIE es un sistema más reciente en la evolución, estando presente en muy pocos clados de Angiospermas (Hiscock & McInnis, 2003).



**Figura 3. Sistemas de autoincompatibilidad.** (A) Autoincompatibilidad esporofítica. El polen es rechazado cuando su haplotipo dominante coincide con el haplotipo del pistilo. En el ejemplo, la relación de dominancia es  $S_1 > S_2 > S_3 > S_5$ . (B) Autoincompatibilidad gametofítica. El polen es rechazado cuando su haplotipo coincide con cualquiera de los haplotipos expresados en el pistilo. En este sistema hay codominancia entre los distintos alelos.

Durante las últimas tres décadas se han realizado muchos progresos en la identificación y caracterización de los genes del locus  $S$  que controlan el mecanismo de autoincompatibilidad. La comparación de los genes expresados en el locus  $S$  de los pistilos de flores de diferentes familias ha revelado tres mecanismos bioquímicamente distintos (Kao &

Tsukamoto, 2004). Aún siendo mecanismos de rechazo diferentes, el estudio de la AI en especies de *Brassica* y *Papaver* ha determinado un rasgo común. La familia Brassicáceas utiliza el sistema de AIE basado bioquímicamente en una interacción ligando-receptor. La familia Papaveráceas exhibe un sistema de AIG y también tiene un reconocimiento polen-pistilo basado en la interacción entre un ligando y un receptor. Esta interacción desencadena una transducción de señales intracelulares que regulan el crecimiento del tubo polínico. Por último, en Solanáceas, Rosáceas y Plantagináceas, el sistema también es de tipo gametofítico y el reconocimiento polen-pistilo se basa en la interacción de dos proteínas en el interior del tubo polínico. La distribución filogenética de los sistemas de AIE y AIG indica que el sistema gametofítico es anterior al esporofítico (Allen & Hiscock, 2008). Siendo el sistema de AIE más reciente, se postula que este mecanismo habría surgido a partir del mecanismo ancestral de AIG. Por el momento se desconoce si ambos tipos de AI coexisten dentro de alguna familia.

A partir del hallazgo del sistema de reconocimiento ligando-receptor, se ha propuesto que los sistemas de AI podrían haber evolucionado a partir de mecanismos de defensa de las plantas contra patógenos (Elleman & Dickinson, 1999). Existen similitudes morfológicas y moleculares entre una respuesta del huésped sobre una hifa invasora y el rechazo del pistilo sobre un tubo polínico incompatible que trata de “invadir” el pistilo. En *Brassica*, por ejemplo, el determinante femenino de la AIE es un receptor quinasa de serina-treonina (*SRK*) que pertenece a una gran familia de receptores quinasa, muchos de cuyos miembros están involucrados en la respuesta de defensa huésped-patógeno (Allen & Hiscock, 2008 y referencias allí citadas). De manera similar, las S-RNasas que median la respuesta AIG en Solanáceas y Rosáceas están relacionados con ribonucleasas implicadas en la defensa contra los patógenos (Kao & McCubbin, 1996; Galiana *et al.*, 1997; Hillwig *et al.*, 2010; Hillwig *et al.*, 2011).

### 1.3. Autoincompatibilidad esporofítica (AIE).

En la AIE la interacción polen-pistilo ocurre entre el grano de polen y la célula de la papila estigmática. La reacción se inicia por lo tanto en la superficie del estigma, desencadenada por las células papilares en respuesta a proteínas presentes en la cubierta del polen. Las especies con AIE tienen un estigma seco por lo que el grano de polen depende de la secreción de las células estigmáticas para su hidratación. Precisamente, las células

estigmáticas actúan impidiendo en el polen incompatible la hidratación necesaria para la germinación. Una misma célula papilar puede aceptar y rechazar un polen de haplotipo diferente o genéticamente relacionado, respectivamente. Por lo tanto, la respuesta de rechazo implica una inhibición altamente localizada de la liberación de agua y nutrientes (Kumar & McClure, 2010).

En la AIE, los factores de reconocimiento codificados por el locus *S* son el receptor quinasa (**SRK**, *S-locus receptor kinase*), expresado en la papila estigmática y localizado en la membrana plasmática, y la proteína rica en cisteína del locus *S* (**SCR**, *S-locus cysteine-rich protein*, también conocida como SP11), expresada en las células del tapete de las anteras y depositada en la cubierta externa del polen (Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000; Fujimoto *et al.*, 2006; Iwano & Takayama, 2012). SRK es una proteína transmembrana, cuyo dominio extracelular tiene la capacidad de interactuar y unirse con la SCR del mismo haplotipo. Esta interacción solo inicia la reacción de la AIE; existen además otros factores que regulan positiva o negativamente el rechazo del polen incompatible.

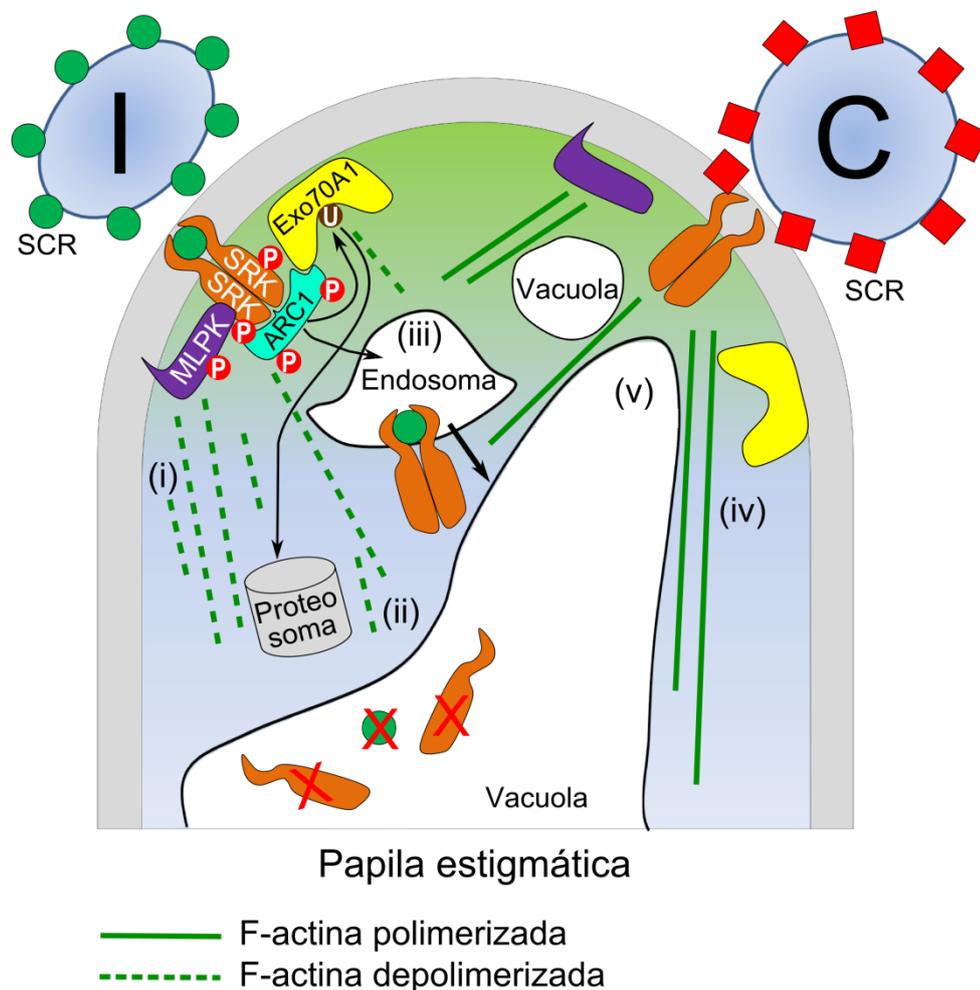
A nivel molecular, una tioredoxina (THL1, *Thioredoxin H-Like1*) interactúa en el dominio citosólico de SRK inhibiendo su fosforilación (Cabrillac *et al.*, 2001). La interacción física entre SRK-SCR desplaza a THL1 del dominio citosólico y desencadena la autofosforilación de SRK de una manera alelo-específica (Takayama *et al.*, 2001). La interacción SRK-SCR también regula otros factores como las ligasas E3 que contienen repeticiones armadillo (ARC1) (Gu *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2003), las quinasas del locus *M* (MLPK) (Murase *et al.*, 2004) y la subunidad del complejo exocisto (Exo70A1) (Samuel *et al.*, 2009). MLPK es una serin-treonina quinasa anclada a la membrana plasmática que interactúa de manera directa con SRK para iniciar un proceso de transducción de señales esencial para la manifestación de la AIE (Murase *et al.*, 2004; Kakita *et al.*, 2007). Las plantas *mlpk* son incapaces de rechazar el polen propio, indicando que esta quinasa actúa como un regulador positivo (Murase *et al.*, 2004). A su vez, también ARC1 interactúa con el dominio quinasa de SRK (Gu *et al.*, 1998). El complejo MLPK-SRK activa a ARC1 mediante fosforilación (Fig. 4). De esta manera, un señalamiento mediado por fosforilación ocurre durante el rechazo del polen incompatible. Como ARC1 posee actividad ubiquitin-ligasa E3, se ha propuesto que estaría involucrada en la señalización y degradación de proteínas mediada por proteosomas (Watanabe *et al.*, 2012). Las plantas *knock-out* en ARC1 no manifestaron el rechazo del polen incompatible, indicando que ARC1 también es un regulador positivo de la AIE (Stone *et al.*, 1999). Por último, la proteína Exo70A1 es una subunidad del complejo exocisto conocido por regular el tráfico vesicular hacia la membrana plasmática en levaduras

y células animales (Zarsky *et al.*, 2009). Ensayos de doble híbrido en levaduras demostraron que ARC1 interactúa y ubiquitina a Exo70A1 (Samuel *et al.*, 2009). En este contexto, el inicio de la respuesta de la AIE requeriría de la eliminación de Exo70A1. En polinizaciones incompatibles, Exo70A1 sería degradada vía ARC1, que a su vez es activada por la interacción haplotipo específica de SRK-SCR (Fig. 4). Samuel *et al.*, (2009) demostraron que la ausencia de Exo70A1 en *Brassica* o *Arabidopsis* resultó en una reducida polinización compatible, mientras que su sobreexpresión resultó en una pérdida del fenotipo de AI. Esto sugiere que Exo70A1 podría estar regulando una entrega exocítica de vesículas que contienen los factores que facilitan la hidratación y germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico (Ivanov *et al.*, 2010).

A nivel subcelular, los eventos más notables mediados por la interacción SRK-SCR que ocurren durante el rechazo del polen incompatible incluyen cambios en las vacuolas de la célula papilar (Iwano *et al.*, 2007), la redirección de los recursos para el sitio de unión del polen, y la internalización de SRK-SCR dentro de endosomas de la papila estigmática (Ivanov & Gaude, 2009). Mediante marcación con faloidina-rodamina, Iwano *et al.*, (2007) mostraron que las polinizaciones compatibles estimularon la polimerización de la actina en las células de la papila estigmática implicadas en la interacción. En contraste, las autopolinizaciones llevaron a una reorganización de la actina que condujo a su depolimerización (Fig. 4). Este grupo de investigadores también analizó la disposición de las vacuolas mediante experimentos de microscopía electrónica de alto voltaje (HVEM). En polinizaciones compatibles, una gran vacuola central se situó en el ápice de la papila estigmática, adyacente a la región de la membrana plasmática donde estaba adherido el grano de polen. Esta vacuola central estaba rodeada por una gran red de vacuolas tubulares conectadas entre sí. En contraste, las polinizaciones incompatibles mostraron unas pocas vacuolas elongadas (Fig. 4), cercanas a la membrana plasmática que aparecían mayormente fragmentadas (Iwano *et al.*, 2007). La vacuola almacena muchos compuestos y contiene diferentes sistemas de transporte, incluyendo bombas  $H^+$  ( $H^+$ -ATPasas), transportadores ( $Ca^{2+}$ -ATPasas) y canales de agua (acuaporinas). Estos transportadores de proteínas regulan la concentración de iones y la presión de turgencia en las células vegetales (Maeshima, 2001). Los experimentos sugieren entonces que el citoesqueleto de F-actina podría estar regulando la estructura vacuolar para controlar el transporte de iones y agua necesarios para la germinación del polen.

La interacción SRK-SCR que ocurre en la membrana plasmática podría involucrar también la endocitosis del complejo receptor-ligando hacia el interior de la célula de la papila estigmática (Fig. 4). Experimentos de inmunolocalización mostraron, en polinizaciones

incompatibles, una distribución irregular de SRK en la membrana plasmática. Esta distribución de SRK se corresponde con una región de la membrana “lista para ser activada” y en íntima comunicación con endosomas internos. El complejo SRK-SCR endocitado es localizado en endosomas que están destinados a ser degradados (Ivanov & Gaude, 2009). Esta disposición puede prevenir que la activación de SRK se extienda a toda la célula, permitiendo que la respuesta de AI sea altamente localizada. De esta manera, una misma célula estigmática puede aceptar el polen compatible y rechazar el incompatible. La figura 4 detalla los eventos descritos para el sistema de AIE.



**Figura 4. Eventos celulares y moleculares del sistema de AIE.** Durante la polinización incompatible (I), el receptor SRK reconoce a su ligando SCR cognato (círculos verdes) que atraviesa la pared celular de la papila estigmática. Esto provoca la autofosforilación de SRK y el reclutamiento de MLPK y ARC1. SRK fosforila a MLPK y juntos fosforilan a ARC1. Este complejo activado es capaz de inducir la ubiquitinación de Exo70A1 para su posterior degradación mediante el proteosoma. Otros eventos destacados son: (i) la depolimerización del citoesqueleto de actina, (ii) la ausencia de vacuolas adyacentes a la zona de interacción polen-papila estigmática y (iii) la endocitosis del complejo receptor-ligando SCR-SRK hacia el interior de la célula de la papila estigmática para su posterior degradación. Durante la polinización compatible (C) la interacción inespecífica SRK-SCR (cuadrados rojos) mantiene a SRK inactivo; y la ausencia de la cascada de señales permite a Exo70A1 formar parte del complejo exocisto que regula el tráfico vesicular hacia la membrana plasmática permitiendo así la hidratación del polen. Otros eventos destacados son: (iv) la polimerización de la actina en la papila estigmática y (v) la relocalización de las vacuolas cercanas a la región de interacción polen-papila estigmática. Adaptado de Ivanov *et al.*, (2010).

#### 1.4. Autoincompatibilidad gametofítica: dos sistemas de AIG muy diferentes.

En los sistemas de AIG el polen germina y produce el tubo polínico, pero el rechazo del polen incompatible se produce mediante el arresto de su crecimiento. Dos mecanismos diferentes de AIG han sido estudiados a nivel celular y molecular. Uno de ellos es el sistema de **AI señalizada por  $\text{Ca}^{2+}$** , encontrado en la familia Papaveráceas y estudiado particularmente en amapola (*Papaver rhoeas*); el otro sistema es el denominado **AI dependiente de S-RNAsas** que fue originalmente encontrado y extensivamente caracterizado en Solanáceas y posteriormente reportado en Rosáceas y Plantagináceas (McClure & Franklin-Tong, 2006). El estigma de Papaveráceas es seco como en Brasicáceas, mientras que en Solanáceas el estigma es húmedo gracias a las secreciones estigmáticas (de Graaf *et al.*, 2006). En el sistema señalizado por  $\text{Ca}^{2+}$  el rechazo del polen ocurre rápidamente, durante la germinación del tubo polínico en la superficie del estigma. En el sistema dependiente de S-RNAsas el rechazo del polen puede tomar horas e incluso días y el arresto ocurre cuando el tubo polínico está creciendo a través de las células del tejido de transmisión (de Graaf *et al.*, 2006).

##### 1.4.1. AIG señalizada por $\text{Ca}^{2+}$ .

A nivel molecular, el mecanismo de AIG mejor conocido es el de *Papaver rhoeas*, el cual ha sido exitosamente reproducido en un sistema *in vitro* que refleja fielmente el escenario *in vivo*. En *Papaver*, los factores expresados en el locus *S* comprenden a las proteínas **PrsS** (*Papaver rhoeas stigma S determinant*) codificada en el pistilo y **PrpS** (*Papaver rhoeas pollen S determinant*) codificada en el polen. El factor PrsS fue caracterizado a principios de los '90 (Foote *et al.*, 1994); es una proteína polimórfica, de aproximadamente 15 kDa, secretada en el estigma. Ningún otro factor adicional del pistilo es requerido para el rechazo del polen incompatible (Franklin-Tong *et al.*, 1988). El factor PrpS ha sido identificado como una proteína transmembrana de aproximadamente 20 kDa presente en la membrana plasmática del tubo polínico (Wheeler *et al.*, 2009). Recientes trabajos han demostrado que PrpS y PrsS interactúan como ligando-receptor de manera alelo-específica (Wheeler *et al.*, 2009; Wheeler *et al.*, 2010) (Fig. 5B).

El  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico es una molécula de gran importancia como segundo mensajero en muchos procesos de señalización intracelular, tanto en células animales como en vegetales.

El  $\text{Ca}^{2+}$  posee una localización específica en el ápice del tubo polínico y es absolutamente necesario para su crecimiento (Franklin-Tong *et al.*, 1993, 1997). La interacción entre PrsS-PrpS del mismo haplotipo, dispara una afluencia masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior del tubo polínico (Fig. 5B). El gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  localizado en el ápice del tubo se disipa relocalizándose en el vástago celular (Franklin-Tong *et al.*, 1993). Este flujo masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como segundo mensajero, señalizando un gran número de procesos fisiológicos que contribuyen, de esta manera, al cese del crecimiento apical del tubo polínico.

#### 1.4.1.1 La AI induce una cascada de señalización dependiente de $\text{Ca}^{2+}$ en el polen incompatible de *Papaver*.

Las señales de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  frecuentemente transducen la fosforilación de proteínas. La marcación de tubos polínicos incompatibles con  $\text{P}^{32}$  en forma de ortofosfato mostró un rápido aumento en la fosforilación de dos proteínas citosólicas de 26 kDa que fueron identificadas como pirofosfatasa soluble inorgánica (sPPasas) denominadas **Pr-p26.1a** y **Pr-p26.1b** (de Graaf *et al.*, 2006). Las pirofosfatasa son poco comunes en las células vegetales y podrían estar involucradas en el activo metabolismo celular necesario para el rápido crecimiento del tubo polínico. Las sPPasas hidrolizan pirofosfato inorgánico (PPi), un abundante subproducto de la biosíntesis de polímeros (Cooperman *et al.*, 1992); de esta manera, la actividad de las Pr-p26s aparece implicada en la biosíntesis de los polímeros de membrana plasmática y pared celular requerida para la extensión del ápice del tubo polínico. Las altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inhiben la actividad pirofosfatasa; por lo tanto, durante la respuesta de AI el flujo masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del tubo polínico actúa inhibiendo la biosíntesis de polímeros, contribuyendo así al arresto del crecimiento del polen (Fig. 5B).

Otras proteínas involucradas en la AI en *Papaver* son las proteínas quinasas activadas por mitógenos (**MAPKs**, *Mitogen-activated protein kinases*), las cuales se activan por fosforilación del motivo conservado TXY. En plantas, las MAPKs están involucradas en respuestas de estrés durante la interacción planta-patógeno (Innes, 2001; Hashimoto *et al.*, 2012) y en procesos de muerte celular programada (Yang *et al.*, 2001). Ensayos de actividad quinasa en gel mostraron la activación de una proteína de 56 kDa (p56) en extractos de tubos polínicos incompatibles 10 minutos después de la inducción *in vitro* de la AI (Rudd *et al.*, 2003). Inhibidores como apigenina y la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos demostraron que p56 tiene actividad del tipo MAPK. Sin embargo **p56-MAPK** alcanzó su

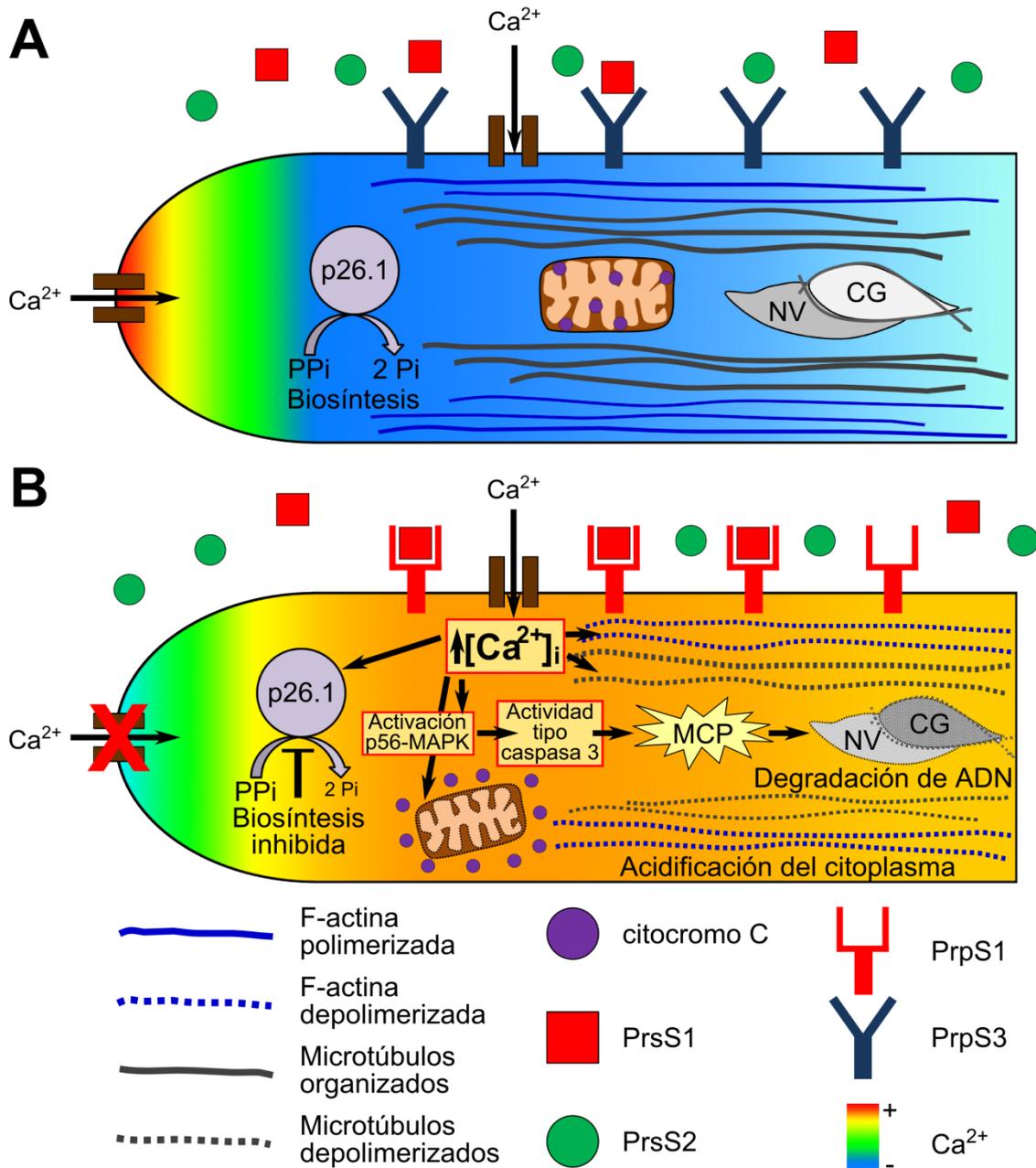
pico de actividad mucho tiempo después del cese del crecimiento del tubo polínico, lo que sugiere que la actividad sucede aguas abajo de los eventos iniciales del rechazo del polen incompatible (Rudd *et al.*, 2003) (Fig. 5B).

El citoesqueleto de F-actina de los tubos polínicos juega un rol muy importante en el crecimiento y es también uno de los principales blancos de la señalización frente a diversos estímulos externos. Experimentos de marcación empleando faloidina fluorescente, mostraron alteraciones en la configuración de los filamentos de actina de los tubos polínicos incompatibles (Geitman *et al.*, 2000). Cultivos de polen tratados con el ionóforo de calcio A23187 y mastoparín (drogas que artificialmente incrementan las concentraciones de  $Ca^{2+}_i$ ) mostraron alteraciones en el citoesqueleto de actina similares al fenotipo de los tubos polínicos desafiados *in vitro* con la proteína recombinante PrsS (Staiger & Franklin-Tong, 2003). Estos resultados indican que la alteración del gradiente de  $Ca^{2+}$  producido en la interacción incompatible activa una cascada de señales que lleva a la depolimerización de la F-actina.

#### 1.4.1.2 Dinámica del citoesqueleto de actina y su rol en la AI.

La apoptosis o **muerte celular programada** (MCP; en inglés PCD, *Programmed Cell Death*) es un proceso altamente conservado en organismos eucariotas que elimina células no deseadas (Thomas & Franklin-Tong, 2004). La MCP está caracterizada por una **fase de iniciación**, que involucra una cascada de señales que preparan a la célula para la **fase de ejecución**, donde ocurre una degradación general organizada que termina en la muerte celular. Los procesos de MCP han sido caracterizados por la alteración de la permeabilidad de las mitocondrias y la posterior liberación de citocromo C dentro del citoplasma, la activación de caspasas y la degradación del ADN nuclear. Numerosos estudios en células animales y levaduras han demostrado que los cambios en el citoesqueleto de actina pueden iniciar procesos de apoptosis. La alteración de la F-actina en tubos polínicos de *Papaver* inducida por una versión recombinante de PrsS, estimuló la liberación de **citocromo C** (Thomas & Franklin-Tong, 2004), la activación de proteínas de tipo **caspasa 3** y la **fragmentación de ADN nuclear** (Fig. 5B) (Thomas & Franklin-Tong, 2004; Thomas *et al.*, 2006; Bosch & Franklin-Tong, 2007). Las drogas Jasplakinolido (Jasp) y Latrunculina B (LatB), agentes que estabilizan y depolimerizan la F-actina respectivamente, produjeron efectos similares a la inducción *in vitro* de la AI. Estos estudios demostraron que los cambios en la dinámica de los

filamentos de actina son suficientes *per se* para iniciar la MCP en el polen incompatible de *Papaver*. La figura 5 detalla los eventos descritos para el sistema de AIG señalizada por  $Ca^{2+}$ .



**Figura 5. Eventos celulares y moleculares del sistema de AIG dependiente de  $Ca^{2+}$ .** (A) Durante la polinización compatible, PrsS1 y PrsS2 no interactúan con PrpS3; el tubo polínico mantiene altos niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  en el ápice que mantiene la actividad normal de la pirofosfatasa (sPPasa). La actividad p26.1 permite la continuidad de la biosíntesis de los polímeros de membrana plasmática y pared celular requeridos para la extensión del ápice. Los microtúbulos y los filamentos de actina permiten la migración de vesículas, organelas y de los núcleos espermáticos al ápice, sosteniendo de esta manera el crecimiento polar. (B) Durante la polinización incompatible, PrsS1 interactúa con PrpS1. Esta interacción resulta en una rápida disminución de  $[Ca^{2+}]_i$  en el ápice y un masivo flujo de  $[Ca^{2+}]_i$  hacia el interior del tubo polínico. La alteración del gradiente de  $Ca^{2+}$  dispara la depolimerización de la F-actina y de los microtúbulos; y la fosforilación de sPPasa, resultando en la inhibición de su actividad y el detenimiento de la actividad de biosíntesis. Posteriormente se activa la MAPK, desencadenando la liberación de citocromo C y la acidificación del citosol. Finalmente, la activación de enzimas de tipo caspasa 3 que resultan en la fragmentación del ADN y el desmantelamiento celular, en un proceso característico de MCP. Adaptado de Franklin-Tong, (2008).

#### 1.4.2. AIG dependiente de S-RNasas.

Las S-RNasas fueron identificadas hace unos 25 años como glicoproteínas abundantes del pistilo de *Nicotiana glauca*. Anderson *et al.*, (1986) clonaron el primer ADNc del locus *S* del pistilo que cosegregaba con el genotipo *S*. La proteína codificada por este ADNc fue nombrada S-RNasa por sus dominios semejantes a la ribonucleasa T2 de *Aspergillus* y por su actividad ribonucleasa (McClure *et al.*, 1989). Las S-RNasas contienen una señal de secreción que las deposita en altas concentraciones en la matriz extracelular del tejido de transmisión del pistilo, son expresadas exclusivamente en el estilo y su producción aumenta a medida que progresan los períodos de maduración de la flor. A nivel molecular, las S-RNasas se han caracterizado en los géneros *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum* (Solanáceas), *Antirrhinum* (Plantagináceas), *Prunus* y *Pyrus* (Rosáceas) (Cruz-García *et al.*, 2003; Iwano & Takayama, 2012). El análisis de las secuencias de los alelos de S-RNasas mostró que estos poseen cinco **regiones conservadas** (C1 - C5) y dos regiones altamente divergentes denominadas **regiones hipervariables** (HVa y HVb) (Ioerger *et al.*, 1991). Enfoques similares fueron utilizados para identificar las cinco regiones conservadas (C1, C2, C3, RC4 y C5) y la única región hipervariable (RHV) en las S-RNasas de Rosáceas (Ishimizu *et al.*, 1998; Ma & Oliveira, 2002). El análisis de su estructura proteica estableció que las regiones HV de las S-RNasas residen en la superficie, donde podrían interactuar con su contraparte del polen (Ida *et al.*, 2001). Aunque existen diferencias estructurales entre las S-RNasas de *Pyrus* con respecto a la de las otras familias, las evidencias sugieren que los genes derivan de un ancestro común. De hecho, la AI basada en S-RNasas pudo haber surgido muy tempranamente de un ancestro común al 75% de las dicotiledóneas (Igic & Kohn, 2001).

Experimentos de transgénesis mostraron que el factor S-RNasa es el único agente determinante de la especificidad *S* en el pistilo. La transformación en plantas híbridas del género *Nicotiana* con el gen *S<sub>A2</sub>-RNasa* produjo una “ganancia de función” que causó el rechazo del polen de haplotipo *S<sub>A2</sub>* (Murfett *et al.*, 1994). Resultados similares han sido obtenidos en especies de *Petunia inflata* (Lee *et al.*, 1994) y *Solanum chacoense* (Matton *et al.*, 1997). Las regiones hipervariables tienen un rol importante en el reconocimiento. En *Solanum chacoense*, *S<sub>13</sub>-RNasa* difiere de *S<sub>11</sub>-RNasa* sólo en 10 aminoácidos, cuatro de los cuales están localizados en la región hipervariable. Las plantas de *Solanum S<sub>12</sub>S<sub>14</sub>* transformadas con el alelo quimérico *S<sub>11</sub>* (que tenía sustituido sus cuatro aminoácidos de la región hipervariable por los de *S<sub>13</sub>*) adquirieron la capacidad de rechazar al polen *S<sub>13</sub>*. Este resultado demuestra que las regiones hipervariables, al menos en algunos casos, controlan la

especificidad de los alelos y también definen a los distintos haplotipos. Sin embargo, experimentos de intercambio de dominios de S-RNasa demostraron que las regiones HV no siempre son suficientes para el rechazo, sugiriendo que otras regiones de la S-RNasa estarían involucradas en el reconocimiento (Zurek *et al.*, 1997; Ishimizu *et al.*, 1998). Además del reconocimiento, la S-RNasa también participa en el mecanismo de rechazo degradando el ARN del tubo polínico incompatible (McClure *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1994). Estos resultados constituyen la base del **modelo citotóxico** de AI en Solanáceas, Rosáceas y Plantagináceas. En este modelo, la S-RNasa tiene una función dual actuando como proteína de reconocimiento y como inhibidor del crecimiento del polen incompatible.

El factor de especificidad del polen, la proteína **SLF** (*S-Locus F-Box*), ha sido identificada en la especie *Petunia inflata* mediante el secuenciamiento de una extensa región de ADN genómico del locus *S* (Zhou *et al.*, 2003). Muchos trabajos han reportado que las mutaciones que afectan al polen producen un fenotipo autocompatible (AC; del inglés SC, *Self-compatible*) a través del efecto del polen heteroalélico (**HAP**, *Heteroallelic pollen*). En este fenómeno, llamado **interacción competitiva**, el polen diploide heteroalélico puede fecundar plantas del mismo genotipo *S*. Por ejemplo, en plantas tetraploides, los pistilos  $S_1S_1S_2S_2$  rechazan al polen normal  $S_1$  o  $S_2$  o al polen homoalélico  $S_1S_1$  o  $S_2S_2$  pero aceptan al polen heteroalélico  $S_1S_2$  (de Nettancourt, 1977). Experimentos de interacción competitiva en plantas de *Petunia* de genotipo  $S_1S_1$ ,  $S_1S_2$  y  $S_2S_3$  transformadas con el alelo *PiSLF<sub>2</sub>* demostraron que esta proteína es el factor determinante del polen en la AI. El factor SLF se expresa específicamente en polen y su expresión aumenta con la maduración de la antera (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 durante el rechazo del polen incompatible. El gen *SLF* también ha sido estudiado en otras especies como *Antirrhinum hispanicum* (Qiao *et al.*, 2004) y varias especies del género *Prunus* (Takayama & Isogai, 2005).

La S-RNasa secretada a la matriz extracelular del tejido de transmisión es posteriormente internalizada dentro del tubo polínico en su trayecto hacia el ovario (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006), de esta forma la interacción polen-pistilo sucede en el interior del tubo polínico, aunque su localización subcelular aún es desconocida.

#### 1.4.2.1. Sistema de AIG en Rosáceas.

En la última década se han realizado también grandes avances en el mecanismo de AI de la familia Rosáceas, tanto a nivel celular como molecular. A partir de un sistema de cultivo de polen *in vitro*, se ha comenzado a descifrar la cascada de señales que ocurre durante el rechazo del polen incompatible. En este sistema, la S-RNasa purificada de estilos de *Pyrus* inhibió la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico del mismo haplotipo (Zhang & Hiratsuka, 1999). El sistema *in vitro* permitió demostrar que durante el rechazo del polen, la S-RNasa exógena altera la localización de las especies reactivas de oxígeno (**ROS**, *reactive oxygen species*) del ápice del tubo polínico (Wang *et al.*, 2010) y el gradiente de  $Ca^{2+}$  (Qu *et al.*, 2007). Estas alteraciones provocadas por las S-RNasas, desencadenaron la depolimerización de la F-actina de los tubos polínicos incompatibles (Liu *et al.*, 2007) que en última instancia, fue suficiente para desencadenar procesos de MCP, como la liberación de citocromo C en el citoplasma y la degradación del ADN nuclear, detectado mediante ensayos de TUNEL (Wang *et al.*, 2009). Todos estos cambios sucedieron antes del arresto del tubo polínico, sugiriendo que estos procesos son la causa y no la consecuencia del rechazo del polen incompatible de *Pyrus* (Wang & Zhang, 2011). Estos resultados son idénticos a los eventos descritos en el sistema de Papaveráceas, sugiriendo que los distintos sistemas de AI podrían compartir algunos mecanismos que producen el rechazo del polen incompatible.

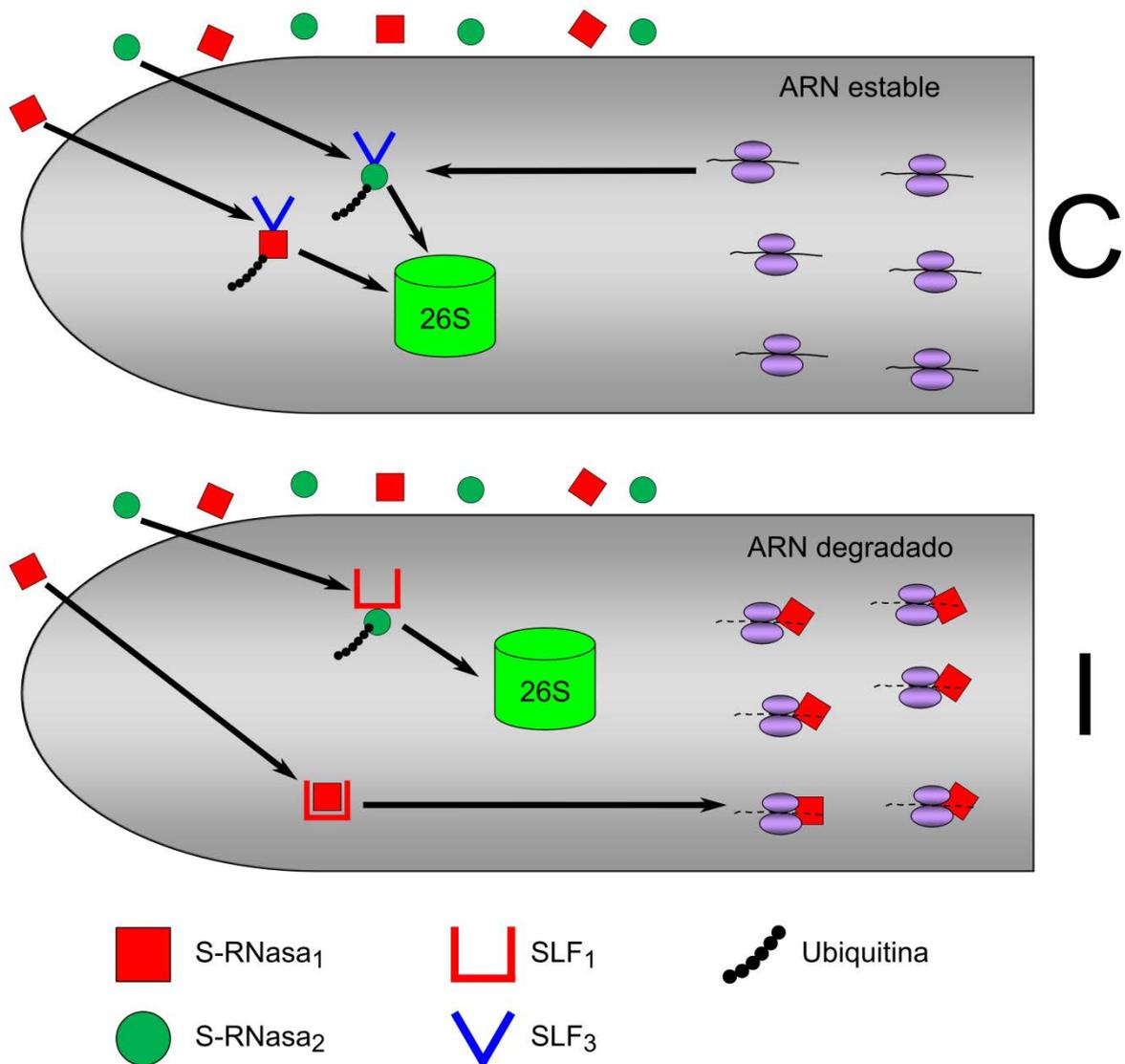
#### 1.4.3. Los factores no ligados al locus S del sistema de AI dependiente de S-RNasas.

Existen amplias evidencias de que la expresión de la S-RNasa en el pistilo y de SLF en el polen no es suficiente para la manifestación de la AI. Existen otros factores expresados en el pistilo que no están ligados al locus S ni relacionados con la especificidad en el reconocimiento polen-pistilo, pero que resultan indispensables para el rechazo del polen incompatible (McClure & Franklin-Tong, 2006). En *Nicotiana alata*, se conocen al menos tres factores, **HT-B**, **120K** y **4936** cuya función específica es desconocida hasta el momento. El factor 120K es una glicoproteína de tipo arabinogalactano que se une con la S-RNasa *in vitro* y que también interactúa con proteínas del polen. Plantas transgénicas con un ARN de interferencia específico que suprimió la expresión de 120K no fueron capaces de rechazar el polen del mismo haplotipo (Hancock *et al.*, 2005). Este resultado demostró que 120K tiene un rol directo en la respuesta de AI. El factor HT-B es una pequeña proteína rica en asparragina

expresada en los períodos tardíos del desarrollo del pistilo. Las plantas con haplotipo *S<sub>C10</sub>-RNasa* transformadas con una secuencia de HT-B antisentido, mostraron una expresión reducida de HT-B y tampoco fueron capaces de rechazar polen de haplotipo *S<sub>C10</sub>*, aún en presencia de la S-RNasa del mismo haplotipo (McClure *et al.*, 1999). Por último, la mutación natural en el factor 4936, del cual se desconoce su naturaleza química, produce una falla en el sistema de AI, que determina un fenotipo AC (Goldraij *et al.*, 2006).

### 1.5. Modelos de AI dependiente de S-RNasas.

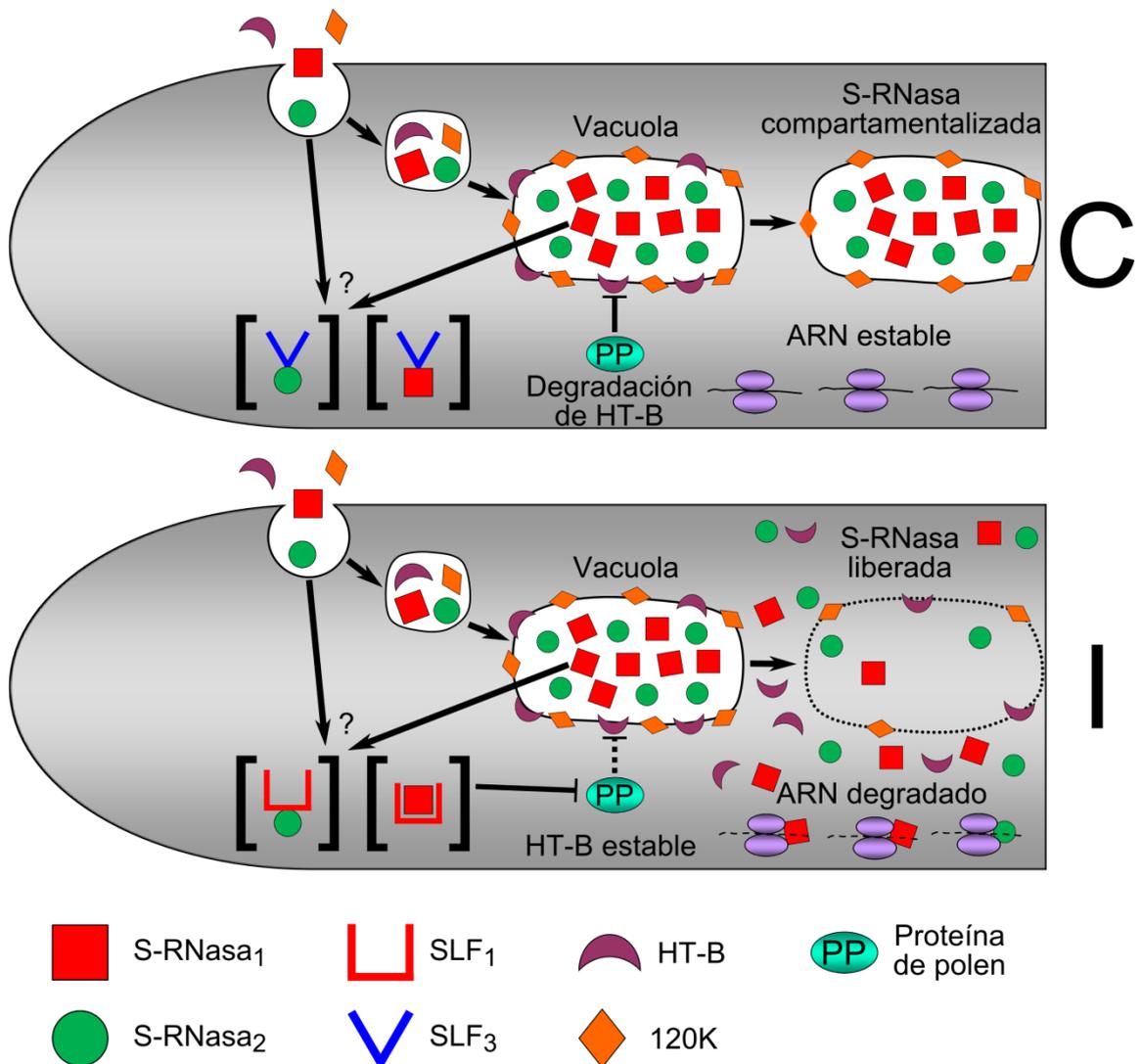
Dado que la S-RNasa ingresa al interior del tubo polínico, tanto en polinizaciones compatibles o incompatibles (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006), resulta necesario explicar la forma en que el polen compatible evade el efecto citotóxico promovido por la S-RNasa. Existen dos modelos que explican el control ejercido sobre las S-RNasas en las polinizaciones compatibles. **El modelo de degradación de S-RNasas** postula que en un cruzamiento compatible, la interacción entre las proteínas S-RNasa y SLF de distinto haplotipo (interacción inespecífica) produce la ubiquitinación de las S-RNasas y su posterior degradación mediada por el proteosoma 26S en el citoplasma del tubo polínico (Ushijima *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2008). De esta manera el tubo polínico conserva estable el ARN y progresa hasta el ovario (Fig. 6). 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 tubo polínico y rechazarlo (Fig. 6). Las principales evidencias que apoyan este modelo son ensayos de coimmunoprecipitación y sistemas de doble híbrido en levaduras que demostraron la interacción *in vitro* entre SLF y S-RNasa de *Antirrhinum* (Qiao *et al.*, 2004) y la interacción entre SLF y proteínas que integran la maquinaria de ubiquitinación (Hua & Kao, 2006). Sin embargo, aún no se han obtenido evidencias contundentes de la degradación de las S-RNasas en cruzamientos compatibles, 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 SI. La figura 6 detalla los eventos descriptos para el modelo de degradación de S-RNasas.



**Figura 6. Eventos moleculares en el modelo de degradación de S-RNasas.** Durante la polinización compatible (C) las S-RNasa<sub>1</sub> y S-RNasa<sub>2</sub> interactúan de manera inespecífica con SLF<sub>3</sub>. Esta interacción ubiquitina las S-RNasas, permitiendo su degradación mediada por el proteosoma 26S, manteniéndose de esta forma la integridad del ARN del tubo polínico. Durante la polinización incompatible (I) la S-RNasa<sub>1</sub> interactúa de manera específica con SLF<sub>1</sub>. Esta interacción previene la ubiquitinación; consecuentemente las S-RNasas permanecen estables y activas para degradar el ARN del tubo polínico y rechazarlo. Adaptado de McClure *et al.*, (2011).

**El modelo de compartimentalización** se basa en hallazgos recientes en *Nicotiana alata*. Mediante experimentos de inmunocitoquímica, se demostró que la S-RNasa internalizada por el tubo polínico es almacenada en vacuolas (Goldraj *et al.*, 2006). En 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 el ARN del tubo polínico de la acción citotóxica de la S-RNasa. Por el contrario, en 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 vacuolar el cuál permanece estable en las polinizaciones compatibles pero no en las incompatibles. Contrariamente, HT-B permanece estable sólo en las polinizaciones incompatibles, y posiblemente actúa mediando la desorganización del tonoplasto en el polen rechazado (Goldraij *et al.*, 2006; Goldraij *et al.*, 2012).



**Figura 7. Eventos moleculares en el modelo de compartimentalización de S-RNasas.** Durante la polinización compatible (C) las S-RNasa<sub>1</sub> y S-RNasa<sub>2</sub> interactúan de manera inespecífica con SLF<sub>3</sub>. El tubo polínico evita la acción citotóxica al degradar a HT-B mediante una proteína hipotética de polen (PP). Las S-RNasas permanecen compartimentalizadas en la vacuola. Durante la polinización incompatible (I) la S-RNasa<sub>1</sub> interactúa de manera específica con SLF<sub>1</sub>. Esta interacción mantiene estable a HT-B (tal vez mediante la inhibición del factor PP). El compartimento vacuolar se desorganiza, liberando a las S-RNasas y otros componentes de la vacuola al citoplasma. La degradación del ARN sería un paso irreversible en el rechazo del tubo polínico. Adaptado de Goldraij *et al.*, (2006).

Las funciones específicas de HT-B y 120K aún son desconocidas; estas proteínas no serían requeridas para el ingreso de la S-RNasa al interior del tubo polínico (Goldraj *et al.*, 2006), y tampoco intervienen en el reconocimiento del polen (Hancock *et al.*, 2005). 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 el mecanismo de autoincompatibilidad.

## **2. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS.**

Esta tesis está enfocada en el sistema de AI dependiente de S-RNasas, tomando como modelo de estudio a *Nicotiana alata* (Link & Otto), una especie de la familia Solanáceas. Esta especie ha sido utilizada desde hace varias décadas como planta modelo en estudios de genética clásica del mecanismo de la AIG (East & Yarnell, 1929). Desde hace unos 25 años ha servido también como modelo para el estudio a nivel molecular de dicho mecanismo (McClure *et al.*, 2011). En los últimos años ha habido considerables progresos en la identificación de los factores moleculares involucrados en la maquinaria de AI de *N. alata*. Sin embargo, la diversidad alélica del locus *S* es muy poco conocida comparada con otras especies de Solanáceas ya que al comienzo de este trabajo no se habían explorado poblaciones naturales de esta especie (Raspe & Kohn, 2007). Las poblaciones naturales resultan útiles para investigar la variabilidad del locus *S*, porque contienen un gran número de alelos. Otra ventaja de las poblaciones naturales es que la fuerza de la respuesta de AI puede variar, llegando a presentarse individuos AC dentro de una especie AI (Tsukamoto *et al.*, 1998, 2003 a y b; Stone *et al.*, 2006). Estos tipos de individuos resultan interesantes para estudiar “mutantes” naturales que contribuyen a revelar la compleja maquinaria de AI dependiente de S-RNasas. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en las familias Papaveráceas y Rosáceas, y en contraste con los progresos a nivel molecular, en Solanáceas aún no está dilucidada la sucesión de eventos subcelulares que conducen al rechazo del polen incompatible (McClure, 2006).

En esta tesis, se propuso abordar algunas de estas áreas aún no exploradas del fenómeno de AI. **El objetivo general** es profundizar el conocimiento a nivel subcelular y molecular de los mecanismos que producen la respuesta de AI en *N. alata*. Los resultados obtenidos contribuyen a clarificar los mecanismos que conducen al rechazo del tubo polínico incompatible. A nivel general, es importante destacar desde un punto de vista agronómico, que el conocimiento de las barreras que actúan en la reproducción sexual constituye una de las bases necesarias para el mejoramiento de especies cultivadas y para la producción de granos y frutos.

En este marco, se plantean los siguientes objetivos específicos e hipótesis de trabajo:

**2.1. Estudiar la diversidad alélica de las S-RNasas del locus *S* en una población natural de *Nicotiana alata*.** Resulta importante caracterizar la variabilidad alélica del locus *S* para comprender las bases moleculares del reconocimiento y el mecanismo bioquímico del rechazo del polen incompatible (Ioerger *et al.*, 1991). La variabilidad de alelos *S* ha sido bien caracterizada en los géneros *Petunia*, *Solanum*, *Physalis*, *Witheringia* y *Lycium*, especies que

están dentro de la familia Solanáceas. En el género *Nicotiana* hay muy pocas *S-RNasas* caracterizadas debido a la falta de estudios en poblaciones naturales. De esta manera, *Nicotiana* muestra una escasa variabilidad de haplotipos en el locus *S* comparada con otras Solanáceas. El estudio de la genealogía del locus *S* resulta útil para inferir la historia demográfica de los linajes, analizar la transición de los sistemas de reproducción, comprender los aspectos propios de la evolución del locus *S* y la historia filogenética del mecanismo de AI (Kohn, 2008). En este objetivo se propone:

- Identificar nuevas S-RNasas de una población natural de *N. alata*.
- Analizar la expresión y ensayar la funcionalidad de las nuevas S-RNasas identificadas.
- Establecer las relaciones filogenéticas entre las nuevas S-RNasas de *N. alata* y las S-RNasas de otras especies de Solanáceas previamente identificadas.

**2.2. Estudiar la dinámica del citoesqueleto de F-actina en polinizaciones compatibles e incompatibles.** El rol del citoesqueleto de actina durante la respuesta de AI ha sido extensivamente estudiado en *Papaver* y *Pyrus*, especies con mecanismos de AIG diferentes al que opera en *N. alata*. En estas especies, estudios *in vitro* han establecido que una de las primeras alteraciones es la rápida y masiva depolimerización de la F-actina del tubo polínico incompatible. La depolimerización de F-actina actúa como señal para desencadenar procesos de MCP (Thomas *et al.*, 2006). Estos procesos en su conjunto llevan al arresto del crecimiento del polen y posteriormente a la muerte celular. La dinámica de la F-actina en el rechazo del polen también ha sido investigada en Brasicáceas, una familia que presenta AIE (Iwano *et al.*, 2007). En *N. alata* se desconoce del rol de la F-actina durante el rechazo del polen incompatible y los eventos que conducen al rechazo han sido considerablemente menos estudiados. En este objetivo se propone:

- Diseñar un sistema de marcación de F-actina *in planta* y analizar la integridad de los filamentos de actina de las polinizaciones compatibles e incompatibles.
- Estudiar los cambios subcelulares que se producen durante la respuesta de AI y analizar la secuencia temporal de estas alteraciones, haciendo hincapié en la integridad del citoesqueleto de F-actina y el sistema de membranas de las vacuolas.

**2.3. Diseñar un sistema experimental para el estudio *in vitro* de la reacción de autoincompatibilidad.** El crecimiento del tubo polínico es un componente esencial en la reproducción sexual de las plantas y el estudio de su metabolismo es crítico para entender la naturaleza y la regulación de la reproducción (Eberle *et al.*, 2012). Los cultivos de polen *in vitro* ofrecen un sistema rápido y sencillo que facilita la investigación de los fenómenos celulares y moleculares involucrados en el desarrollo del tubo polínico. En *Papaver* y *Pyrus*, los factores involucrados en el mecanismo de la AI y los eventos del rechazo del polen incompatible han sido estudiados a partir de cultivos de polen *in vitro*, desafiando a los tubos polínicos con el factor *S* femenino (la proteína PrsS recombinante en *Papaver* y la S-RNasa purificada de estilo en *Pyrus*). En *Nicotiana* existen reportes previos de cultivos de polen *in vitro* desafiados con S-RNasas purificadas (Anderson *et al.*, 1989; Jahnen *et al.*, 1989). Pero estos trabajos no pudieron reproducir el rechazo del polen incompatible. En ese momento se desconocía la existencia de los factores no ligados al locus *S* producidos en el pistilo que resultan indispensables para el funcionamiento de la maquinaria de rechazo. Por el momento, en *Nicotiana* no existe un sistema *in vitro* que refleje el rechazo del polen incompatible mediante el mecanismo de AI. En este objetivo se propone:

- Establecer un sistema de cultivo de polen *in vitro* y desafiar a los tubos polínicos con extractos de proteínas de estigma-estilo compatible e incompatible.
- Estudiar la integridad del citoesqueleto de F-actina y la dinámica del tráfico vesicular durante el desarrollo de los tubos polínicos desafiados con los extractos de proteínas.
- Establecer un orden temporal de los eventos y las alteraciones que suceden durante el rechazo del polen cultivado *in vitro*.

**3. OBJETIVO 1. Estudiar la diversidad alélica de las S-RNasas del locus *S* en una población natural de *Nicotiana glauca*.**

### **3.1. Introducción.**

Dentro de las Angiospermas, más de la mitad de las aproximadamente 250.000 especies muestran algún tipo de sistema de AI (de Nettancourt, 2001). Esto quiere decir que existe en la naturaleza una presión considerable para evitar la endocria y mantener la diversidad genética. En Solanáceas, el sistema de AI es gametofítico (AIG) (McClure *et al.*, 2011); esto significa que el fenotipo del tubo polínico (compatible/incompatible) que crece a través del estilo está determinado por su propio genotipo haploide. Como ya se indicó en la Introducción General, el rechazo de polen se produce cuando el haplotipo *S* expresado en el tubo polínico haploide coincide con cualquiera de los dos haplotipos *S* expresados en el pistilo diploide. El sistema de AI está genéticamente determinado por el locus *S* que controla la especificidad del reconocimiento polen-pistilo. El locus *S* tiene al menos dos genes bien estudiados que codifican los factores de especificidad que son selectivamente expresados en polen y pistilo. Una de las características más sobresalientes del sistema de AI es que el locus *S* es altamente polimórfico. Ambos genes (*S-RNasa* y *SLF*) son multialélicos y se heredan como una única unidad de segregación. De esta forma, cada par de alelos define un haplotipo para el locus *S*.

La investigación fundamental sobre las bases moleculares del sistema de AI en Solanáceas se llevó a cabo principalmente en plantas de *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum* como modelos experimentales. Los primeros reportes demostraron que la S-RNasa es el factor que confiere la especificidad para el reconocimiento polen-pistilo (McClure *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994) y también el agente citotóxico en el proceso de rechazo del polen, mediante la degradación del ARNm del tubo polínico incompatible (McClure *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1994). Por otro lado, el factor de especificidad del polen es codificado por el gen SLF, que ha sido identificado y clonado en *Petunia* (Sijacic *et al.*, 2004). Recientemente, se ha informado de varios candidatos ortólogos de SLF en *Nicotiana* (Wheeler & Newbigin, 2007). Para poder interactuar con SLF, la S-RNasa es internalizada tanto en tubos polínicos incompatibles como en compatibles (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006), aunque la naturaleza y la localización de la interacción S-RNasa-SLF aún es desconocida.

Un tema que adquirió mucha importancia en biología evolutiva es el polimorfismo que se presenta en algunos loci. La diversificación alélica subyace en muchos fenómenos biológicos importantes tales como la resistencia a enfermedades y las reacciones inmunológicas (Lu, 2006). Los sistemas de AI han atraído la atención de los genetistas de poblaciones desde el descubrimiento del polimorfismo del locus *S* descrito por Emerson (1939) en poblaciones naturales de *Oenothera organensis*. El polimorfismo extremo que

presenta el locus *S* es originado y mantenido por distintos procesos de selección (Richman, 2000). La **selección balanceada** es un tipo de selección natural que contribuye activamente a mantener el polimorfismo del locus *S*. Los alelos del locus *S* están sometidos a un tipo de selección balanceada conocida como **selección dependiente de frecuencia negativa** (Igic *et al.*, 2007). En este tipo de selección, la tasa de reproducción de un fenotipo es grande cuando el mismo se presenta en menor frecuencia y decrece cuando el fenotipo es más común. En los sistemas de AI, la selección dependiente de frecuencia negativa incrementa enormemente la persistencia del polimorfismo en el locus *S* (Igic *et al.*, 2007); esto se debe a que las plantas que producen polen de un genotipo *S* poco frecuente tienen más posibilidades de fertilizar que aquellas plantas de genotipos más frecuentes. Con el paso de las generaciones, el alelo originalmente raro aumenta su frecuencia y se alcanza un estado de **isopletería**, en el cual los alelos tienen la misma frecuencia dentro de la población. En los últimos años se realizaron grandes avances en el campo de la biología evolutiva, estudiando el polimorfismo del locus *S* en distintas poblaciones naturales. Los estudios de genealogía realizados fueron utilizados para inferir la historia demográfica de los linajes del locus *S* (Takahata, 1990), las transiciones desde sistemas de AI a sistemas de AC durante la divergencia de las especies y para deducir aspectos particulares de la evolución del locus *S* observado en algunas familias (Richman & Kohn, 2000). En todas las especies examinadas, los linajes de alelos *S* preceden al origen de las especies que los contienen. Este fenómeno conforma un patrón de **polimorfismo trans-específico**, consecuencia de la selección dependiente de frecuencia negativa (Ioerger *et al.*, 1990) que aumenta en gran medida la persistencia de polimorfismo del locus *S*, la cual se extiende más allá del tiempo esperado para la divergencia de las especies.

Los notables progresos realizados en los últimos 25 años a nivel celular, molecular y bioquímico del mecanismo de AI en el género *Nicotiana* fueron llevados a cabo en poblaciones de laboratorio. La AI es un carácter constitutivo de cada especie, pero a su vez es bastante plástica, dependiendo de manera importante de factores ambientales y fisiológicos (Mena-Alí & Stephenson, 2007). Por ello, no resulta extraño que la AI difiera considerablemente en las poblaciones naturales respecto a las poblaciones de laboratorio. En *Nicotiana*, no existen estudios del polimorfismo del locus *S* y, consecuentemente, la diversidad de alelos hallados en la base de datos es mucho menor, comparada con otras especies de Solanáceas que han sido objeto de esos estudios. Por este motivo, resulta muy apropiado investigar la diversidad alélica de *Nicotiana glauca* a partir de poblaciones naturales, que suelen contener un número importante de alelos *S*.

Las técnicas de PCR con *primers* basados en los dominios conservados de las S-RNasas ofrecen un método sencillo y eficaz para examinar sus variantes alélicas. Una investigación pionera siguiendo este enfoque fue descrita en *Solanum carolinense* (Richman *et al.*, 1995). También a partir de este análisis, nuevos alelos de S-RNasa han sido identificados y caracterizados en poblaciones naturales de *Petunia* y en otras especies de *Solanum*. Por ejemplo, 21 alelos S-RNasa fueron encontrados en *Petunia inflata* (Wang *et al.*, 2001), mientras que en *Solanum chilense* fueron identificados 34 alelos (Igic *et al.*, 2007). Las poblaciones naturales de otros géneros de Solanáceas como *Physalis* (Richman *et al.*, 1996; Lu, 2006), *Witheringia* (Stone & Pierce, 2005) y *Lycium* (Savage & Miller, 2006; Miller *et al.*, 2008) también fueron examinados y el número de alelos S identificados osciló entre 21 y 36.

Además de la gran diversidad de alelos, las poblaciones naturales muestran grandes diferencias en la robustez de la respuesta de AI entre sus individuos. En *Petunia* y *Solanum* se han descrito individuos AI y AC mezclados en la misma población natural (Tsukamoto *et al.*, 1999; 2003a; Kokubun *et al.*, 2006; Mena-Ali & Stephenson, 2007). Como se menciona más arriba, la respuesta de AI puede ser influenciada por condiciones ambientales como la temperatura, por la condición fisiológica de las flores (por ejemplo, la edad de maduración del estilo), por mutaciones que afectan directamente a la S-RNasa o por mutaciones en factores genéticos no ligados al locus S que pueden afectar la “fuerza” del rechazo del polen (Mena-Ali & Stephenson, 2007). Diversos mecanismos involucrados en el sistema de AI pueden comprometer el rechazo y volver a los individuos autocompatibles, estableciendo así un nuevo destino evolutivo en las especies. De esta manera, los individuos AC exhiben “mutaciones” que constituyen una herramienta valiosa para ayudar a descifrar la compleja maquinaria molecular que participa del rechazo del polen incompatible en el mecanismo de AI dependiente de S-RNasas (McClure, 2008).

El sistema de reproducción, la biología de la polinización y los mecanismos de rechazo del polen han sido estudiados en *Nicotiana alata* y sus parientes de la sect. *alatae* (Pandey, 1979; Murfett *et al.*, 1996; McClure *et al.*, 2000; Ippolito *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a la falta de estudios de diversidad alélica de las S-RNasas en poblaciones naturales, en *N. alata* se conocen pocos alelos de S-RNasa en comparación con otras Solanáceas. Además, algunos alelos de S-RNasa de esta especie han sido anotados con diferentes códigos en la base de datos (ej, *S<sub>7-</sub>* y *S<sub>C10</sub>-RNasa*) a pesar de tener iguales secuencias de aminoácidos. Otros números de acceso corresponden a S-RNasas, que no tienen un papel funcional claro como alelos S, como MS1 y MS2 (Kuroda *et al.*, 1994). No se puede

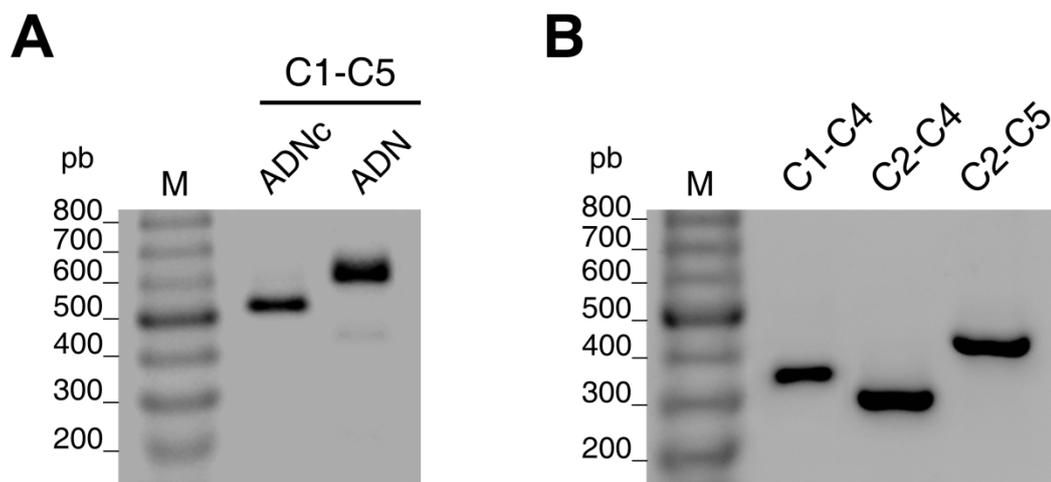
descartar que estas ribonucleasas puedan ser **genes parecidos a las S-RNasas** o **relictos de S-RNasas** no implicados en el funcionamiento de la AI, aunque a nivel de estructura primaria presentan una similitud muy alta con las S-RNasas funcionales (Green, 1994; Golz *et al.*, 1998). Estos genes han sido reportados en los pistilos de especies AC y AI de muchas familias de plantas (Green, 1994; Kao & Tsukamoto, 2004), incluyendo *N. alata* (Dodds *et al.*, 1996). Por lo tanto, la secuencia de ADN no es suficiente *per se* para confirmar de manera concluyente la funcionalidad de las *S-RNasas* en la AI. Los ensayos de funcionalidad son, entonces, importantes para identificar con claridad las S-RNasas funcionales (Igic *et al.*, 2007).

Como parte del análisis de la variación natural en el locus *S* de Solanáceas, el objetivo de esta sección del trabajo de tesis fue identificar y caracterizar nuevos alelos S-RNasa de la especie AI *N. alata* en una población natural localizada en el noreste de Argentina. Usando la estrategia de RT-PCR, se identificaron siete nuevas secuencias de *S-RNasa*. Mediante amplificaciones específicas para cada alelo se examinó el perfil de expresión de las nuevas S-RNasas en diferentes individuos de la población natural, en diferentes tejidos y en diferentes etapas del desarrollo estilar. Se efectuaron cruzamientos semicompatibles para establecer si las nuevas S-RNasas identificadas eran alelos *S* funcionales. Finalmente, se realizó un análisis filogenético para determinar la extensión del polimorfismo de las S-RNasas en *N. alata* y la distribución de las nuevas S-RNasas a través de los diferentes linajes *S* en Solanáceas.

### **3.2. Resultados.**

### 3.2.1. Identificación de las S-RNAs de una población natural de *Nicotiana alata*.

Para realizar el estudio de la diversidad alélica de la *S-RNasa* se diseñaron dos *primers* degenerados basados en las regiones conservadas C1 y C2 (*primers forward*) y dos *primers* degenerados basados en las regiones conservadas C4 y C5 (*primers reverse*) a partir de un apilamiento de aminoácidos de diferentes S-RNAs de distintas especies de Solanáceas. Los ensayos de RT-PCR utilizando distintas combinaciones de los *primers* mencionados amplificaron un único fragmento del tamaño esperado (Fig. 8). Los ensayos de PCR a partir de ADN genómico como templado amplificaron fragmentos aproximadamente 100 pb más grandes que los fragmentos de RT-PCR, sugiriendo la amplificación de genes de S-RNAs, los cuales poseen un único intrón de este tamaño (Fig. 8A y 8B). Estos resultados sugieren que los *primers* diseñados fueron capaces de reconocer y amplificar fragmentos de S-RNasa.



**Figura 8. Amplificaciones de secuencias de S-RNAs mediante PCR.** (A) La amplificación se llevó a cabo a partir de ADNc de estilo y ADN genómico, mediante RT-PCR y PCR genómica respectivamente. Los *primers* degenerados C1f-C5r o C1af-C5r (Tabla 6) fueron usados para amplificar los fragmentos C1-C5. El tamaño esperado para el ADNc fue de aproximadamente 500 pb (Ioerger *et al.*, 1991). El fragmento de ADN fue de aproximadamente 600 pb, consistente con la presencia de un intrón con un tamaño promedio de 100 pb en las S-RNAs de Solanáceas. (B) Usando el ADNc C1-C5 mostrado en A como templado, los fragmentos de PCR fueron amplificados con diferentes combinaciones de *primers* degenerados C1f, C2f, C4r y C5r (Tabla 1). El tamaño promedio esperado por fragmento fue 350 pb (C1-C4), 280 pb (C2-C4) y 420 PB (C2-C5). M, marcador molecular estándar.

Utilizando la combinación de *primers* C1-C5, los fragmentos de ADNc amplificados de los estilos de 12 individuos de la población natural de *N. alata* (Tabla 6 en Materiales y métodos, Fig. 8A) fueron clonados, clasificados mediante ensayos de digestión con enzimas de restricción y finalmente secuenciados. Para facilitar la lectura, llamaremos a estas secuencias candidatas a ser S-RNAs simplemente como "S-RNAs", aún cuando su

condición de tales solo puede ser confirmada de manera concluyente mediante ensayos de funcionalidad que se detallarán más adelante.

Tres de estas secuencias obtenidas fueron más de 99% idénticas a los alelos  $S_{C10}$ ,  $S_2$ , y  $S_6$ -RNasa, que fueron previamente caracterizados como alelos funcionales del sistema de AI (Anderson *et al.*, 1989; Murfett *et al.*, 1996). Una cuarta secuencia designada aquí  $S_63$ , fue casi idéntica a una ribonucleasa conocida con el nombre MS1 descrita por Kuroda *et al.*, (1994). Adicionalmente, seis nuevas secuencias de S-RNasas fueron denominadas  $S_5$ ,  $S_{27}$ ,  $S_{70}$ ,  $S_{75}$ ,  $S_{107}$  y  $S_{210}$ -RNasa. En algunos individuos se identificó sólo una secuencia de las dos esperadas para el locus  $S$ . En otras plantas, tres o incluso cuatro secuencias fueron identificadas (Tabla 1).

Tabla 1. S-RNasas identificadas en los estilos de la población NaM.

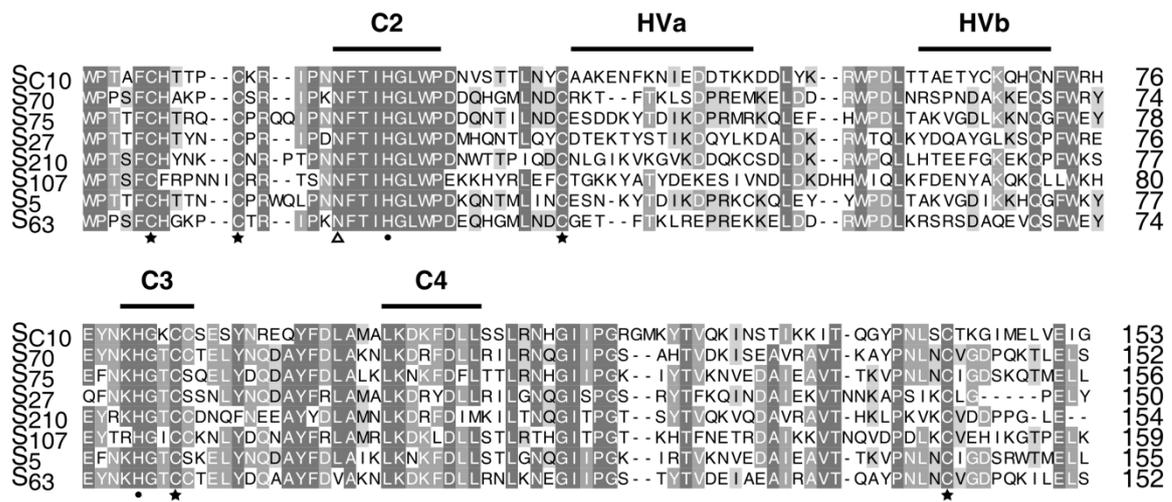
Individuos NaM	<sup>a, b</sup> S-RNasa (Fragmento C1-C5)
1	$S_5$ , $S_63$
2	$S_{C10}$
3	$S_5$ , $S_63$
4	$S_5$ , $S_{75}$ , $S_6$ , $S_63$
5	$S_{75}$ , $S_{70}$ , $S_63$
6	$S_5$ , $S_63$
7	$S_{C10}$ , $S_63$
8	$S_5$ , $S_63$
9	$S_2$
10	$S_{27}$
11	$S_{107}$
12	$S_{210}$ , $S_{107}$

<sup>a</sup> Los fragmentos C1-C5 fueron amplificados usando los pares de *primers* C1f-C5r (Individuos NaM 1-8) y C1af-C5r (individuos NaM 9-12) (ver Tabla 6 en Materiales y métodos). Los fragmentos amplificados de cada planta fueron clonados, secuenciados y comparados por BLASTn.

<sup>b</sup>  $S_{C10}$ -,  $S_2$ -, y  $S_6$ -RNasas fueron previamente caracterizados como alelos  $S$  funcionales en *N. alata*.

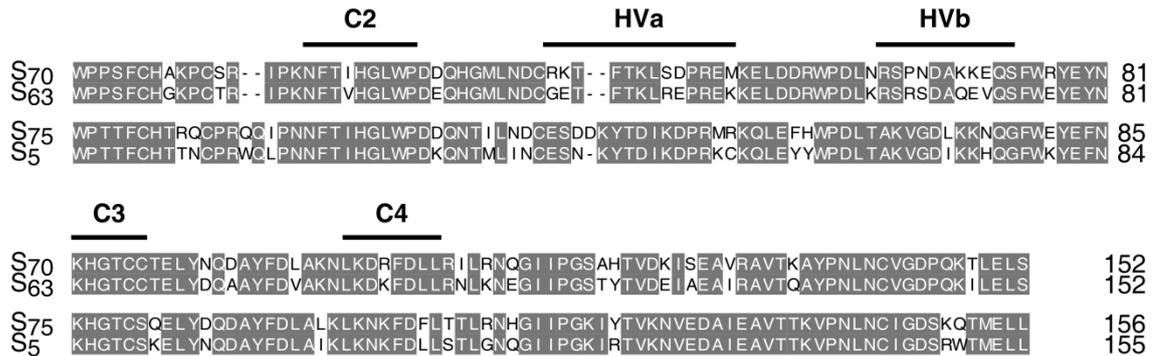
Como se espera que todos los individuos analizados sean heterocigotas para el locus  $S$ , la identificación de una sola secuencia en algunas plantas indicó que los *primers* conservados utilizados poseían una afinidad diferencial para cada una de las secuencias esperadas de las ribonucleasas.

Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento de los fragmentos C1-C5 amplificados, empleando al alelo funcional *S<sub>C10</sub>-RNasa* como referencia (Fig. 9). En Solanáceas, el fragmento C1-C5 (sin incluir la región de los primers C1f, C1af y C5r) representa aproximadamente el 70% del tamaño completo de las S-RNasas (Ioerger *et al.*, 1991). Todas las secuencias exhibieron la estructura primaria típica de una S-RNasa, mostrando los dominios conservados C2, C3, C4 y las regiones hipervariables HVa y HVb, situadas entre los dominios C2 y C3. También exhibieron otros rasgos típicos de las S-RNasas, tales como el sitio de glicosilación en el dominio C2, las cinco cisteínas conservadas incluidas entre los dominios C1 y C5, y los residuos de histidina, incluidos en los dominios C2 y C3, indispensables para la actividad catalítica de las ribonucleasas tipo T2 (MacIntosh, 2011). La identidad de aminoácidos entre las secuencias de las S-RNasas varió de un 40% a un 58%, con excepción de dos pares de secuencias que mostraron la identidad más alta de aminoácidos. El par *S<sub>70</sub>/S<sub>63</sub>* tenía una identidad del 81% y el par *S<sub>5</sub>/S<sub>75</sub>* tenía una identidad del 83%. En general, el grado de diversidad en las secuencias de S-RNasas de la población NaM fue similar a los valores previamente descritos por otros autores para distintas poblaciones de S-RNasas, la cual osciló entre 38-92% de identidad (Tsai *et al.*, 1992; Matton *et al.*, 1997; Kao & Tsukamoto, 2004).



**Figura 9. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las S-RNasas identificadas en la población natural NaM.** Los fragmentos alineados fueron amplificados con el par de *primers* C1f-C5r o C1af-C5r detallados en la Tabla 6. Se utilizó la secuencia de *S<sub>C10</sub>-RNasa* como referencia. Los aminoácidos fueron marcados en distintos tonos de grises de acuerdo al porcentaje de similitud. Los tres dominios conservados (C2, C3 y C4) y las dos regiones hipervariables (HVa y HVb) de las S-RNasas de Solanáceas están indicadas con líneas sólidas. Otras características de las S-RNasas son las cisteínas conservadas (estrellas), los residuos de histidina que participan en la actividad catalítica (puntos negros) y el sitio de glicosilación (triángulo).

Un alineamiento particular fue realizado entre los pares  $S_{70}/S_{63}$  y  $S_5/S_{75}$  (Fig. 10). Mientras que el par  $S_{70}/S_{63}$  tuvo la mayor variabilidad de aminoácidos en las regiones HVa y HVb, el par  $S_5/S_{75}$  mostró una distribución uniforme de la variabilidad de aminoácidos en toda la secuencia comprendida entre los dominios C1-C5, aunque con una pequeña concentración en la región HVa (Fig. 10). La Tabla 2 muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos de las siete S-RNasas obtenidas.



**Figura 10. Alineamiento de aminoácidos de los pares de S-RNasas  $S_{70}/S_{63}$  y  $S_{75}/S_5$ .** Los aminoácidos idénticos son mostrados en gris. Tres dominios conservados (C2, C3 y C4) y dos regiones hipervariables (HVa y HVb) de las S-RNasas de Solanáceas están indicadas por líneas sólidas.

**Tabla 2. Porcentaje de identidad entre las distintas S-RNasas.**

S-RNasas (Fragmentos C1-C5)	$S_5$	$S_{27}$	$S_{63}$	$S_{70}$	$S_{75}$	$S_{107}$	$S_{210}$
$S_5$	---	52.0	52.6	57.2	83.2	41.9	49.0
$S_{27}$		---	46.0	50.0	50.0	44.0	46.0
$S_{63}$			---	80.9	55.3	42.8	44.1
$S_{70}$				---	57.9	43.4	48.7
$S_{75}$					---	40.4	43.5
$S_{107}$						---	42.2
$S_{210}$							---

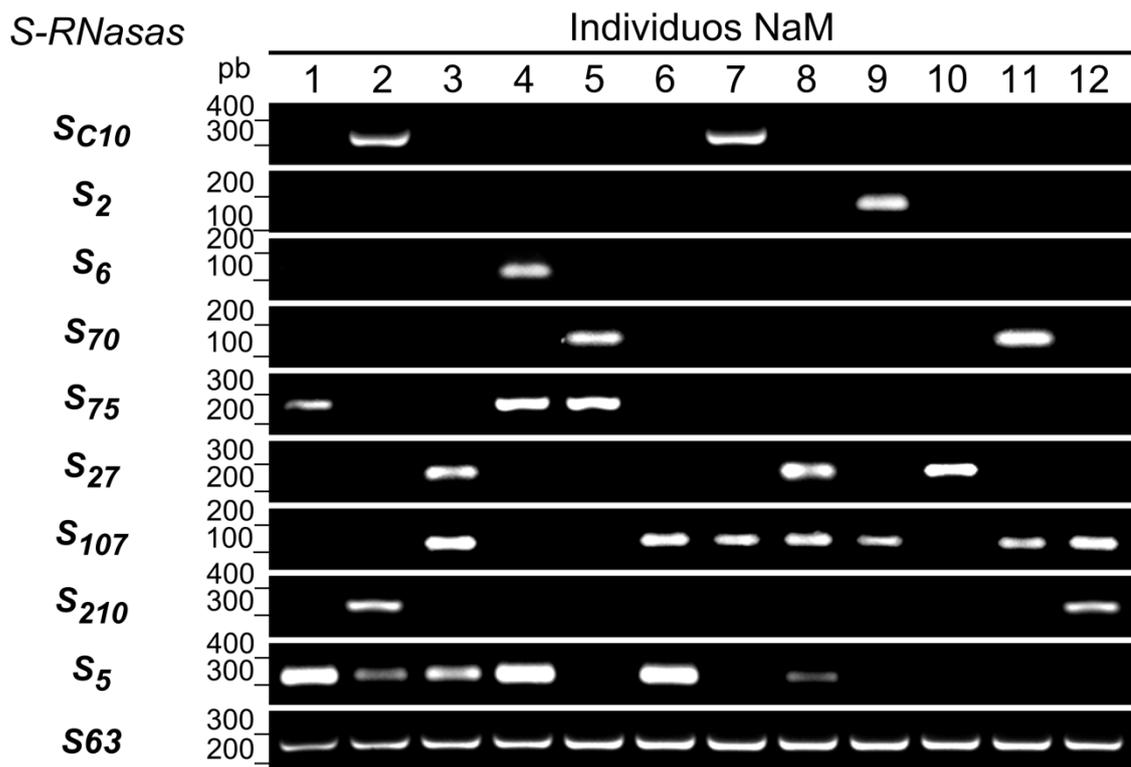
Aunque las secuencias mostraron características similares a las S-RNasas a nivel estructural, la identificación de más de una secuencia en algunas plantas sugirió que algunas de estas ribonucleasas podrían no ser funcionales para el sistema de AI. Para determinar de manera preliminar si las nuevas S-RNasas eran funcionales, se realizaron ensayos de expresión mediante RT-PCR de diferentes plantas de la población NaM. También se evaluó la

expresión relativa de todas las S-RNasas en diferentes tejidos y períodos de la maduración del estilo. Por último, para establecer la funcionalidad de manera concluyente, se llevaron a cabo cruzamientos semicompatibles controlados para asociar la segregación de los nuevos alelos junto con el fenotipo de AI. En todos estos experimentos, las S-RNasas fueron evaluadas en paralelo con la *S<sub>C10</sub>-RNasa*, un alelo *S* caracterizado previamente, con un fenotipo robusto de rechazo del polen incompatible (Murfett *et al.*, 1994).

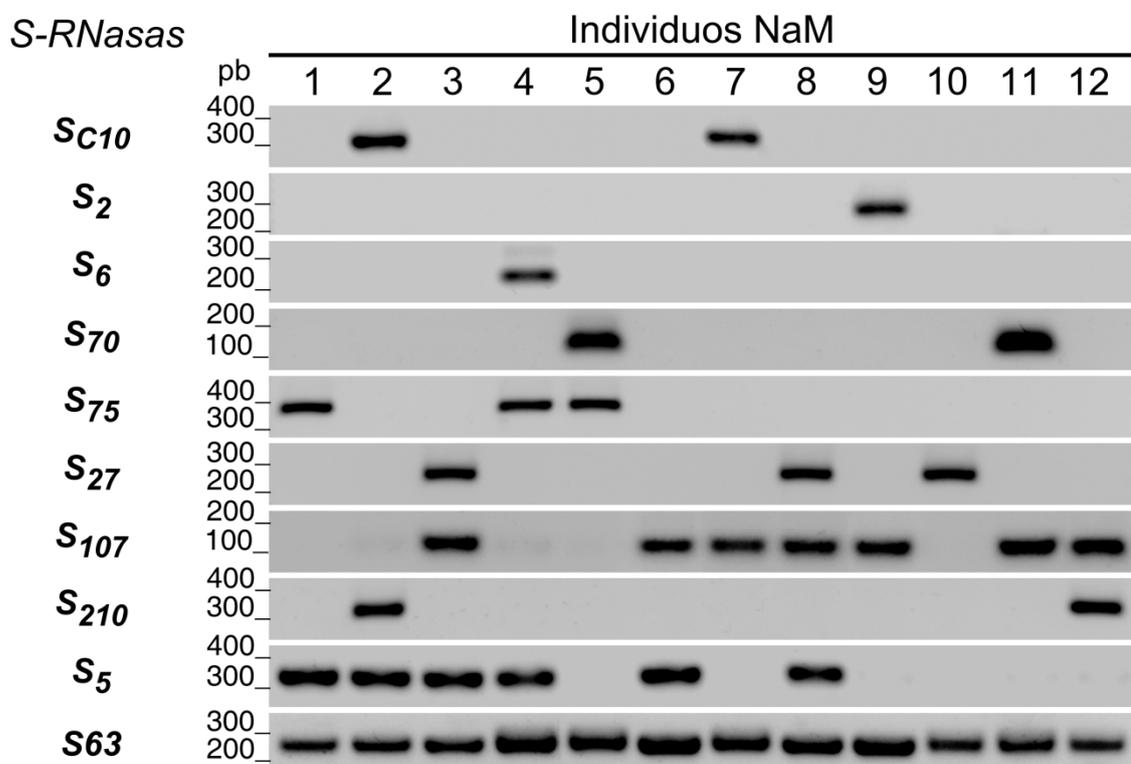
### 3.2.2. Especificidad de la expresión de las S-RNasas.

A partir de las secuencias obtenidas utilizando los *primers* degenerados, se diseñaron *primers* específicos para cada alelo, basados en las regiones hipervariables HVa y HVb (Tabla 6 y Fig. 18 en Materiales y métodos). Con los distintos pares de *primers* específicos para cada alelo se realizaron ensayos de RT-PCR en los 12 individuos de la población NaM. Cada par de *primers* amplificó un fragmento de ADNc del tamaño previsto (Fig. 11). Como se esperaba, los *primers* para *S<sub>C10</sub>-RNasa* revelaron una amplificación específica en las plantas NaM-2 y NaM-7, en consistencia con los resultados obtenidos mediante secuenciamiento de los fragmentos amplificados con los *primers* degenerados. De manera similar, las amplificaciones con los *primers* para *S<sub>2</sub>* y *S<sub>6</sub>-RNasa* presentaron una única banda en las plantas NaM-9 y NaM-4 respectivamente. Lo mismo ocurrió con los *primers* específicos para *S<sub>70</sub>*, *S<sub>75</sub>*, *S<sub>27</sub>*, *S<sub>107</sub>*, *S<sub>210</sub>*, y *S<sub>5</sub>-RNasa*, que amplificaron los productos correspondientes en las plantas secuenciadas (Fig. 11, Tabla 1).

Los ensayos de PCR genómica mostraron el mismo patrón de especificidad que presentaron las amplificaciones de RT-PCR (Fig. 12). Estos resultados refuerzan la idea de que los distintos candidatos a S-RNasas son específicos de cada individuo de la población NaM. Los ensayos de PCR también revelaron la presencia de algunas S-RNasas en otras plantas de la población NaM, que no fueron identificados mediante secuenciamiento. Por ejemplo, en el individuo NaM-1 se amplificó *S<sub>75</sub>*, un alelo que no pudo ser identificado en esta planta mediante secuenciamiento de los fragmentos amplificados con *primers* degenerados. Estos resultados sugieren que las secuencias analizadas son específicas del locus *S*. En contraste, *S<sub>63</sub>* mostró una amplificación ubicua, estando presente en las 12 plantas NaM examinadas. Esto indica que *S<sub>63</sub>* no es una S-RNasa funcional y, por lo tanto, no pertenece al locus *S* (Fig. 11 y Fig. 12), aunque conserva los rasgos de estructura primaria típicos de una S-RNasa.

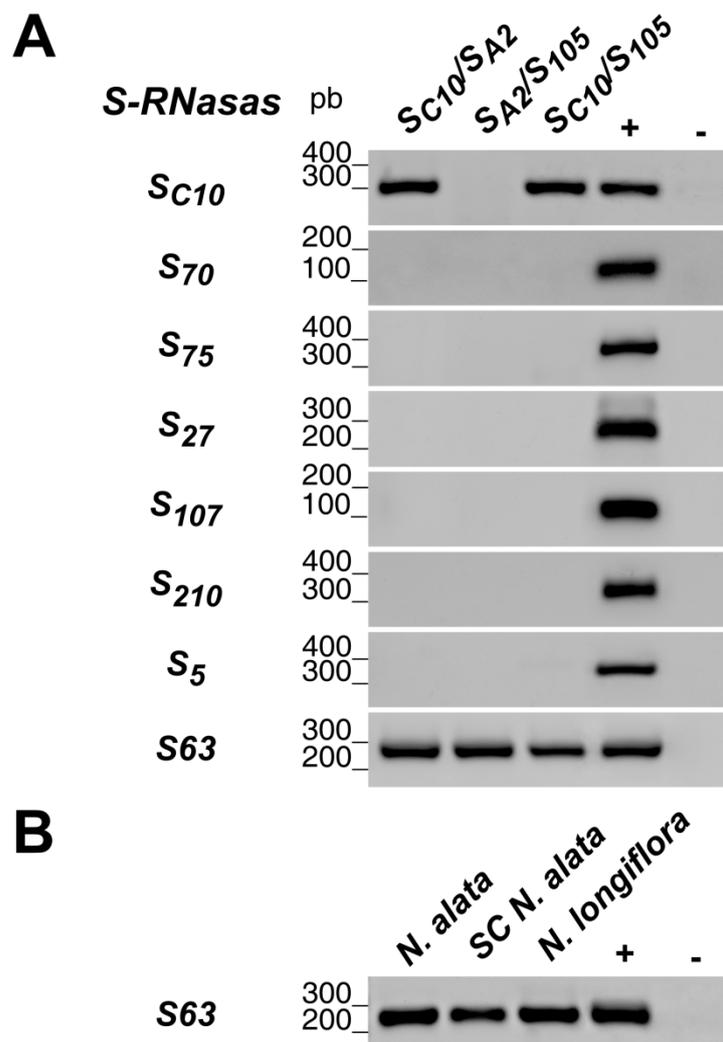


**Figura 11. Ensayos de expresión de S-RNasas de la población NaM.** RT-PCR de los transcritos de *S-RNasa* en los individuos de la población NaM utilizando los *primers* específicos para cada alelo detallados en la Tabla 6. Las S-RNasas ensayadas son indicadas a la izquierda de cada panel.



**Figura 12. Ensayos de genotipificación de las S-RNasas de la población NaM.** Las reacciones de PCR genómica se llevaron a cabo utilizando los *primers* específicos para cada alelo detallados en la Tabla 6. Las S-RNasas ensayadas son indicadas a la izquierda de cada panel. La amplificación de *S63* en todos los individuos analizados demuestra que esta secuencia no pertenece a una S-RNasa funcional y por tanto no es alelo del locus *S*.

Como control adicional de la naturaleza de las secuencias de las S-RNasas, se realizaron ensayos de PCR genómica en una población de laboratorio de *Nicotiana alata* cuyos individuos tienen el locus *S* bien caracterizado y en las especies *Nicotiana longiflora* y *Nicotiana alata* BT (BT, cultivar Breakthrough), dos individuos AC (Fig. 13). Como se esperaba, el alelo *S<sub>C10</sub>-RNasa* fue detectado en las plantas de la población de laboratorio de genotipo *S<sub>C10</sub>S<sub>105</sub>* y *S<sub>C10</sub>S<sub>A2</sub>* pero no en la planta *S<sub>A2</sub>S<sub>105</sub>*. La secuencia *S63* fue detectada en las tres plantas de la población de laboratorio de *N. alata* (Fig. 13A), consistente con su presencia en todos los individuos de la población NaM. Además, *S63* fue amplificada en la especie AC *Nicotiana longiflora* y en la versión AC de *N. alata*, plantas que no expresan S-RNasas funcionales (Fig. 13B) (McClure *et al.*, 1999).

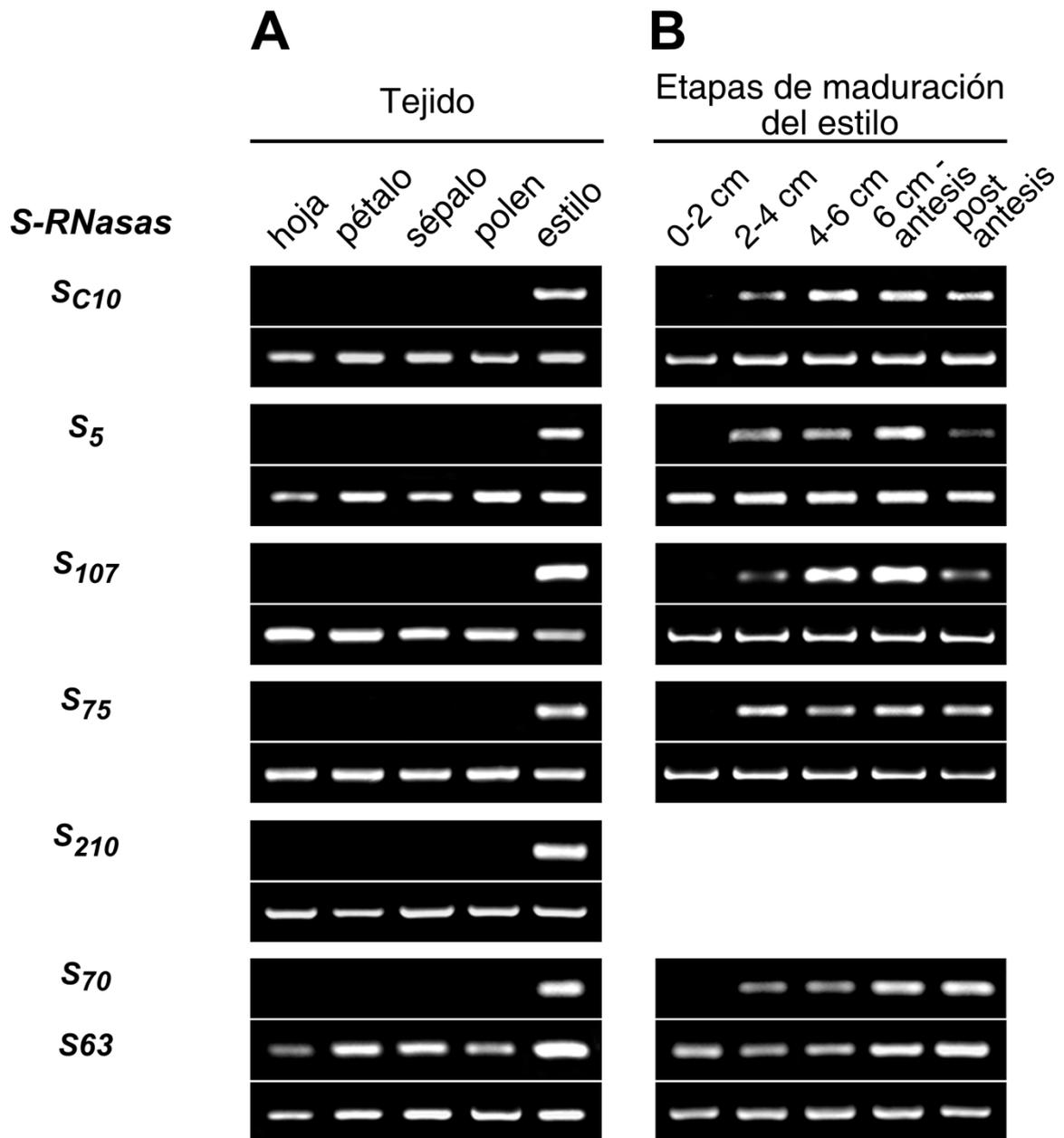


**Figura 13. Amplificación de S-RNasas en una población de laboratorio de *N. alata*.** Las reacciones de PCR genómica se llevaron a cabo utilizando *primers* específicos para cada alelo, detallados en la Tabla 6. Las S-RNasas ensayadas son indicadas a la izquierda de cada panel. (A) PCR genómica en plantas de una población de laboratorio de *N. alata* de diferentes genotipos *S*. (B) PCR genómico en la especie AC *Nicotiana longiflora* y en un cultivar AC de *N. alata* (cv Breakthrough). Controles, plásmidos portadores (+) o no portadores (-) de la secuencia de las S-RNasas ensayadas.

Ninguna de las otras S-RNAsas de NaM fueron detectadas en la población de laboratorio de *N. alata* (Fig. 13A). Además, de acuerdo a lo esperado, el alelo  $S_{C10}$  y los candidatos  $S_5$  y  $S_{75}$ -RNasa no fueron detectados en ninguno de los dos individuos AC ensayados en la figura 13B (resultados no mostrados).

Para una mejor caracterización de las S-RNAsas se realizaron ensayos de expresión en diferentes tejidos de la planta y en diferentes períodos de maduración floral, donde la expresión de las S-RNAsas aumenta con la maduración del pistilo (McClure et al., 1999). El patrón de expresión relativa de  $S_5$ ,  $S_{107}$ ,  $S_{70}$ ,  $S_{75}$  y  $S_{210}$ -RNasa en los diferentes tejidos fue idéntico al patrón de  $S_{C10}$ -RNasa, amplificando en el estilo un producto del tamaño esperado. Este producto no fue amplificado en otros tejidos florales o en hoja (Fig. 14A). Por el contrario, los transcritos de  $S_{63}$  fueron detectados en todos los órganos analizados. La mayor expresión de  $S_{63}$  fue en el estilo, los pétalos y los sépalos de la flor comparado con la escasa expresión en el polen y en las hojas (Fig. 14A).

Las S-RNAsas también mostraron un aumento de transcritos durante la maduración del estilo. La expresión de  $S_5$ ,  $S_{107}$ ,  $S_{70}$  y  $S_{75}$ -RNasa fue similar al patrón específico exhibido por  $S_{C10}$ -RNasa (Fig. 14B). En la primera etapa del desarrollo estilar no se detectaron transcritos (0 - 2cm). En la siguiente etapa se observó un aumento gradual de la expresión hasta alcanzar su nivel máximo cercano a la madurez (6cm - antesis), cuando los estilos estaban totalmente aptos para la polinización. Inmediatamente después de la apertura floral, la expresión se mantuvo constante o disminuyó ligeramente. En contraste,  $S_{63}$  mostró nuevamente una amplificación general desde la primera etapa de maduración, aunque su mayor expresión se detectó en las etapas finales del desarrollo del estilo (Fig. 14B). Estos resultados confirman que  $S_{63}$  es una ribonucleasa constitutiva y ubicua que no pertenece al locus *S* y cuya función no parece estar restringida a la reproducción.



**Figura 14.** Ensayos de la expresión espacial y temporal de las S-RNasas de la población NaM. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo utilizando *primers* específicos para cada alelo (detallados en la Tabla 6) en distintos órganos (A) y en distintas etapas del desarrollo del estilo (B). La RT-PCR fue diseñada para 33 ciclos en todas las muestras ensayadas. El panel debajo de los ensayos de expresión de cada alelo corresponde a la expresión de la actina que se utilizó como control de carga. No se obtuvieron muestras apropiadas para analizar las diferentes etapas de maduración del estilo para S<sub>210</sub>-RNasa.

### 3.2.3. La funcionalidad de las nuevas S-RNasas.

Aunque las secuencias obtenidas mostraron muchas coincidencias (a nivel estructural y de expresión) con las S-RNasas del locus *S*, existen ribonucleasas que son muy similares estructuralmente a las S-RNasas pero que no tienen funciones en el sistema de AI. Por lo tanto, resulta estrictamente necesario estudiar si las nuevas S-RNasas son realmente

funcionales en la AI. Para ello se llevaron a cabo ensayos de segregación y funcionalidad para todas las secuencias obtenidas. Primero se analizaron  $S_5$  y  $S_{107}$  que fueron los alelos más frecuentes dentro de la población NaM y mostraron la típica expresión específica que tiene una *S-RNasa*, tanto en diferentes tejidos como en las distintas etapas de la maduración de la flor (Fig. 14A y 14B). Para analizar la segregación de  $S_5$  y  $S_{107}$  se realizaron ensayos de PCR con los *primers* específicos para cada alelo en la progenie obtenida del cruzamiento semicompatible NaM-3 x NaM-6 (Tabla 3). La planta NaM-3 mostró como candidatos a alelos del locus *S* a las secuencias  $S_5$ ,  $S_{27}$  y  $S_{107}$ , mientras que NaM-6 mostró a  $S_5$ ,  $S_{107}$  y  $S_?$  (Fig. 11 y Fig. 12). Mediante un test  $\chi^2$  se propuso como hipótesis nula que si el candidato evaluado fuera funcional en la AI, entonces en un cruzamiento semicompatible, su proporción en la progenie será de un 50%. La segregación de la progenie de  $S_{107}$ -*RNasa* mostró la proporción esperada 1:1 (Tabla 3); esto indica que la presencia de esta *S-RNasa* en la progenie es debido únicamente a la contribución materna. La segregación de la progenie confirmó que  $S_{107}$  es un alelo funcional para la AI. Por el contrario, la segregación de  $S_5$  rechazó la hipótesis nula porque no respondió a la proporción 1:1, lo que indica que  $S_5$  no es un alelo *S* funcional en la población NaM (Tabla 3). Como era de esperar para un alelo no funcional, toda la progenie derivada del cruzamiento NaM-7 x NaM-5 exhibió a la ribonucleasa  $S63$ . En consecuencia, las ribonucleasas no funcionales en la AI,  $S63$  y  $S_5$ , fueron red denominadas *NnSR1* y *NnSR2* (*Nicotiana non S-RNase*).

**Tabla 3. Segregación de los candidatos  $S_5$  y  $S_{107}$ -*RNasa* para probar funcionalidad en la AI.**

<sup>a</sup> Parental NaM ♀ x ♂	Progenie analizada	Alelo ensayado	Proporción observada (+ : -)	<sup>b</sup> Proporción esperada (+ : -)	$\chi^2$ (Valor <i>P</i> )
3 ( $S_5$ , $S_{107}$ , $S_{27}$ ) x 6 ( $S_5$ , $S_{107}$ , $S_?$ )	34	$S_5$	34:0	1:1	34 ( $<0.0001$ )
		$S_{107}$	16:18	1:1	0,12 (0,73)
7 ( $S_{C10}$ , $S_{107}$ ) x 5 ( $S_{70}$ , $S_{75}$ )	33	$S63$	33:0	1:1	33 ( $<0.0001$ )

<sup>a</sup> Las *S-RNasas* candidatas del parental NaM están basadas en la figura 11.

<sup>b</sup> Proporción esperada si la *S-RNasa* evaluada es funcional para el sistema de AI.

+/- Significa presencia o ausencia del alelo paternal ensayado para funcionalidad.

Un análisis de segregación similar fue aplicado a las otras *S-RNasas* identificadas, pero en este caso se evaluó el único alelo paterno compatible que segregaría en la progenie de

los cruzamientos semicompatibles. En el test  $\chi^2$  se propuso como hipótesis nula que si el candidato evaluado no es funcional para el sistema de AI, entonces en un cruzamiento semicompatible, su distribución en la progenie será de un 50%. Por el contrario, si el candidato evaluado es funcional, debería estar presente en el 100% de la progenie, como único aporte paterno. La segregación de las progenies de los cruzamientos realizados para evaluar  $S_{75}$ ,  $S_{70}$  y  $S_{27}$ -RNasa no mostraron la proporción esperada 1:1 (Tabla 4) confirmando que estos candidatos son alelos funcionales para la AI. Como controles de la segregación de alelos funcionales se realizaron los cruzamientos NaM-3 x NaM-7 y NaM-t1 x NaM-t2, para evaluar la segregación de  $S_{107}$  y  $S_{C10}$  respectivamente, dos alelos de funcionalidad conocida (Murfett *et al*, 1996; Tabla 4 de este trabajo). Además, se realizó el cruzamiento entre las plantas NaM-3 ( $S_{107}S_{27}$ ) x NaM-5 ( $S_{70}S_{75}$ ) que no comparten un alelo en común, como un control adicional de una polinización compatible.

**Tabla 4. Segregación de los alelos S en cruzamientos semicompatibles para probar funcionalidad en la AI.**

<sup>a,b</sup> Parental NaM ♀ x ♂	Progenie analizada	Alelo ensayado	Alelo paterno ensayado por PCR	Proporción observada (+ : -)	<sup>c</sup> Proporción esperada (+ : -)	$\chi^2$ (Valor P)
5 ( $S_{70}S_{75}$ ) x t1 ( $S_{C10}S_{75}$ )	28	$S_{75}$	$S_{C10}$	28:0	1:1	28 (<0.0001)
5 ( $S_{70}S_{75}$ ) x t2 ( $S_{C10}S_{70}$ )	20	$S_{70}$	$S_{C10}$	20:0	1:1	20 (<0.0001)
3 ( $S_{107}S_{27}$ ) x 7 ( $S_{C10}S_{107}$ )	20	$S_{107}$	$S_{C10}$	20:0	1:1	20 (<0.0001)
12 ( $S_{107}S_{210}$ ) x 2 ( $S_{C10}S_{210}$ )	20	$S_{210}$	$S_{C10}$	17:3	1:1	9,8 (<0.0017)
10 ( $S_{27}S_{27}$ ) x 3 ( $S_{107}S_{27}$ )	18	$S_{27}$	$S_{107}$	18:0	1:1	18 (<0.0001)
t1 ( $S_{C10}S_{75}$ ) x t2 ( $S_{C10}S_{70}$ )	20	$S_{C10}$	$S_{70}$	20:0	1:1	20 (<0.0001)
<sup>d</sup> 3 ( $S_{107}S_{27}$ ) x 5 ( $S_{70}S_{75}$ )	17	----	$S_{75}$	8:9	1:1	0.059 (0.812)

<sup>a</sup> El genotipos S de los parentales NaM propuestos está basado en los resultados mostrados en la figura 11 y en la Tabla 3.

<sup>b</sup> t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub> son plantas portadoras del alelo  $S_{C10}$ -RNasa.

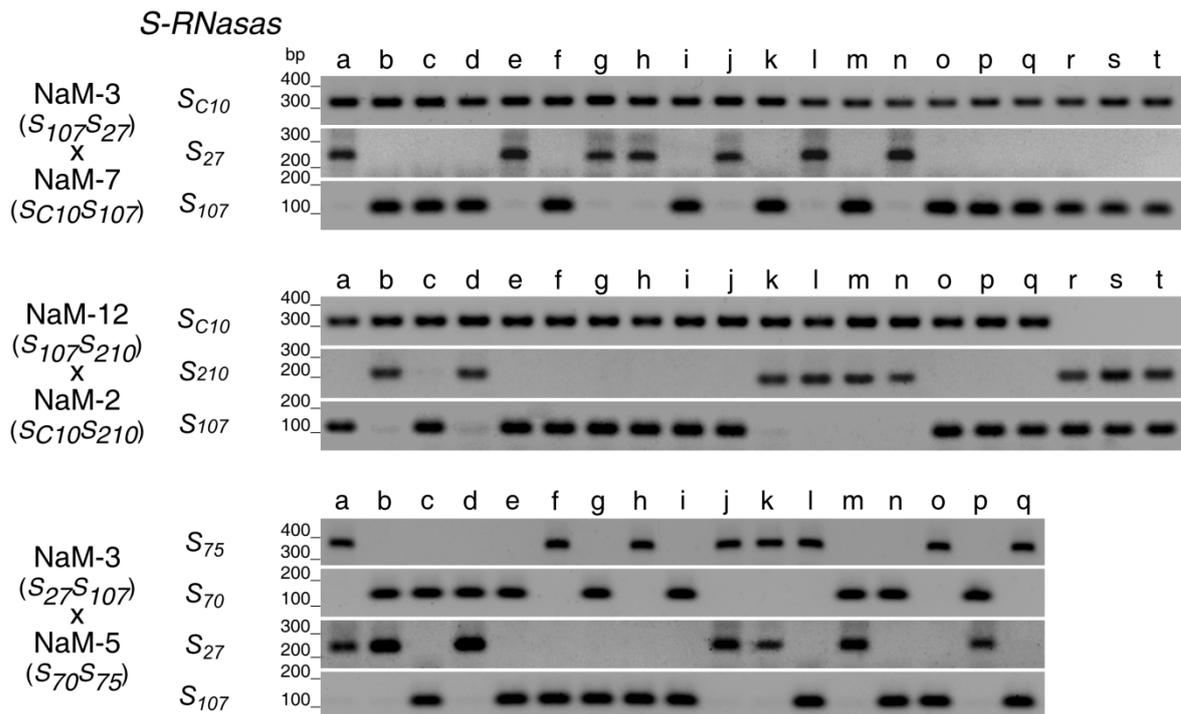
<sup>c</sup> Proporción esperada si la S-RNasa evaluada no es funcional y el cruzamiento es completamente compatible.

<sup>d</sup> Cruzamiento compatible (control).

+/- Significa presencia o ausencia del alelo paterno ensayado por PCR.

Como se esperaba, la segregación de la progenie NaM-3 x NaM-5 se ajustó a la relación 1:1, indicando que la contribución del polen en este caso no se limita a un único alelo *S*.

En el caso de  $S_{210}$ , se observó un “derrame” del alelo en el cruzamiento semicompatible, indicando que la reacción de rechazo de  $S_{210}$  podría ser más débil que en el resto de la población ensayada. Los tres individuos que no llevaban el alelo paterno  $S_{C10}$  tuvieron un genotipo  $S_{107}S_{210}$ , donde el alelo  $S_{107}$  fue heredado de la planta madre (Tabla 4, cruzamiento NaM-12 x NaM-2). Esto confirma que el 15% de la progenie evaluada heredó el alelo  $S_{210}$  de los tubos polínicos incompatibles que escaparon del rechazo (Fig. 15, plantas **r**, **s** y **t** de la progenie obtenida del cruzamiento NaM-12 x NaM-2). La figura 15 muestra la segregación completa de los genotipos *S* de tres cruzamientos seleccionados de la Tabla 6. Cada cruzamiento demostró claramente que las S-RNAsas segregaron entre sí, como es de esperar para los dos alelos funcionales de S-RNAsas que residen en el locus *S*.

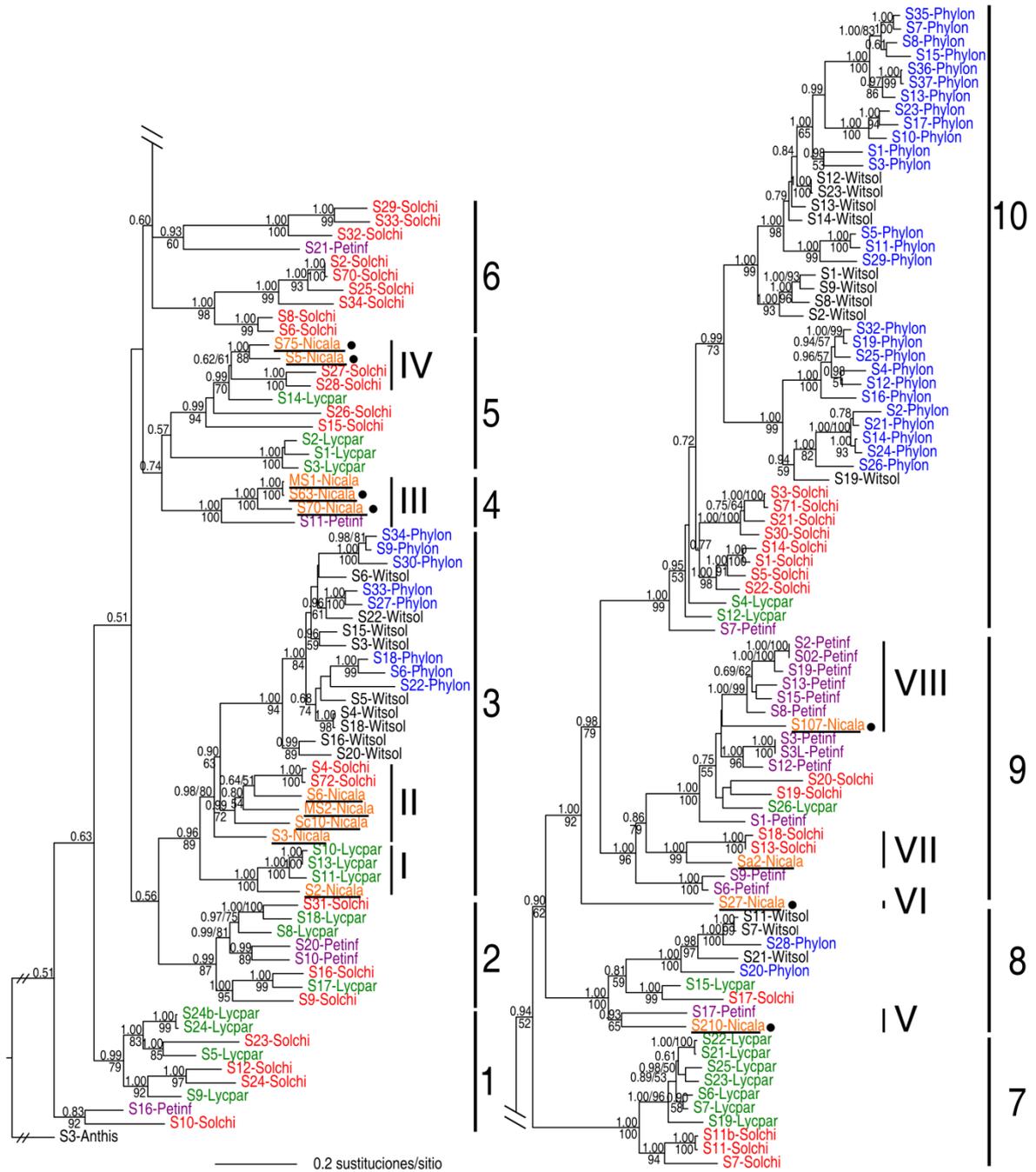


**Figura 15. Segregación de las S-RNAsas.** La progenie de tres cruzamientos seleccionados, detallados en la Tabla 4, fueron genotipificados mediante PCR con *primers* específicos para la detección de los alelos  $S_{C10}$ ,  $S_{70}$ ,  $S_{75}$ ,  $S_{107}$ ,  $S_{27}$  y  $S_{210}$ . Los individuos de la progenie son indicados mediante letras.

### 3.2.4. Análisis filogenético de las S-RNasas.

Para determinar las relaciones evolutivas y el grado de polimorfismo del locus *S* de la población NaM respecto a otras especies de Solanáceas AI, se realizó un extensivo análisis filogenético de las nuevas S-RNasas caracterizadas. En un árbol filogenético realizado previamente, las S-RNasas de *N. alata* parecían estar distribuidas en unos pocos linajes *S* en comparación con otras especies de Solanáceas con mayor cantidad de alelos *S* conocidos (Richman & Kohn, 2000). Los métodos estadísticos de **probabilidades posteriores** y los **valores de bootstrap** derivados de los análisis mediante inferencia bayesiana (BI, *Bayesian inference*) y máxima verosimilitud (ML, *Maximum-likelihood*) proporcionaron un sustento sólido para casi todos los nodos no basales del árbol filogenético mostrado en la figura 16. Las secuencias de *N. alata* fueron agrupadas en 8 linajes *S* transgénicos (TG) denominados I-VIII. Una línea TG se consideró como el nodo más reciente que incluyeran S-RNasas de más de una especie (Fig. 16). Los linajes TG II y III concentran cuatro y tres S-RNasas respectivamente, mientras que las nuevas S-RNasas identificadas en este trabajo se distribuyeron en cinco de los ocho linajes TG. El nodo que contiene a la *S*<sub>27</sub>-RNasa fue considerado un linaje TG independiente, sustentado con un alto valor de *bootstrap*. Su aislamiento puede ser debido a un muestreo todavía incompleto del polimorfismo total de las S-RNasas o a una rápida divergencia de otro linaje ancestral. En el árbol también se identificaron diez clados (denominados 1-10), derivados de nodos ancestrales con valores de *bootstrap* y de probabilidades posteriores sólidos. Con unas pocas excepciones, las S-RNasas de *Nicotiana alata*, *Petunia inflata*, *Lycium parishii* y *Solanum chilense* están agrupadas entre sí y ampliamente distribuidas en los clados 1-10.

En contraste, *Witheringia solanacea* y *Physalis longifolia* están claramente restringidas en los clados 3, 8 y 10. El pequeño número de linajes *S* antiguos contemplado por alelos de estas especies coincidió con varios trabajos previos (Richman & Kohn, 2000; Stone & Pierce, 2005; Savage & Miller, 2006; Lu, 2006). En general, las secuencias obtenidas de *N. alata* se distribuyeron en varios linajes de alelos *S* ancestrales, lo que indica que el polimorfismo existente en el locus *S* de *Nicotiana alata*, al igual que en otras Solanáceas precede a la aparición de la especie.



**Figura 16. Análisis filogenético de las S-RNasas de Solanáceas.** El árbol representa las relaciones filogenéticas de las S-RNasas de *Nicotiana alata* (Nical, naranja), *Petunia inflata* (Petinf, violeta), *Solanum chilense* (Solchi, rojo), *Lycium parishii* (Lycpar, verde), *Physalis longifolia* (Phylon, azul) y *Witheringia solanacea* (Witsol, negro). Se muestran 8 linajes TG de *Nicotiana alata* (líneas I-VIII) y diez linajes S (líneas 1-10). Los alelos de *N. alata* están subrayados y las nuevas S-RNasas reportadas en este trabajo se destacan con un punto negro. Las probabilidades posteriores y los valores de *bootstrap* (porcentaje de 1000 réplicas de *bootstrap*) son mostradas en los nodos correspondientes cuando su valor supera el 50%. S<sub>3</sub>-RNasa de *Antirrhinum hispanicum* (Anthis) se usó como *outgroup*. Los números de acceso de las 154 S-RNasas analizadas están detallados en la sección Materiales y Métodos.

### **3.3. Discusión.**

En este trabajo se identificaron y caracterizaron nuevos alelos *S* de una población natural de *N. alata* ubicada en el noreste de Argentina, contribuyendo al análisis de la variación natural del locus *S* de Solanáceas. Utilizando la técnica de RT-PCR a partir de *primers* basados en regiones conservadas de las *S-RNasas* (Ioerger *et al.*, 1991) se obtuvieron siete nuevas secuencias de potenciales *S-RNasas*. Mediante PCR a partir de *primers* específicos para cada alelo (basados en las regiones HVs de las secuencias obtenidas) se analizó el perfil de expresión de las *S-RNasas* en diferentes tejidos y distintas etapas del desarrollo estilar en una muestra de 12 plantas de la población NaM. Para determinar si las potenciales *S-RNasas* eran funcionales como alelos *S*, se realizaron cruzamientos controlados y se analizó la segregación de las nuevas secuencias en las respectivas progenies. Finalmente se realizó un análisis filogenético para determinar la extensión del polimorfismo de las *S-RNasas* en *N. alata* y su distribución entre los diferentes linajes *S* de Solanáceas. Se reportaron cinco nuevas *S-RNasas* funcionales y se caracterizaron además dos ribonucleasas no funcionales para la AI, que exhibieron un patrón de expresión diferente a las de las *S-RNasas* funcionales.

### **3.3.1. Identificación de las secuencias que codifican las *S-RNasas* de una población natural de *N. alata*.**

En la familia Solanáceas, varias poblaciones naturales de distintas especies han sido objeto de estudio para el reconocimiento de los distintos alelos de *S-RNasa*, utilizando técnicas de RT-PCR (Tsukamoto *et al.*, 1999; Igic *et al.*, 2007 y otras referencias contenidas en este trabajo; Mena-Ali & Stephenson, 2007). Aunque *N. alata* fue utilizada desde hace muchos años para explorar la diversidad genética de la AI (East & Yarnell, 1929) y las bases bioquímicas y moleculares del sistema de AI dependiente de *S-RNasas* (McClure, 2008), hasta el momento no existían reportes sobre la diversidad alélica de las *S-RNasas* a nivel molecular. Tampoco se habían realizado estudios en poblaciones naturales de esta especie. En consecuencia, se conocían muy pocos alelos de *S-RNasa* de *N. alata* en comparación con otras especies de Solanáceas.

Los *primers* degenerados basados en los dominios conservados C1 y C5 fueron efectivos para amplificar distintas *S-RNasas*. En total, diez secuencias diferentes de aproximadamente 500 pb fueron identificadas (Tabla 1). Tres de estas secuencias (*S*<sub>2</sub>, *S*<sub>6</sub>, y *S*<sub>C10</sub>) son *S-RNasas* que habían sido previamente caracterizadas como alelos funcionales del

locus *S* (Anderson *et al.*, 1989; Murfett *et al.*, 1996). Otra secuencia candidata a S-RNasa, designada *NnSR1* (Rojas *et al.*, en consideración), fue muy similar a la ribonucleasa MS1 de pistilo de *N. alata* (Kuroda *et al.*, 1994). Las otras seis secuencias putativas (*NnSR2*, *S<sub>27</sub>*, *S<sub>70</sub>*, *S<sub>75</sub>*, *S<sub>107</sub>* y *S<sub>210</sub>*) son descritas en este trabajo por primera vez. El alineamiento deducido de aminoácidos de las secuencias identificadas confirmó que tienen la estructura primaria típica de S-RNasas de Solanáceas (Fig. 9).

Aunque se esperaba encontrar dos S-RNasas diferentes en cada planta, en algunos individuos sólo se identificó una sola S-RNasa, mientras que en otras plantas se encontraron más de dos secuencias (Tabla 1). En el primer caso, la afinidad diferencial de los *primers* de los dominios conservados podría favorecer la amplificación de una única secuencia. Podría ocurrir también que los niveles de transcritos o la estabilidad de los mismos sea significativamente diferente entre los dos alelos S-RNasa. Aunque esta posibilidad aún no ha sido investigada, podría ser uno de los motivos que contribuyen a la diferente "fuerza" de los distintos alelos de S-RNasa en el rechazo del polen incompatible. Por otro lado, el pistilo también expresa otras ribonucleasas ajenas a la función de AI que se asemejan estructuralmente a las S-RNasas funcionales. Esto explicaría porqué se amplificaron más de dos secuencias en algunos individuos de la población NaM.

### 3.3.2. La expresión y la funcionalidad de las S-RNasas del estilo de *N. alata*.

Aprovechando la alta divergencia que poseen las distintas S-RNasas en las regiones HV, se diseñaron *primers* específicos para cada alelo, basados en las regiones HVa o HVb para determinar el genotipo del locus *S* de la población NaM (ver Tabla 6, en materiales y métodos de este capítulo). Excepto para *NnSR1* que mostró una expresión general en toda la población, los ensayos de RT-PCR realizados con los *primers* específicos mostraron la expresión de todas las S-RNasas en distintos individuos de la población NaM. Este patrón de expresión sugirió de manera preliminar que las secuencias obtenidas provenían del locus *S* y que estarían implicadas en el sistema de AI (Fig. 11). En contraste, *NnSR1* fue la única secuencia detectada en todas las plantas examinadas, un rasgo que indicó que esta ribonucleasa no proviene del locus *S* y por lo tanto no era funcional en la AI. La especificidad de las S-RNasas fue también ensayada en diferentes órganos y en las etapas del desarrollo de estilo durante la maduración floral, utilizando *S<sub>C10</sub>-RNasa* como un control interno (Fig. 14). Todas las secuencias analizadas reprodujeron los patrones de expresión espacial y temporal de

*S<sub>Cl0</sub>-RNasa*, excepto en el caso de *NnSRI*. El análisis obtenido por RT-PCR de los transcritos de *S<sub>Cl0</sub>-RNasa* del estilo en desarrollo fue idéntico a la expresión evaluada previamente en un *gel-blot* de ARN para el mismo alelo *S* (McClure *et al.*, 1999). Los resultados de la estructura primaria, la expresión específica de cada individuo y los patrones de expresión espacial y temporal de cada secuencia obtenida fueron los esperados para S-RNasas funcionales implicadas en el sistema de AI. Por el contrario, la expresión ubicua de la ribonucleasa *NnSRI* entre los diferentes individuos, como así también entre distintos tejidos y distintas etapas de maduración floral, descarta su especificidad como alelo *S*, sugiriendo que su función no está exclusivamente involucrada en el proceso reproductivo.

Para demostrar de manera concluyente si las secuencias identificadas estaban asociadas con fenotipos de AI, se analizó mediante ensayos de PCR genómica, con *primers* específicos para cada alelo, la segregación de las nuevas S-RNasas en las progenies obtenidas en cruzamientos semicompatibles. En este tipo de cruzamiento, los parentales comparten un alelo en común (Tablas 3 y 4). Todas las secuencias ensayadas, excepto *NnSRI* y *NnSR2*, segregaron en la progenie como era esperado para las S-RNasas funcionales. Estos resultados confirman que *S<sub>70</sub>*, *S<sub>75</sub>*, *S<sub>27</sub>*, *S<sub>107</sub>*, *S<sub>210</sub>-RNasa* son alelos de AI funcionales en *N. alata*. El pequeño “derrame” de *S<sub>210</sub>-RNasa* observada en la progenie del cruzamiento NaM-12 x NaM-2, reveló que en esta población natural existen plantas que pueden tener diferentes grados de respuesta a la AI, comparada con la robustez para rechazar el polen que generalmente exhiben las poblaciones de laboratorio (McClure *et al.*, 2011). Basado en la genotipificación obtenida por RT-PCR que se muestra en la figura 11 y las pruebas de funcionalidad de las Tablas 3 y 4, se puede deducir el genotipo *S-RNasa* para cada individuo NaM analizado (Tabla 5).

**Tabla 5. Genotipos *S* propuestos para los individuos de la población NaM.**

Individuos NaM	<sup>a</sup> Genotipo <i>S</i>
1	<i>S<sub>75</sub> S?</i>
2	<i>S<sub>Cl0</sub> S<sub>210</sub></i>
3	<i>S<sub>27</sub> S<sub>107</sub></i>
4	<i>S<sub>75</sub> S<sub>6</sub></i>
5	<i>S<sub>75</sub> S<sub>70</sub></i>
6	<i>S<sub>107</sub> S?</i>
7	<i>S<sub>Cl0</sub> S<sub>107</sub></i>
8	<i>S<sub>27</sub> S<sub>107</sub></i>
9	<i>S<sub>2</sub> S<sub>107</sub></i>
10	<i>S<sub>27</sub> S?</i>
11	<i>S<sub>70</sub> S<sub>107</sub></i>
12	<i>S<sub>210</sub> S<sub>107</sub></i>

<sup>a</sup> El genotipo *S* fue deducido de los resultados de la figura 11 y de las Tablas 3 y 4.

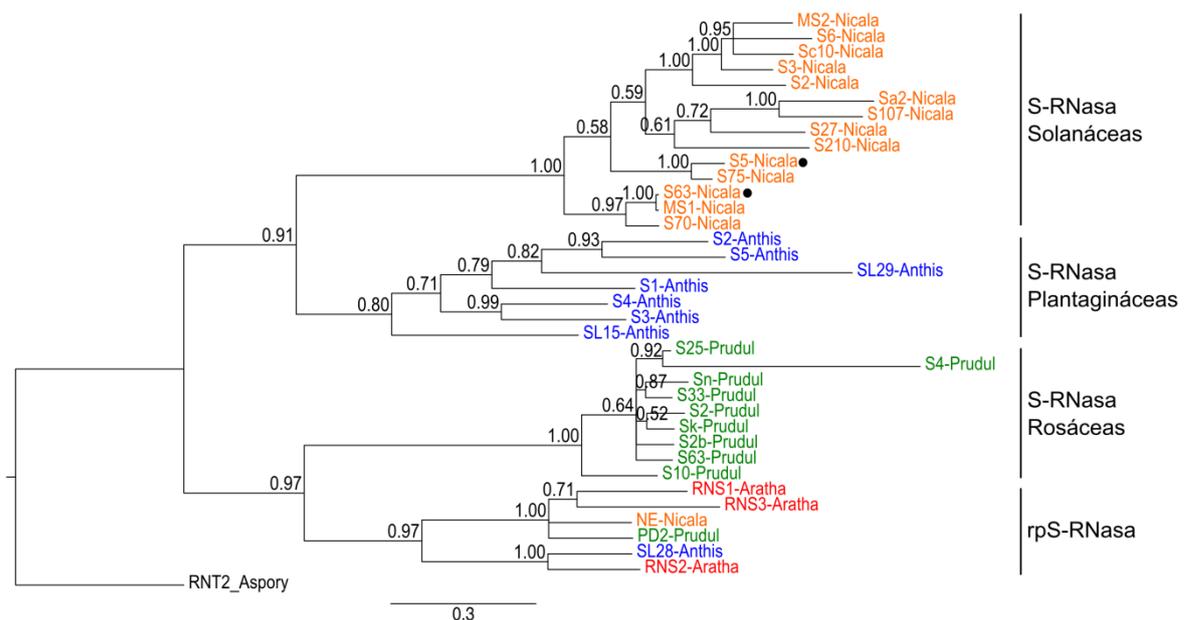
Aún falta por reconocer el alelo *S* restante de las plantas NaM-1, NaM-6 y NaM-10.

### 3.3.3. Ribonucleasas no funcionales en el sistema de AI.

La ubicuidad o la alta frecuencia de las secuencias *NnSR1* y *NnSR2* entre los individuos NaM examinados, sugirió que estos alelos no son funcionales en el mecanismo de AI. Esto significa que los *primers* basados en las regiones conservadas también fueron capaces de reconocer y amplificar otros tipos de ribonucleasas. Efectivamente, existen otras ribonucleasas conocidas como **ribonucleasas parecidas a las S-RNasas** (rpS-RNasas; en inglés, *S-like RNases*) o **relictos de S-RNasas** (rS-RNasas; en inglés, *relic S-RNases*) que presentan muchas similitudes con las S-RNasas a nivel de estructura primaria. Las proteínas codificadas por estos genes son miembros de la superfamilia de S-RNasas T2 (Green, 1994; Kao & Tsukamoto, 2004; MacIntosh, 2011). Las rpS-RNasas y rS-RNasas han sido reportadas en especies AC y AI de muchas familias de plantas. Como el gen *rpS-RNasa* no está vinculado al locus *S*, su expresión no se limita sólo al pistilo. Con frecuencia, su función está relacionada con los escenarios de estrés, como la escasez de fosfato o el ataque de patógenos (Dodds *et al.*, 1996; Hugot *et al.*, 2002). El gen *rS-RNasa* es un tipo particular de rpS-RNasas que tampoco está vinculado al locus *S*, aunque su expresión está restringida sólo al pistilo. Originalmente los rS-RNasas fueron descritos en especies AC (Golz *et al.*, 1998), aunque también han sido reportados en especies AI (Lee *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 2003). Por el momento se desconoce el rol que cumplen los rS-RNasas. Probablemente se originaron como copias parálogas de S-RNasas funcionales (Kao & Tsukamoto, 2004). Ninguna de las secuencias de aminoácidos de *NnSR1* o *NnSR2* fueron significativamente diferentes del resto de los alelos *S* alineados (Fig. 9). Más aún, las identidades más altas fueron encontradas entre *NnSR1* (*S63*) y *S70*, y entre *NnSR2* (*S5*) y *S75* (Fig. 9 y Fig. 10, Tabla 2). En contraste con la alta frecuencia que presentaron *NnSR1* y *NnSR2* dentro la población NaM, los alelos *S70* y *S75* fueron expresados en sólo dos y tres individuos de la población respectivamente (Fig. 11 y Fig. 12). El parecido estructural entre las S-RNasas funcionales, las rpS-RNasas, y los rS-RNasas demandó realizar ensayos de expresión y funcionalidad para determinar de manera concluyente cuáles de las secuencias de potenciales S-RNasas eran funcionales en el sistema de AI.

El análisis filogenético ha demostrado que los rS-RNasas y las S-RNasas funcionales tienen el mismo origen, mientras que las rpS-RNasas de distintas especies son más distantes y

están relacionadas en un clado independiente (Golz *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2003) (Fig. 17). En cuanto a su secuencia de aminoácidos, las ribonucleasas *NnSR1* y *NnSR2* son similares a los rS-RNasas y son indistinguibles de las S-RNasas funcionales. Aunque estas ribonucleasas no participan en el sistema de rechazo del polen incompatible, presentaron el mismo origen filogenético de las S-RNasas, compartiendo un clado diferente al de las rpS-RNasas (Tabla 2; Fig. 17). Este resultado indica que *NnSR1* y *NnSR2* son rS-RNasas. Una diferencia contrastante entre estos dos rS-RNasas está en el patrón de expresión espacial y temporal. Mientras que *NnSR2* demostró una expresión órgano-específica como un rS-RNasa (expresión limitada al estilo), *NnSR1* fue expresada en varios tejidos, como una rpS-RNasa. *NnSR1* y *NnSR2* son muy parecidas a dos S-RNasas funcionales (*S<sub>70</sub>* y *S<sub>75</sub>* respectivamente), exhibiendo los valores de identidad más altos a nivel de secuencia entre los alelos de S-RNasa (Fig. 9, Tabla 2), Esto refuerza la presunción de que constituyen parálogos de los alelos funcionales *S<sub>70</sub>* y *S<sub>75</sub>*. El análisis filogenético de los tres tipos de ribonucleasas (Fig. 17) y la ubicación de *NnSR1* en individuos AI y AC de *Nicotiana* sugieren que *NnSR1* se duplicó de *S<sub>70</sub>* antes de que *NnSR2* lo hiciera de *S<sub>75</sub>* y posiblemente antes de la especiación en el género *Nicotiana* (Fig. 13).



**Figura 17. Análisis filogenético de las S-RNasas, rS-RNasas y rpS-RNasas en familias con sistema de AI dependiente de S-RNasa.** El árbol de genes fue construido incluyendo las secuencias de los ADNc de las S-RNasas obtenidas en este trabajo y usando el método de inferencia Bayesiana. Los rS-RNasas identificados en este trabajo están señalados con un punto negro. *Nicotiana alata* (Nicala, naranja), *Antirrhinum hispanicum* (Anthis, azul), *Prunus dulcis* (Prudul, verde), *Arabidopsis thaliana* (Aratha, rojo). S63-Nicala y S5-Nicala son *NnSR1* y *NnSR2* respectivamente.

Resulta interesante conocer si *NnSR1* o *NnSR2* están relacionados con el metabolismo nutricional de las plantas o con las respuestas de defensa al ataque de patógenos, como se estableció anteriormente para las rpS-RNAsas (Dodds *et al.*, 1996; Hugot *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2002). Varios trabajos indican que la carencia de fosfato inorgánico (Pi) puede inducir la expresión de determinadas RNAsas (MacIntosh, 2001; Ivanov & Anderson, 2011). Actualmente se está estudiando el rol de *NnSR1* en plantas crecidas en ausencia de Pi. Ensayos de RT-PCR mostraron que las plantas NaM con deficiencia de Pi incrementaron los niveles de transcritos de *NnSR1*. El aumento de expresión fue confirmado mediante ensayos de *western blot* que mostraron un aumento en la concentración de proteínas de *NnSR1*. Por último, el agregado de Pi exógeno disminuyó los niveles de transcritos y de proteína de *NnSR1* en plantas carentes de fosfato. Estos resultados sugieren que *NnSR1* posee un rol importante en el reciclado de ARN cuando la planta se encuentra ante una deficiencia de Pi (Rojas *et al.*, en revisión). Por el momento, la funcionalidad de *NnSR2* no ha sido establecida. El gen *NnSR2* pudo haber derivado de *S<sub>75</sub>* por duplicación génica seguido de una translocación a otro locus. Los resultados comentados para *NnSR1* demuestran que estos genes, que derivan del mecanismo de AI, pueden ganar otras funcionalidades necesarias para la adaptación de las plantas a situaciones de estrés.

### 3.3.4. Genealogía de las S-RNAsas.

El extremo polimorfismo genético del locus *S* mantenido mediante selección por frecuencia negativa está íntimamente relacionado con los **mecanismos de reconocimiento**, como el existente en los sistemas de AI. Un tipo de evidencia que explica la persistencia del polimorfismo del locus *S* es el patrón denominado **evolución transespecífica** (TSE, *Trans-specific evolution*), en el que un alelo está más estrechamente relacionado con el alelo de otra especie, que con su alelo conespecífico (Richman, 2000). Este patrón explica el origen de los linajes de alelos *S* que preceden a la especie en la que se encuentran. Los patrones TSE fueron observados en los loci MHC de histocompatibilidad en el hombre (Klein, 1986) y en el sistema de AI de diversas especies de plantas (Richman, 2000).

Para evaluar el nivel de TSE en las S-RNAsas de *N. alata*, se eligieron cinco especies AI de Solanáceas que representaban una muestra amplia de linajes *S*. Se emplearon S-RNAsas de *Solanum chilense*, *Lycium parishii* y *Petunia inflata* (Igic *et al.*, 2007; Savage & Miller 2006; Wang *et al.*, 2001), *Physalis longifolia*, y *Witheringia solanacea* (Lu, 2006; Stone &

Pierce, 2005). El árbol filogenético reconstruido en este trabajo confirmó la agrupación de todas las S-RNAsas en líneas TG y transespecíficas. Las S-RNAsas de *Solanum*, *Lycium*, *Petunia*, y *Nicotiana* formaron grupos distribuidos en varios clados. De cualquier manera, la distribución de *Petunia* y *Nicotiana* no abarcó todos los clados. El muestreo aún incompleto en estos dos géneros podría explicar la ausencia de S-RNAsas de *Petunia* en los clados 3, 5, 7 y de *Nicotiana* en los clados 1, 2, 6 y 7. Aunque *N. alata* no estuvo representada en todos los clados, mostró un polimorfismo más amplio que el de las especies restringidas *Physalis* y *Witheringia* que se presentaron únicamente en tres clados. La restricción en estas dos especies no fue debida a la falta de muestreo, siendo bien representadas con 36 alelos analizados para *Physalis* y 21 para *Witheringia*. Una posible explicación de la restricción a solo tres clados es el “**cuello de botella**”, fenómeno por el cual una población o especie sufrió un drástico descenso en el número de sus miembros en algún momento del pasado, presentando como consecuencia, muy poca variabilidad entre los individuos restantes. En este caso, el cuello de botella redujo el polimorfismo del locus *S* en *Witheringia* y *Physalis*. Esta restricción tuvo que haber ocurrido después del origen del ancestro en común de todas las Solanáceas, pero antes del origen del ancestro en común de *Physalis* y *Witheringia*. La agrupación de distintas S-RNAsas de diferentes especies de Solanáceas en distintos clados, confirma que la diversidad de S-RNAsas representa un antiguo polimorfismo que precede a la divergencia de las especies (Ioerger *et al.*, 1990; Richman & Kohn, 2000), explicando porqué los alelos *S* son más parecidos entre especies diferentes que dentro de una misma especie.

Otro enfoque de mucho interés en el área evolutiva es cómo se generan nuevos alelos de autoincompatibilidad. La selección de frecuencias negativas mantiene el polimorfismo del locus *S* y mantiene las frecuencias de los alelos en un equilibrio armónico, pero no explica cómo surgen nuevos alelos. Las mutaciones en los alelos *S* parecen ser la explicación más razonable, aunque todos los intentos de generar nuevos alelos específicos mediante mutagénesis clásica han fallado y resultaron sólo en la producción de alelos no funcionales (de Nettancourt, 2001). Una mutación que cambie la especificidad del polen únicamente, daría lugar a un haplotipo AC que sería eliminado de la población de alelos de AI. Se requiere que las mutaciones sucedan al mismo tiempo entre los componentes S-RNasa y SLF, para formar un nuevo haplotipo específico (Charlesworth, 2010, Uyenoyama *et al.*, 2001). Muchos reportes han sugerido a las regiones HV como sitios de posible mutación para la generación de nuevos alelos (Ioerger *et al.*, 1991), aunque es posible que muchos aminoácidos tengan que ser sustituidos a la vez para formar un nuevo haplotipo. En *Solanum chacoense*, los alelos *S*<sub>11</sub> y *S*<sub>13</sub> son fenotípicamente distintos, aunque presentan tan solo 10 aminoácidos diferentes, de

los cuales 4 se encuentran en las regiones HV. La proteína quimérica  $S_{11}$ -RNasa (la cual tenía modificados los 4 aminoácidos de las regiones HV por los de  $S_{13}$ ) fue capaz de reconocer y rechazar el polen de haplotipo  $S_{13}$  (Matton *et al.*, 1997). Más aún, las modificaciones de tan sólo tres aminoácidos en las regiones HV de  $S_{11}$  por los de  $S_{13}$ , crearon una **S-RNasa dual**, capaz de reconocer y rechazar el polen de haplotipos  $S_{11}$  y  $S_{13}$  (Matton *et al.*, 1999). Este resultado sugiere que las mutaciones puntuales en la S-RNasa pueden generar nuevos alelos, como la S-RNasa de especificidad dual que puede ser el intermediario de un nuevo alelo S. Al parecer, existen otros mecanismos de formación de nuevos alelos S. Un análisis filogenético establecido a partir de diferentes regiones de las S-RNasas de *Petunia inflata* reveló que el alelo  $S_{19}$  heredó su región 5' de un ancestro en común con  $S_2$  y su región 3' de un ancestro en común con  $S_8$ . Este resultado sugiere que la recombinación intragénica también contribuye a la diversidad de alelos del locus S (Wang *et al.*, 2001). Una relación evolutiva similar fue deducida en el mismo estudio para los alelos  $S_3$ ,  $S_{12}$  y  $S_{15}$  (Wang *et al.*, 2001).

Sin embargo, una premisa de los estudios genealógicos es que si las especies tuvieran a los alelos S en clados monofiléticos específicos, entonces se podría plantear que los nuevos alelos surgen dentro del tiempo de vida de las especies. El caso contrario es que si el pariente más próximo de cada alelo está en otra especie, entonces la formación de un nuevo alelo parece un evento raro dentro del tiempo de vida de las especies. Los clados monofiléticos de alelos S, tomados de una sola especie, son poco frecuentes y son representados por sólo un par de alelos hermanos intraespecíficos. Ninguno de estos clados son respaldados por un *bootstrap* sólido (Raspe & Kohn, 2007). Esto implica que los alelos S rara vez han diversificado desde el origen de cada una de las especies, o que cada vez que un nuevo alelo surge, se desplaza su alelo progenitor sin dejar una diversificación aparente (Uyenoyama *et al.*, 2001). El árbol filogenético reportado para las S-RNasas de *N. alata* mostró una distribución amplia del polimorfismo S, sugiriendo que posiblemente no aparecieron nuevos alelos una vez formada la especie *N. alata*. El hallazgo de  $S_{C10}$ -RNasa en la población NaM, un alelo de AI previamente caracterizado en otras poblaciones geográficamente distantes, puede ser indicativo de la conservación del *pool* original de S-RNasas ancestrales al origen de las diferentes especies. Resultó interesante encontrar este alelo en dos poblaciones de *N. alata* totalmente diferentes y distanciadas por miles de kilómetros. No obstante el árbol filogenético también presenta un pequeño clado que abarca justamente a  $NnSR2$  ( $S_5$ )/ $S_{75}$ . Esto sugiere que  $NnSR2$  (que hasta el momento no ha sido caracterizado funcionalmente) puede ser un nuevo alelo S en formación, que estaría en transición y reemplazaría posteriormente a  $S_{75}$ , o viceversa; el alelo funcional  $S_{75}$  estaría reemplazando a  $NnSR2$  que perdió su función de AI.

### 3.3.5. La importancia de las poblaciones naturales.

Con la excepción del alelo  $S_{210}$ , el análisis funcional de las nuevas S-RNAsas descritas reveló, en general, una respuesta de AI robusta para la población NaM. Este comportamiento ha sido encontrado en otras poblaciones naturales como la del tomate silvestre *Solanum chilense*, donde una muestra de diez nuevas S-RNAsas identificadas exhibió para todas ellas un mecanismo de rechazo del polen de gran robustez (Igic *et al.*, 2007). Sin embargo, las poblaciones naturales de Solanáceas han mostrado una marcada variación fenotípica en la fuerza del rechazo del polen incompatible. Más aún, existen especies que presentan en la misma población natural una mezcla de individuos AI y AC e inclusive plantas con comportamientos intermedios con que exhiben diversos grados de autofecundación (Tsukamoto *et al.*, 1999; Stone *et al.*, 2006). En la población NaM estudiada, las plantas NaM-1 y NaM-8 generaron frutos propios a partir de autopolinizaciones (resultados no mostrados). Curiosamente NaM-3 y NaM-8 presentan el mismo genotipo, pero en contraste a NaM-8, la planta NaM-3 se presentó fuertemente autoincompatible. En estas poblaciones resultaría importante conocer el **índice de autocompatibilidad**, una medición del grado de variedad de la respuesta de AI que puede llegar a exhibir cada individuo. La variación natural de las respuestas de AI puede ser causada por diferentes mecanismos, tales como la deficiencia de expresión o la pérdida de función de las S-RNAsas (Tsukamoto *et al.*, 2003a; Mena-Ali & Stephenson, 2007), o la pérdida de función del polen (Tsukamoto *et al.*, 2003b). Otra posibilidad radica en las mutaciones de las regiones flanqueantes alrededor de los diferentes alelos  $S$  (Good-Avila *et al.*, 2008), regiones que posiblemente sean necesarias para la transcripción de estos alelos. La falla en el rechazo del polen puede también estar motivada por una mutación en factores no ligados al locus  $S$  (Cruz García *et al.*, 2005; Hancock *et al.*, 2005). El escape y la fertilización del polen de haplotipo  $S_{210}$  pudo ocurrir por un bajo número de copias de  $S_{210}$ -RNasa en el pistilo. Por razones técnicas, en este trabajo no se pudo medir los niveles de transcripción de este alelo durante la maduración estilar.

Los individuos AC poseen algunas ventajas importantes para la especie. En primer lugar, la autofecundación permite heredar de manera directa todo un genoma parental a la siguiente generación y el polen a su vez estaría dispuesto para la reproducción cruzada con sus congéneres. En segundo lugar, la autofecundación puede ser ventajosa si no están dadas las condiciones de reproducción cruzada que comprometen la formación de semillas para la próxima generación. Esto puede ocurrir por la presencia de polinizadores poco fiables o por falta de los mismos. En tercer lugar, la autofecundación ofrece menos costos en términos de

energía y de recursos para la producción de semillas (Good-Avila *et al.*, 2008). Por ejemplo, se requiere de un mayor costo energético para producir la recompensa floral que buscan los polinizadores (Good-Avila *et al.*, 2008 y referencias de ese trabajo) y la planta podría utilizar estos recursos para otras necesidades. La autofecundación es una estrategia reproductiva importante para las malezas y especies colonizadoras, que normalmente se someten a repetidas colonizaciones y eventos de extinción local y cuyo tamaño poblacional suele ser pequeño (Kohn, 2008).

El rechazo del polen en Solanáceas es un mecanismo bastante complejo. Al menos en el sistema de AI dependiente de S-RNasas de *N. alata* y de otras especies de Solanáceas, están implicados varios factores independientes del locus *S* y que son necesarios para el rechazo del polen incompatible (McClure *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2002; Hancock *et al.*, 2005; Puerta *et al.*, 2009). Otros factores hipotéticos han sido propuestos como parte de la maquinaria molecular que conduce al rechazo del polen (Goldraij *et al.*, 2006; Hua & Kao, 2006; McClure, 2008). Actualmente se están seleccionando los individuos de la población NaM que muestran una tendencia a la autofecundación. El análisis de estos individuos, posiblemente deficientes en alguno de los factores implicados en el rechazo de polen, contribuirá a clarificar una parte del complejo mecanismo molecular del sistema SI basado en S-RNasas.

En conclusión, esta parte del trabajo de tesis contribuyó principalmente a: 1) Examinar por primera vez el locus *S* de una población natural de *Nicotiana alata* lo que permitió conocer con mayor profundidad la diversidad alélica de las S-RNasas. Mediante análisis filogenético se confirmó que las S-RNasas de esta especie se distribuyen en un espectro amplio de líneas transgénicas. 2) Identificar dos nuevas ribonucleasas no funcionales en AI, pero, al menos en el caso de NnSR1, con otras funciones vinculadas a la adaptación de la planta a situaciones de estrés.

### **3.4. Materiales y métodos.**

### 3.4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.

La población natural de *Nicotiana alata* estudiada en esta tesis fue designada **NaM** (*Nicotiana alata* de Misiones) y fue recolectada el 26 de noviembre de 2006 en la provincia de Misiones, Argentina. Las plantas fueron localizadas en la costa del río Paraná, a unos 300 m de la confluencia los ríos del Paraná e Iguazú (25° 35' 50'' S, 54° 35' 34'' O). La población ocupaba un área de aproximadamente 5.000 m<sup>2</sup> donde se encontraron unas 15 plantas aisladas, establecidas en un suelo pedregoso con poca cobertura vegetal. Se recolectaron semillas al azar en microtubos de 1,5 ml, se mezclaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Las semillas fueron germinadas y crecidas en un invernáculo a 28°C con un período de 16/8 h de luz/oscuridad. Los individuos NaM-1 a NaM-8 fueron seleccionados al azar de las semillas recolectadas. Los individuos NaM-9 y NaM-10 derivaron de un *screening* de la población NaM mediante ensayos de PCR con *primers* específicos para cada alelo, para seleccionar plantas que no llevaran la secuencia S5 (designada *NnSR2*, con posterioridad a los estudios de funcionalidad). Los individuos NaM-11 y NaM-12 derivaron de cruzamientos NaM-5 x NaM-7 y NaM-2 x NaM-7, respectivamente. Los individuos NaM-t1 y NaM-t2 fueron utilizados como plantas control, derivadas del cruzamiento de NaM-5 x *S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>* (esta última planta fue obtenida de la autofecundación de NaM-7 lograda mediante la polinización de pistilos inmaduros). Ninguna de las plantas produjo frutos por autofecundación, con excepción de NaM-1 y NaM-8 que, ocasionalmente, produjeron pequeñas cápsulas.

Las semillas de *N. longiflora*, un miembro AC de la sección *Alatae* (Goodspeed, 1954), fueron colectadas de una población natural de Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina (31° 26' 18'' S, 64° 11' 23'' W). Las plantas de la población de laboratorio de *N. alata* de genotipos *S<sub>C10</sub>S<sub>105</sub>* y *S<sub>C10</sub>S<sub>A2</sub>* y *S<sub>105</sub>S<sub>A2</sub>* fueron obtenidos mediante el cruce de líneas homocigotas *S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>*, *S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>* y *S<sub>A2</sub>S<sub>A2</sub>* (Murfett *et al.*, 1996; McClure *et al.*, 1999). La planta AC *N. alata* cv Breakthrough (BT) fue cedida por el Dr. Bruce McClure, *University of Missouri*, EE.UU. Estas plantas fueron cultivadas en las mismas condiciones descriptas para la población NaM. Por lo menos, dos individuos de cada especie o genotipo fueron seleccionados para los experimentos de caracterización del genotipo S.

### 3.4.2. Extracción de ácidos nucleicos.

Para los ensayos de PCR genómica, el ADN fue purificado siguiendo el protocolo de Dellaporta *et al.*, (1983). Aproximadamente 150 mg de hoja de cada planta fueron molidas en aire líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregó un buffer de extracción (100 mM Tris-ClH pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) y se mezcló por inversión. Se adicionó 10% SDS y se incubó en baño de agua a 65°C durante 20 min, mezclando por inversión cada 5 min. Posteriormente se agregó solución III (5 M AcK/AcH glaciar/H<sub>2</sub>O en relación 60/11,5/28,5), se mezcló por inversión y se incubó durante 20 min en hielo. La solución fue centrifugada a máxima velocidad en frío para recuperar el sobrenadante, se agregaron 2 volúmenes de etanol frío y se dejó precipitando a -20°C durante 2 hs. Luego de una centrifugación a máxima velocidad durante 10 min se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado con etanol al 70%, secado y resuspendido en 50  $\mu$ L de agua estéril o buffer TE. En el ADN resuspendido se agregó RNasa A hasta 20  $\mu$ g/mL y se incubó en baño de agua a 42°C durante 30 min. Posteriormente se agregó agua estéril hasta 500  $\mu$ L y se realizaron una serie de lavados sucesivos con 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 25/24/1; fenol cloroformo 1/1 y cloroformo, recuperando siempre la fase superior (acuosa). Para la precipitación del ADN se agregó solución III hasta el 10% del volumen recuperado, 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20°C durante 2 hs para precipitar el ADN. El *pellet* fue lavado con etanol 70%, secado y resuspendido en agua estéril o buffer TE en un volumen final de 50  $\mu$ L. Ocasionalmente el ADN también fue purificado mediante el kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep kit (Sigma, St Louis, MO), siguiendo las especificaciones del fabricante.

El ARN total se extrajo de estilos (incluyendo el estigma) de acuerdo a McClure *et al.*, (1990). Seis estigma-estilos (de aproximadamente 20-25 mg cada uno) fueron colectados, inmediatamente congelados en aire líquido y procesados en el momento o guardados a -80°C. Los pistilos fueron macerados en mortero con aire líquido hasta alcanzar un polvo bien fino; el tejido pulverizado se sumergió en aire líquido en un tubo Falcon de 15 mL e inmediatamente luego de la evaporación del aire líquido se agregó 1 mL de partes iguales de buffer de extracción (100 mM Tris-ClH pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 7 M Urea, 1% SDS, 1%  $\beta$ -Mercaptoetanol) y fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25/24/1. Inmediatamente se mezcló con vortex por 5 min para facilitar una extracción masiva. El contenido fue volcado en un microtubo de 1,5 mL y centrifugado por 5 min a máxima velocidad. La fase superior recuperada fue lavada dos veces con un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico

25/24/1 y un volumen de cloroformo, agitando vigorosamente y centrifugando por 5 min a máxima velocidad. Para precipitar los ácidos nucleicos, la fase superior recuperada fue tratada con 10 M acetato de amonio y se agregó un volumen de isopropanol bien frío, se mezcló por inversión y se dejó precipitando a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 min o más. Posteriormente se realizó una centrifugación en frío a máxima velocidad por 15 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue secado con una corriente suave de nitrógeno gaseoso. El *pellet* fue resuspendido en 300  $\mu\text{L}$  con agua DEPC en frío, se agregó un volumen de 8 M LiCl, se mezcló por inversión y se dejó precipitando selectivamente el ARN a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido nuevamente en agua DEPC. Tras agregar 100  $\mu\text{L}$  de 10 M acetato de amonio se llenó el tubo con etanol absoluto frío y se dejó precipitando a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 min o más. Por último se realizó una centrifugación en frío para coleccionar el ARN, se descartó el sobrenadante y se lavó con 70% etanol bien frío. El *pellet* fue secado con nitrógeno gaseoso y resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de agua DEPC.

El ADN y ARN fueron cuantificados mediante espectrofotometría y la calidad del material se evaluó cualitativamente mediante geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio.

Para determinar los genotipos de la progenie en los ensayos de funcionalidad, se extrajo ADN de pequeños trozos de hojas de plántulas mediante una homogeneización ligera con un mortero de plástico en 0,2 mL de 0,2 M Tris-ClH pH 8 que contenía 0,25 M NaCl, 0,02 M EDTA, y 0,5% w/v SDS. Después de calentar a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, el sobrenadante fue precipitado sucesivamente con isopropanol y 70% etanol. El *pellet* final fue resuspendido en agua estéril. Se utilizó 0,4-2  $\mu\text{L}$  del extracto de la hoja como templado en una reacción de PCR de 20  $\mu\text{L}$ , como se indica más abajo.

### **3.4.3. PCR, clonado y secuenciamiento de las potenciales S-RNasas. Análisis de la expresión espacial y temporal de los transcritos de S-RNasa.**

Las *S-RNasas* de los estilos de la población NaM fueron amplificadas utilizando pares de *primers* degenerados basados en los dominios conservados C1-C5 y C2-C4 (Fig. 18; Ioerger *et al.*, 1991). Todas las secuencias de los *primers* degenerados y *primers* específicos para cada alelo se detallan en la Tabla 6.

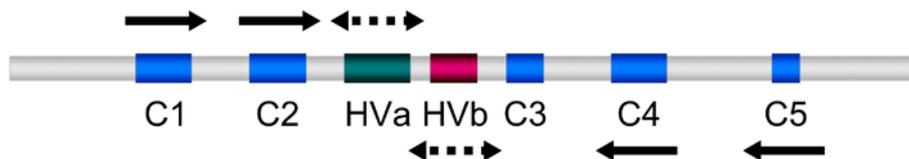
Tabla 6. Pares de *primers*, condiciones de PCR y tamaños de productos de amplificación.

Transcripto	Par de primers	<sup>a</sup> Secuencia del primer 5' → 3'	Temperatura de apareamiento (°C)	Producto de RT-PCR (pb)
S-RNasas <sup>b</sup> (Fragmento C1-C5)	C1f C5r	TGCAACTBGTBTTRMMAT RAACATATRCCWAYCTC	47,4	~500
S-RNasas (Fragmento C1-C5)	C1af C5r	TGCAACTBGTBTTRMMATGGCCAA ver arriba	44	~500
S-RNasas (Fragmento C2-C4)	C2f C4r	AACTTTACRATYCA YGRCTTTG AACTTTACRATYCA YGRCTTTG	47,4	~280
S-RNasas (Fragmento C1-C4)	C1f C4r	ver arriba ver arriba	47,4	~350
S-RNasas (Fragmento C2-C5)	C2f C5r	ver arriba ver arriba	47,4	~420
Sc10-RNasa	Sc10f Sc10r	GACCTAACCACCGCAGAAAC CATCGAGTCGAAACATATGCC	63	312
S <sub>2</sub> -RNasa	S2f S2r	T TACTGCGATCGCTCCAAACC ACAACACGTGCCATGCTTT	62	157
S <sub>6</sub> -RNasa	S6f S6r	GGTAAAGAAGATGACTATAACAT TTCATACAATCAGCTTTCTCTC	58,3	101
S <sub>5</sub> -RNasa	S5f S5r	TCCCCGTAAGTGCAAACAA GTCCAGCGAGAATCACCAATG	62,5	312
S70-RNasa	S70f S70r	T TAAACCGCAGCCCAA GATCGAAATATGCGTCCTGATTA	60	112
S75-RNasa	S75f S75r	GACTGCGAGTCTGATGACAAG TTCCATGATTTCTCAGAGTTG	59,4	247
S107-RNasa	S107f S107r	T TACGCCAAGCAGAAACA ACTCC GCGCATGGCTAATCTAAAATA	60,5	106
S27-RNasa	S27f S27r	CAGGCTTATGGTTTGAA TAGGAGCCTTATTATTAGTA	51	232
S210-RNasa	S210f S210r	TCAAGGACGACCAGAAATG TCGACGFCACTTGACCTTAG	62	304
S63-RNasa	S63f S63r	GCCGATCTGATGCACAAGAA ACGCAATTGAGGTTAGGATACG	65	244
Actina	Actf Actr	CCCTCCCACATGCTATTCT AGAGCCTCCAATCCAGACA	54	~520

<sup>a</sup> Las secuencias de los pares de *primers* para S<sub>2</sub> y S<sub>6</sub>-RNasas fueron tomados de Li *et al.*, 2000.

<sup>b</sup> Los fragmentos C1-C5 fueron amplificados usando C1f o C1af como *primer forward*.

(B) = G + T + C; (M) = A + C; (R) = A + G; (W) = A + T; (Y) = C + T.



**Figura 18. Diseños de oligonucleótidos basados en la estructura primaria de las S-RNAsas.** Los *primers* degenerados fueron diseñados a partir de un alineamiento de las regiones conservadas (C) (flechas sólidas). Los *primers* específicos fueron diseñados a partir de un alineamiento de las regiones hipervariables (HVa o HVb) (flechas punteadas).

Los ensayos de PCR genómica fueron realizados en reacciones de 20  $\mu\text{L}$  que contenían 0,4 unidades de GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polimerasa (Promega, Madison WN), GreenGoTaq Flexi buffer<sup>®</sup>, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, y 12,5 a 33 pg de ADN. Los *primers* específicos y *primers* degenerados fueron utilizados entre 0,4 y 1,2  $\mu\text{M}$  respectivamente. Las reacciones se incubaron a 95°C durante 5 min, para continuar luego con los ciclos de desnaturalización de 1 min a 94°C, apareamiento de 45 s a la temperatura indicada en la Tabla 6, y extensión de 1 min a 72°C. Estos tres ciclos fueron repetidos 40 veces, seguidos por un paso de extensión final de 5 min a 72°C.

Para las amplificaciones mediante RT-PCR, se incubó 1  $\mu\text{g}$  de ARN total y 5,5  $\mu\text{M}$  oligo (dT)<sub>15</sub> durante 5 min a 70°C, se enfrió en agua con hielo durante 5 min, y se mezcló con 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  de ImProm-II<sup>TM</sup> transcriptasa inversa e ImProm-II<sup>TM</sup> buffer (Promega, Madison WN) en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . La síntesis de la cadena simple de ADNc se realizó durante 1 h a 42°C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la amplificación por PCR se utilizó como molde una alícuota de 2  $\mu\text{L}$  de la reacción de síntesis de ADNc, siguiendo el procedimiento indicado anteriormente para la PCR genómica. Los fragmentos amplificados fueron analizados en geles de agarosa, purificados y clonados en vector pGEM-Teasy (Promega, Madison WN). Se analizaron veinte a treinta plásmidos recombinantes por digestión con enzimas de restricción o por PCR con *primers* específicos para cada alelo. Todos los tipos de plásmidos identificados fueron secuenciados con los *primers* universales correspondientes a los promotores SP6 o T7 (Macrogen Inc, MD, EE.UU.). Para cada tipo de clon identificado, ambas hebras de ADN de dos o más plásmidos fueron secuenciados.

Debido a la alta frecuencia que presentaron *S63* y *S5* durante el clonado, se emplearon diversas estrategias para “eludir” la amplificación de estas dos secuencias. Para eludir la amplificación de *S63* se diseñó un nuevo *primer* (C1af, ver Tabla 6) que tenía 6 bases adicionales 5' GGCCAA 3'. La nueva combinación C1af-C5r no amplificó a *S63* en ensayos

de PCR ni de RT-PCR, lo cual fue confirmado mediante PCR de colonias con *primers* específicos para cada alelo y mediante ensayos de digestión con la enzima Hind III que cliva específicamente la secuencia *S63*. La misma estrategia no funcionó en las plantas que presentaban *S5* o *SC10* porque ambas secuencias presentaban el extremo 5' GGCCAA 3'. Para eludir la secuencia *S5* se realizó un segundo *screening* en 20 individuos más de la población NaM, donde se seleccionaron las plantas NaM-9 y NaM-10 que carecían de esta secuencia. En el caso del alelo *SC10*, para identificar el otro alelo de S-RNasa en las plantas NaM-2 y NaM-7, se realizaron los cruzamientos NaM-2 x NaM-7 y NaM-5 x NaM-7 y una selección posterior de las plantas F1 que no tenían *SC10*, de esta forma se seleccionaron las plantas NaM-11 y NaM-12.

Para el análisis de la expresión espacial y temporal de los transcritos, el ARN total fue aislado de diferentes tejidos (estigma/estilo, hojas, polen, sépalos y pétalos) y de los estilos en diferentes etapas del desarrollo floral. Se evaluó la linealidad de amplificación de los alelos por PCR mediante densitometría (Gel-Pro™ Analyzer 3.0). Se utilizó la actina como control positivo de carga y como referencia para estimar la abundancia relativa de cada transcrito. Los datos de las nuevas secuencias que se describen aquí, han sido depositados en las bibliotecas de datos del GenBank con los números de acceso GQ375150 (*S70*), GQ375151 (*S5*), GQ375152 (*S75*), GQ375153 (*S27*), GQ375154 (*S107*), GQ375155 (*S210*) y GQ850520 (*S63*).

#### 3.4.4. Ensayos de funcionalidad de las secuencias obtenidas.

La funcionalidad de las secuencias obtenidas fue establecida mediante cruzamientos entre plantas que comparten un candidato a alelo *S* (cruzamiento semicompatible) y el subsecuente análisis de segregación del genotipo *S* de la progenie por PCR en extractos de ADN con *primers* específicos para cada alelo. Las flores fueron emasculadas 2 días antes de la floración y polinizadas abundantemente 24 hs después de la antesis. En los cruzamientos semicompatibles, si los alelos ensayados son funcionales en el sistema de AI, se espera que estén presente en el 50% de la progenie, debido a la exclusiva contribución materna (suponiendo viabilidad completa de las gametas e igual probabilidad de segregación). Si los alelos compartidos no son funcionales en la AI, su proporción en la progenie sería mayor, lo que reflejaría la contribución paterna. Del mismo modo, se espera que todos los individuos de la progenie de un cruzamiento semicompatible reciban el único alelo paterno compatible. Por

ejemplo, en el cruzamiento hipotético ♀BC x ♂AB donde A, B y C son alelos S, si B es un alelo de AI completamente funcional tanto en el polen como en el estilo, entonces el cruzamiento será semicompatible y el alelo A es la única contribución del polen a la progenie (la F1 será AB y AC). Con esta estrategia, los haplotipos funcionales y no funcionales fueron identificados en muchas especies con el sistema de AI dependiente de S-RNasas (Hauck *et al.*, 2006; Igic *et al.*, 2007; Tsukamoto *et al.*, 2008).

### 3.4.5. Alineación de proteínas y análisis filogenético.

El análisis filogenético fue llevado a cabo junto al bioquímico Rodrigo Quiroga, especialista en Bioinformática. Las secuencias de nucleótidos de los candidatos a S-RNasas de la región comprendida entre los dominios conservados de C2-C5 (Ioerger *et al.*, 1991) fueron traducidas en secuencias de aminoácidos, alineadas con ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), retraducidas a una alineación de nucleótidos y ajustadas manualmente para asegurar una alineación adecuada de los sitios conservados de las S-RNasas de Solanáceas. El porcentaje de identidad de aminoácidos en las secuencias alineadas se determinó utilizando Megalign™ 5.00 (DNASTAR). Los árboles de secuencias S-RNasa fueron reconstruidos usando los métodos de Inferencia Bayesiana (BI) y Máxima Verosimilitud (ML) empleando los programas MrBayes v3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) y RaxML 7.04 (Stamatakis, 2006) respectivamente. Para la determinación de la filogenia por inferencia bayesiana, cuatro cadenas paralelas de Monte-Carlo Markov (MCMC) fueron corridas por 10 millones de generaciones para buscar el espacio en el árbol, con una frecuencia de muestreo de 100 generaciones. Se utilizó el modelo de sustitución de tiempo general reversible (GTR), aproximando la tasa de variación entre sitios mediante el uso de cuatro categorías *gamma* discretas. Un árbol consenso fue construido con el subprograma de MrBayes “SUMT”, descartando el 25% inicial de los árboles que se generan en cada corrida como *burn-in*. El estado estacionario fue sugerido por el promedio de desviaciones estándar de las frecuencias por debajo de 0,01 después de 6,5 millones de generaciones y los valores de factor de reducción de escala (PSRF) para todos los parámetros oscilando entre 1.000 y 1.003. La filogenia ML fue calculada utilizando la aproximación GTR+CAT (Stamatakis *et al.*, 2008) para modelar la variación de la tasa de sitio, utilizando un árbol inicial de máxima parsimonia para llevar a cabo 1.000 *bootstrap* rápidos y el modelo GTR con 4 categorías *gamma* discretas para llevar a cabo una búsqueda exhaustiva del árbol ML de mejor puntaje (un *bootstrapping*

tradicional no paramétrico se llevó a cabo con resultados muy similares). La topología del árbol de ML con mejor puntuación y el árbol consenso de BI demostraron ser muy similares. Las probabilidades posteriores para los clados del árbol consenso BI fueron asignadas en el árbol ML de mejor puntaje. Además de *N. alata*, se incluyeron cinco especies en el análisis filogenético que representaban una distribución amplia (*Solanum chilense*, *Lycium parishii*, *Petunia inflata*) o restringida (*Physalis longifolia*, *Witheringia solanacea*) de los alelos S-RNasa en los distintos linajes *S* (Richman & Kohn, 1999; Stone & Pierce, 2005; Kohn, 2008). Para establecer el número de linajes transgénicos (TG) que ocupaban las S-RNasas de *N. alata* en el árbol filogenético, se definió a un linaje TG como el nodo más reciente incluyendo S-RNasas de más de una especie (Savage & Miller, 2006). Se utilizó el alelo *S*<sub>3</sub>-RNasa de *Antirrhinum hispanicum* como *outgroup* de un conjunto total de 154 secuencias individuales para generar el árbol filogenético. En la Tabla 7 se detallan los números de acceso de las secuencias incluidas en el árbol.

También se realizó un árbol filogenético por BI comparando las S-RNasas de Solanáceas, Plantagináceas y Rosáceas con los relictos de S-RNasas (rS-RNasas), y las ribonucleasas parecidas a S-RNasas (rpS-RNasas). El árbol fue generado como se ha descrito anteriormente, a excepción de la longitud de corrida para MCMC, que fue de 3 millones de generaciones. La ribonucleasa T2 de *Aspergillus oryzae* fue asignada como *outgroup*.

Tabla 7. Secuencias utilizadas para el análisis filogenético de las S-RNasas.

Secuencia	Acceso	Secuencia	Acceso	Secuencia	Acceso	Secuencia	Acceso
Anthis_S1	AJ440730	Nicala-S210	GQ375155	Phylon_S26	AF281199	Solchi_S31	EF680091
Anthis_S2	X96465	Nicala-S63	GQ850520	Phylon_S27	AF281200	Solchi_S16	EF680092
Anthis_S3	AJ315593	Nicala_S6	U08861	Phylon_S28	AF281201	Solchi_S9	EF680093
Anthis_S3	AJ315593	Nicala_Sa2	U45957	Phylon_S29	AY706473	Solchi_S4	EF680094
Anthis_S4	X96466	Nicala_Sc10	U45959	Phylon_S3	AF281182	Solchi_S32	EF680095
Anthis_S5	X96464	Nicala_S3	U66427	Phylon_S30	AF374425	Solchi_S34	EF680096
Anthis_SL15	AJ440731	Nicala_S2	X03803	Phylon_S32	AF374426	Solchi_S19	EF680097
Anthis_SL28	AJ489249	Nicala_Ne	U13256	Phylon_S33	AF374427	Solchi_S20	EF680098
Anthis_SL29	AJ315592	Petinf_S02	AY136628	Phylon_S34	AF374428	Solchi_S21	EF680099
Aratha_RNS1	U05206	Petinf_S1	M67990	Phylon_S35	AF374429	Solchi_S30	EF680100
Aratha_RNS2	M98336	Petinf_S10	AF301171	Phylon_S36	AY706472	Solchi_S22	EF680101
Aratha_RNS3	U05207	Petinf_S11	AF301172	Phylon_S37	AF374420	Solchi_S17	EF680102
Aspory_RNT2	X61086	Petinf_S12	AF301173	Phylon_S4	AF281183	Solchi_S3	EF680103
Lycpar_S1	DQ367853	Petinf_S13	AF301174	Phylon_S5	AF374430	Solchi_S14	EF680105
Lycpar_S2	DQ367854	Petinf_S15	AF301175	Phylon_S6	AF281184	Solchi_S1	EF680106
Lycpar_S3	DQ367855	Petinf_S16	AF301176	Phylon_S7	AF281185	Solchi_S13	EF680107
Lycpar_S4	DQ367856	Petinf_S17	AF301177	Phylon_S8	AF281186	Solchi_S18	EF680108
Lycpar_S5	DQ367857	Petinf_S19	AF301178	Phylon_S9	AF281187	Solchi_S7	EF680109
Lycpar_S6	DQ367858	Petinf_S2	AY136628	Prudul_S10	AM231658	Solchi_S11	EF680110
Lycpar_S7	DQ367859	Petinf_S20	AF301179	Prudul_S2	AF510416	Solchi_S11	Z26581
Lycpar_S8	DQ367860	Petinf_S21	AF301180	Prudul_S25	EF690372	Solchi_S33	Z26582
Lycpar_S9	DQ367861	Petinf_S3	M67991	Prudul_S2b	EF690369	Witsol_S1	AY454099
Lycpar_S10	DQ367862	Petinf_S3L	M67991	Prudul_S33	EF690375	Witsol_S2	AY454100
Lycpar_S11	DQ367863	Petinf_S6	AF301167	Prudul_S4	AF490506	Witsol_S4	AY454102
Lycpar_S12	DQ367864	Petinf_S7	AF301168	Prudul_S63	AY613919	Witsol_S5	AY454103
Lycpar_S13	AF105343	Petinf_S8	AF301169	Prudul_Sk	AF267511	Witsol_S6	AY454104
Lycpar_S14	DQ367866	Petinf_S9	AF301170	Prudul_Sn	DQ093825	Witsol_S7	AY454105
Lycpar_S15	DQ367867	Phylon_S1	AF281180	Prudul_Pd2	AF202030	Witsol_S8	AY454106
Lycpar_S17	DQ367868	Phylon_S10	AF374421	Solchi_S5	AB072466	Witsol_S9	AY454107
Lycpar_S18	DQ367869	Phylon_S11	AF374422	Solchi_S28	AB072467	Witsol_S11	AY454109
Lycpar_S19	DQ367870	Phylon_S12	AF281188	Solchi_S70	AB072470	Witsol_S12	AY454110
Lycpar_S21	DQ367871	Phylon_S13	AF281189	Solchi_S71	AB072471	Witsol_S13	AY454111
Lycpar_S22	DQ367872	Phylon_S14	AF281190	Solchi_S72	AB072472	Witsol_S14	AY454112
Lycpar_S23	DQ367873	Phylon_S15	AF281191	Solchi_S15	EF680077	Witsol_S15	AY454113
Lycpar_S24	DQ367874	Phylon_S16	AF281192	Solchi_S26	EF680078	Witsol_S16	AY454114
Lycpar_S25	DQ367875	Phylon_S17	AF281193	Solchi_S27	EF680079	Witsol_S3	AY454115
Lycpar_S26	DQ367876	Phylon_S18	AF281194	Solchi_S24	EF680081	Witsol_S18	AY454116
Lycpar_S24b	EU074799	Phylon_S19	AF374423	Solchi_S12	EF680082	Witsol_S19	AY454117
Nicala_MS1	D63887	Phylon_S2	AF281181	Solchi_S29	EF680084	Witsol_S20	AY454118
Nicala_MS2	D63888	Phylon_S20	AF281195	Solchi_S8	EF680085	Witsol_S21	AY454119
Nicala-S70	GQ375150	Phylon_S21	AY706474	Solchi_S6	EF680086	Witsol_S22	AY454120
Nicala-S5	GQ375151	Phylon_S22	AF281196	Solchi_S23	EF680087	Witsol_S23	AY454121
Nicala-S75	GQ375152	Phylon_S23	AF281197	Solchi_S10	EF680088		
Nicala-S27	GQ375153	Phylon_S24	AF374424	Solchi_S2	EF680089		
Nicala-S107	GQ375154	Phylon_S25	AF281198	Solchi_S25	EF680090		

**4. OBJETIVO 2. Estudiar la dinámica del citoesqueleto de F-actina en polinizaciones compatibles e incompatibles.**

## **4.1. Introducción.**

El citoesqueleto de actina es un componente esencial de la maquinaria del **crecimiento polar** en los tubos polínicos (Cheung & Wu, 2008). En estas células, los filamentos de actina (F-actina) polimerizada exhiben una organización muy definida y particular, presentándose dispuestos en paralelo al eje principal del tubo polínico. Estos haces de F-actina se extienden desde la región subapical a lo largo del vástago citoplasmático del tubo polínico. En la región subapical, se encuentran fragmentos de F-actina más cortos y dispuestos azarosamente formando lo que se conoce como **franja de actina**, una red densa de actina ubicada inmediatamente detrás de la región apical (Geitmann *et al.*, 2000; Vidali *et al.*, 2001). En la región apical propiamente dicha, la actina se presenta en filamentos finos e individuales difíciles de observar, sobre todo por debajo del límite de la resolución de las técnicas de microscopía de fluorescencia (Staiger *et al.*, 2010). Esta organización altamente estructurada de F-actina no sólo proporciona el sostén celular, sino que también es un escenario adecuado para el movimiento de las vesículas y de las organelas, incluyendo el transporte de las vesículas secretoras desde la región subapical hacia el ápice. Este transporte resulta necesario para sostener el crecimiento del *tip* celular (Staiger *et al.*, 1994; Cai & Cresti, 2009). El crecimiento polar también es propio de los pelos radicales de las plantas, las hifas de los hongos y en las neuritas de los animales. Debido a la facilidad que tienen los tubos polínicos de germinar y crecer fácilmente en medios de cultivo, la mayoría de los estudios de la organización y la dinámica de la F-actina fueron realizados en sistemas *in vitro*. Los escasos estudios realizados *in vivo*, de tubos polínicos que crecen a través del estilo, confirmaron la misma disposición general de F-actina observada *in vitro* (Geitmann *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002).

Dentro de las Angiospermas, la AI ha evolucionado varias veces en forma de diferentes mecanismos independientes (Kao & Tsukamoto, 2004). Diferentes familias de plantas presentan una variedad de estrategias para detener la germinación y el crecimiento del polen incompatible. A nivel molecular, el mecanismo de AI mejor conocido es el de *Papaver rhoeas* que ha sido exitosamente reproducido en un sistema *in vitro*. La adición de glicoproteínas *S* purificadas del estigma (Franklin-Tong *et al.*, 1993) o proteínas recombinantes *S* (Franklin-Tong *et al.*, 1997) provocó la inhibición del crecimiento *in vitro* del tubo polínico incompatible, simulando de esta manera las condiciones del rechazo *in vivo* (Franklin-Tong, 2008; Poulter *et al.*, 2011). Estos trabajos pusieron de manifiesto el papel crucial del citoesqueleto de F-actina en el rechazo del polen incompatible en el sistema de AI de *Papaver*. Luego de agregar la proteína estigmática *S* recombinante al medio de cultivo de polen, una afluencia masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  libre es disparado en el vástago citoplasmático del tubo

polínico incompatible, desencadenando una rápida y masiva depolimerización de los cables de F-actina y la posterior formación de actina polimerizada en forma puntiforme (Geitmann *et al.*, 2000; Snowman *et al.*, 2002; Poulter *et al.*, 2010). Esta simple depolimerización de F-actina (inducida por la respuesta de AI) desencadena un proceso de muerte celular programada (MCP) durante el rechazo del polen incompatible (Thomas *et al.*, 2006; Bosch & Franklin Tong, 2007; Wilkins *et al.*, 2011). De esta manera, la F-actina actúa tanto como blanco y efector de la transducción de señales del sistema de AI. Los cambios en la organización de la F-actina y inducción de la MCP han sido reportados también en diversos procesos biológicos en células animales y en levaduras, (revisado recientemente por Franklin-Tong & Gourlay, 2008; Smertenko & Franklin-Tong, 2011).

El papel de la F-actina ha sido considerablemente menos estudiado en el sistema de AI dependiente de S-RNasas, mecanismo que comparten las familias de Solanáceas, Plantagináceas y Rosáceas (Hua *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; McClure *et al.*, 2011). En *Pyrus pyrifolia*, la germinación *in vitro* y el crecimiento del tubo polínico fueron inhibidos de manera selectiva por una S-RNasa incompatible añadida al medio de cultivo (Hiratsuka *et al.*, 2001). Esta S-RNasa causó la disrupción y la redistribución de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive oxygen species*) localizadas en la región apical. La disrupción de ROS desencadenó la depolimerización del citoesqueleto de F-actina, pasando del patrón de cables al patrón de actina puntiforme (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). Estos cambios se producen en paralelo junto con alteraciones en la membrana mitocondrial y la degradación del ADN nuclear (Wang *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que en Rosáceas, los cambios de la configuración de F-actina también darían lugar a un proceso de MCP durante el rechazo del polen incompatible (Wang & Zhang, 2011).

En Solanáceas, los cambios subcelulares producidos en el polen incompatible fueron estudiados a nivel ultraestructural. En un estadio temprano de rechazo del polen en *Solanum peruvianum* (sub nom. *Lycopersicum peruvianum*, de Nettancourt *et al.*, 1973) y *Brugmansia suaveolens* (Geitmann *et al.*, 1995), las primeras manifestaciones reportadas fueron las alteraciones morfológicas en el retículo endoplasmático rugoso, la agregación de las vesículas citoplasmáticas en el ápice y un aumento en la deposición de calosa en la pared celular. En experimentos de inmunocitoquímica se mostró que las S-RNasas estaban localizadas en vacuolas (Goldraj *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009), las cuales parecen colapsar selectivamente después del rechazo. La ruptura de la integridad vacuolar produce la liberación de las S-RNasas al citoplasma de los tubos polínicos incompatibles, donde ejercerían su actividad citotóxica. Aunque en Solanáceas se caracterizaron algunos eventos subcelulares en el tubo

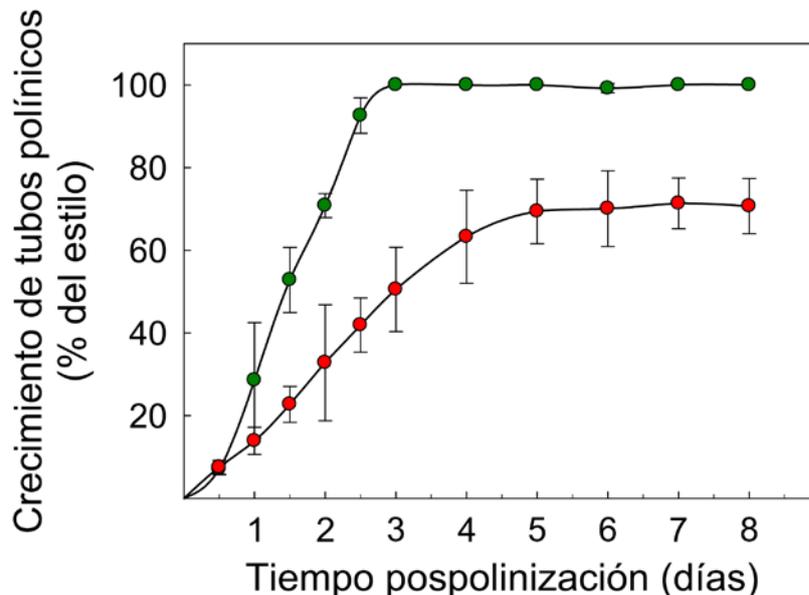
polínico rechazado, ningún estudio ha focalizado en las alteraciones de la F-actina y su posible rol durante la respuesta de AI dependiente de S-RNasas. Además, con la excepción de un único experimento en *Papaver* (Geitmann *et al.*, 2000), los estudios de los cambios configuracionales de la F-actina durante la reacción de AI se han llevado a cabo casi exclusivamente, en sistemas *in vitro*.

En esta tesis se estudiaron las alteraciones *in vivo* del citoesqueleto de F-actina de tubos polínicos creciendo a través de estilos polinizados durante la reacción de AI en *Nicotiana alata*. A medida que los tubos polínicos incompatibles progresaban en el tejido de transmisión del estilo, aumentó gradualmente la fragmentación de los cables de la F-actina en segmentos más cortos, alcanzando casi al 80% de los tubos polínicos, cuando el crecimiento de los mismos se detuvo completamente. Sin embargo, en este punto, más del 80% de los tubos mantuvieron íntegro el sistema vacuolar. Este resultado indica que la desorganización de la F-actina precede a la ruptura vacuolar durante el proceso de rechazo del polen incompatible en *Nicotiana*. De esta manera, los tubos polínicos incompatibles presentaron una desorganización secuencial y organizada de sus estructuras subcelulares, en lugar de una degeneración citoplásmica generalizada, como había sido sugerido previamente (de Nettancourt *et al.*, 1973; Geitmann *et al.*, 1995). En consecuencia, la liberación de la S-RNasa almacenada en vacuolas ocurre en una fase tardía del rechazo una vez que una importante desorganización subcelular se haya producido en el polen incompatible. Los cambios subcelulares ocurridos en el polen de *Nicotiana alata* durante la respuesta de AI *in vivo* se discutirán respecto a los cambios subcelulares ocurridos en los tubos polínicos incompatibles de *Papaver* y *Pyrus* durante la respuesta de AI *in vitro*.

## 4.2. Resultados.

#### 4.2.1. Crecimiento de los tubos polínicos en polinizaciones compatibles e incompatibles.

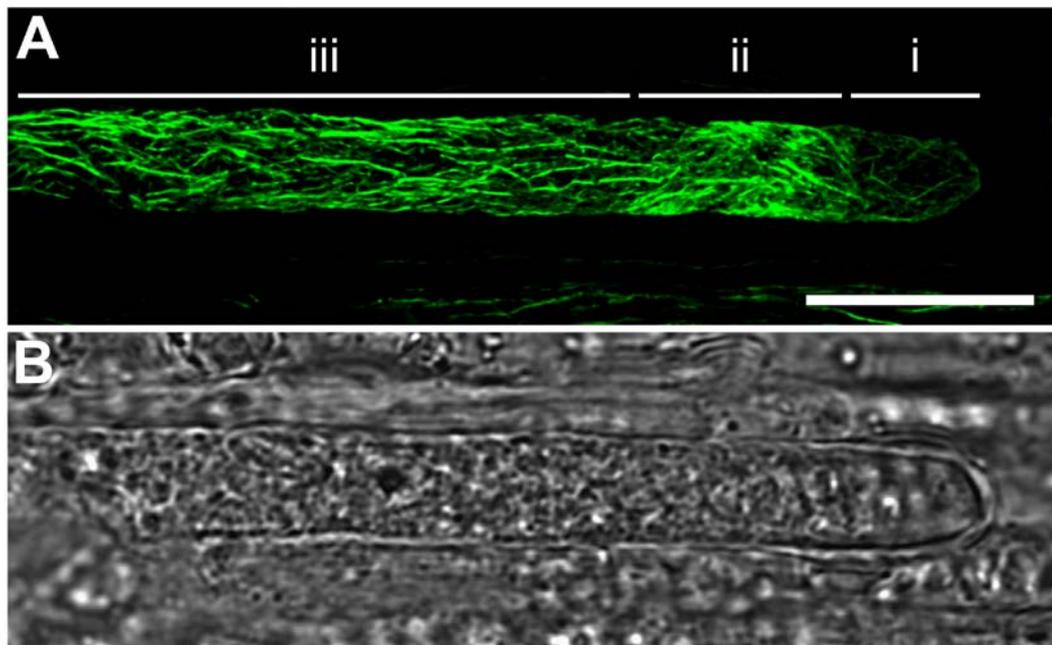
En primer lugar, resultó necesario conocer la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos dentro del pistilo en polinizaciones compatibles ( $S_{C10}S_{C10} \times S_{70}$ ) e incompatibles ( $S_{C10}S_{C10} \times S_{C10}$ ). Esta velocidad puede variar ampliamente dentro de una misma especie, por causas genéticas, fisiológicas o ambientales, entre otras (Mena-Alí & Stephenson, 2007 y referencias de ese trabajo). Los tubos polínicos compatibles e incompatibles mostraron la misma velocidad de crecimiento durante las primeras 12 hs pospolinización, cuando el ápice del tubo penetró el estigma y unos 5 mm en el interior del estilo (etapa de polinización temprana) (Fig. 19). El crecimiento del polen aumentó luego y se mantuvo en un nivel constante en el cruzamiento compatible, donde los tubos polínicos alcanzaron el ovario dentro de las 72 hs pospolinización. En las autopolinizaciones también hubo un crecimiento lineal luego de las 12 hs iniciales, aunque a una velocidad notablemente más lenta que en las polinizaciones cruzadas. Al quinto día pospolinización el crecimiento fue totalmente detenido, localizándose el “frente” de los tubos polínicos ligeramente por debajo de la mitad del estilo.



**Figura 19. Crecimiento de los tubos polínicos en polinizaciones compatible e incompatible.** Pistilos  $S_{C10}S_{C10}$  fueron polinizados con polen compatible  $S_{70}$ , (círculos verdes) y polen incompatible  $S_{C10}$ , (círculos rojos). La posición del frente de avance de los tubos polínicos fue determinada en muestras teñidas con azul de anilina por microscopía de epifluorescencia, a diferentes tiempos después de la polinización. Cada punto representa la media  $\pm$  el desvío estándar de tres o más experimentos independientes.

#### 4.2.2. Organización de la F-actina en polinizaciones compatibles e incompatibles.

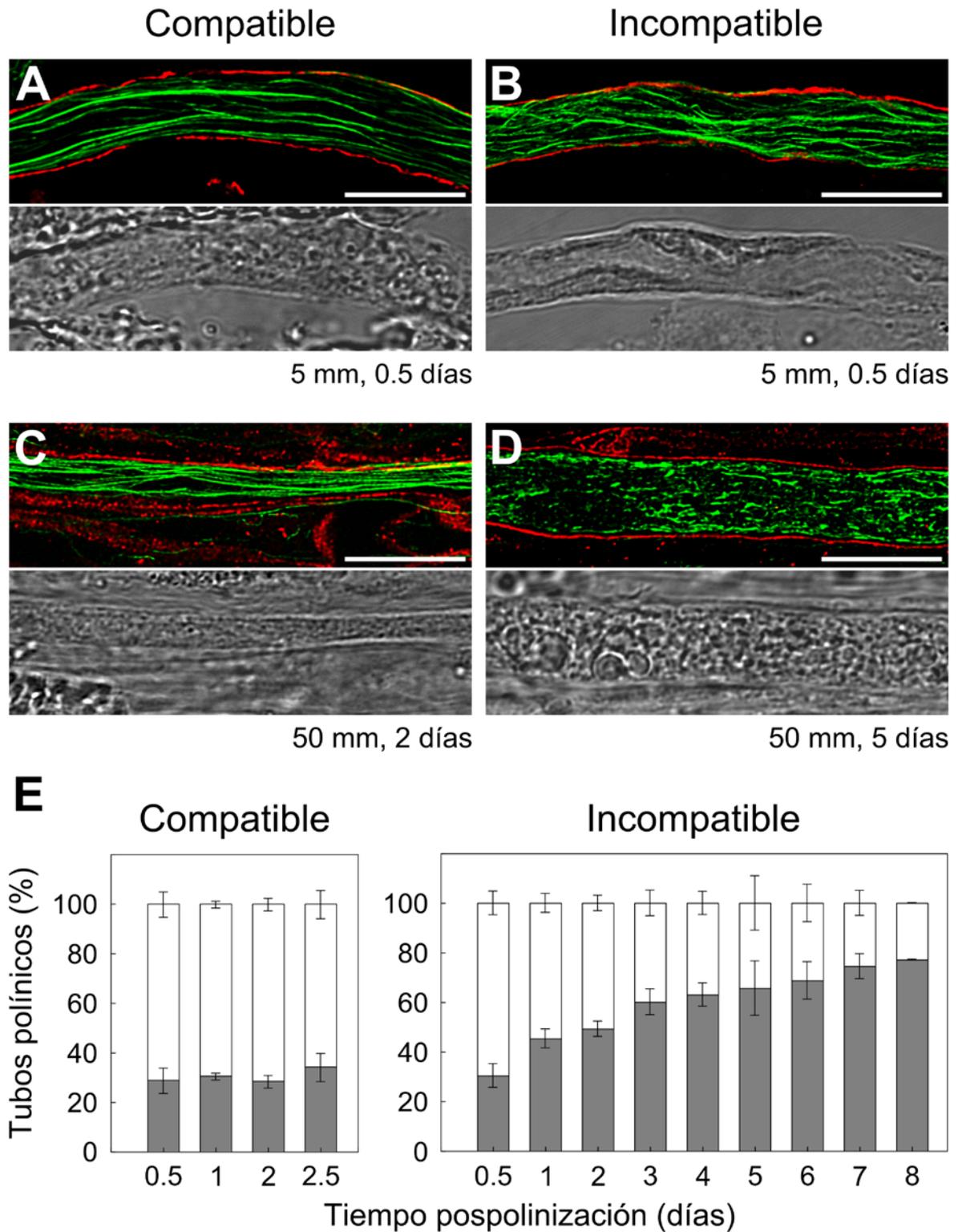
Para analizar la integridad del citoesqueleto de F-actina, se controló en primer lugar la eficacia del método de fijación para preservar la disposición de los filamentos de actina de los tubos polínicos crecidos *in vivo*. Las secciones fijadas de pistilos polinizados con polen compatible fueron tratadas con faloidina Alexa 488 para marcar la F-actina. Los tubos polínicos mostraron el patrón típico de marcación de filamentos de actina paralelos al eje longitudinal del tubo polínico, distinguidos en la zona subapical del vástago de la célula (Fig. 20A). Las regiones más próximas al ápice del tubo mostraron filamentos de actina más cortos dispuestos sin organización aparente, evidenciando la franja de actina, una zona de transición entre las regiones subapical y apical que usualmente posee fluorescencia más intensa. En el ápice del tubo polínico, donde se sitúa la zona de alargamiento, la marcación de F-actina fue más débil y dispersa. Este patrón de disposición de F-actina fue similar a configuraciones presentadas en trabajos anteriores, donde los tubos polínicos fueron marcados por diferentes métodos (Geitmann *et al.*, 2000; Wilsen *et al.*, 2006; Cheung *et al.*, 2008). Este resultado confirma que el procedimiento de fijación y marcación fue el apropiado para preservar la organización de la F-actina en los tubos polínicos crecidos *in vivo*.



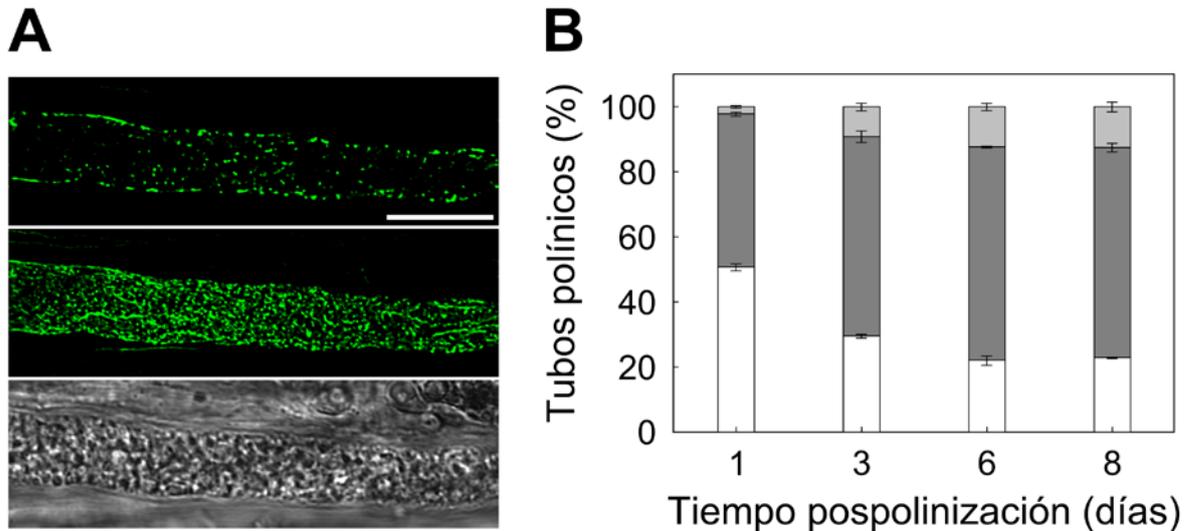
**Figura 20. Organización del citoesqueleto de F-actina de un tubo polínico en una polinización compatible.** (A) Patrón de marcación de la F-actina, mediante faloidina (proyección confocal). Se distinguen tres regiones características, desde la punta hacia el vástago: (i) El ápice con una marca de actina débil y fragmentos cortos, (ii) La franja de actina, mostrando una brillante y densa malla de F-actina, (iii) El vástago celular que comprende la región subapical y la región distal, mostrando los filamentos de actina orientados en paralelo al eje axial de la célula. (B) Campo brillante de la imagen que se muestra en A. Barra, 10  $\mu\text{m}$ .

Una vez comprobada entonces la eficacia de la marcación y tomando como referencia las velocidades de crecimiento de los tubos polínicos (Fig. 19), los pistilos  $S_{C10}S_{C10}$  polinizados de manera compatible (polen  $S_{70}$ ) o incompatible (polen  $S_{C10}$ ) fueron colectados a distintos tiempos postpolinización. Las secciones fueron tratadas con faloidina Alexa 488 (verde) para marcar la F-actina y con un anticuerpo anti calosa, para demarcar la pared celular del tubo polínico (rojo). Con esta estrategia se podría distinguir con claridad la marca de F-actina del polen y de las células del tejido de transmisión. La figura 21 muestra imágenes representativas de los tubos polínicos compatibles e incompatibles localizados en la misma posición en el estilo. Coincidentemente con las similares velocidades de crecimiento (Fig. 19), luego de transitar una distancia de 5 mm en 12 horas, los tubos polínicos compatibles e incompatibles mostraron el mismo patrón de organización de F-actina (Fig. 21A y 21B). En contraste, una diferencia notable fue observada luego de que los tubos polínicos recorrieran una distancia de 50 mm. Dos días después de la polinización los tubos polínicos compatibles se localizaban cerca del ovario y mostraron la organización de la F-actina similar a la etapa temprana de polinización de 12 hs (Fig. 21C). Por el contrario, 5 días después de la autopolinización, cuando el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles estaba totalmente detenido (Fig. 19), los filamentos de F-actina estaban fragmentados en segmentos cortos de distintos tamaños, extendidos a lo largo de toda la región subapical del tubo polínico incompatible (Fig. 21D). Las dos configuraciones de F-actina descritas fueron cuantificadas a distintos tiempos postpolinización (Fig. 21E). En ambos tipos de polinizaciones, el 30% de los tubos polínicos exhibieron la F-actina desorganizada 12 horas después de la polinización. Mientras que en las polinizaciones compatibles este porcentaje se mantuvo constante durante toda la trayectoria de los tubos polínicos hacia el ovario, hubo un incremento progresivo del número de tubos polínicos incompatibles con la F-actina desorganizada, llegando a un 70% en el momento del arresto del crecimiento de los tubos polínicos (5 días después de la polinización) y casi a un 80%, 8 días después de la polinización. El patrón de la desorganización de la F-actina del polen incompatible mostrado en la figura 21D fue predominante en todos los tiempos posteriores a las 12 horas de polinización.

Los experimentos de marcación de F-actina también mostraron un patrón de tipo puntiforme (Fig. 22A), una de las alteraciones características de la F-actina observadas en tubos polínicos incompatibles cultivados *in vitro* en *Papaver* y en *Pyrus* (Poulter *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, este patrón fue observado solo ocasionalmente. Después de 8 días de polinización, la actina puntiforme constituyó menos del 13% de los tubos polínicos incompatibles con la F-actina alterada (Fig. 22B).



**Figura 21. Cambios en el citoesqueleto de F-actina de tubos polínicos durante la respuesta de AI.** Colocalización de F-actina (verde) y calosa (rojo) en pistilos ( $S_{C10}S_{C10}$ ) polinizados de manera compatible (polen  $S_{70}$ ) e incompatible (polen  $S_{C10}$ ). (A-D) Imagen de la proyección confocal de los tubos polínicos marcados con faloidina superpuesta con la sección óptica media de la serie marcada con calosa (panel superior). Los respectivos campos brillantes se muestran en el panel inferior. Las distancias desde el estigma y los tiempos posteriores a la polinización están indicados debajo de las imágenes. Barra, 10  $\mu$ m. (E) Cuantificación de la morfología de la F-actina de los tubos polínicos compatibles e incompatibles. *Blanco*, F-actina organizada en cables; *gris*, actina desorganizada. Al menos setenta y cinco tubos polínicos fueron examinados en cada experimento. Los valores de las barras son la media  $\pm$  el desvío estándar para dos o más experimentos independientes.



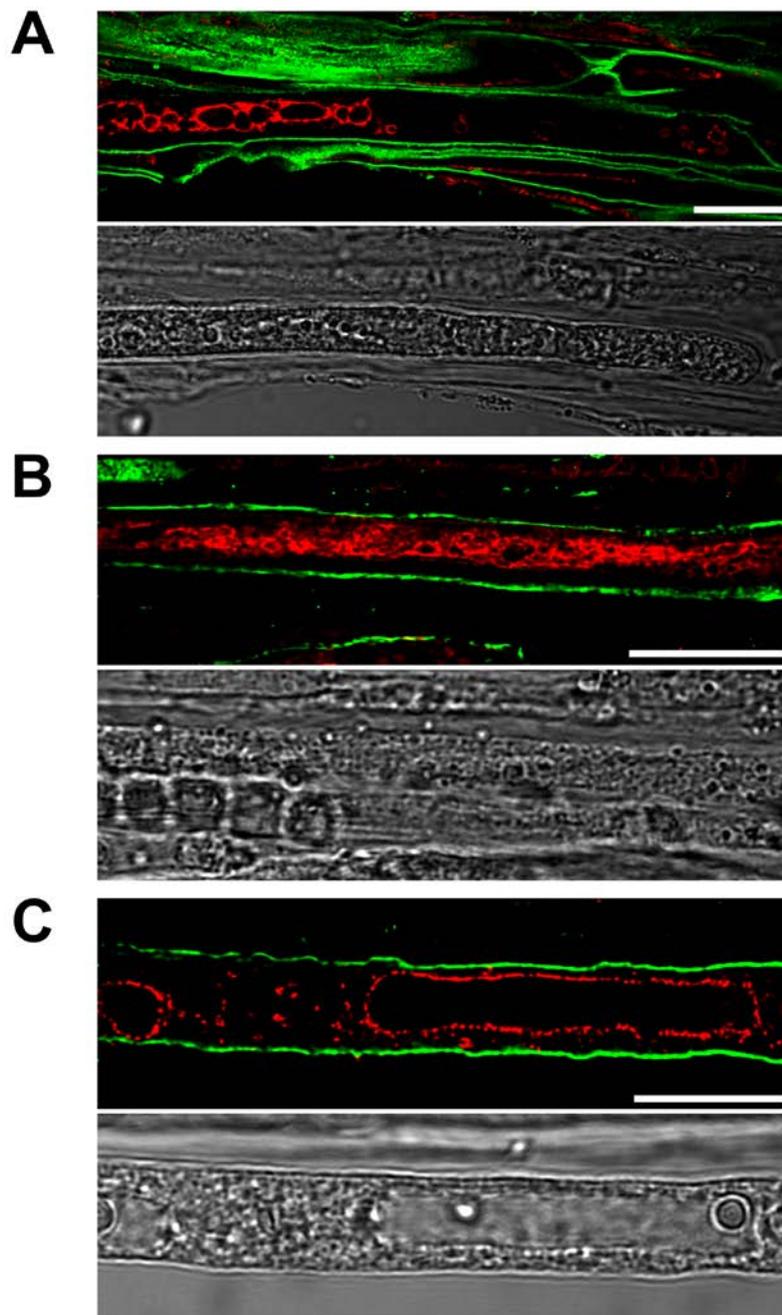
**Figura 22. Patrón de F-actina puntiforme en tubos polínicos incompatibles.** Sección de un estilo ( $S_{C10}S_{C10}$ ) polinizado con polen incompatible ( $S_{C10}$ ), colectado 8 días después de la polinización y marcado con faloidina Alexa 488. (A) Sección óptica media mostrando la acumulación de actina en la región cortical del tubo polínico (panel superior); proyección completa (14 secciones ópticas) (panel central); campo brillante (panel inferior). Barra, 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación del patrón de las alteraciones de F-actina. *Blanco*, F-actina organizada en filamentos; *gris oscuro*, actina desorganizada; *gris claro*, actina puntiforme. Setenta y cinco tubos polínicos fueron examinados en cada experimento. Los valores son la media  $\pm$  el desvío estándar de dos o más experimentos independientes.

#### 4.2.3. La interrupción de los cables de F-actina y la desorganización del compartimento vacuolar.

La progresión de los cambios subcelulares llevados a cabo durante el rechazo del polen incompatible en sistemas de AI dependiente de S-RNasas es conocida solo parcialmente. A partir de los primeros trabajos sobre las alteraciones subcelulares más notables tales como el exceso de deposición de calosa, la disposición del retículo endoplasmático en círculos concéntricos, y la acumulación de vesículas en el ápice, se ha propuesto que durante el rechazo del polen incompatible se produce una degeneración generalizada del citoplasma del tubo polínico, sin establecer una progresión específica para estos cambios (Geitmann, 1999; de Graaf *et al.*, 2006). Por otro lado, el hallazgo de la desorganización de los compartimentos vacuolares, donde las S-RNasas están confinadas (Goldraij *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009), ha sido descrito como un evento relativamente tardío del rechazo del polen incompatible de *Nicotiana glauca* (Goldraij *et al.*, 2006).

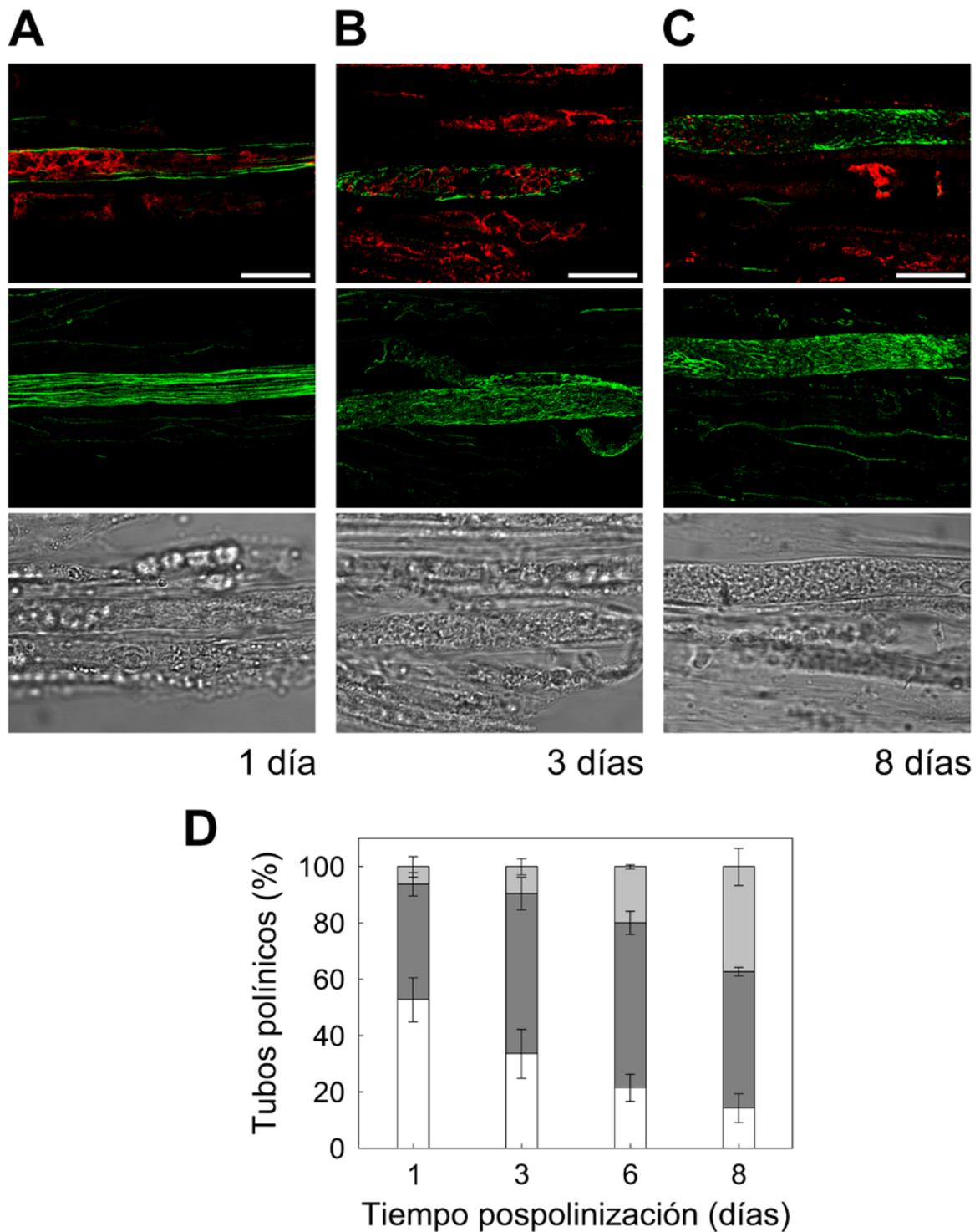
A partir de estos antecedentes, se evaluó si en el sistema de AI dependiente de S-RNasas hay una desorganización masiva y simultánea de los filamentos de F-actina y el sistema vacuolar, o bien, si la desorganización de estas estructuras subcelulares se lleva a cabo de una manera progresiva y secuencial. Para ello, se realizaron experimentos de

colocalización del citoesqueleto de F-actina y del sistema de membranas vacuolar de los tubos polínicos incompatibles. Un anticuerpo contra la pirofosfatasa vacuolar (vPPasa) fue utilizado para visualizar el tonoplasto de los compartimentos vacuolares del tubo polínico. En la zona subapical, los compartimentos vacuolares fueron definidos de una manera clara mostrando una gran diversidad en tamaño y morfología (Hicks *et al.*, 2004) (Fig. 23).



**Figura 23. Diversidad en el tamaño y la morfología de las vacuolas de tubos polínicos.** Secciones de pistilos ( $S_{C10}S_{C10}$ ) polinizados con polen compatible ( $S_{70}$ ) colectados 2 días después de la polinización y marcados con anticuerpos anti calosa (verde) y anti vPPasa (rojo). (A), (B), y (C) muestran diferentes patrones de marcación de vacuolas en la región subapical de los tubos polínicos. Los correspondientes campos brillantes son mostrados debajo de las imágenes de fluorescencia. Barra, 10  $\mu$ m.

Los experimentos de marcación de F-actina y compartimentos vacuolares en diferentes días pospolinización mostraron tres patrones representativos (Fig. 24). En una etapa de polinización temprana, 1 día después de la polinización, los tubos polínicos incompatibles mostraron los filamentos de actina y los compartimentos vacuolares bien organizados (Fig. 24A). Después de 3 días de polinización, la mayoría de los tubos polínicos incompatibles perdieron los cables de actina, presentando fragmentos mucho más pequeños, mientras que la integridad del sistema vacuolar se mantuvo sin cambios (Fig. 24B). Luego de transcurridos 8 días de polinización, la pérdida de la integridad de la F-actina en los tubos polínicos fue similar al observado a los 3 días pospolinización. Aunque la mayoría de los tubos polínicos mantuvieron las vacuolas organizadas, hubo un incremento en la frecuencia de tubos con el sistema vacuolar desorganizado en los cuales se detectó baja o nula señal de vPPasa (Fig. 24C). Las vacuolas de las células del tejido de transmisión aparecían marcadas normalmente en cualquier etapa, constituyendo un control interno de la técnica de marcación. A partir de estos tres patrones bien caracterizados, se realizó una cuantificación simultánea de la organización de F-actina y de la integridad del compartimento vacuolar en tubos polínicos incompatibles (Fig. 24D). Entre 1 a 3 días después de la polinización, los tubos polínicos con F-actina desorganizada aumentaron de un 48% a 67%, aunque menos del 8% de los tubos que presentaron los filamentos desorganizados, mostraron la pérdida de integridad de la membrana vacuolar. Después de 8 días de polinización, cerca del 40% de los tubos polínicos mostraron ruptura vacuolar, pero más del 84% mostraron la F-actina desorganizada. En ningún caso se encontraron tubos polínicos con la F-actina organizada y los compartimentos vacuolares perturbados. Estos resultados indican que durante el proceso de rechazo del polen incompatible en *Nicotiana glauca* la desorganización de la F-actina se produce con anterioridad a la disrupción vacuolar.



**Figura 24. La desorganización del citoesqueleto de F-actina precede a la disrupción de las vacuolas en tubos polínicos incompatibles durante la respuesta de AI *in vivo*.** Colocalización de F-actina (verde) y vPPasa (rojo) en pistilos ( $S_{C10}S_{C10}$ ) polinizados con polen incompatible ( $S_{C10}$ ). Las imágenes son representativas de los tres patrones observados: (A) Filamentos de actina y sistema de membranas vacuolares organizado. (B) Actina desorganizada y sistema de membranas vacuolares organizado. (C) Actina y sistema de membranas vacuolares desorganizados. La imagen muestra la colocalización de las secciones ópticas medias (panel superior), proyección de F-actina marcada con faloidina (panel central) y los campos brillantes correspondientes (panel inferior). Los días posteriores a la polinización se indican debajo de las imágenes. Barra, 10  $\mu$ m. (D) Cuantificación de la morfología de la F-actina y el sistema de membranas vacuolares. *Blanco*, F-actina y vacuolas íntegras; *gris oscuro*, actina desorganizada y vacuolas íntegras; *gris claro*, actina y vacuolas desorganizadas. Setenta y cinco tubos polínicos fueron examinados en cada experimento. Los valores son la media  $\pm$  el desvío estándar para dos o más experimentos independientes.

### **4.3. Discusión.**

En esta parte de la tesis se estudiaron los cambios subcelulares que se producen en los tubos polínicos de *N. alata* luego de polinizaciones compatibles e incompatibles. Los estudios se focalizaron en la organización del citoesqueleto de F-actina y la integridad del sistema de membranas vacuolares. Se analizó la secuencia temporal de las alteraciones en los tubos polínicos incompatibles y se estableció que la desorganización de la F-actina sigue una secuencia temporal progresiva que precede a la disrupción de la membrana vacuolar. Esta última tiene lugar después de haberse inhibido completamente el crecimiento del tubo polínico rechazado.

#### 4.3.1. El rol del citoesqueleto de F-actina en el crecimiento polar.

La dinámica del citoesqueleto de F-actina es uno de los fenómenos más notables del crecimiento polar en células como el tubo polínico, los pelos radicales de las plantas, las hifas de los hongos y las neuritas de los animales (Cheung & Wu, 2008). Los filamentos de actina proporcionan un andamiaje adecuado para el movimiento de vesículas y de organelas a lo largo de todo el citoplasma del tubo polínico. En la región subapical, los filamentos de actina se presentan como filamentos finos y cortos, formando la “franja de actina” presumiblemente implicada en el transporte de vesículas hacia el ápice. La región apical no está desprovista de actina, pero contiene menos filamentos y están dispuestos de una forma más azarosa, siendo difíciles de detectar en el microscopio óptico. Los pocos filamentos cortos de actina en el *tip* podrían desempeñar un papel importante en procesos de exocitosis-endocitosis, coordinando el transporte de vesículas secretorias y la fusión de las mismas en la membrana plasmática cerca del ápice del tubo polínico (Staiger *et al.*, 2010).

La interrupción de la organización del citoesqueleto de F-actina provoca una severa reducción o inhibición del crecimiento del tubo polínico (Gibbon *et al.*, 1999). Considerando que el citoesqueleto de F-actina juega un rol importante en el crecimiento polar, se han realizado numerosos estudios sobre la integridad de la F-actina de los tubos polínicos durante la respuesta de AI, proceso por el cual se inhibe el crecimiento del polen incompatible. Sin embargo, todos estos estudios fueron llevados a cabo principalmente en *Papaver*, una especie que tiene un sistema de AI diferente al de Solanáceas (Geitmann *et al.*, 2000; Snowman *et al.*, 2002; Poulter *et al.*, 2011) y *Pyrus*, una especie con AI dependiente de S-RNAsas (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010) pero con algunas diferencias importantes respecto al sistema de AI de Solanáceas (McClure, 2006). Además, la mayoría de los estudios de la dinámica de F-

actina fueron realizados en polen cultivado *in vitro*. A excepción de un único reporte aislado realizado en *Papaver* (Geitmann *et al.*, 2000), los ensayos presentados en esta tesis comprenden el primer estudio sobre las alteraciones del citoesqueleto de F-actina durante el rechazo del polen incompatible *in vivo*, y también el primero para el sistema de AI dependiente de S-RNAsas de Solanáceas.

Como una característica general dentro de Solanáceas, el arresto del crecimiento del tubo polínico sucede en el tercio superior del estilo (Rea & Nasrallah, 2008), aunque existen reportes de poblaciones en *Nicotiana* con variantes en rapidez de la respuesta de AI (Pandey, 1979). Mediante experimentos de injertos de estilos compatibles en estilos incompatibles, Lush y Clarke (1997) mostraron que el tubo polínico puede también detenerse en la parte inferior del estilo. Lo mismo sucedió en las polinizaciones incompatibles en la población NaM, donde el arresto del crecimiento del tubo polínico ocurrió apenas abajo de la mitad del estilo (Fig. 19). El prolongado crecimiento que tuvieron los tubos polínicos incompatibles se produjo, probablemente, porque los individuos pertenecen a una población natural, donde la intensidad de la respuesta de AI es muy variable (Good-Avila *et al.*, 2008; Roldán *et al.*, 2010).

Para evaluar la integridad del citoesqueleto de F-actina del polen durante la reacción de AI, se utilizó faloidina conjugada al fluorescente Alexa 488 para visualizar la F-actina en pistilos polinizados. Las muestras fueron previamente fijadas en condiciones que permitieron resguardar la configuración de los filamentos de actina (Doris & Steer, 1996) (Fig. 20). En estas condiciones, los tubos polínicos exhibieron el mismo el patrón de F-actina que los tubos polínicos cultivados *in vitro*, marcados con faloidina o con anticuerpos (Wilsen *et al.*, 2006) o marcados con varias proteínas de unión a actina fusionadas a GFP (*green fluorescent protein*) (Cheung *et al.*, 2008). Las imágenes obtenidas también fueron similares a la de reportes previos en lirio (Jauh & Lord, 1995), tabaco (Chen *et al.*, 2002) y amapola (Geitmann *et al.*, 2000). La coincidencia de marcación de la F-actina visualizada mediante diferentes técnicas y las imágenes mostradas en este trabajo, confirmaron que el procedimiento de fijación utilizado en pistilos polinizados de *Nicotiana* fue el apropiado para preservar la organización de la F-actina de los tubos polínicos.

El citoesqueleto de actina también juega un papel importante en otros organismos con crecimiento polar. Por ejemplo, en las hifas del oomycete *Phytophthora infestans* el tratamiento con el fármaco LatB causó diferentes tipos de defectos en el ápice, que van desde pequeñas y grandes hinchazones, ramificaciones de las hifas y hasta aumento en el diámetro de los tubos (Ketelaar *et al.*, 2012). En todas estas alteraciones morfológicas, la actina

presentó el mismo patrón puntiforme observada en *Pyrus* y *Papaver*. La alteración de la disposición de F-actina no solamente inhibió el crecimiento polar, también afectó la posición de organelas como los núcleos que se relocalizaron en el ápice celular (Ketelaar *et al.*, 2012).

#### **4.3.2. La integridad del citoesqueleto de F-actina y del sistema de membranas vacuolares en polinizaciones compatibles e incompatibles.**

La desorganización de la F-actina del tubo polínico incompatible fue gradual y progresiva (Fig. 19 y Fig. 21), lo cual fue consistente con el rechazo típicamente lento en este mecanismo de AI. La interrupción de la configuración normal de los cables de F-actina probablemente impidió el tráfico apropiado de las vesículas y el transporte de organelas al ápice de la célula, causando así la detención del crecimiento del tubo polínico (Gibbon *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). La alteración de la F-actina no es un fenómeno suficiente para matar a las células (Snowman *et al.*, 2002), pero puede actuar como efector de cascadas de señalización (Staiger, 2000; Thomas *et al.*, 2006). En *Nicotiana*, la desorganización de la F-actina de los tubos polínicos incompatibles podría ser una manifestación temprana a nivel celular de un proceso más complejo que conduce al rechazo del polen incompatible, como ocurre en *Papaver* (Franklin-Tong, 2008; Goldraij *et al.*, 2012). Para establecer si hay una secuencia de eventos organizados durante el rechazo del polen incompatible, las estructuras de actina fueron colocalizadas con vPPasa, una proteína específica del tonoplasto de las vacuolas. La disrupción vacuolar fue caracterizada como un evento tardío en la reacción de AI en *Nicotiana*. Este fenómeno es especialmente relevante, ya que las vacuolas demarcadas por vPPasa son las mismas que mantienen compartimentalizada la S-RNasa (Goldraij *et al.*, 2006), el agente citotóxico responsable, en última instancia, del rechazo del polen incompatible en el sistema de AI dependiente de S-RNasas (McClure *et al.*, 1990; Murfett *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1994). La visualización simultánea del citoesqueleto de F-actina y de las membranas vacuolares permitió establecer una secuencia de eventos celulares que se manifiestan durante el rechazo del polen incompatible (Fig. 24). Después de los 6 días posteriores a una polinización incompatible, cuando el crecimiento de los tubos polínicos estaba totalmente inhibido, alrededor del 80% de los tubos polínicos mostraron la F-actina fragmentada, mientras que las vacuolas se mantuvieron básicamente intactas. Por lo tanto, en *Nicotiana alata*, la pérdida de la integridad del sistema de membranas vacuolares se

produce después de una extensiva desorganización de la F-actina, durante el rechazo del polen incompatible.

Los estudios a nivel de ultraestructura celular en el sistema de AI dependiente de S-RNAsas revelaron que no se pueden distinguir cambios entre los tubos polínicos compatibles e incompatibles en las etapas tempranas de polinización. Los primeros cambios morfológicos en el polen incompatible de *Brugamansia* y *Solanum* (sub nom. *Lycopersicum*), fueron visualizados entre 4 y 8 hs después de la polinización. Estos cambios consistían en la disposición del retículo endoplasmático en estructuras concéntricas, la acumulación de vesículas en el ápice del tubo y el engrosamiento de la pared celular por una mayor deposición de calosa (de Nettancourt *et al.*, 1973; Geitmann *et al.*, 1995) que precedían a una degeneración citoplasmática generalizada (Geitmann, 1999). En base a estos cambios morfológicos y a la relativa lentitud del rechazo del tubo polínico, se ha sugerido que el polen incompatible sufre un proceso necrótico durante la respuesta de AI (Geitmann, 1999; Geitmann *et al.*, 2004; De Graaf *et al.*, 2006). Por otra parte, los fenómenos de desorganización de la F-actina y la pérdida de integridad del tonoplasto de las vacuolas han sido descritos como alteraciones típicas de muchos procesos de MCP en células vegetales, inclusive en el sistema de AI (Thomas *et al.*, 2006; Smertenko & Franklin-Tong, 2011; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011). La depolimerización de la F-actina desencadenó un proceso de MCP durante el rechazo del polen incompatible de *Papaver* (Thomas *et al.*, 2006) a través de una cascada de señales bien caracterizada (Franklin-Tong, 2008) que lleva a la activación de caspasas, la fragmentación del ADN y la acidificación pronunciada del citosol (Jordan *et al.*, 1999; Bosch & Franklin-Tong, 2007). Esto sugiere que en *Papaver*, las alteraciones del citoesqueleto de F-actina iniciarían una cascada de señales que produce, a nivel subcelular, la ruptura del tonoplasto de las vacuolas líticas del tubo polínico. Algo semejante ocurre en el sistema de *Pyrus*, donde el polen es rechazado por la acción de S-RNAsas. En *Pyrus*, la depolimerización de la F-actina ocurrió 30 minutos después de agregar S-RNasa incompatible a tubos polínicos cultivados *in vitro* (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). También se pusieron de manifiesto otras respuestas como la alteración de los niveles de ROS localizados en el ápice, la alteración de la permeabilidad de la mitocondria y la degradación del ADN (Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Dado que todos estos cambios se produjeron antes del arresto del crecimiento del tubo polínico incompatible, los autores sugirieron que los mismos serían la causa y no la consecuencia de la inhibición del polen (Liu *et al.*, 2007; Wang & Zhang, 2011). Basándose en estos resultados se propuso la existencia de una cascada de señales que desencadena la MCP en el polen incompatible de *Pyrus*. Este modelo propone que

la degradación del ARN debido a la actividad citotóxica de la S-RNasa, podría ser sólo el comienzo de la respuesta de AI (Wang & Zhang, 2011). Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo en experimentos *in vivo*, demuestran que la inhibición del crecimiento del tubo polínico y la desorganización de la F-actina son eventos que ocurren en paralelo y que preceden a la ruptura vacuolar. Dado que las S-RNasas están compartimentalizadas en las vacuolas del tubo polínico (Goldraj *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009), los resultados *in vivo* sugieren que la degradación masiva del ARN del polen sería un evento tardío que se produce después de que se haya llevado a cabo profundos cambios subcelulares en los tubos polínicos rechazados. Es posible que la liberación masiva de S-RNasa sea un evento necesario para garantizar la irreversibilidad del proceso de rechazo. Aún así, no se puede descartar la existencia de un *pool* diferente de S-RNasas que puedan ejercer alguna acción citotóxica en una etapa temprana del rechazo. Por otro lado, se ha especulado recientemente sobre posibles diferencias en el mecanismo de rechazo entre los experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* (Zhang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). En cualquier caso, la naturaleza del rechazo del polen incompatible es bastante compleja, siendo todavía un tema crucial de debate el papel exacto de las S-RNasas (Zhang *et al.*, 2009).

#### 4.3.3. El posible rol del citoesqueleto de F-actina y la citotoxicidad de las S-RNasas.

Los primeros experimentos de injertos de pistilos polinizados con polen incompatible sobre pistilos compatibles (Lush & Clarke, 1997) mostraron que la inhibición del crecimiento de algunos tubos polínicos fue revertido, sugiriendo que el efecto citotóxico de las S-RNasas no era permanente y que su función podría no estar relacionada exclusivamente con la degradación del ARN. De estos experimentos surge la idea de que las S-RNasas podrían tener funciones adicionales a las ya conocidas (ver página 33) durante el rechazo. Varias ribonucleasas del tipo T2 poseen funciones muy diversas, algunas de las cuales son independientes de la actividad nucleasa, sugiriendo que estas proteínas tienen funciones adicionales a la degradación de ARN (Luhtala & Parker, 2010). Thompson y Parker (2009), demostraron que el ARN<sub>t</sub> y el ARN<sub>r</sub> de levadura fueron clivados, durante la inducción de estrés oxidativo, por la liberación de la ribonucleasa **Rny1p** desde la vacuola, hacia el citosol. A su vez, esta proteína modula la supervivencia celular durante el estrés oxidativo, efecto que es independiente de su actividad catalítica y que ha sido demostrado mediante cepas mutantes que contenían la ribonucleasa *rny1-pci* catalíticamente inactiva. La sobreexpresión de *rny1-*

*pci* no mostró actividad catalítica, pero sí redujo la viabilidad celular en respuesta al estrés oxidativo. Estos resultados demuestran que la liberación de Rny1p de la vacuola promueve la degradación del ARN y activa *downstream* la señalización que lleva a la MCP de manera independiente (Thompson & Parker, 2009). La proteína **ACTIBIND** (una RNasa T2 extracelular del hongo *Aspergillus niger*) ejerce su actividad citotóxica uniéndose a la F-actina y alterando, de esta manera, la red de actina en líneas celulares de cáncer de colon (HT-29, Caco-2 y RSB), de mama (ZR-75-1) y de ovario (2780), convirtiéndose en un efectivo factor que inhibe la carcinogénesis y la angiogénesis (Roiz *et al.*, 2006). Es posible que las S-RNasas también posean funciones adicionales al reconocimiento y la degradación del ARN del polen incompatible, tal como sugieren Wang y Zhang (2011) que vinculan a la S-RNasa con el inicio de una cascada de señales que desencadena la MCP.

Es importante mencionar que los resultados presentados en este trabajo se ajustan bien a los dos modelos que actualmente explican el rechazo del polen en el sistema de AI dependiente de S-RNasas. Los modelos de la degradación de la S-RNasa (Hua *et al.*, 2008) y la compartimentalización de la S-RNasa (Goldraj *et al.*, 2006) pueden ser conciliados, considerando que ambos asumen que el reconocimiento y la citotoxicidad son llevados a cabo en el citoplasma del tubo polínico, donde se localiza SLF, el factor de reconocimiento del polen (Wang & Xue, 2005; Meng *et al.*, 2010). Una fracción menor de S-RNasas podrían tener acceso al citoplasma del tubo polínico por transporte retrógrado y llevar a cabo el reconocimiento del polen mediante la interacción S-RNasa-SLF (Goldraj *et al.*, 2006). En las polinizaciones incompatibles, las mismas S-RNasas y/o algún otro factor aún desconocido podrían iniciar un efecto citotóxico que altere la organización del citoesqueleto de F-actina (Wang & Zhang, 2011). Esto a su vez, podría desencadenar una cascada de señales, que afectaría posteriormente la integridad de la membrana de la vacuola y, de esta manera, producir la liberación del *pool* mayor de S-RNasas de los compartimentos dando lugar a la etapa final del rechazo. Por el contrario, en las polinizaciones compatibles, la degradación de las S-RNasas ubiquitinadas mediante la maquinaria del proteosoma 26S (Hua *et al.*, 2008) preservaría la integridad de la F-actina y de los compartimentos vacuolares, permitiendo el crecimiento normal del tubo polínico hacia el ovario. En Solanáceas, se espera que los factores no específicos del locus *S* también contribuyan a la regulación tanto del escenario compatible como incompatible, aunque sigue siendo desconocida la función exacta de los mismos (Cruz-García *et al.*, 2005; Hancock *et al.*, 2005).

En conclusión, durante la respuesta de AI en *Nicotiana glauca* se observaron cambios subcelulares notables en los tubos polínicos incompatibles, los cuales ocurrieron de manera secuencial y ordenada en el tiempo. Los filamentos de actina fueron gradualmente desorganizados en paralelo con la reducción de la velocidad de crecimiento del tubo polínico. El colapso de las vacuolas se produjo posteriormente, sólo después de una extensiva desorganización de la F-actina. Los resultados indicaron que durante el rechazo del polen incompatible hubo una serie de alteraciones ordenada de las estructuras celulares en vez de una degeneración celular masiva como se especulaba previamente (Geitmann *et al.*, 2004). La actividad catalítica de las S-RNasas, que ha demostrado ser esencial para la respuesta de AI (Huang *et al.*, 1994), se manifestaría en una etapa tardía del rechazo del polen, después del dismantelamiento de las principales estructuras subcelulares.

#### **4.4. Materiales y métodos.**

#### 4.4.1. Material vegetal, condiciones de crecimiento y cruzamientos.

Los individuos NaM-5 ( $S_{70}S_{75}$ ) y NaM-7 ( $S_{C10}S_{107}$ ) de la población natural descrita anteriormente (Roldán *et al.*, 2010) fueron autopolinizados en etapas inmaduras del desarrollo floral, cuando la maquinaria de AI aún no está completamente expresada. De esta manera se pueden obtener individuos homocigotas en el locus *S*. A partir de un *screening* realizado en la generación F2, se seleccionaron individuos con genotipos homocigota  $S_{C10}S_{C10}$  y  $S_{70}S_{70}$  que se utilizaron para los estudios de microscopía de fluorescencia de esta tesis. Las plantas fueron cultivadas en un invernáculo a 28°C con un período de 16/8 hs de luz/oscuridad.

Las flores de genotipo  $S_{C10}S_{C10}$  fueron emasculadas 2 días antes de la antesis floral y polinizadas un día después de la apertura de los pétalos con polen de genotipo  $S_{70}S_{70}$  (compatible) o  $S_{C10}S_{C10}$  (incompatible).

#### 4.4.2. Tinción del frente de avance de los tubos polínicos mediante la técnica de *style squash*.

Para determinar la posición del frente de avance de los tubos polínicos en el estilo, se tiñó la pared celular de los mismos mediante la técnica de *style squash* de Kho & Baer (1968), con algunas modificaciones. Las flores fueron emasculadas 2 días previos a la antesis y polinizadas en horario vespertino. Se recogieron pistilos a diferentes tiempos después de la polinización que fueron fijados en etanol-acético 3:1 durante 1 h, lavados con agua y ablandados mediante incubación con 4M NaOH durante 1 h. Después de un lavado con agua, los pistilos fueron decolorados con 50% hipoclorito de sodio durante 30 min. Posteriormente fueron lavados tres veces con agua y sumergidos durante toda la noche en 0,1% azul de anilina preparada en 0,1 M  $K_2HPO_4$ , pH 9,5. Todas estas incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. El *style squash* se llevó a cabo en un portaobjetos con 0,1% azul de anilina en 50% glicerol. Los preparados fueron observados en un microscopio de epifluorescencia Axioplan con un objetivo 10X y utilizando un filtro de 405 nm.

#### 4.4.3. Preparación de las muestras para marcación con fluorescentes.

Para la colocalización de la F-actina con calosa o pirofosfatasa vacuolar (vPPasa), los estilos recogidos en diferentes tiempos pospolinización fueron fijados en dos etapas: primero se realizó un vacío suave en presencia de un **buffer estabilizante de actina** (en inglés ASB, *actin-stabilizing buffer*; Geitmann *et al.*, 2000) pH 6,8 que contenía 250  $\mu$ M m-maleimidobenzoil N-hydroxisuccinimida éster (MBS) preparada en el momento. Tras 45 min de incubación los estilos fueron nuevamente fijados durante una hora en buffer ASB que contenía 4% paraformaldehído preparado en el momento. Después de tres lavados en ASB, se seleccionó un segmento de estilo de 15 mm que incluyera el frente de avance de los tubos polínicos (localizado mediante la técnica de *style squash*). Las porciones seleccionadas de estilo fueron embebidas en Cryoplast (Biopack, Argentina) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y se realizaron cortes de 10  $\mu$ m de espesor en crióstato (Leica Microsystems, Alemania), los cuales fueron montados en portaobjetos tratados con 1 mM polilisina. Después de tres lavados con PBS, las secciones fueron incubadas durante 10 min con PBS conteniendo 1% (p/v) Macerozima R-10 (Yakult Honsha Co., Japón), 1% (p/v) Celulosa "Onozuca" RS (Yakult Honsha Co., Japón) y 1% (p/v) BSA. Luego, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS, bloqueadas durante 30 min con PBS conteniendo 5% BSA y 0,1% Triton X-100, lavadas nuevamente con PBS e incubadas toda la noche con anticuerpo primario anti-calosa (Biosupplies, Australia), o anticuerpo primario anti-vPPasa (Goldraj *et al.*, 2006), diluidos en solución de bloqueo con 1% BSA. Posteriormente las muestras fueron lavadas tres veces con PBS, e incubadas con anticuerpos secundarios goat anti-mouse Alexa 546 (Molecular Probes, Inc) para marcar calosa o donkey anti-rabbit DyLight 549 (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) para marcar vPPasa durante 7 hs. Después de dos lavados con PBS y uno con ASB, las secciones fueron incubadas toda la noche con 700 nM faloidina Alexa 488 (Molecular Probes) preparado en ASB y conteniendo 5 mM DTT y 0,1% Tween 20. Finalmente, las muestras fueron lavadas en ASB y montadas en Fluorsave (Calbiochem, Schwalbach, Alemania). Cuando se marcó la F-actina únicamente, las secciones fueron incubadas directamente con 500 nM faloidina Alexa 488 en las condiciones descriptas anteriormente.

#### 4.4.4. Microscopía de fluorescencia.

Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas mediante el uso del microscopio confocal Carl Zeiss LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). La fluorescencia de Alexa 488 (rojo) fue detectada mediante láser de argón (488 nm de excitación, filtro BandPass de 505-530 nm). La fluorescencia de Alexa 546 y DyLight 549 fue detectada mediante el uso de láser helio-neón (excitación 543 nm, filtro long pass de 560 nm). Las muestras fueron visualizadas con un objetivo Plan-Apochromat 100x/1.4 NA Oil DIC con un *zoom* digital 2x. Se tomaron imágenes de 12-14 secciones ópticas de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor. Las imágenes fueron deconvolucionadas utilizando el software cell ^ R y empleando el algoritmo “advanced maximum likelihood estimation algorithm” AMLE, versión 3.3, realizado con 20 iteraciones y una subcapa de volumen de 10 píxeles (Olympus Soft Imaging Solutions, Munchen, Germany). Una función de dispersión teórica (PSF) fue utilizada durante la deconvolución. La F-actina y las membranas vacuolares de la región subapical fueron visualizadas en los primeros 50-100  $\mu\text{m}$  del tubo polínico. Para la cuantificación de las diferentes morfologías observadas en los tubos polínicos, la F-actina y las membranas vacuolares fueron clasificadas como "organizadas" o "desorganizadas" en al menos 75 tubos polínicos por cada experimento independiente.

**5. OBJETIVO 3. Diseñar un sistema experimental para el estudio *in vitro* de la reacción de autoincompatibilidad.**

## **5.1. Introducción.**

La selección del polen más apropiado en el tracto del tejido de transmisión es un aspecto crítico en la reproducción sexual de las plantas. El polen seleccionado debe garantizar el *fitness* de la progenie y contribuir a mantener la variabilidad genética de la especie. La reproducción sexual en plantas requiere de múltiples interacciones célula-célula entre el polen y el pistilo, desde el estigma, el tránsito a través del tejido de transmisión y la llegada al ovario para la fertilización. Resulta interesante estudiar la biología del desarrollo del tubo polínico para entender la naturaleza y la regulación del proceso reproductivo.

Los **ensayos de polinización** comprenden una herramienta ideal para evaluar la actividad de los genes del pistilo durante el crecimiento de los tubos polínicos. Sin embargo, una limitación significativa de los ensayos *in vivo* es la imposibilidad de manipular directamente el medio de crecimiento primario (el estigma, el estilo, y el tejido de transmisión) para evaluar los factores u otros tratamientos exógenos que regulan el crecimiento del tubo polínico (Eberle *et al.*, 2012).

Muchos de los estudios para esclarecer los factores que regulan el desarrollo del tubo polínico fueron realizados en **cultivos de polen *in vitro***. La ventaja de este sistema radica en la facilidad para seguir de manera rápida y directa el crecimiento de la misma célula. Los cultivos de polen son un excelente material para estudios de microscopía de células *in vivo* porque, entre otras ventajas, son claramente visibles (tienen un diámetro celular de 10-20  $\mu\text{m}$ ) y son transparentes. Los ensayos *in vitro* han sido ampliamente utilizados para medir la viabilidad y la germinación del polen, la morfología y la tasa de crecimiento del tubo polínico y para estudiar los efectos a nivel subcelular que tienen muchos agentes que inhiben o promueven el crecimiento. De cualquier manera, es importante precisar que aunque la germinación y el crecimiento *in vitro* del tubo polínico es completamente normal, la velocidad y la longitud alcanzada por las células son considerablemente menores a las registradas en el tracto estilar (Eberle *et al.*, 2012). Es importante destacar que el tubo polínico tiene una de las velocidades de crecimiento celular más altas de la naturaleza. Por ejemplo, los tubos polínicos de *Nicotiana tabacum* pueden crecer *in vivo* con una velocidad de hasta  $0,65 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$  (Read *et al.*, 1993; Higashiyama & Inatsugi, 2006). En polinizaciones compatibles en la población natural NaM de *Nicotiana alata*, el tubo polínico llegó a tener una velocidad de crecimiento de  $1 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$  (Roldán *et al.*, 2012).

Dos componentes claves de la maquinaria del crecimiento polar, el citoesqueleto de actina y el tráfico vesicular, han sido ampliamente estudiados en tubos polínicos cultivados en sistemas *in vitro* (Ŝamaj *et al.*, 2006; Cheung & Wu, 2008). Como se describe en el capítulo anterior, el citoesqueleto de actina muestra un arreglo característico formando filamentos

longitudinales más o menos paralelos entre sí que se extienden hacia la zona apical del tubo (Cheung *et al.*, 2008; Roldán *et al.*, 2012). Esta estructura de F-actina junto a las proteínas asociadas al citoesqueleto, como la **miosina**, constituyen el andamiaje necesario para el tráfico vesicular. En la zona subapical cercana al ápice se presenta la franja de actina (Lovy-Wheller *et al.*, 2005), mientras que la zona clara se presenta libre de actina. La inhibición química o genética de la polimerización de actina interrumpe el tráfico vesicular y, por ende, el crecimiento. De esta manera se pone de manifiesto la interdependencia entre el citoesqueleto y el sistema de endomembranas para el funcionamiento de la maquinaria de crecimiento polar del tubo polínico. (Cheung & Wu, 2007; Zhang *et al.*, 2010).

La tinción con el fluorescente FM 4-64 (Bolte *et al.*, 2004) ha revelado un patrón característico del tráfico vesicular en tubos polínicos cultivados *in vitro*. En la zona subapical y a través de un activo proceso endocítico, el tubo polínico incorpora todos los materiales necesarios para su crecimiento. Estas vesículas se fusionan a endosomas y posteriormente al aparato de Golgi y vacuolas (Parton *et al.*, 2001). A su vez, desde el trans Golgi se origina un flujo vesicular impulsado por una corriente citoplasmática extraordinariamente activa en forma de **fuelle invertida**, que moviliza las organelas y las vesículas hasta la zona apical del tubo polínico. En la zona próxima a la región apical, el movimiento se revierte y la corriente se aleja del ápice por el centro del tubo. La zona estrictamente apical o **zona clara** tiene una forma de **“V” invertida** y consiste en vesículas endocíticas y exocíticas muy pequeñas que transportan material de pared y membrana. Estas vesículas se fusionan a la membrana plasmática para sostener el continuo alargamiento del ápice del tubo. En paralelo, hay un activo y continuo reciclado de vesículas desde el ápice hacia el interior del tubo (Lancelle & Hepler, 1992; Zonia & Munnik, 2008).

Los distintos mecanismos de rechazo del polen propio también han sido objeto de estudios *in vitro*. El polen cultivado ha sido desafiado con extractos incompatibles (Qiao *et al.*, 2004) o proteínas de reconocimiento del polen apropiadamente purificadas (Franklin-Tong *et al.*, 1993; Hiratsuka *et al.*, 2001) o producidas de manera recombinante (Franklin-Tong *et al.*, 1997). En al menos dos especies, *Papaver roheas* y *Pyrus piryfolia*, la estrategia del rechazo del polen incompatible durante la respuesta de AI converge en procesos de MCP (Thomas & Franklin-Tong, 2004; Wang *et al.*, 2009). En Papaveráceas, donde la respuesta de AI no depende de S-RNasas, una de las primeras alteraciones que se producen durante el rechazo del polen incompatible es la rápida y masiva depolimerización del citoesqueleto de actina, lo que conduce al arresto del crecimiento del tubo polínico (Geitmann *et al.*, 2000;

Thomas *et al.*, 2006). Un fenómeno similar ocurre en Rosáceas, una familia que tiene un sistema de AI dependiente de S-RNasas, aunque con notables diferencias estructurales y funcionales con el mecanismo observado en Solanáceas (Liu *et al.*, 2007; McClure, 2006). En ambos casos el rechazo del polen ocurre en un escenario de MCP. Aunque los sistemas de AI evolucionaron varias veces de manera independiente y mediante mecanismos diferentes (Kao & Tsukamoto, 2004), la finalidad en todos ellos es la misma: mantener la variabilidad genética evitando la autofecundación. Por lo tanto es razonable pensar que los distintos sistemas de AI puedan compartir algunos mecanismos que contribuyen al rechazo del polen propio.

En *Nicotiana glauca* (y en Solanáceas en general), en contraste con los importantes avances alcanzados en el conocimiento del nivel molecular del mecanismo de AI (McClure *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2010), no existen estudios a nivel celular de una profundidad equivalente. Las alteraciones a nivel subcelular recientemente descritas en el polen incompatible de *Nicotiana glauca* coinciden con algunos patrones característicos de la desorganización celular observada en procesos de MCP (Goldraij *et al.*, 2006; Reape *et al.*, 2008; Roldán *et al.*, 2012).

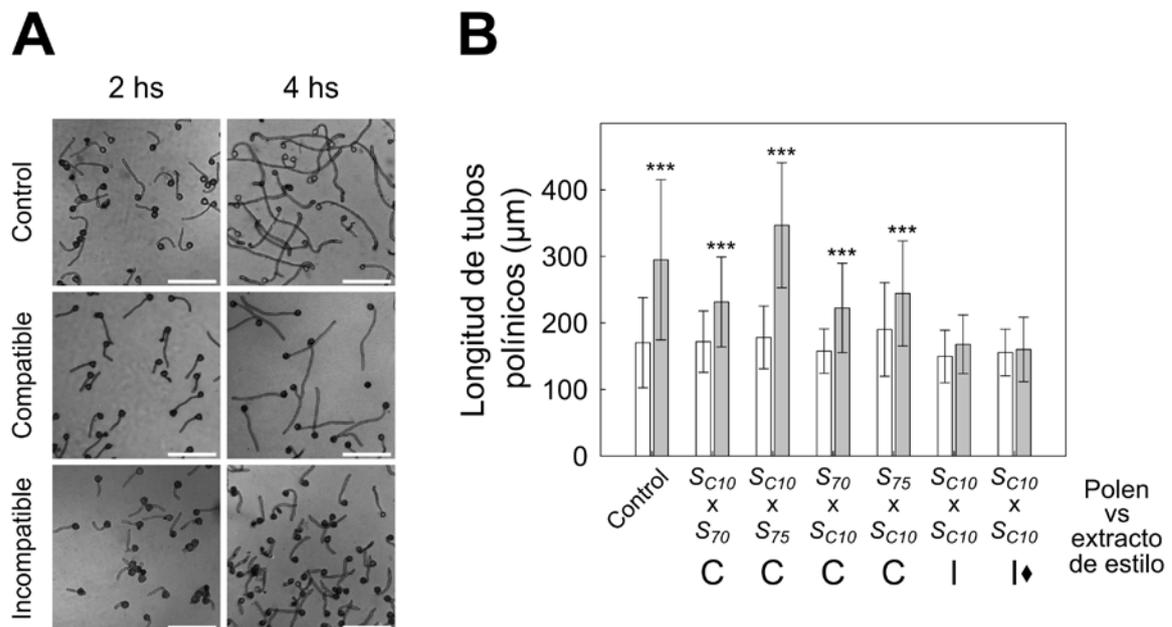
Por todos los motivos mencionados anteriormente, los cultivos de polen *in vitro* constituyen un sistema práctico y eficaz para estudiar los fenómenos que ocurren en el mecanismo de AI. El diseño de un buen sistema *in vitro* permitirá profundizar el conocimiento de los eventos que conducen al rechazo del polen incompatible, durante la respuesta de AI en la familia Solanáceas. Existen reportes previos de cultivos de polen *in vitro* de *Nicotiana glauca* desafiados con S-RNasas purificadas del mismo haplotipo (Anderson *et al.*, 1989; Jahnen *et al.*, 1989). Sin embargo, este sistema no reproducía fielmente el rechazo del polen incompatible, posiblemente porque en esa época no se conocían los factores no ligados al locus *S*, indispensables para que se lleve a cabo la respuesta de AI.

En esta tesis, se estudió la integridad del citoesqueleto de F-actina y del tráfico de vesículas de los tubos polínicos compatibles e incompatibles. La estrategia que se empleó fue la de cultivar polen *in vitro* de *Nicotiana glauca* y desafiarlo con extractos de estigma-estilo, donde están presentes las S-RNasas y el resto de los factores necesarios para el rechazo del polen incompatible.

## 5.2. Resultados.

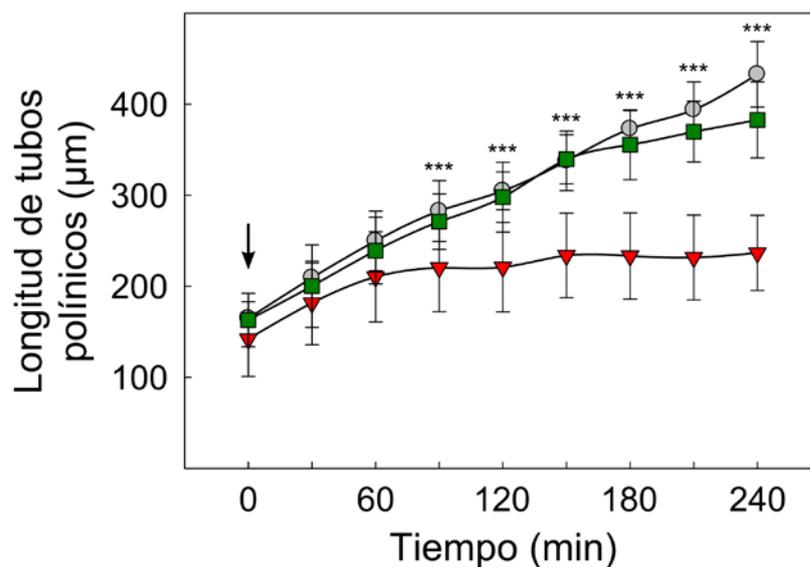
### 5.2.1. Efecto de los extractos de estilos en el crecimiento de los tubos polínicos cultivados *in vitro*.

Para averiguar si el mecanismo de rechazo del polen en *Nicotiana alata* se manifiesta en tubos polínicos cultivados *in vitro*, polen proveniente de plantas con genotipo  $S_{C10}S_{C10}$ ,  $S_{70}S_{70}$  y  $S_{75}S_{75}$  de la población NaM fueron cultivados en presencia de extractos de diferentes estilos. En las primeras 2 hs de cultivo, los tubos polínicos no mostraron diferencias de crecimiento (Fig. 25A y 25B). Dentro de los cultivos con polen  $S_{C10}$ , el menor crecimiento se registró en presencia de extractos de estilo de la misma planta, siendo evidente a las cuatro horas, donde el crecimiento del tubo polínico incompatible fue entre un 25% ( $I S_{C10} \times S_{C10}$  vs  $C S_{70} \times S_{C10}$ ) y un 51% ( $I S_{C10} \times S_{C10}$  vs  $C S_{C10} \times S_{75}$ ) menor respecto de las distintas combinaciones de cultivos compatibles (Fig. 25B). El polen  $S_{C10}$  también registró el menor crecimiento a las 4 hs después de haber sido desafiado con un extracto de estilo de una planta diferente pero de genotipo  $S_{C10}S_{C10}$  en el locus *S* (Fig. 25B,  $\blacklozenge$ ). Estos resultados indican que los extractos de estilo  $S_{C10}S_{C10}$  pueden inhibir el crecimiento del polen propio y del polen del mismo haplotipo.



**Figura 25. Efecto de los extractos de estilo en el crecimiento de tubos polínicos de *Nicotiana alata*.** (A) Imágenes representativas a las 2 y 4 hs de cultivos de polen  $S_{C10}$  en medio de germinación (Control), en extracto de estilo  $S_{75}S_{75}$  (Compatible) o en extracto de estilo propio (Incompatible). Barra, 200  $\mu\text{m}$ . (B) Polen de las plantas  $S_{C10}S_{C10}$ ,  $S_{70}S_{70}$  y  $S_{75}S_{75}$  fueron cultivados *in vitro* durante 2 hs (barras blancas) o 4 hs (barras grises), en medio de germinación (control) o en medio de germinación con el agregado de extracto de estilo de plantas compatibles “C”, extracto de estilo propio “I” o extracto de estilo del mismo haplotipo “ $\blacklozenge$ ”. Las barras representan las medias  $\pm$  la desviación estándar de 100 tubos polínicos. El extracto de estilo (5 mg/ $\mu\text{L}$ ) se realizó en medio MG. Las diferencias significativas fueron establecidas con una ANOVA de una variable y un test de Tukey como post test de análisis:  $p < 0.001$ ; (\*\*\*)  $I S_{C10} \times S_{C10}$  4 hs vs C 4 hs.

A partir de los resultados obtenidos en la figura 25, se optó por continuar los estudios en los cultivos de polen compatible e incompatible que mostraron las máximas diferencias en crecimiento. Por lo tanto, los siguientes experimentos fueron realizados en cultivos de polen de haplotipo  $S_{C10}$  en extractos de estilo propio (cultivo incompatible) o de estilo  $S_{75S75}$  (cultivo compatible). Debido a que el polen germina a distintos tiempos, se cultivó inicialmente en medio de germinación (MG) durante 2 hs con el objetivo de tener todo el polen germinado y poder realizar un estudio enfocado en el crecimiento de los tubos polínicos en presencia de los extractos de estilo. Después de dos horas de cultivo en MG, el polen germinó y desarrolló un tubo polínico de aproximadamente 160  $\mu\text{m}$  de longitud (resultado no mostrado). Posteriormente, en los cultivos se agregó un extracto de estilo propio ( $S_{C10}S_{C10}$ , cultivo incompatible) o un extracto de estilo de plantas con haplotipo  $S_{75S75}$  (cultivo compatible) a una concentración final de proteína de 0,35  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . La figura 26 muestra el crecimiento de los tubos polínicos a diferentes tiempos de incubación. Los tubos polínicos del cultivo compatible y del control crecieron a una velocidad constante, hasta 4 hs después de haber agregado los extractos de estilo. En cambio, la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos incompatibles fue similar a la de los tubos polínicos compatibles hasta después de 1 h de haberse agregado el extracto de estilo, luego de lo cual el crecimiento se detuvo (Fig. 26).

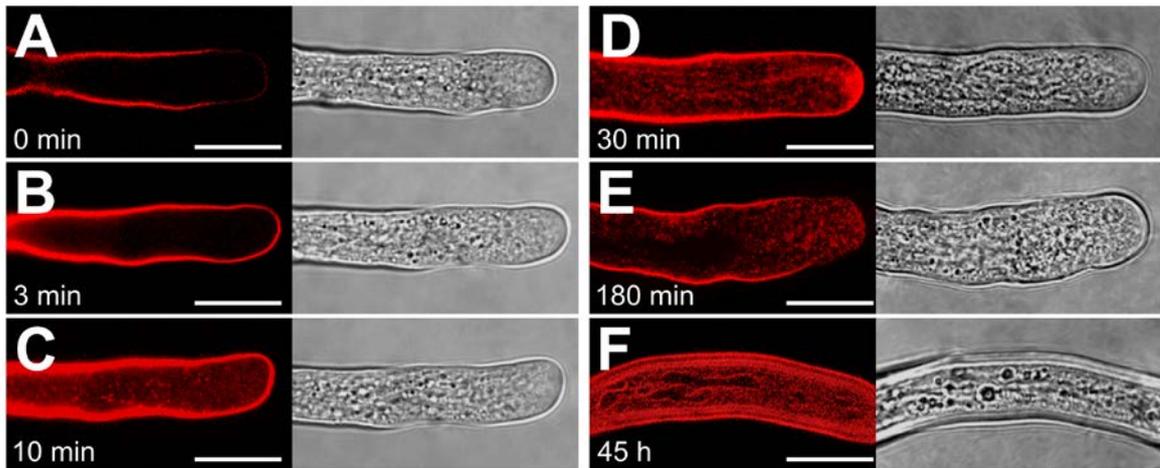


**Figura 26.** Crecimiento de tubos polínicos de *Nicotiana glauca* cultivados *in vitro*. Tubos polínicos ( $S_{C10}$ ) fueron cultivados en medio de germinación (●) y desafiados 2 hs después (flecha) con extractos de estilo compatible ( $S_{75S75}$ , ■) e incompatible ( $S_{C10}S_{C10}$ , ▼). Cada punto representa el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres o más experimentos independientes. Las diferencias significativas fueron establecidas con una ANOVA de una variable y un test de Tukey como post test de análisis:  $p < 0.001$ ; (\*\*\*) cultivo incompatible vs cultivo compatible y/o control.

Después de 4 hs de cultivo en presencia de extractos de estilo, los tubos polínicos incompatibles crecieron un 55% menos que los compatibles. Este resultado indica claramente que el crecimiento del tubo polínico es inhibido en presencia de extractos de estilo de la misma planta.

### **5.2.2. Efecto de los extractos de estilos en la dinámica del tráfico vesicular de los tubos polínicos cultivados *in vitro*.**

Los tubos polínicos son células de rápido crecimiento que exhiben de manera característica un activo tráfico vesicular. En trabajos previos se ha demostrado la compartimentalización de las S-RNAsas en vacuolas (Goldraj *et al.*, 2006) sugiriendo que la ruta endocítica cumple un papel crítico en el sistema de AI en *Nicotiana glauca*. Como ensayo previo a estudios de colocalización entre la integridad del citoesqueleto de F-actina y el sistema de endomembranas, se utilizó el marcador de endocitosis fluorescente FM para estudiar la dinámica de marcación de membranas en tubos polínicos cultivados *in vitro* (Bolte *et al.*, 2004). El fluorescente agregado al medio de cultivo se asoció rápidamente con la membrana plasmática del tubo polínico, primeramente en la región subapical (Fig. 27A) y luego en la región apical (Fig. 27B), 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 (Fig. 27C). 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 el ápice del tubo polínico (Fig. 27D). Esta marca es coincidente con la región denominada “zona clara”, enriquecida en vesículas menores de 0,2  $\mu\text{m}$ , 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 (Fig. 27E). El patrón de marcación se estudió también a tiempos largos de cultivo. Entre las 18 y 45 hs después de agregar FM, el fluorescente se acumuló en zonas más alejadas de la región subapical en estructuras discretas de mayor tamaño (Fig. 27F). 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).



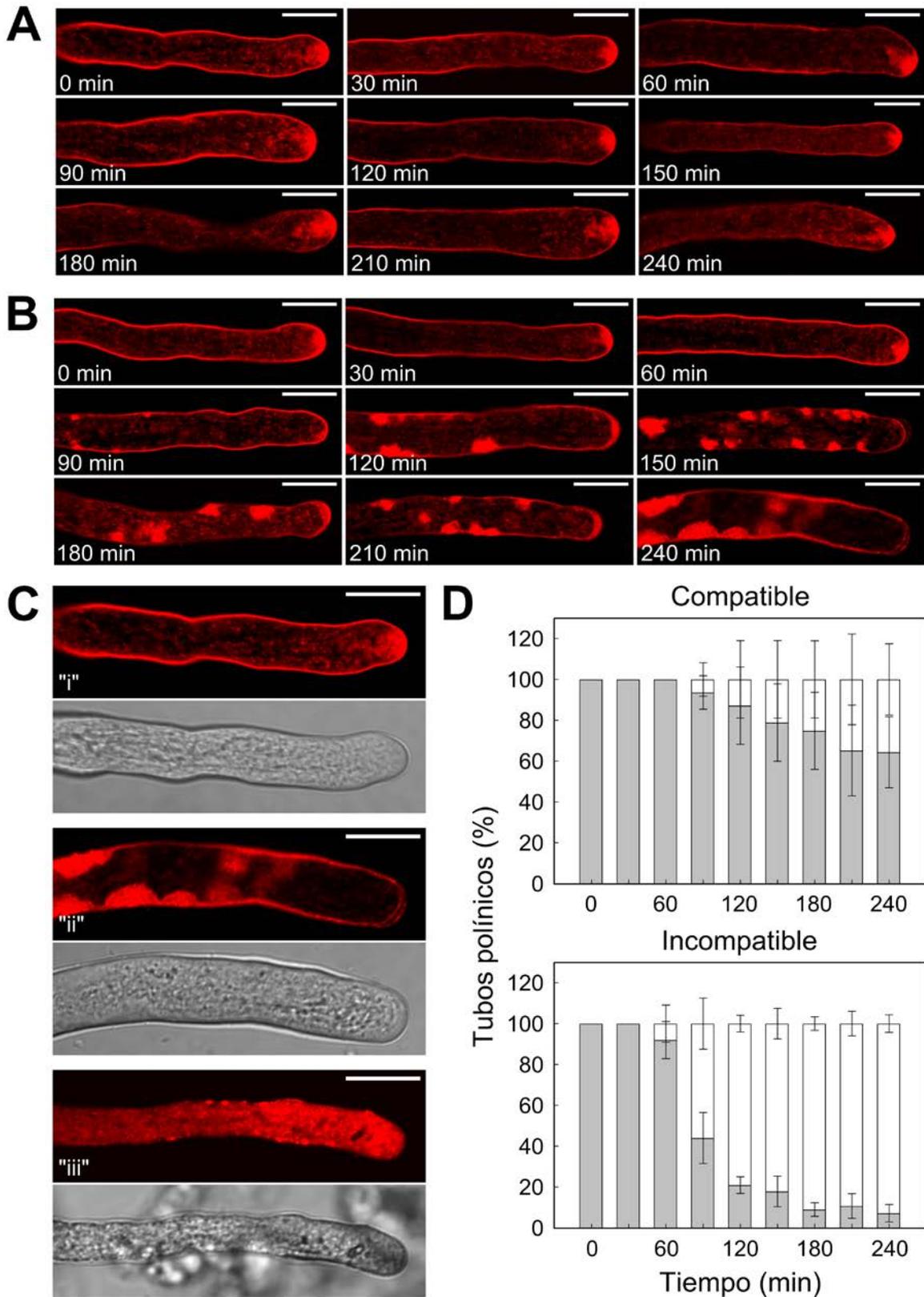
**Figura 27. Dinámica de marcación de membranas en tubos polínicos de *N. alata* cultivados *in vitro*.** Los tubos polínicos fueron cultivados durante 2 hs antes del agregado de 12  $\mu$ M del fluorescente FM4-64 FX. La dinámica de marcación se estudió a partir de la detección de la fluorescencia (A) durante los tiempos indicados (B-F). Barra, 10  $\mu$ m.

Posteriormente, se utilizó el marcador FM para estudiar el patrón de marcación de membranas en tubos polínicos cultivados con diferentes extractos de estilos. En presencia de extractos compatibles, los tubos polínicos conservaron en todo momento la “V” invertida característica de la zona apical, en donde están presentes una gran cantidad de pequeñas vesículas endocíticas-exocíticas para el crecimiento (Fig. 28A y 28C, patrón “i”). En contraste, luego de 90 minutos del agregado del extracto, los tubos polínicos del cultivo incompatible mostraron escaso movimiento vesicular y carecieron de la marcación de la “V” invertida, mostrando una creciente acumulación de vesículas en la región subapical adyacente a la membrana (Fig. 28B y 28C, patrón “ii”). Otro patrón observado, aunque con menor frecuencia, fue la acumulación masiva de fluorescencia en todo el citoplasma del tubo polínico, que en este caso exhibieron ausencia total de tráfico vesicular (Fig. 28C, patrón “iii”). Las tres configuraciones de FM descritas y que se muestran en la figura 28, fueron cuantificadas en los distintos tiempos de incubación (los patrones “ii” y “iii” fueron agrupados como un mismo patrón de tubos alterados con escasa o nula movilidad vesicular) (Fig. 23D). En ambos tipos de cultivos, los tubos polínicos exhibieron un tráfico normal de vesículas y marcación de la zona de la “V” invertida hasta 1 h después de ser desafiados con los distintos tipos de extractos. Mientras que este patrón se mantuvo predominante en los tubos polínicos de los cultivos compatibles, en los cultivos incompatibles hubo un incremento progresivo del número de células exhibiendo un tráfico vesicular lento y una creciente acumulación de vesículas en el citoplasma, dispersas como manchas aisladas. Este patrón estuvo presente en el 55% de los tubos polínicos 90 minutos luego de agregarse el extracto incompatible,

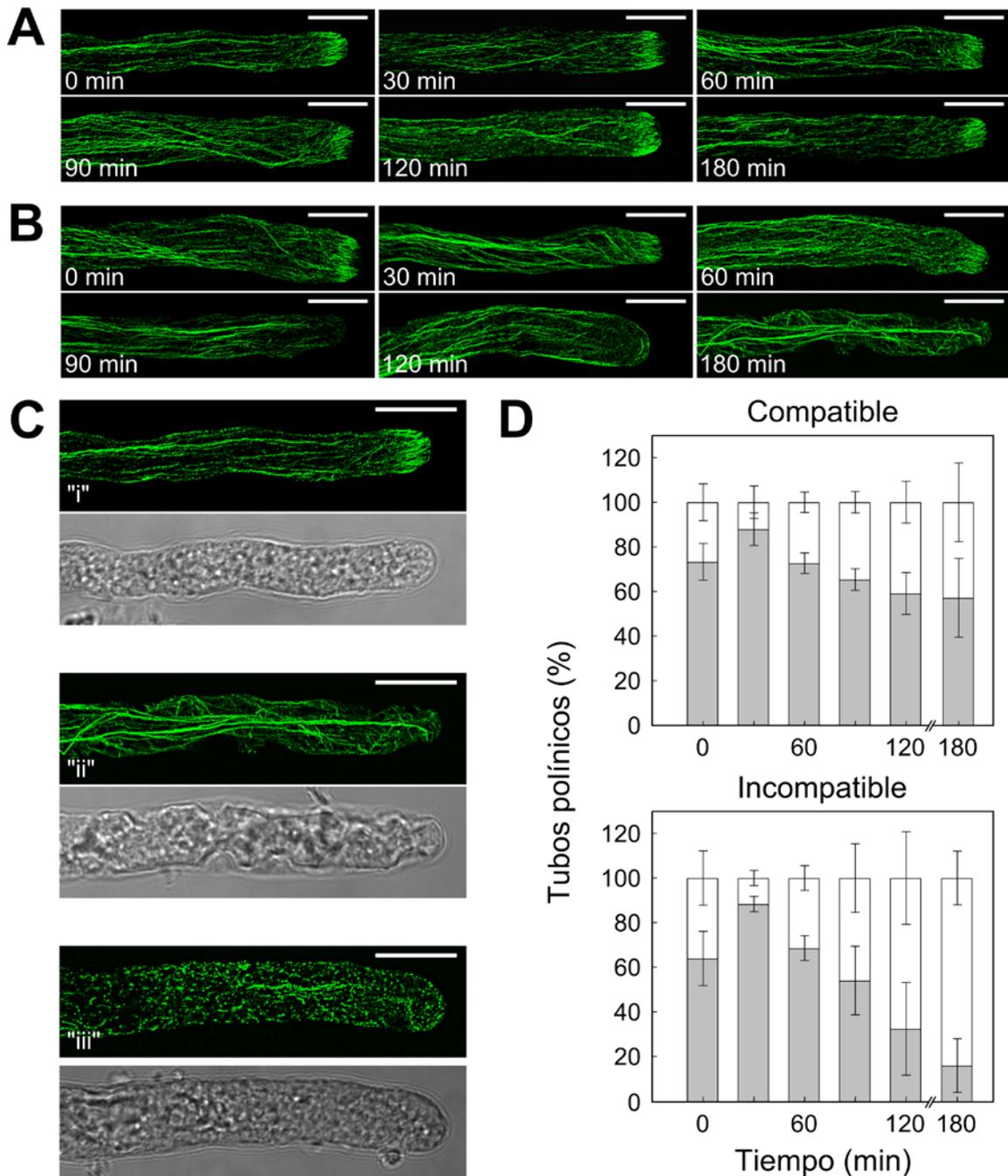
alcanzando una frecuencia del 90% a los 180 minutos (Fig. 28D). Después de 4 hs de cultivo, el patrón “iii” representó tan solo el 5% de los tubos polínicos alterados. Estos cambios respecto del patrón normal de marcación de vesículas con FM, sugieren que los tubos polínicos en presencia de extractos incompatibles sufren una alteración del tráfico vesicular que afecta el crecimiento celular.

### **5.2.3. Efecto de los extractos de estilo en la integridad de la F-actina de los tubos polínicos.**

A fin de estudiar la dinámica del citoesqueleto de F-actina, los tubos polínicos desafiados con extractos de estilo fueron fijados y marcados posteriormente con faloidina conjugada a Alexa 488. En presencia de extractos compatibles, los tubos polínicos conservaron en todo momento el patrón característico de F-actina (Roldán *et al.*, 2012), exhibiendo los filamentos largos de actina en el vástago del tubo polínico y la marcación de la franja de actina cercana al ápice. La franja de actina se caracterizó por la fuerte marcación de cables más cortos que forman una malla (Fig. 29A y 29C, patrón “i”). En contraste, 90 minutos después del agregado del extracto incompatible, los tubos polínicos no mostraron la presencia de la franja de actina y los filamentos de actina del vástago se presentaron mayormente distorsionados (Fig. 29B y 29C, patrón “ii”). Otro patrón encontrado, aunque en menor proporción, fue la actina desorganizada en pequeños fragmentos o actina puntiforme (Fig. 29C, patrón “iii”). Las tres configuraciones de actina mostradas en la figura 24 fueron cuantificadas en los distintos tiempos de incubación (Fig. 29D). Tal como en la marcación con FM, los patrones de actina “ii” y “iii” fueron agrupados como patrones alterados de F-actina en los tubos polínicos. En ambos tipos de cultivos, los tubos polínicos exhibieron la configuración normal de F-actina hasta 1 h después de ser desafiados con los distintos tipos de extractos. Mientras que este patrón se mantuvo predominante en los tubos polínicos compatibles, hubo un incremento progresivo del número de tubos polínicos incompatibles, principalmente con ausencia de la franja de actina y con los filamentos de actina desorganizados, llegando al 50% a los 90 minutos de iniciado el cultivo y alcanzando casi un 85% a los 180 minutos (Fig. 29D). Después de 4 hs de cultivo, el patrón “iii” representó el 15% de los tubos polínicos alterados.



**Figura 28. Tráfico vesicular en tubos polínicos compatibles e incompatibles.** Los tubos polínicos fueron incubados con el marcador de membranas FM 4-64FX. (A y B) Imágenes representativas del tráfico vesicular a distintos tiempos de cultivo con extracto compatible (A) o incompatible (B). (C) Patrones de marcación de vesículas y sus respectivos campos brillantes; tráfico normal y marcación de vesículas en la región subapical y apical "i"; vesículas agregadas en la región subapical y ausentes en la región apical "ii"; tráfico inhibido y acumulación vesicular en todo el citoplasma "iii". Barra, 10  $\mu$ m. (D) Cuantificación del patrón de endomembranas en los tubos polínicos. *Gris*, tráfico normal y marcación de la "V" invertida "i". *Blanco*, tráfico restringido, con acúmulos vesiculares aislados "ii" o tráfico nulo con acúmulos vesiculares convergentes "iii". Los valores son la media  $\pm$  el desvío estándar de tres o más experimentos independientes.

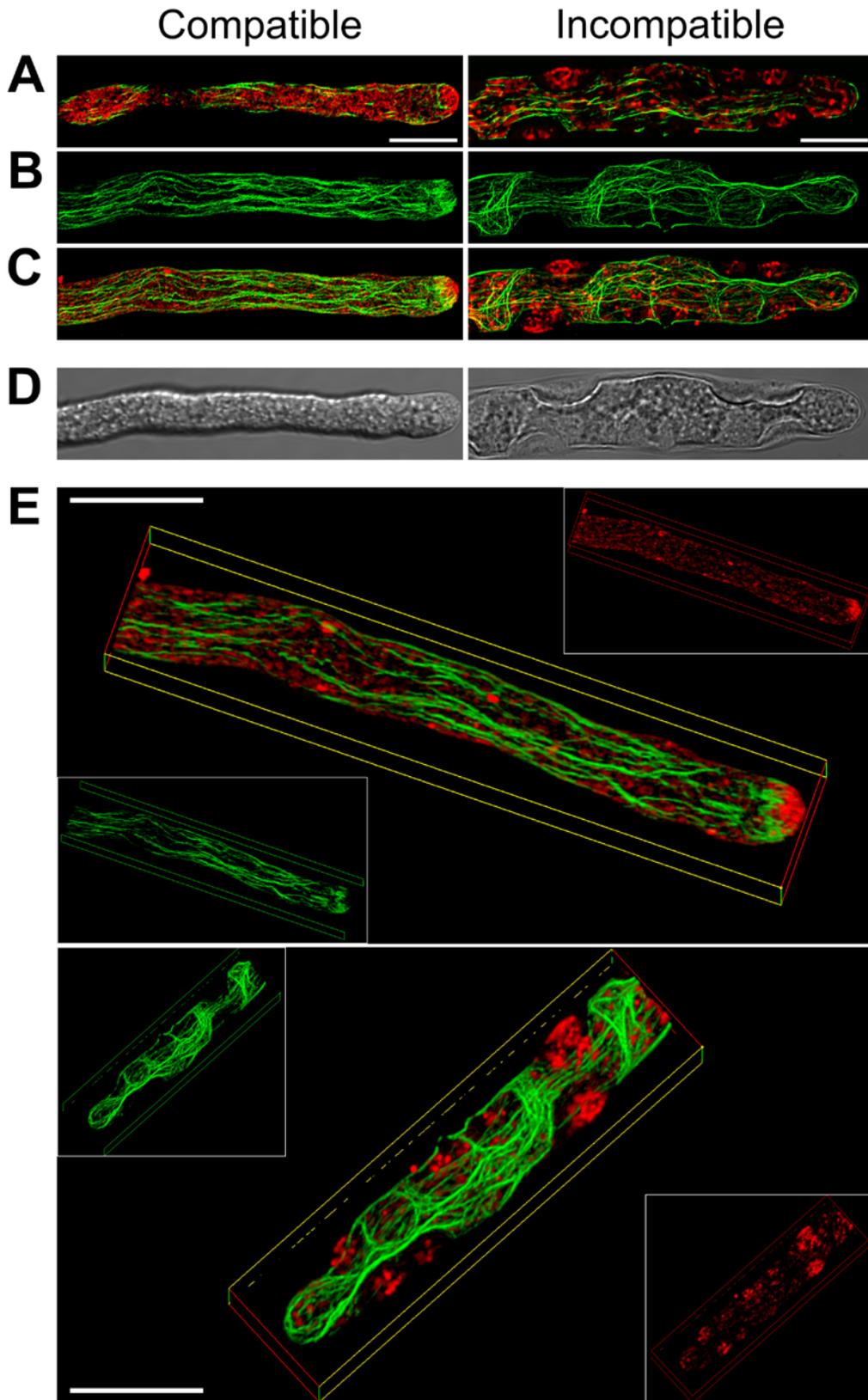


**Figura 29. Integridad del citoesqueleto de F-actina en tubos polínicos compatibles e incompatibles.** Los tubos polínicos cultivados con extractos de estilo fueron marcados con faloidina Alexa 488. (A y B) Imágenes representativas de la dinámica de la F-actina a distintos tiempos de cultivo con extracto compatible (A) o incompatible (B). (C) Patrones de marcación de la F-actina; filamentos de actina en la región subapical y “franja de actina” cercana al ápice “i”; filamentos de actina alterados y ausencia de la franja de actina “ii”; Actina fragmentada “iii”. Barra, 10  $\mu$ m. (D) Cuantificación de la configuración de actina de los tubos polínicos. *Gris*, filamentos de actina y franja de actina visible “i”. *Blanco*, filamentos de actina distorsionados y sin franja de actina “ii” o actina fragmentada y sin franja de actina “iii”. Los valores son la media  $\pm$  el desvío estándar de tres experimentos independientes.

Estos cambios respecto del patrón normal de marcación de la F-actina, indican que los tubos polínicos en presencia de extractos incompatibles, sufren una alteración en la conformación del citoesqueleto de F-actina que, junto con los cambios en el tráfico vesicular mostrados más arriba, afectan el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles.

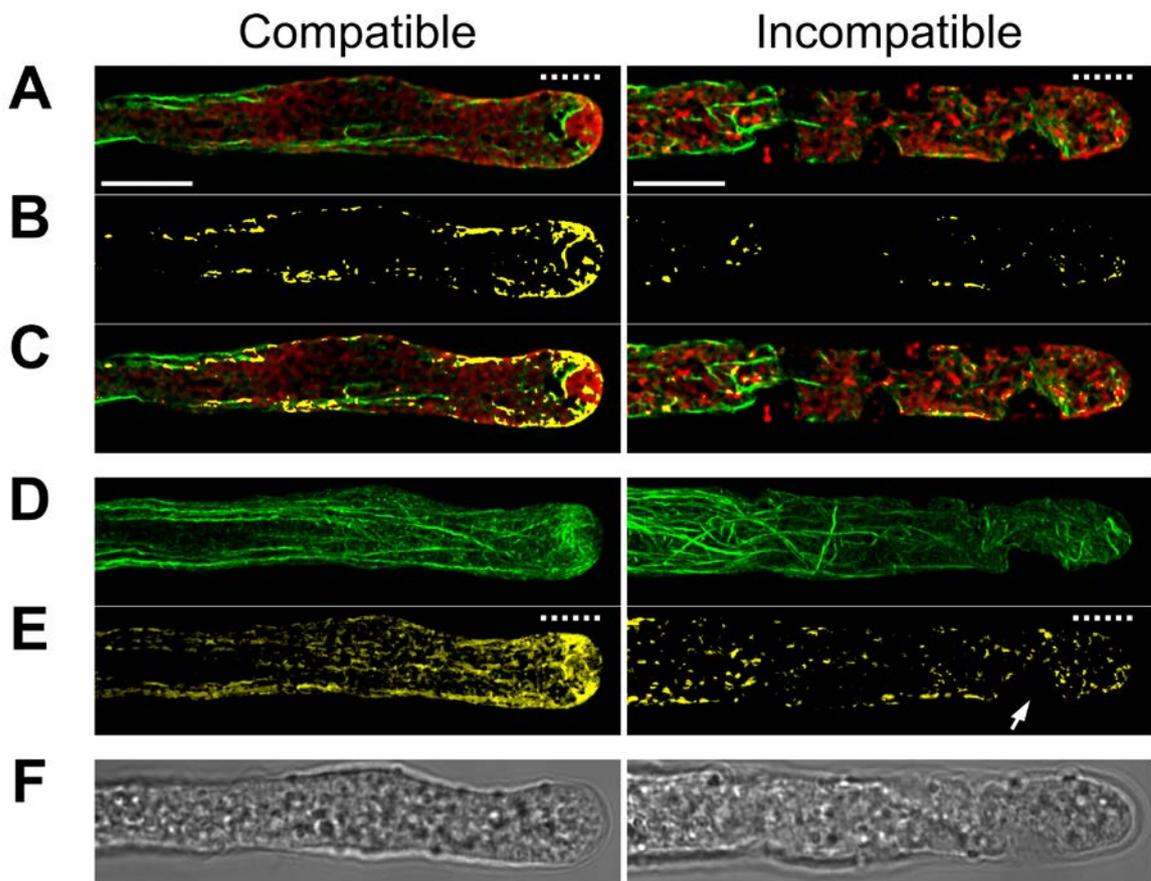
#### **5.2.4. Colocalización de F-actina y el sistema de endomembranas en tubos polínicos cultivados *in vitro*.**

Aunque existen algunos trabajos de colocalización de F-actina y FM en levaduras (Gachet & Hyams, 2005) y en células BY-2 de tabaco (Higaki *et al.*, 2006), no se conocen trabajos previos donde se muestren colocalizaciones de estas estructuras en tubos polínicos. Con el objetivo de visualizar los filamentos de actina y el tráfico vesicular de manera simultánea, se realizaron colocalizaciones de ambas estructuras empleando los marcadores de faloidina y FM. Los tubos polínicos compatibles mostraron la característica zona “V” invertida y la franja de actina (Fig. 30A y 30B, columna izquierda) asociadas en el ápice del tubo polínico (Fig. 30C, columna izquierda). En contraste y tal como se esperaba a partir de los experimentos previos, las marcaciones fueron alteradas en presencia de extracto incompatible. Los tubos polínicos incompatibles no mostraron la zona “V” invertida; en su lugar presentaron acumulaciones de vesículas en todo el vástago del tubo (Fig. 30A, columna derecha). Esta alteración estuvo asociada con la ausencia de la franja de actina del ápice y los filamentos de actina distorsionados en el vástago del tubo polínico (Fig. 30B y 30C, columna derecha). La superposición de las imágenes de ambas fluorescencias indicó una fuerte colocalización en el ápice del tubo polínico, entre las marcaciones de las vesículas de la “V” invertida y de la franja de actina (Fig. 30C, columna izquierda). En contraste, no se observó colocalización en el ápice del tubo polínico incompatible, carente de ambas estructuras (30C, columna derecha). La reconstrucción tridimensional de ambos tubos polínicos mostró claramente la diferencia entre los dos tipos de patrones de marcación (Fig. 30E).



**Figura 30. Doble marcación de citoesqueleto de F-actina (verde) y sistema de endomembranas (rojo) en tubos polínicos.** Tubos polínicos cultivados con extractos de estigma-estilo compatible e incompatible fueron marcados con faloidina Alexa 488 y FM 4-64. Las imágenes fueron tomadas a 90 minutos de cultivo. (A) Sección óptica media. (B) Proyección de F-actina. (C) Proyección de F-actina y sistema de endomembranas. (D) Campo brillante. (E) Reconstrucción tridimensional, panel superior tubo polínico compatible, panel inferior tubo polínico incompatible. Barra, 10  $\mu\text{m}$ .

Para confirmar la interacción entre la F-actina y las vesículas, se analizó la colocalización de las señales de fluorescencia de faloidina y FM en 10 y 11 tubos polínicos compatibles e incompatibles respectivamente. Todos los tubos polínicos mostraron una fuerte colocalización faloidina-FM, indicando que hay una interacción entre el sistema de endomembranas y el citoesqueleto de actina (Fig. 31). En todos los tubos polínicos compatibles, la colocalización estuvo asociada a los filamentos de actina del vástago y a la franja de actina del ápice (Fig. 31B y 31E, columna izquierda), coincidente con las marcaciones de faloidina y FM descritas anteriormente. Los tubos polínicos incompatibles, en contraste, nunca mostraron una fuerte colocalización en el ápice, esto fue coincidente con la ausencia en el ápice de la franja de actina y la zona “V” invertida de vesículas. En los tubos polínicos incompatibles, la colocalización fue observada sólo en los filamentos de actina (Fig. 31B y 31E, columna derecha). Ninguno de los agregados vesiculares marcados con FM muestra colocalización con los cables de F-actina (Fig. 31B-F, columna derecha).



**Figura 31. Colocalización de citoesqueleto de F-actina (verde) y sistema de endomembranas (rojo) en tubos polínicos.** Tubos polínicos cultivados con extractos de estilo compatible e incompatible fueron marcados con faloidina Alexa 488 y FM 4-64FX. Las imágenes fueron tomadas a los 90 minutos de cultivo. Sección óptica media (A-C) y proyección de 28 secciones ópticas (D-E) de un tubo polínico. (A) F-actina y sistema de endomembranas; (B) perfil de colocalización; (C) superposición de A y B. (D) F-actina (E) Perfil de la colocalización (F) Campo brillante. La flecha indica la región de agregados vesiculares adyacentes a la membrana plasmática. La línea de puntos destaca la región apical. Barra, 10  $\mu$ m.

### **5.3. Discusión.**

Se estudiaron los cambios subcelulares que se producen en los tubos polínicos de *N. alata* cultivados *in vitro* en presencia de extractos de estilo. Los estudios se focalizaron en la organización del citoesqueleto de F-actina y el sistema de endomembranas en una región de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  desde el ápice del tubo. Se analizó la secuencia temporal de las alteraciones en los tubos polínicos incompatibles, donde se estableció que la desorganización de la F-actina y la alteración del tráfico de vesículas hacia el ápice son progresivas y que estas alteraciones morfológicas son coincidentes con el arresto del crecimiento del tubo polínico.

### 5.3.1. Dinámica del crecimiento de los tubos polínicos en extractos de estilos compatibles e incompatibles.

El arresto del crecimiento del polen en presencia de extractos de estilo del mismo haplotipo (cultivo incompatible), permitió un estudio detallado a nivel subcelular de los fenómenos que ocurren durante el rechazo de los tubos polínicos incompatibles. Existen antecedentes de sistemas *in vitro* capaces de reflejar el fenómeno de AI que ocurre *in vivo*. Por ejemplo en Papaveráceas, el cultivo *in vitro* de polen en presencia del factor de reconocimiento femenino del locus *S* (PrsS) reveló que el mecanismo de AI desencadena procesos de MCP (Thomas & Franklin-Tong, 2004). En *Antirrhinum*, un miembro de la familia Plantagináceas donde el mecanismo de rechazo del polen depende de las S-RNAsas, el cultivo de polen en presencia de un extracto de estilo incompatible produjo una disminución notable del tamaño del tubo polínico. El secuestro de la S-RNasa presente en el extracto mediado por un anticuerpo, alivió el efecto de arresto del crecimiento (Qiao *et al.*, 2004). En *Nicotiana alata* los primeros intentos de poner a punto un sistema de AI *in vitro* no reflejaron de manera consistente el rechazo del polen (Jahnen *et al.*, 1989). Sin embargo estos experimentos fueron llevados a cabo con S-RNAsas purificadas y no con extractos totales de estilo, por lo que los factores no ligados al locus *S*, indispensables para la manifestación del rechazo (McClure & 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 AI.

En experimentos llevados a cabo con polen de la planta  $S_{C10}S_{C10}$  y pistilos de genotipo  $S_{C10}S_{C10}$  y  $S_{75}S_{75}$ , fue evidente la disminución del crecimiento del polen en presencia de extractos incompatibles. Este “rechazo” del polen se manifestó en la menor longitud (Fig. 25 y Fig.26) y la detención del tráfico vesicular (Fig. 28) del tubo polínico en el cultivo

incompatible. La diferencia en el crecimiento del tubo polínico sugiere que las S-RNasas del extracto de estilo fueron capaces de reconocer el polen propio y del mismo haplotipo. Aunque estos resultados no afirman concluyentemente que el efecto de rechazo del polen cultivado en extracto de estilos incompatibles sea producido por el sistema de AI, la diferencia entre los cultivos de polen compatible e incompatible es evidente y reproducible. Un experimento futuro importante consistirá en tratar de inhibir la S-RNasa de los extractos para determinar si esta proteína está involucrada en la respuesta de rechazo *in vitro*.

### 5.3.2. La dinámica del tráfico de vesículas de los tubos polínicos en presencia de extractos de estilos.

La ruta de acceso al tubo polínico de la S-RNasa y de los factores no ligados al locus *S* es probablemente la vía endocítica (McClure, 2006; Chen *et al.*, 2010). La S-RNasa ingresaría al tubo polínico en el interior de vesículas, separada del citoplasma para evitar la degradación del ARN del polen. En *Nicotiana glauca*, tanto en cruzamientos compatibles como incompatibles, la S-RNasa fue localizada en la vacuola del tubo polínico al menos hasta las 16 hs posteriores a la polinización. Transcurridas 36 hs luego de la polinización, la vacuola conservó su integridad en los cruzamientos compatibles con la S-RNasa en su interior. En contraste, la vacuola de los tubos polínicos incompatibles apareció desorganizada, con la S-RNasa dispersa ocupando todo el citoplasma del tubo polínico (Goldraij *et al.*, 2006). En base a éstos antecedentes, se realizó una serie de ensayos *in vitro* para estudiar la marcación de membranas en tubos polínicos de *Nicotiana glauca* con el marcador fluorescente de la vía endocítica FM (Bolte *et al.*, 2004).

El marcador FM fue utilizado para observar el tráfico de membranas de tubos polínicos creciendo en extractos de estilos (Fig. 28). Los tubos con movimiento restringido de vesículas mostraron cambios en el patrón normal de marcación del fluorescente. Después de 90 minutos de haber desafiado a los tubos polínicos con extracto incompatible, los cambios más notables fueron la acumulación de la fluorescencia en “sacos” adyacentes a la membrana en la región subapical y la ausencia de la zona en forma de “V” invertida en la región apical. Este resultado sugiere una alteración de los procesos endocítico y exocítico que parece ser paralelo o precede al arresto del crecimiento del tubo polínico. Posiblemente las zonas de acumulación del fluorescente FM representan agregados vesiculares, fenómeno frecuentemente observado en los cultivos de tubos polínicos con alteraciones morfológicas o

muerdos. La ausencia de la zona de “V” invertida es consistente con la disminución del crecimiento; esta región del ápice está enriquecida en vesículas que transportan y reciclan el material de membrana y pared celular para soportar el activo crecimiento del tubo polínico (Cheung & Wu, 2007; Zonia & Munnik, 2008).

### **5.3.3. La integridad del citoesqueleto de actina en tubos polínicos creciendo en extractos de estilos.**

La alteración morfológica en el citoesqueleto de actina en los tubos polínicos de *Nicotiana alata* fue estudiada en presencia de extractos de estilo incompatible. En *Papaver rhoeas*, una de las primeras alteraciones es la rápida y masiva depolimerización de la F-actina, estimulado por la inducción de la AI (Geitmann *et al.*, 2000). Aunque se estableció que la autoincompatibilidad en *Papaver* dispara la depolimerización de la F-actina como respuesta del rechazo, en *Nicotiana alata* no se ha establecido aún si los tubos polínicos incompatibles manifiestan una **depolimerización** de la actina, más bien hablamos de una desorganización de la arquitectura del citoesqueleto. Las alteraciones de la F-actina en cultivos *in vitro* parecen no ser estrictamente coincidentes con las observadas en tubos polínicos incompatibles *in planta*, donde los tubos polínicos mostraron una mayor frecuencia del patrón de F-actina fragmentada (Roldán *et al.*, 2012). Sin embargo, existió una clara diferencia entre los cultivos compatibles e incompatibles en cuanto a la organización del citoesqueleto de F-actina. La diferencia principal radicó en que el 85% de los tubos polínicos del cultivo incompatible no presentaron la franja de actina (Fig. 29D), una zona que estaría involucrada en la promoción de vesículas hacia el ápice como parte del proceso de exocitosis. Las diferencias más destacables se produjeron entre los 90 y los 120 minutos de iniciado el cultivo, cuando comenzó a manifestarse la pérdida de la integridad de la F-actina, la restricción del tráfico vesicular, y la detención del crecimiento del tubo polínico.

### **5.3.4. La relación de la dinámica de la F-actina y el tráfico vesicular.**

Muchas actividades celulares contribuyen al crecimiento polar de los tubos polínicos, pero los aportes más significativos lo realizan la dinámica del citoesqueleto de actina y los procesos de endocitosis-exocitosis (Hepler *et al.*, 2001). La dinámica de la F-actina y el

tráfico vesicular dependen uno del otro. Mediante el empleo de drogas inhibitorias de una u otra función, Zhang *et al* (2010) demostraron que estas dos actividades celulares son interdependientes en tubos polínicos de *Arabidopsis thaliana*. La colocalización de la F-actina y del sistema de endomembranas presentada en esta tesis fue confirmada mediante la marcación simultánea de ambas estructuras empleando faloidina y FM, respectivamente (Fig. 30 y Fig. 31), lo que manifiesta la estrecha relación entre ambos componentes claves del crecimiento polar. La principal diferencia en la doble marcación F-actina-FM, entre los tubos polínicos compatibles e incompatibles, radica en la colocalización que se presenta en el *tip* del tubo polínico, asociada a la presencia de la franja de actina y de la región de vesículas denominada “V” invertida. Todos los tubos polínicos compatibles analizados mostraron una fuerte colocalización en el *tip* (Fig. 31A-E, columna izquierda), mientras que todos los tubos polínicos incompatibles con los patrones de marcación alterados, presentaron una colocalización notablemente más débil en esta región. (Fig. 31A-E, columna derecha). Los efectos de las drogas LatB y Jasp en la distribución espacial de las vesículas (Zhang *et al.*, 2010) demuestran que la franja de actina es crítica para el transporte direccional de las vesículas hacia el *tip*. Un experimento futuro consistirá en demostrar la interdependencia de la integridad de la franja de actina y el tráfico vesicular en presencia de extractos de estilo incompatible.

Por otra parte, el citoesqueleto de actina funciona como *target* para la sucesiva transducción de señales en muchos procesos celulares (Staiger, 2000). Como se mencionara en las páginas 89 y 115, en *Papaver* y en *Pyrus* la reacción de AI en tubos polínicos cultivado *in vitro* motivó la rápida depolimerización de actina y el inicio posterior de procesos de MCP. La coincidencia de algunos patrones subcelulares que hemos observado en el sistema de cultivo de polen *in vitro* en *Nicotiana alata* expuesto a extractos incompatibles abre el interrogante de si la desorganización de los filamentos de actina y/o la ausencia de la franja de actina, pueden desencadenar procesos similares en el sistema de AI dependiente de S-RNAsas de Solanáceas.

#### **5.4. Materiales y métodos.**

#### 5.4.1. Material vegetal, condiciones de crecimiento y cruzamientos.

Los genotipos homocigotas utilizados en este estudio,  $S_{C10}S_{C10}$ ,  $S_{75}S_{75}$  y  $S_{70}S_{70}$ , fueron obtenidos como se describe en la página 109. Las plantas fueron cultivadas en un invernáculo a 28°C con un período de 16/8 hs de luz/oscuridad. Las flores fueron emasculadas 2 días antes de la antesis floral y recolectadas un día después de la apertura de los pétalos para coleccionar el polen y preparar extractos de proteína estilar.

#### 5.4.2. Preparación de extractos de estigma-estilo.

Los estigma-estilos de *Nicotiana glauca* de los genotipos  $S_{C10}S_{C10}$ ,  $S_{75}S_{75}$  y  $S_{70}S_{70}$ , fueron molidos en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Para extraer las proteínas de la matriz extracelular del tejido de transmisión (de ahora en adelante el extracto será denominado **extracto de estilo**). El polvo fue embebido en un medio de cultivo mineral (1,6 mM  $H_3BO_3$ ; 1 mM KCl; 1 mM  $CaCl_2$ ; 1 mM  $NH_4Cl$ ; 0,8 mM  $MgCl_2$ ; 15 mM MES pH: 5,9 y 7,5% PEG 4000) que contenía 5% sacarosa en base a la relación 5 mg peso fresco/ $\mu$ L. Luego de incubar 30 min en hielo con agitación por vortex cada 5 min la suspensión fue centrifugada dos veces (13.000 rpm, 4°C, 10 min) y se recuperó el sobrenadante. La proteína extraída se cuantificó con reactivo de Bradford (Biorad). Este extracto fue utilizado como medio de cultivo de polen a una concentración de proteínas final de 0,35  $\mu$ g/ $\mu$ L.

#### 5.4.3. Cultivos de polen y/o de tubos polínicos en extractos de estilo.

Dos tipos de cultivos con extractos de estilo fueron llevados a cabo para desafiar al grano de polen o al tubo polínico. Para los cultivos de polen en extractos de estilo, el polen  $S_{C10}$ ,  $S_{75}$  y  $S_{70}$  (50 células/ $\mu$ L) fue cultivado directamente con extractos de estilo de diferente haplotipo (cultivos compatibles). El polen  $S_{C10}$  también fue cultivado en extractos de estilo propio o de igual haplotipo (cultivos incompatibles), en este último caso, el extracto de estilo proviene de una “planta hermana” con el mismo genotipo  $S_{C10}S_{C10}$ . El polen fue incubado en microtubos *ependorf* de 1,5 ml de capacidad a 24°C en agitación (120 rpm). Para desafiar a los tubos polínicos en presencia de extractos de estilo, el polen  $S_{C10}$  (50 células/ $\mu$ L) fue incubado en microtubos *ependorf* de 1,5 ml de capacidad a 24°C en agitación (120 rpm) para

estimular la germinación y el crecimiento de los tubos polínicos. Después de 2 hs de cultivo, los tubos polínicos  $S_{C10}$  fueron incubados en extractos de estilo  $S_{C10}S_{C10}$  (cultivo incompatible) o en extracto  $S_{75}S_{75}$  (cultivo compatible).

Los tubos polínicos  $S_{70}$ ,  $S_{75}$  y  $S_{C10}$  también fueron incubados en medio de germinación (MG), como control del crecimiento.

#### 5.4.4. Análisis del crecimiento de los tubos polínicos.

Los tubos polínicos fueron observados en microscopio invertido de epifluorescencia Axiovert 135, con un objetivo 4X y se tomaron fotografías con cámara Axiovision tomando una alícuota de 10  $\mu$ L. Para los cultivos de polen se tomaron fotos a las 2 hs y 4 hs de iniciado el cultivo. Para los cultivos de tubos polínicos se tomaron fotos cada 30 min. La adquisición de fotos fue sistemática, tomando 4 fotos de cada región del pocillo que contenía el cultivo y una foto central. La medición de la longitud del tubo polínico se llevo a cabo con el programa Image J midiéndose un total de 100 tubos por tiempo y tratamiento. La medición fue sistemática; se dividió la foto en cuatro cuadrantes y se midió del primer cuadrante hasta el cuarto todos los tubos polínicos a excepción de aquellos cuya longitud era menor de 60  $\mu$ m. La medición en cada serie de fotos se hizo de manera alternada (foto de por medio) hasta completar la medición de 100 tubos por tratamiento. Cada tratamiento fue repetido tres o más veces de manera independiente.

Para el análisis estadístico de los cultivos de polen con extracto se realizó un test de ANOVA y un test de Tukey en cada experimento independiente. Para el análisis estadístico de los cultivos de tubos polínicos con extractos de pistilo se sacaron 10 valores promedio de las 100 mediciones iniciales por tratamiento de cada experimento independiente, y se promedió los valores para cada tiempo. De esta manera, se obtuvieron tamaños muestrales que oscilaron entre  $n=30$  (mediciones de 3 experimentos independientes) a  $n=50$  (mediciones de 5 experimentos independientes). Por último, con estos valores se realizó un test ANOVA de una variable y un test de Tukey para evaluar las diferencias significativas por tratamiento. Por otra parte se realizó un test de ANOVA y un test de Tukey para cada experimento independiente donde se observaron diferencias significativas entre los 90 y 120 min después de agregar el extracto de estilo.

Las diferencias significativas fueron establecidas como: \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) y \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

#### **5.4.5. Cultivos de polen en presencia del marcador de membranas fluorescente FM 4-64FX.**

Para analizar la dinámica del tráfico vesicular, el polen fue cultivado en extracto compatible o incompatible como se detalló más arriba. Después de una hora de cultivo, se agregó en el medio 12  $\mu\text{M}$  FM<sup>®</sup> 4-64FX (Molecular Probes, Inc). Para facilitar la lectura, este marcador será denominado sencillamente **FM**. Los tubos polínicos fueron observados en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un objetivo de inmersión 100X o en el microscopio Olympus 300 con un objetivo de inmersión 60X, tomando una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de cada tratamiento cada 30 min y contando durante 5 min tres patrones de marcación que se detallan más abajo.

#### **5.4.6. Cultivos de polen en presencia de Faloidina Alexa 488.**

Para analizar la organización del citoesqueleto de F-actina *in vitro*, el polen fue cultivado en medio de germinación como se detalló más arriba. Después de 2 hs de cultivo, los tubos polínicos fueron desafiados con extractos de estilo compatible o incompatible y fijados a distintos tiempos. Los medios de cultivo fueron centrifugados a 700 rpm durante 2 min para descartar el sobrenadante y los tubos polínicos fueron resuspendidos y fijados durante 5 min con buffer ASB (Geitmann *et al.*, 2000) pH 6,8 que contenía 4% de paraformaldehído preparado en el momento. Los tubos polínicos fijados fueron lavados por centrifugación con ASB tres veces y luego fueron permeabilizados durante 15 min con una solución de ASB que contenía 5 mM DTT y 0,1% Tween 20. Luego de un lavado con ASB, las células se incubaron con 400 nM faloidina Alexa 488 (Molecular Probes, Inc) durante 2 hs. A continuación los tubos polínicos fueron lavados tres veces con ASB y montados en Fluorsave (Calbiochem, Schwalbach, Alemania).

Para la colocalización del citoesqueleto de F-actina con el sistema de endomembranas, el tubo polínico fue cultivado en 20  $\mu\text{M}$  de FM, 1 h después del inicio del cultivo. Después de 2 hs de cultivo se agregó extracto de estilo compatible o incompatible como se detalló más arriba y se incubó durante 90 min. Los tubos polínicos fueron posteriormente centrifugados a 700 rpm durante 2 min) y fijados durante 30 minutos con ASB pH 6,8 conteniendo 4% de formaldehído preparado en el momento. El resto del tratamiento fue idéntico al especificado para la marcación con faloidina excepto que la incubación de la misma se prolongó por 3 hs.

Finalmente los tubos polínicos fueron lavados tres veces con ASB y montados en Fluorsave (Calbiochem, Schwalbach, Alemania).

#### 5.4.7. Microscopía de fluorescencia.

Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas mediante el uso del microscopio confocal Carl Zeiss LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para el citoesqueleto de F-actina, la fluorescencia de faloidina Alexa 488 (verde) fue detectada mediante láser de argón (488 nm de excitación, filtro BandPass de 505-530 nm). Para las vesículas de membrana, la fluorescencia de FM (rojo) fue detectada mediante láser helio-neón (excitación 543 nm, filtro long pass de 560 nm). Las muestras fueron visualizadas con un objetivo Plan-Apochromat 100x/1.4 NA Oil DIC con un zoom digital 2x. Para los videos de la dinámica del tráfico vesicular, se realizaron *time series* de 60 imágenes tomadas a intervalos de 1 segundo.

Para la colocalización de F-actina-FM, las imágenes de 25-35 secciones ópticas de 0,3  $\mu\text{m}$  de espesor fueron deconvolucionadas utilizando el software cell ^ R, empleando el algoritmo “advanced maximum likelihood estimation algorithm” AMLE (Olympus Soft Imaging Solutions, Munchen, Germany), versión 3.3, realizado con 20 iteraciones y una subcapa de volumen de 10 píxeles, utilizando una función de dispersión teórica (PSF). La F-actina y las vesículas de membrana fueron visualizadas desde el ápice hacia el vástago del tubo polínico abarcando una distancia de 100  $\mu\text{m}$ .

Tres patrones básicos de movilidad vesicular fueron observados en la marcación con FM y en campo brillante: i) Movimiento normal, donde el tráfico de vesículas es continuo y activo, y el ápice celular muestra la zona “V” invertida, rica en vesículas endocíticas y exocíticas. ii) Movimiento lento y desordenado de vesículas junto con la acumulación de manchas de FM adyacentes a la membrana plasmática. iii) Movimiento nulo de vesículas con todo el citoplasma marcado de rojo con FM. Se estableció La frecuencia de los tres patrones contando más de 50 tubos polínicos por cada experimento independiente.

Igualmente, se definieron tres patrones de F-actina basados en la marcación con Faloidina Alexa 488: i) cables de F-actina en el vástago y marcación de la “franja de actina” en la región subapical del tubo polínico, patrón normal mostrado por un tubo polínico en crecimiento. ii) Cables de F-actina en el vástago, pero sin marcación de la franja de actina en la región subapical del tubo polínico. iii) Actina desorganizada en el vástago, mostrando fragmentos más cortos y dispuestos al azar y ausencia de la franja de actina. Se estableció la

frecuencia de los tres patrones contando más de 75 tubos polínicos por cada experimento independiente.

**6. DISCUSIÓN GENERAL DEL MODELO PROPUESTO PARA EL MECANISMO DE AI EN *NICOTIANA ALATA*.**

La AI es un mecanismo ancestral en las Angiospermas que previene la autofertilización. El funcionamiento de este sistema evita las consecuencias detrimentales de la endocría y contribuye a mantener la diversidad genética de la especie. Los diferentes mecanismos de AI se originaron de manera independiente a lo largo de la evolución de las Angiospermas, lo que refleja la importancia que tiene para la especie el control y la selección del polen para la reproducción sexual (Allen & Hiscock, 2008). Tres sistemas de AI han sido particularmente bien estudiados a nivel molecular: el sistema de AIE en *Brassica*, el sistema de AIG dependiente de S-RNasas en Solanáceas, Rosáceas y Plantagináceas, y el sistema de AIG señalizado por  $\text{Ca}^{2+}$  en *Papaver*.

Varios sistemas de AI están controlados por el locus polimórfico *S* que codifica los factores de reconocimiento del polen y el pistilo. Uno de los mecanismos de AI más estudiados es el de la familia Solanáceas, el cual es controlado principalmente por las S-RNasas. Esta glicoproteína estilar cumple una doble función: i) reconoce el polen propio o genéticamente relacionado y ii) ejerce una acción citotóxica, degradando el ARN del polen incompatible. El factor del reconocimiento del polen es la proteína SLF producida en el citoplasma del tubo polínico, sitio donde se presume que interacciona de manera directa con la S-RNasa (Kao & Tsukamoto, 2004; McClure *et al.*, 2011).

La S-RNasa ingresa indistintamente al tubo polínico compatible o incompatible, posiblemente por endocitosis, y su destino final son los compartimentos vacuolares. Durante el rechazo del polen, estas vacuolas son selectivamente desorganizadas en los tubos polínicos incompatibles, mientras que en los tubos polínicos compatibles mantienen su integridad (Goldraij *et al.*, 2006). Este **mecanismo de compartimentalización** resulta efectivo para controlar la citotoxicidad de las S-RNasas. Por el momento, sigue siendo un enigma cuál es la cascada de señales implicadas en la disrupción de las vacuolas del polen incompatible. La estabilización del factor HT-B, un factor no ligado al locus *S* implicado en la respuesta de AI, podría estar mediando el proceso de desorganización vacuolar selectiva (McClure *et al.*, 1999; Goldraij *et al.*, 2006; 2012). Un modelo alternativo al de compartimentalización surge a partir del hallazgo de los dominios conservados F-box en la proteína SLF, (dominios que interactúan con el complejo de ubiquitin ligasa E3). A partir de esto, se ha propuesto que las S-RNasas de haplotipo diferente a SLF, podrían ser ubiquitinadas y posteriormente degradadas mediante el proteosoma 26S, manteniéndose de esta forma la integridad del tubo polínico (Qiao *et al.*, 2004; Hua *et al.*, 2008). Este **mecanismo de degradación** propuesto, funcionaría como un sistema detoxificante que elimina selectivamente las S-RNasas (Kubo *et al.*, 2010).

Resulta de sumo interés conocer dónde se produce la interacción S-RNasa-SLF. El factor SLF es una proteína que se encuentra en el citoplasma del tubo polínico (Ushijima *et al.*, 2003; Wang & Xue, 2005; Chen *et al.*, 2010) y por lo tanto varios autores sugieren que la interacción ocurriría en el citoplasma. Esta hipótesis genera un interrogante respecto al mecanismo de compartimentalización, porque las S-RNasas están almacenadas en vacuolas. En este contexto, no se descarta la posibilidad de que un pequeño *pool* de S-RNasas escape a la compartimentalización y quede libre en el citoplasma, disponible para la interacción con SLF (Goldraj *et al.*, 2006). En principio, resulta poco probable que esta pequeña cantidad de S-RNasa liberada en el citoplasma pueda ser la responsable de llevar a cabo la masiva degradación del ARN del tubo polínico (McClure *et al.*, 1990); por el contrario, el *pool* mayoritario de S-RNasas secuestrada en las vacuolas debería jugar un rol más activo en el rechazo del polen.

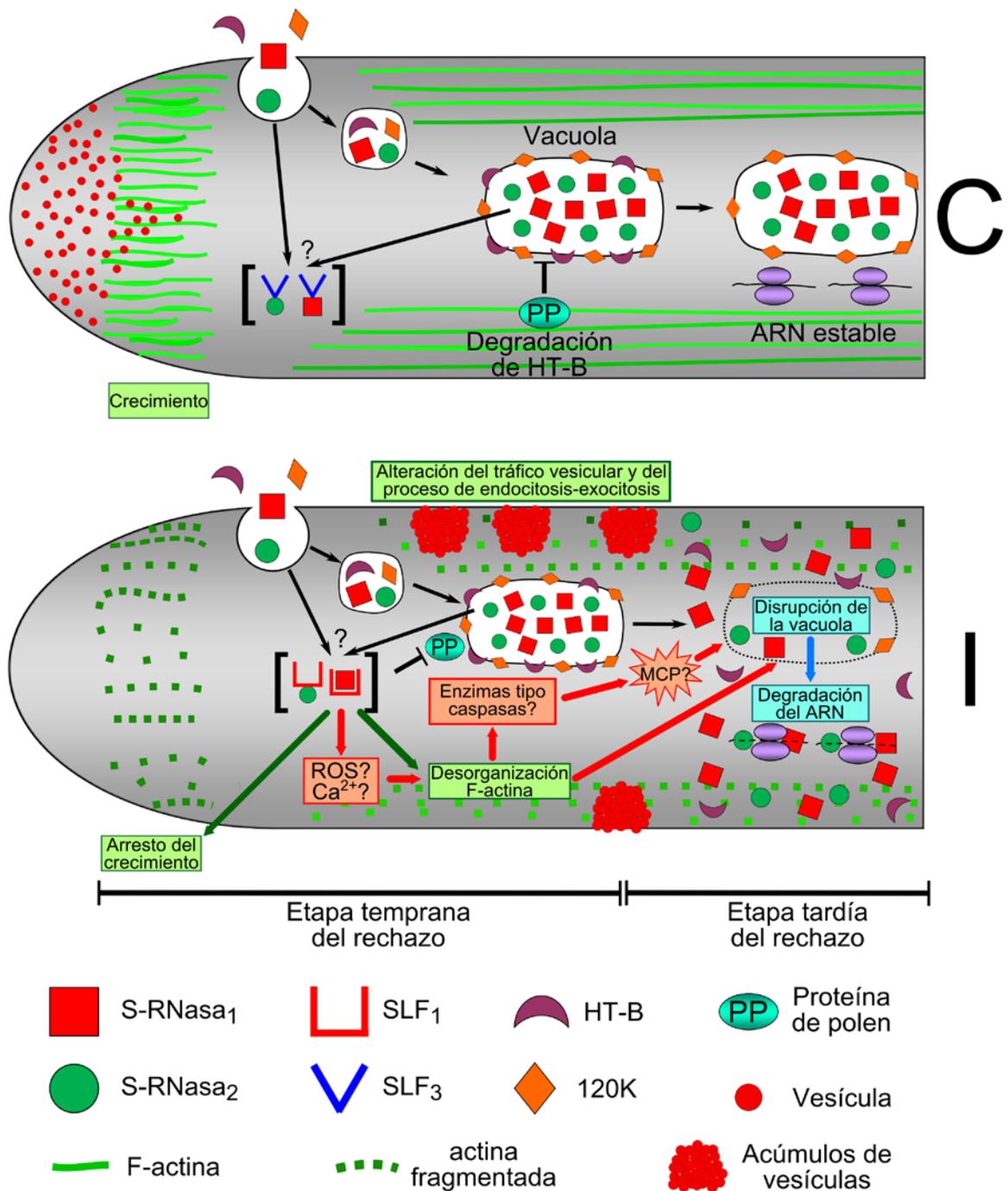
Las respuestas tempranas en el rechazo del polen pueden contribuir a señalar la desorganización del tonoplasto vacuolar en los tubos polínicos incompatibles. La integridad de los filamentos de actina es totalmente necesaria para el normal crecimiento del tubo polínico durante su migración hacia el ovario. Recientemente hemos demostrado que la desorganización del citoesqueleto de F-actina precede como evento de rechazo a la desorganización vacuolar de los tubos polínicos incompatibles de *N. alata* (Roldán *et al.*, 2012) (Fig. 24D). Este resultado indica que el desmantelamiento celular del tubo polínico incompatible ocurrió de manera organizada, siguiendo una secuencia específica de eventos que culmina en la disrupción de la vacuola y la consecuente liberación del *pool* mayoritario de S-RNasa en el citoplasma celular. De esta manera, la S-RNasa libre degradaría el ARN del polen incompatible confiriendo al proceso un carácter irreversible. La relevancia de estos estudios surge a partir del conocimiento actual de la dinámica del citoesqueleto de F-actina y su rol en la transducción de señales en muchos procesos dentro de células animales y vegetales (Smertenko & Franklin-Tong, 2011). La F-actina está bien caracterizada como blanco y efector de los mecanismos de rechazo en el sistema de AI de Papaveráceas (Poulter *et al.*, 2011) y de Rosáceas (Wang & Zhang, 2011).

La disrupción del tonoplasto y la consecuente liberación de S-RNasas al citoplasma del polen generan una serie de interrogantes respecto a la acción citotóxica que causa el rechazo del polen incompatible. La degradación del ARN por la acción de la S-RNasa ha sido considerada indispensable para la manifestación de la AI (Huang *et al.*, 1994; Royo *et al.*, 1994). Sin embargo, el lumen vacuolar usualmente contiene enzimas líticas las cuales podrían ser liberadas al citoplasma conjuntamente con la S-RNasa, participando junto a ésta del efecto

citotóxico. De hecho, la cisteín proteasa aleuraína se encuentra almacenada en el mismo compartimento que la S-RNasa (Goldraij *et al.*, 2006). Esto sugiere que el daño celular sobre el polen incompatible en la fase tardía del rechazo no sería causado exclusivamente por la S-RNasa. ¿Por qué entonces la actividad catalítica ribonucleasa es considerada indispensable para el rechazo del polen? Más allá de la acción degradativa general causada por enzimas vacuolares liberadas al citoplasma, es posible que la altísima cantidad de S-RNasa almacenada en la vacuola del polen garantice la rápida y masiva degradación del ARN causando un daño irreversible en la maquinaria celular del polen. Este aspecto particular del mecanismo de rechazo es objeto actualmente de un activo debate (Chen *et al.*, 2010; Roldán *et al.*, 2012).

A partir de los resultados obtenidos y de reportes previos realizados en *N. alata* y en los sistemas de *Papaver* y *Pyrus*, en esta tesis se postula el siguiente modelo de rechazo en el sistema AI de Solanáceas. El rechazo se manifestaría en dos fases (Fig. 32): en una **fase temprana**, el citoesqueleto de F-actina se desorganiza, mientras que el sistema de membranas de las vacuolas permanece intacto con la S-RNasa compartimentalizada en su interior (Roldán *et al.*, 2012). Posiblemente esta desorganización de la F-actina sea a través de las alteraciones de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y/o de la localización y concentración de ROS, como se ha encontrado en *Papaver* y *Pyrus* (Bosch & Franklin-Tong, 2008; Wang & Zhang, 2011). La desorganización de la F-actina ocurriría en paralelo con la alteración del tráfico vesicular y llevarían progresivamente al arresto del crecimiento de los tubos polínicos incompatibles. A su vez, la desorganización de la F-actina actuaría como segundo mensajero para señalar la disrupción de las vacuolas, posiblemente a través de un proceso mediado por la estabilidad de HT-B y otros factores (Goldraij *et al.*, 2006). Varios trabajos consideran a la pérdida de integridad de las vacuolas como un evento característico de la MCP (Higaki *et al.*, 2008; Hatsugai & Hara-Nishimura, 2010; Hara-Nishimura & Hatsugai, 2011).

En una **fase tardía**, el tonoplasto vacuolar pierde su integridad, liberando las S-RNasas al citoplasma donde se produce la degradación del ARN y el consecuente rechazo del polen incompatible, lo que garantizaría la irreversibilidad del rechazo (Goldraij *et al.*, 2012). Todos estos cambios no ocurren en las polinizaciones compatibles, donde el citoesqueleto y la vacuola conservan su integridad durante todo el trayecto del tubo polínico hacia el ovario. De esta manera, la compartimentalización es un mecanismo esencial que protege al ARN del tubo polínico de la acción citotóxica de las S-RNasas.



**Figura 32. Modelo propuesto de los eventos que se producen durante el rechazo del polen incompatible en el sistema de AI dependiente de S-RNasas.** El modelo propone que la alteración del gradiente de  $[Ca^{2+}]_i$  y de ROS, iniciarían la desorganización de la F-actina (Roldán *et al.*, 2012) que produce a su vez la detención del tráfico vesicular y el arresto del crecimiento. La F-actina desorganizada desencadenaría eventos de MCP que llevarían a la ruptura vacuolar y a la liberación de S-RNasas que degradan el ARN del tubo polínico incompatible (Goldraij *et al.*, 2006), confiriendo al proceso un carácter irreversible que destruye la maquinaria celular (Goldraij *et al.*, 2012). Las flechas y recuadros rojos indican eventos aún no comprobados en Solanáceas pero sí en sistemas de AI inmediatamente relacionados (por ejemplo en Rosáceas; Wang *et al.*, 2009; 2010). Las flechas y recuadros verdes designan eventos caracterizados en este trabajo de tesis. Las flechas y recuadros celestes indican eventos previamente reportados en *Nicotiana glauca* (McClure *et al.*, 1990; Goldraij *et al.*, 2006; Roldán *et al.*, 2012).

El rol de los filamentos de actina como efector de la cascada de señales ha sido bien documentado en *Papaver rhoeas*, especie que posee un sistema de AI diferente al de *Nicotiana glauca*. También ha sido caracterizado en *Pyrus pirifolia*, especie que comparte el mismo sistema con *N. glauca* pero exhibiendo mecanismos genéticos y moleculares diferentes (Hauck *et al.*, 2006; McClure, 2008). Sin embargo los eventos celulares y moleculares que conforman la respuesta de rechazo en ambas especies han sido conciliadas (Goldraij *et al.*, 2012). En ambas especies, los estudios fueron llevados a cabo en ensayos de polen *in vitro*. Inmediatamente después de la inducción de AI, el tubo polínico incompatible experimenta un masivo ingreso y redistribución de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región subapical (Franklin-Tong *et al.*, 1993; Qu *et al.*, 2007). El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  dispara una rápida y extensiva depolimerización del citoesqueleto de actina (Geitman *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007) que a su vez inicia una red de eventos que confluyen en un proceso de MCP (Thomas & Franklin-Tong, 2004; Wang *et al.*, 2009). *Pyrus* posee un sistema AI dependiente de S-RNasas pero a partir de los resultados obtenidos los autores postulan un modelo de rechazo diferente al propuesto en la figura 32, sugiriendo que la degradación del ARN ocurre en una etapa temprana del rechazo, que conduce finalmente a la MCP. Este modelo propuesto resulta difícil de extender al sistema de AI de *N. glauca* por varios motivos. Dentro de Solanáceas, la S-RNasa no es un factor suficiente para rechazar el polen incompatible, existen otros factores no ligados al locus *S* como HT-B y 120K que son indispensables para la respuesta de AI (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005). Por otro lado, la acción citotóxica de las S-RNasas en *N. glauca* ocurriría después de la ruptura vacuolar y su consecuente liberación al citoplasma, evento que fue claramente caracterizado como posterior a la desorganización de la F-actina.

Las futuras investigaciones pueden revelar qué tan divergente son los sistemas de estas dos familias, como para considerar mecanismos de rechazo de AI dependiente de S-RNasas evolutivamente diferentes.

## **7. LITERATURA CITADA.**

- **Allen AM, Hiscock SJ** (2008) Evolution and phylogeny of Self-incompatibility systems in Angiosperms. In: Franklin-Tong VE. ed. *Self-incompatibility in flowering plants-Evolution, diversity and mechanisms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 73-101.
- **Anderson MA, Cornish EC, Mau S-L, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Bönig I, Grego B, Simpson R, Roche PJ, Haley JD, Penschow JD, Niall HD, Tregear GW, Coughlan JP, Crawford RJ, Clarke AE** (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* **321**: 38-44.
- **Anderson MA, McFadden GI, Bernatzky R, Atkinson A, Orpin T, Dedman H, Tregear G, Fernley R, Clarke AE** (1989) Sequence variability of three alleles of the self- incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell* **1**:483-491.
- **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.
- **Bosch M, Franklin-Tong VE.** (2007). Temporal and spatial activation of a caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in *Papaver* pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**: 18327-18332.
- **Cai G, Cresti M** (2009) Organelle motility of pollen tube: a tale of 20 years. *Journal of Experimental Botany* **60**: 495-508.
- **Charlesworth D** (2010) Self-incompatibility. *F1000 Biology Reports* **2**: 62-68.
- **Chen CY, Wong EI, Vidali L, Estavillo A, Hepler PK, Wu Hm, Cheung AY** (2002) The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes. *The Plant Cell* **14**: 2175-2190.
- **Chen T, Teng N, Wu X, Wang Y, Tang W, Šamaj J, Baluška F, Lin J** (2007) Disruption of actin filaments by latrunculin B affects cell wall construction in *Picea meyeri* pollen tube by disturbing vesicle trafficking. *Plant and Cell Physiology* **48**: 19-30.
- **Chen G, Zhang B, Zhao Z, Sui Z, Zhang H, Xue Y** (2010) “A life or death decision” for pollen tubes in S-RNase-based self-incompatibility. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2027-2037.
- **Cheung A, Wu H** (2007) Structural and functional compartmentalization in pollen tubes. *Journal of Experimental Botany* **58**: 75-82.

- **Cheung AY, Duan Qh, Santos Costa S, de Graaf BHJ, Di Stilio VS, Feijo J, Wu HM** (2008) The dynamic pollen tube cytoskeleton: Live cell studies using actin-binding and microtubule-binding reporter proteins. *Molecular Plant* **1**: 686-702.
- **Cheung AY, Wu HM** (2008) Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 547-572.
- **Cooperman BS, Baykov AA, Lahti R** (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 262-266.
- **Cruz-Garcia F, Hancock CN, McClure BA** (2003) S-RNase complexes and pollen rejection. *Journal of Experimental Botany* **54**: 123-130.
- **Cruz-Garcia F, Hancock CN, Kim D, McClure BA** (2005) Stylar glycoproteins bind to S-RNase *in vitro*. *The Plant Journal* **42**: 295-304.
- **Darwin F, Seward AC** (1903) More letters of Charles Darwin (John Murray, London), Vol. 2.
- **Dellaporta S, Wood J, Hicks J** (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**: 19-21.
- **Dodds PN, Clarke AE, Newbigin E** (1996) Molecular characterisation of an S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation. *Plant Molecular Biology* **31**: 227-238.
- **Doris FP, Steer MW** (1996) Effects of fixatives and permeabilisation buffers on pollen tubes: Implications for localisation of actin microfilaments using phalloidin staining. *Protoplasma* **195**: 25-36.
- **East E, Yarnell SH** (1929) Studies on self-sterility VIII. Self-sterility allelomorphs. *Genetics* **14**: 455-487.
- **Eberle CA, Clasen BM, Anderson NO, Smith AG** (2012) A novel pollen tube growth assay utilizing a transmitting tract-ablated *Nicotiana tabacum* style. *Sexual Plant Reproduction* **25** (1): 27-37.
- **Elleman, CJ, Dickinson HG** (1999) Commonalities between pollen/stigma and host/pathogen interactions: calcium accumulation during stigmatic penetration by *Brassica oleracea* pollen tubes. *Sexual Plant Reproduction* **12**: 194-202.
- **Emerson S** (1939) A preliminary survey of the *Oenothera organensis* population. *Genetics* **24**: 524-537.

- **Foote HCC, Ride JP, Franklin-Tong VE, Walker EA, Lawrence MJ, Franklin FCH** (1994) Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 2265–2269.
- **Franklin-Tong VE, Lawrence MJ, Franklin FCH** (1988) An *in-vitro* method for the expression of self-incompatibility in *Papaver rhoeas* using stigmatic extracts. *New Phytologist* **110**, 109-118.
- **Franklin-Tong VE, Ride JP, Read ND, Trewavas AJ, Franklin FCH** (1993) The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *The Plant Journal* **4**: 163-177.
- **Franklin-Tong VE, Hackett G, Hepler PK** (1997) Ratio-imaging of  $[Ca^{2+}]_i$  in the self-incompatibility response in pollen tubes of *Papaver rhoeas*. *The Plant Journal* **12**:1375-1386.
- **Franklin-Tong VE** (2008) Self-incompatibility in *Papaver rhoeas*: progress in understanding mechanisms involved in regulating self-incompatibility in *Papaver*. In: Franklin-Tong VE. ed. *Self-incompatibility in flowering plants-Evolution, diversity and mechanisms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 237-258.
- **Franklin-Tong VE, Gourlay CW** (2008) A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochemical Journal* **413**: 389-404.
- **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.
- **Gachet Y, Hyams JS** (2005) Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *Journal of Cell Science* **118**: 4231-4242.
- **Galiana E, Bonnet P, Conrod S, Keller H, Panabieres F, Ponchet M, Poupet A, Ricci P** (1997) RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiology* **115**: 1557-1567.
- **Gaude T, McCormick S** (1999) Signaling in pollen-pistil interactions. *Cell & developmental biology* **10**: 139-147.
- **Geitmann A, Hudák J, Vennigerholz F, Walles B** (1995) Immunogold localization of pectine and callose in pollen grains and pollen tubes of *Brugmansia suaveolens*-Implications for the self-incompatibility reaction. *Journal of Plant Physiology* **147**: 225-235.

- **Geitmann A** (1999) Cell death of self-incompatible pollen tubes: necrosis or apoptosis? In: Cresti M, Cai G, Moscatelli A eds. *Fertilization in higher plants. Molecular and cytological aspects*. Springer-Verlag; Berlin Heidelberg, 113-137.
- **Geitmann A, Snowman BN, Emons AMC, Franklin-Tong VE.** (2000) Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *The Plant Cell* **12**: 1239-1251.
- **Geitmann A, Franklin-Tong VE, Emons AC** (2004) The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* pollen causes early and striking alterations to organelles. *Cell Death and Differentiation* **11**: 812-822.
- **Gibbon BC, Kovar DR, Staiger CJ** (1999) Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth. *The Plant Cell* **11**: 2349-2364.
- **Good-Avila SV, Mena-Alí JI, Stephenson AG** (2008) Genetic and environmental causes and evolutionary consequences of variations in self-fertility in self-incompatible species. In: Franklin-Tong VE. ed. *Self-incompatibility in flowering plants- Evolution, diversity and mechanisms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 33-51.
- **Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vázquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-García F, McClure BA** (2006) S-RNase compartmentalization and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* **439**: 805-810.
- **Goldraij A, Roldán JA, Rojas HJ** (2012) Early F-actin disorganization may be signaling vacuole disruption in incompatible pollen tubes of *Nicotiana glauca*. *Plant Signaling & Behavior* **7** (12): 1-3.
- **Golz JF, Clarke AE, Newbiggin E, Anderson M** (1998) A relic S-RNase is expressed in the styles of self-compatible *Nicotiana glauca*. *The Plant Journal* **16**: 591-599.
- **Goodspeed TH** (1954) The genus *Nicotiana*. Origins, relationships and evolution of its species in the light of their distribution, morphology and cytogenetics. *Chronica Botanica Company*, Waltham, MA, pp 389-405.
- **de Graaf BHJ, Cheung AY, Andreyeva T, Lévassieur K, Kieliszewski M, Wu H-m** (2005) Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco. *The Plant Cell* **17**:2564–2579

- **de Graaf BHJ, Lee C, McClure BA, Franklin-Tong VE.** (2006) Cellular Mechanisms for pollen tube growth inhibition in gametophytic Self-incompatibility. In: *The Pollen Tube*. Malhó R ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 201-221.
- **Green PJ** (1994) The ribonucleases of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 421-445.
- **Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias DD, Goring DR.** (1998) Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 382-387.
- **Hancock CN, Kent L, McClure BA** (2005) The stylar 120 k glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal* **43**: 716-723.
- **Hara-Nishimura I, Hatsugai N** (2011) The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1298-1304.
- **Hashimoto M, Komatsu K, Maejima K, Okano Y, Shiraishi T, Ishikawa K, Takinami Y, Yamaji Y, Namba S** (2012) Identification of three MAPKKKs forming a linear signaling pathway leading to programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biology* **8**:12:103.
- **Hatsugai N, Hara-Nishimura I** (2010) Two vacuole-mediated defense strategies in plants. *Plant Signaling & Behavior* **5** (12): 1568-1570.
- **Hauck NR, Yamane H, Tao R, Iezzoni AF** (2006) Accumulation of non-functional S-haplotypes results in the breakdown of gametophytic self-incompatibility in tetraploid *Prunus*. *Genetics* **172**: 1191-1198.
- **Hepler PK, Vidali L, Cheung AY** (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**: 159-187.
- **Hicks GR, Rojo E, Hong S, Carter DC, Raikhel NV** (2004) Germinating pollen has tubular vacuoles, displays highly dynamic vacuole biogenesis, and requires *VACUOLESS1* for proper function. *Plant Physiology* **134**: 1227-1230.
- **Higaki T, Kutsuna N, Okubo E, Sano T, Hasezawa S** (2006) Actin microfilaments regulate vacuolar structures and dynamics: dual observation of actin microfilaments and vacuolar membrane in living tobacco BY-2 Cells. *Plant and Cell Physiology* **47** (7): 839-52.

- **Higaki T, Kadota Y, Goh T, Hayashi T, Kutsuna N, Sano T, Hasezawa S, Kuchitsu K** (2008) Vacuolar and cytoskeletal dynamics during elicitor-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant Signaling & Behavior* **3** (9): 700-703.
- **Higashiyama T, Inatsugi R** (2006) Comparative analysis of biological models used in the study of pollen tube growth. *Plant Cell Monographs* **3**: 265-286.
- **Hillwig MS, Liu X, Liu G, Thornburg RW, MacIntosh GC** (2010) *Petunia* nectar proteins have ribonuclease activity. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2951-2965.
- **Hillwig MS, Kanobe C, Robert W, Thornburg RW, MacIntosh GC** (2011) Identification of S-RNase and peroxidase in *Petunia* nectar. *Journal of Plant Physiology* **168**: 734–738.
- **Hiratsuka S, Zhang SL, Nakagawa E, Kawai Y** (2001) Selective inhibition of the growth of incompatible pollen tubes by S-protein in the Japanese pear. *Sexual Plant Reproduction* **13**: 209-215.
- **Hiscock SJ, McInnis SM** (2003) Pollen recognition and rejection during the sporophytic Self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends in Plant Science* **8**:606–613.
- **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.
- **Hua Z, Fields A, Kao T-h** (2008) Biochemical models for S-RNase-based Self-incompatibility. *Molecular Plant* **1**: 575-585.
- **Huang S, Lee HS, Karunandaa B, Kao T-h** (1994) Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell* **6**: 1021-1028.
- **Hugot K, Ponchet M, Marais A, Ricci P, Galiana E** (2002) A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 243-250.
- **Ida K, Norioka S, Yamamoto M, Kumasaka T, Yamashita E, Newbigin E, Clarke AE, Sakiyama F, Sato M** (2001) The 1.55Å resolution structure of *Nicotiana glauca* S(F11)-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *Journal of Molecular Biology* **314**: 103-112.
- **Igic B, Kohn JR** (2001) Evolutionary relationships among Self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 13167-13171.
- **Igic B, Smith WA, Robertson KA, Schaal BA, Kohn JR** (2007) Studies of Self-incompatibility in wild tomatoes: I. S-allele diversity in *Solanum chilense* Dun. (Solanaceae). *Heredity* **99**: 553-561.

- **Innes RW** (2001) Mapping out the roles of MAP kinases in plant defense. *Trends in Plant Science* **6**: 392-394.
- **Ippolito A, Fernandes GW, Holtsford TP** (2004) Pollinator preferences for *Nicotiana alata*, *N. forgetiana*, and their F1 hybrids. *Evolution* **58**: 2634-2644.
- **Ioerger TR, Clarke AE, Kao T-h** (1990) Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**: 9732-9735.
- **Ioerger TR, Gohlke JR, Xu B, Kao T-h** (1991) Primary structural features of the Self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sexual Plant Reproduction* **4**: 81-87.
- **Ishimizu T, Endo T, Yamaguchi-Kabata Y, Nakamura KT, Sakiyama F, Norioka S** (1998) Identification of regions in which positive selection may operate in S-RNase of Rosaceae: Implication for S-allele-specific recognition sites in S-RNase. *FEBS Letters* **440**: 337-342.
- **Ivanov R, Gaude T** (2009) Endocytosis and endosomal regulation of the S-receptor kinase during the Self-incompatibility response in *Brassica oleracea*. *The Plant Cell* **21**: 2107-2117.
- **Ivanov R, Fobis-Loisy I, Gaude T** (2010) When no means no: guide to Brassicaceae Self-incompatibility. *Trends in Plant Science* **15**: 387-394.
- **Ivanov P, Anderson P** (2011) Stress-induced ribonucleases. In: Nicholson AW (ed) *Ribonucleases, Nucleic Acids and Molecular Biology*. Berlin-Heidelberg, Germany, Springer-Verlag, pp 115-119.
- **Iwano M, Shiba H, Matoba K, Miwa T, Funato M, Entani T, Nakayama P, Shimosato H, Takaoka A, Isogai A, Takayama S** (2007) Actin dynamics in papilla cells of *Brassica rapa* during self- and cross-pollination. *Plant Physiology* **144**: 72-81.
- **Iwano M, Takayama S** (2012) Self/non-self discrimination in angiosperm self-incompatibility. *Current Opinion in Plant Biology* **15(1)**: 78-83.
- **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.
- **Jauh GY, Lord EM** (1995) Movement of the tube cell in the lily style in the absence of the pollen grain and the spent pollen tube. *Sexual Plant Reproduction* **8**: 168-172.

- **Jordan ND, Kakeda K, Conner A, Ride JP, Franklin-Tong VE, Franklin FCH** (1999) S-protein mutants indicate a functional role for SBP in the self-incompatibility reaction of *Papaver rhoeas*. *The Plant Journal* **20**: 119-126.
- **Judd WS, Campbell CS, Kellog EA, Stevens PF, Donoghue MJ** (2002) Plant Systematics, a phylogenetic approach. *Sinauer Associates, Inc*, Sunderland, USA.
- **Kakita M, Murase K, Iwano M, Matsumoto T, Watanabe M, Shiba H, Isogai A, Takayama S** (2007) Two distinct forms of Mlocus protein kinase localize to the plasmamembrane and interact directly with S-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *The Plant Cell* **19**: 3961–3973.
- **Kao T-h, Tsukamoto T.** (2004) The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell* **16**: S72–S83.
- **Ketelaar T, Meijer HJ, Spiekerman M, Weide R, Govers F** (2012) Effects of latrunculin B on the actin cytoskeleton and hyphal growth in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* **49**: 1014-1022.
- **Kho YO, Baer J** (1968) Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* **17**: 299-302.
- **Klein J** (1986). Natural history of the major histocompatibility complex. *Wiley*: New York.
- **Kohn JR** (2008) What Genealogies of S-alleles Tell Us. In: Franklin-Tong VE (ed) Self-incompatibility in flowering plants. *Evolution diversity and mechanisms*. Springer, Berlin, pp 130-121.
- **Kokubun H, Nakano M, Tsukamoto T, Watanabe H, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L, Basualdo IL, Kao TH, Ando T** (2006) Distribution of self-compatible and self-incompatible populations of *Petunia axillaris* (Solanaceae) outside Uruguay. *Journal of Plant Research* **5**: 419-430.
- **Kubo K, Entani T, Takara A, Wang N, Fields AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima S, Ando T, Isogai A, Kao TH, Takayama S** (2010) Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science* **330 (6005)**: 796-799.
- **Kumar A, McClure B** (2010) Pollen-pistil interactions and the endomembrane system. *Journal of Experimental Botany* **61(7)**: 2001-2013.
- **Kuroda S, Norioka S, Mitta M, Kato I, Sakiyama F** (1994) Primary structure of a novel stylar RNase unassociated with self-incompatibility in tobacco plant *Nicotiana glauca*. *Journal of Protein Chemistry* **13**: 438-439.

- **Lancelle S, Hepler P** (1992) Ultrastructure of freeze-substituted pollen tubes of *Lilium longitlorum*. *Protoplasma* **167**: 215-230.
- **Lee HS, Singh A, Kao T-h** (1992) RNase X2, a pistil-specific ribonuclease from *Petunia inflata*, shares sequence similarity with solanaceous *S* proteins. *Plant Molecular Biology* **20**: 1131-1141.
- **Lee HS, Huang S, Kao T-h** (1994) *S* proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**: 560-563.
- **Lee CB, Page LE, McClure BA, Holtsford TP** (2008) Post-pollination hybridization barriers in *Nicotiana* section *Alatae*. *Sexual Plant Reproduction* **21**: 183-195.
- **Li JH, Nass N, Kusaba M, Dodds PN, Treloar N, Clarke AE, Newbigin E** (2000) A genetic map of the *Nicotiana alata S* locus that includes three pollen-expressed genes. *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 956-964.
- **Liang L, Lai Z, Ma W, Zhang Y, Xue Y** (2002) AhSL28, a senescence- and phosphate starvation-induced S-like RNase gene in *Antirrhinum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **17**: 5964-5971.
- **Liang L, Huang J, Xue Y.** (2003) Identification and evolutionary analysis of a relic S-RNase in *Antirrhinum*. *Sexual Plant Reproduction* **16**: 17-22.
- **Liu Zq, Xu Gh, Zhang Sl.** (2007) *Pyrus pyrifolia* stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes in vitro. *Protoplasma* **232**: 61-67.
- **Lovy-Wheeler A, Wilsen KL, Baskin TI, Hepler PK** (2005) Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube. *Planta* **221** (1): 95-104.
- **Lu Y** (2006) Historical events and allelic polymorphism at the gametophytic self-incompatibility locus in Solanaceae. *Heredity* **96**: 22-28.
- **Luhtala N, Parker R** (2010) T2 family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends in Biochemical Sciences* **35**: 253-259.
- **Lush MW, Clarke AE** (1997) Observations of pollen tube growth in *Nicotiana alata* and their implications for the mechanism of self-incompatibility. *Sexual Plant Reproduction* **10**: 27-35.
- **Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M** (2000) S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* **407**: 649-651.

- **Ma RC, Oliveira MM** (2002) Evolutionary analysis of S-RNase genes from Rosaceae species. *Molecular Genetics & Genomics* **267** (1): 71-78.
- **MacIntosh GC, Bariola PA, Newbiggin E, Green PJ** (2001) Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: Unexpected functions for ancient enzymes?. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 1018-1023.
- **MacIntosh GC** (2008) RNase T2 family: enzymatic properties, functional diversity, and evolution of ancient ribonucleases. In: Nicholson AW (ed.) *Ribonucleases, nucleic acids and Molecular Biology* 26. Springer, Berlin, pp 89-114.
- **Maeshima M** (2001) Tonoplast transporters: organization and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 469-497.
- **Matton DP, Maes C, Laublin G, Qin XK, Bertrand C, Morse D, Cappadoccia M** (1997) Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *The Plant Cell* **9**: 1757-1766.
- **Matton DP, Luu DT, Xike Q, Laublin G, O'Brien M, Maes O, Morse D, Cappadoccia M** (1999) Production of an S-RNase with dual specificity suggests a novel hypothesis for the generation of new S alleles. *The Plant Cell* **11**: 2087-2097.
- **McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE** (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955-957.
- **McClure BA, Gray JE, Anderson MA, Clarke AE** (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of rRNA. *Nature* **347**: 757-760.
- **McClure BA, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R** (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 13548-13553.
- **McClure BA, Cruz-García F, Beecher B, Sulaman W** (2000) Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Annals of Botany* **85**: 113-123.
- **McClure BA, Frankling-Tong V** (2006) Gametophytic Self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta* **226**: 233-245.
- **McClure BA** (2006) News views of S-RNase-based Self-incompatibility. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 639-646.

- **McClure BA** (2008) Comparing models for S-RNase-based Self-incompatibility. In: Franklin-Tong VE (ed) Self-incompatibility in flowering plants. *Evolution diversity and mechanisms*. Springer, Berlin, pp 217-236.
- **McClure BA, Cruz-García F, Romero C** (2011) Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals of Botany* **108**: 647-658.
- **Mena-Alí JI, Stephenson AG** (2007) Segregation analyses of partial self-incompatibility in self and cross progeny of *Solanum carolinense* reveal a leaky S-allele. *Genetics* **177**: 501-510.
- **Meng XY, Hua ZH, Wang N, Fields AM, Dowd PE, Kao T-h** (2009) Ectopic expression of S-RNase of *Petunia inflata* in pollen results in its sequestration and non-cytotoxic function. *Sexual Plant Reproduction* **22**: 263-275.
- **Meng XY, Sun P, Kao T-h** (2010) S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*. *Annals of Botany* **108**: 637-646.
- **Miller JS, Levin RA, Feliciano NM** (2008) A tale of two continents: Baker's rule and the maintenance of self-incompatibility in *Lycium* (Solanaceae). *Evolution* **5**: 1052-1065.
- **Murase K, Shiba H, Iwano M, Che FS, Watanabe M, Isogai A, Takayama S** (2004) A Membrane-Anchored Protein Kinase Involved in *Brassica* Self-Incompatibility Signaling. *Science* **303**: 1516-1519.
- **Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA.** (1994) S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allelespecific pollen rejection. *Nature* **367**: 563–566.
- **Murfett J, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure BA** (1996) S-RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *The Plant Cell* **8**: 943-958.
- **Newbigin E, Uyenoyama M** (2005) The evolutionary dynamics of self-incompatibility systems. *Trends in Genetics* **21**: 500-505.
- **de Nettancourt D, Devreux M, Bozzini A, Cresti M, Pacini E, Sarfatti G** (1973) Ultrastructural aspects of the self-incompatibility mechanism in *Lycopersicum peruvianum* Mill. *Journal of Cell Science* **12**: 403-419.
- **de Nettancourt D** (1977) Incompatibility in Angiosperms. In: Frankel R, Gall GAE, Linskens HF, eds. *Monographs on theoretical and applied genetics*. Berlin: Springer-Verlag, 48.

- **de Nettancourt D** (2001) Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag 322 pp, 2<sup>nd</sup> ed.
- **O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Koyama Y, Matton DP** (2002) Molecular analysis of the style-expressed *Solanum chacoense* asparagine-rich protein family related to the HT modifier gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *The Plant Journal* **32**: 1-12.
- **Pandey KK** (1979) The genus *Nicotiana*: evolution of incompatibility in flowering plants. In: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic, London, 421-434.
- **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.
- **Poulter NS, Staiger CJ, Rappoport JZ, Franklin-Tong VE** (2010) Actin-binding proteins implicated in the formation of the punctate actin foci stimulated by the Self-incompatibility response in *Papaver*. *Plant Physiology* **152**: 1274-1283.
- **Poulter NS, Bosch M, Franklin-Tong VE** (2011) Proteins implicated in mediating self-incompatibility-induced alterations to the actin cytoskeleton of *Papaver* pollen. *Annals of Botany* **108**: 659-675.
- **Puerta AR, Ushijima K, Koba T, Sassa H.** (2009) Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1309-1318.
- **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.
- **Qu HY, Shang ZL, Zhang SL, Liu LM, Wu JY** (2007) Identification of hyperpolarization-activated calcium channels in apical pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*. *New Phytologist* **174**: 524-536.
- **Raspé O, Kohn JR** (2007) Population structure at the S-locus of *Sorbus aucuparia*. *Molecular Ecology* **16**: 1315-1325.
- **Rea AC, Nasrallah JB.** (2008) Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. *International Journal of Developmental Biology* **52**: 627-636.

- **Read SM, Clarke AE, Bacic A** (1993) Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W38 pollen tubes by poly(ethylene glycol) and Cu(II) salts. *Protoplasma* **177**: 1-14.
- **Reape TJ, Molony EM, McCabe PF** (2008) Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany* **59** (3): 435-444.
- **Richman A, Kao T-h, Schaeffer SW, Uyenoyama MK** (1995) S-allele sequence diversity in natural populations of *Solanum carolinense* (Horsenettle). *Heredity* **75**: 405-415.
- **Richman AD, Uyenoyama MK, Kohn JR** (1996) S-allele diversity in a natural population of *Physalis crassifolia* (Solanaceae) (ground cherry) assessed by RT-PCR. *Heredity* **76**: 497-505.
- **Richman AD** (2000). S-allele diversity in *Lycium andersonii*: implications for the evolution of S-allele age in the Solanaceae. *Annals of Botany* **85**: 241-245.
- **Richman AD, Kohn JR** (1999) Self-incompatibility alleles from *Physalis*: Implications for historical inference from balanced genetic polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 168-172.
- **Richman A, Kohn JR** (2000) Evolutionary genetics of self-incompatibility in the Solanaceae. *Plant Molecular Biology* **42**: 169-179.
- **Roiz L, Smirnov P, Bar-Eli M, Schwartz B, Shoseyov O** (2006) ACTIBIND, an actin-binding fungal T2-RNase with antiangiogenic and anticarcinogenic characteristics. *Cancer* **106**: 2295-2308.
- **Rojas HJ, Roldán JA, Goldraij A** (2013) NnSR1, a class III non S-RNase constitutively expressed in styles, is induced in roots and stems to cope with phosphate starvation in *Nicotiana glauca*. *Annals of Botany*. En revision.
- **Roldán JA, Quiroga R, Goldraij A** (2010) Molecular and genetic characterization of novel S-RNases from a natural population of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Reports* **29**: 735-746.
- **Roldán JA, Rojas HJ, Goldraij A** (2012) Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the in vivo self-incompatibility response in *Nicotiana glauca*. *Annals of Botany* **110** (4): 787-795.
- **Ronquist F, Huelsenbeck JP** (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.

- **Royo J, Kunz C, Kowyama Y, Anderson MA, Clarke AE, Newbigin E** (1994) Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proceedings National Academy of Sciences USA* **91**: 6511-6514.
- **Rudd JJ, Osman K, Franklin FCH, Franklin-Tong VE** (2003) Activation of a putative MAP kinase in pollen is stimulated by the self-incompatibility (SI) response. *FEBS Letters* **547**: 223-227.
- **Samaj J, Müller J, Beck M, Böhm N, Menzel D** (2006) Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science* **11**: 594-600.
- **Samuel MA, Chong YT, Haasen KE, Aldea-Brydges MG, Stone SL, Goring DR** (2009) Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *The Plant Cell* **21(9)**: 2655-2671.
- **Savage AE, Miller JS** (2006) Gametophytic self-incompatibility in *Lycium parishii* (Solanaceae): allelic diversity, genealogical structure and patterns of molecular evolution. *Heredity* **96**: 434-444.
- **Schopfer CR, Nasrallah ME, Nasrallah JB** (1999) The male determinant of self- incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**:1697–700.
- **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 AG, Huang S, Kao TH** (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase mediated Self-incompatibility. *Nature* **429**: 302-305.
- **Smertenko A, Franklin-Tong VE** (2011) Organisation and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1263-1270.
- **Snowman BN, Kovar DR, Shevchenko G, Franklin-Tong VE, Staiger CJ** (2002) Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response. *The Plant Cell* **14**: 2613-2626.
- **Staiger CJ, Yuan M, Valenta R, Shaw PJ, Warn RM, Lloyd CW.** (1994) Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Current Biology* **4**: 215-219.

- **Staiger CJ** (2000) Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 257-288.
- **Staiger CJ, Franklin-Tong VE** (2003) The actin cytoskeleton is a target of the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. *Journal of Experimental Botany* **54**: 103-113.
- **Staiger CJ, Poulter NS, Henty JL, Franklin-Tong VE, Blanchoin L** (2010) Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1969-1986.
- **Stamatakis A** (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688-2690.
- **Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J** (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RaxML web servers. *Systematic Biology* **57**: 758-771.
- **Stone SL, Arnold M, Goring DR** (1999) A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **286**: 1729-1731.
- **Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR** (2003) ARC1 Is an E3 Ubiquitin Ligase and Promotes the Ubiquitination of Proteins during the Rejection of Self-Incompatible *Brassica* Pollen. *The Plant Cell* **15**: 885-898.
- **Stone JL, Pierce S** (2005) Rapid recent radiation of S-RNase lineages in *Witheringia solanaceae* (Solanaceae). *Heredity* **94**: 547-555.
- **Stone JL, Sasuclark MA, Blomberg C** (2006) Variation in the self-incompatibility response within and among populations of the tropical shrub *Witheringia solanaceae* (Solanaceae). *American Journal of Botany* **93**: 592-598.
- **Takahata N** (2001) Genealogy of neutral genes and spreading of selected mutations in a geographically structured population. *Genetics* **129**: 585-595.
- **Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F-S, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A** (2000) The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 1920-1925.
- **Takayama S, Shimosato H, Shiba H, Funato M, Che FS, Watanabe M, Iwano M, Isogai A** (2001) Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature* **413**: 534-538.

- **Takayama S, Isogai A** (2005) Self-Incompatibility in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 467-489.
- **Tarutani Y, Shiba H, Iwano M, Kakizaki T, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Takayama S** (2010) Trans-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature* **466**: 983-986.
- **Thomas SG, Franklin-Tong VE** (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen. *Nature* **429**: 305-309.
- **Thomas SG, Huang S, Li S, Satiger CJ, Franklin-Tong VE.** (2006) Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen. *Journal of Cell Biology* **174**: 221-229.
- **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmouguin F, Higgins DG** (1997) The ClustalX window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.
- **Thompson DM, Parker R** (2009) The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **185**: 43-50.
- **Tsai D-S, Lee H-S, Post LC, Kreiling KM, Kao TH** (1992) Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sexual Plant Reproduction* **5**: 256-263.
- **Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka R, HashimotoG, Marchesi E, Kao T-h** (1998) Differentiation in the status of self- incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* **49**: 115-133.
- **Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Masada M, Zhu X, Marchesi E, Kao T-h** (1999) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. *Sexual Plant Reproduction* **12**: 6-13.
- **Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Sato T, Masada M, Marchesi E, Kao T-h** (2003a) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by a modifier locus that suppresses the expression of an S-RNase gene. *Sexual Plant Reproduction* **15**: 255-263.
- **Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun H, Marchesi E, Kao T-h** (2003b) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiology* **131**: 1903-1912.

- **Tsukamoto T, Potter V, Tao R, Vieira CP, Vieira J, Iezzoni AF** (2008) Genetic and molecular characterization of three novel S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Journal of Experimental Botany* **59**: 3169-3185.
- **Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H** (2003) Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell* **15**: 771-781.
- **Uyenoyama MK, Zhang Y, Newbigin E** (2001) On the origin of self-incompatibility haplotypes: transition through self-compatible intermediates. *Genetics* **157**: 1805-1817.
- **Vidali L, McKenna ST, Hepler PK** (2001) Actin polymerization is essential for pollen tube growth. *Molecular Biology of the Cell* **12**: 2534-2545.
- **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.
- **Wang HY, Xue YB** (2005) Subcellular localization of the S locus F-box protein AhSLF-S<sub>2</sub> in pollen and pollen tubes of self-incompatible *Antirrhinum*. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**: 76-83.
- **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 CL, Xu GH, Jiang XT, Chen G, Wu J, Wu HQ, Zhang SL** (2009) S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia* *in vitro* *The Plant Journal* **57**: 220-229.
- **Wang CL, Wu J, Xu GH, Gao YB, Chen G, Wu JI, Wu HQ, Zhang SL** (2010) S-RNase disrupts tip-localized reactive oxygen species and induces nuclear DNA degradation in incompatible pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*. *Journal of Cell Science* **123**: 4301-4309.
- **Wang CL, Zhang SL** (2011) A cascade signal pathway occurs in self-incompatibility of *Pyrus pyrifolia*. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 420-421.
- **Watanabe M, Suwabe K, Suzuki G** (2012) Molecular genetics, physiology and biology of self-incompatibility in Brassicaceae. *Proceedings of the Japan Academy - Series B: Physical & Biological Sciences* **88(10)**:519-535.

- **Wheeler D, Newbigin 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**: 2171-2180.
- **Wheeler MJ, de Graaf BH, Hadjosif N, Perry RM, Poulter NS, Osman K, Vatovec S, Harper A, Franklin FC, Franklin-Tong VE** (2009) Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature* **459** (7249): 992-995.
- **Wheeler MJ, Vatovec S, Franklin-Tong VE** (2010) The pollen S-determinant in *Papaver*: comparisons with known plant receptors and protein ligand partners. *Journal of Experimental Botany* **61** (7): 2015-2025.
- **Wilkins KA, Bancroft J, Bosch M, Ings J, Smirnoff N, Franklin-Tong VE.** (2011) Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of *Papaver*. *Plant Physiology* **156**: 404-416.
- **Wilson KL, Lovy-Wheeler A, Voigt B, Menzel D, Kunkel JG, Hepler PK** (2006) Imaging the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Sexual Plant Reproduction* **19**: 51-62.
- **Yang KY, Liu YD, Zhang SQ** (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 741-746.
- **Zárský V, Cvrcková F, Potocký M, Hála M** (2009) Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *New Phytologist* **183**(2): 255-72.
- **Zhang SL, Hiratsuka S** (1999) Variations in S-protein levels in styles of Japanese pears and the expression of self-incompatibility. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **68**: 911-918.
- **Zhang Y, Zhao Z, Xue Y** (2009) Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 21-42.
- **Zhang Y, He J, Lee D, McCormick S** (2010) Interdependence of endomembrane trafficking and actin dynamics during polarized growth of *Arabidopsis* pollen tubes. *Plant Physiology* **152**: 2200-2210.
- **Zhou J, Wang F, Ma W, Zhang Y, Han B, Xue Y** (2003) Structural and transcriptional analysis of S-locus F-box (SLF) genes in *Antirrhinum*. *Sexual Plant Reproduction* **16**: 165-177.
- **Zonia L, Munnik T** (2008) Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. *Journal of Experimental Botany* **59**: 861-873.

- **Zurek D, Mou B, Beecher B, McClure BA** (1997) Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana glauca* disrupts pollen recognition. *The Plant Journal* **11**: 797-808.