

EVITANDO EL INCESTO EN LAS PLANTAS: CONTROL GENÉTICO Y BIOQUÍMICO

Liliana E. García-Valencia, Carlos E. Bravo-Alberto
y Felipe Cruz-García*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. C.P. 04510, Deleg. Coyoacán, México, D.F. E-mail:* fcg@unam.mx

RESUMEN

Para evitar la endogamia muchas plantas con flores hermafroditas evolucionaron con un mecanismo para reconocer y rechazar su propio polen y que se conoce como sistema de autoincompatibilidad (AI). En muchos casos la AI está controlada genéticamente por un solo locus altamente polimórfico, conocido como locus *S*. Esta región del DNA incluye dos unidades transcripcionales fuertemente ligadas. Una de ellas codifica la determinante femenina (expresada en el pistilo) y la otra a la determinante masculina (expresada en el polen). En esta revisión se discuten los principales avances en el mecanismo de AI gametofítica dependiente de S-RNasas, el cual está presente en Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae. En estas familias, la determinante femenina codifica una ribonucleasa (S-RNasa) y la determinante masculina una proteína con caja F (SLF/SFB). Además, se describe la participación de genes modificadores no codificados en el locus *S* y que son esenciales en la AI, así como la posible función de sus productos en el mecanismo de rechazo del polen. Finalmente, proponemos un modelo que incluye los principales sucesos descritos a la fecha.

Palabras Clave: Genes modificadores, *Nicotiana*, rechazo del polen, sistemas de autoincompatibilidad, SLF, S-RNasa.

ABSTRACT

To avoid endogamy many flowering plants evolved a mechanism to recognize and reject their self-pollen, which is known as self-incompatibility (SI) system. In many cases the SI is genetically controlled by a single and highly polymorphic locus known as the *S*-locus. This DNA region carries two tightly linked transcriptional units. One of them encodes the female determinant (pistil expressed) and the second one the male determinant (pollen expressed). In this review, we discuss the most relevant advances in the SI mechanism in S-RNase based systems, which are present in Solanaceae, Rosaceae and Plantaginaceae. In these families, the female determinant encodes a ribonuclease named S-RNase and the male determinant encodes a protein called SLF/SFB (*S*-locus F-Box). We finally describe the role of the modifier genes, not coded by *S*-locus, in the pollen rejection response and propose a model including the main events so far described.

Key Words: Modifiers genes, *Nicotiana*, pollen rejection, self-incompatibility systems, SLF, S-RNase.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la reproducción sexual fue un gran salto en la evolución y representó que las mutaciones al azar no fueran la única fuente de variabilidad genética. Sin embargo, este tipo de reproducción trajo consigo las siguientes paradojas: Cómo evitar la reproducción con individuos genéticamente relacionados para no acumular los

efectos deletéreos de la endogamia y, por otro lado, cómo evitar la reproducción inter-especie para no generar individuos estériles. En el caso de los animales, lo han resuelto por su capacidad de seleccionar parejas a través del olfato, la visión, el tacto, etc. y de conductas que estimulan el apareamiento con parejas genéticamente diferentes¹. En las plantas se carece de estas posibilidades y estrategias de selección de parejas lo que junto con la condición de hermafroditismo (flores que contienen las estructuras reproductivas femeninas (pistilo) y masculinas (estambres) (Figura 1) aumenta la probabilidad de la

Nota: Artículo recibido el 14 de enero de 2013 y aceptado el 14 de abril de 2013.

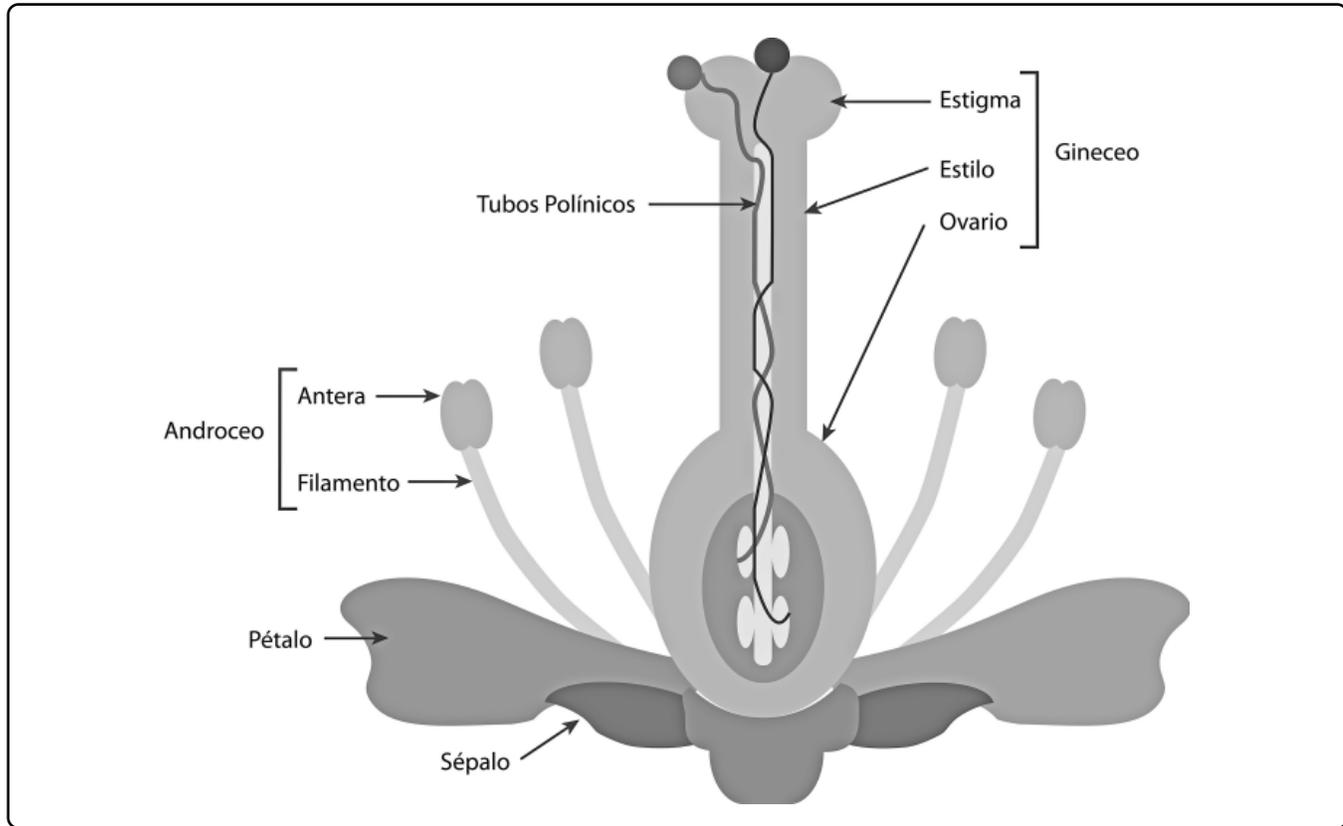


Figura 1. La flor con sus diferentes órganos. Las flechas indican los pétalos, sépalos, pistilo o gineceo (compuesto por estigma, estilo y ovario) y los estambres o androceo (compuestos por anteras y filamentos). En esta imagen también se observa el crecimiento de tubos polínicos a través del estilo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

autopolinización y la autofecundación y, por lo tanto, de endogamia².

Charles Darwin, realizó estudios para explicar por qué la reproducción cruzada prevalece en la naturaleza. Los experimentos que Darwin realizó en 57 especies de plantas que se autopolinizan y en aquellas que no, confirman la hipótesis de que la autopolinización es perjudicial para la progenie producida, debido a que se presenta una disminución del vigor y de la fertilidad en la mayoría de las especies estudiadas³.

Para promover la polinización cruzada varias especies de plantas desarrollaron adaptaciones morfológicas, como la separación espacial de los pistilos y estambres (hercogamia) y adaptaciones fisiológicas como la maduración diferencial de los órganos reproductivos (dicogamia). Sin embargo, estas barreras no son del todo eficientes, porque la restricción del flujo de polen entre individuos relacionados genéticamente es limitada. Para sobreponerse a este problema, algunas especies desarrollaron un mecanismo genético de reconocimiento del polen propio, conocido como autoincompatibilidad (AI), definida como la incapacidad de una

planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización².

La AI está controlada por el locus *S* que es multialélico y que determina la especificidad del reconocimiento del polen. En el locus *S* se encuentran al menos dos genes estrechamente ligados, uno de ellos es expresado en el polen (determinante masculina) y otro es expresado en el pistilo (determinante femenina). Los productos de estos genes interaccionan para determinar si el polen es compatible o incompatible².

El locus *S* se ha ubicado cerca del centrómero y la muy cercana proximidad de las dos determinantes evita la recombinación entre ambos genes, lo que da como resultado su herencia como una unidad mendeliana, conocida como haplotipo *S*⁴. El número de alelos *S* presentes en una población puede ser muy grande y variar de especie a especie⁵.

La AI puede ser clasificada en dos tipos: gametofítica y esporofítica. La mayor parte de las familias de interés comercial tienen un sistema de AI gametofítico (Solanaceae, Plantaginaceae, Rosaceae y Papaveraceae). Este tipo de control

genético es llamado así porque el fenotipo *S* del polen está determinado por su genotipo haploide. El polen es rechazado cuando el haplotipo *S* del polen coincide con alguno de los dos haplotipos *S* del pistilo en un heterocigoto, en caso contrario el polen es aceptado (Figura 2A)⁶.

En el sistema de AI esporofítico (mayormente estudiado en Brassicaceae) el fenotipo *S* del polen está determinado por el genotipo diploide (esporofito) de la antera donde se desarrolló (Figura 2B)⁷.

Estudios recientes han generado importantes hallazgos a nuestro entendimiento del mecanismo molecular de la AI en algunas especies⁸⁻¹¹. Esta revisión explorará los hechos más relevantes del sistema de AI gametofítico dependiente de las S-RNasas, en las familias Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae.

¿Quiénes son los responsables de la AI dependiente de S-RNasas?

Determinante femenina (S-RNasa)

En 1981 Bredimeijer y Blaas identificaron glicoproteínas específicas del pistilo que cosegregaban con un haplotipo *S* en

*Nicotiana alata*¹². Estas proteínas mostraron actividad de ribonucleasa, por lo que fueron nombradas S-RNasas¹³.

Experimentos de pérdida y ganancia de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* y *Petunia* demostraron que las S-RNasas determinan la respuesta de AI en el pistilo¹⁴⁻¹⁶. Por ejemplo, la transformación de los híbridos de *N. langsdorffii* x *N. alata* $S_{105}S_{105}$ que expresan los transgenes que codifican a la S_2 -RNasa o a la S_{C10} -RNasa, rechazan el polen S_{A2} o S_{C10} , un fenotipo que las plantas sin transformar no presentan^{16,17}.

Las S-RNasas son proteínas altamente divergentes, tienen un rango de similitud de secuencia de 38-98%. A pesar de esta amplia diversidad en su secuencia, estas ribonucleasas contienen cinco regiones conservadas (C1-C5) y dos dominios hipervariables (HVa y HVb). Las regiones C2 y C3 comparten un alto grado de similitud con las correspondientes regiones de la RNasa T2 y de otras RNasas. En estas regiones se encuentran dos histidinas conservadas (His32 e His90)¹⁸. Para demostrar que estas His participan en la catálisis, fueron reemplazadas por mutagénesis dirigida, lo que provocó que las plantas transgénicas con esta S-RNasa mutada fueran incapaces de rechazar su

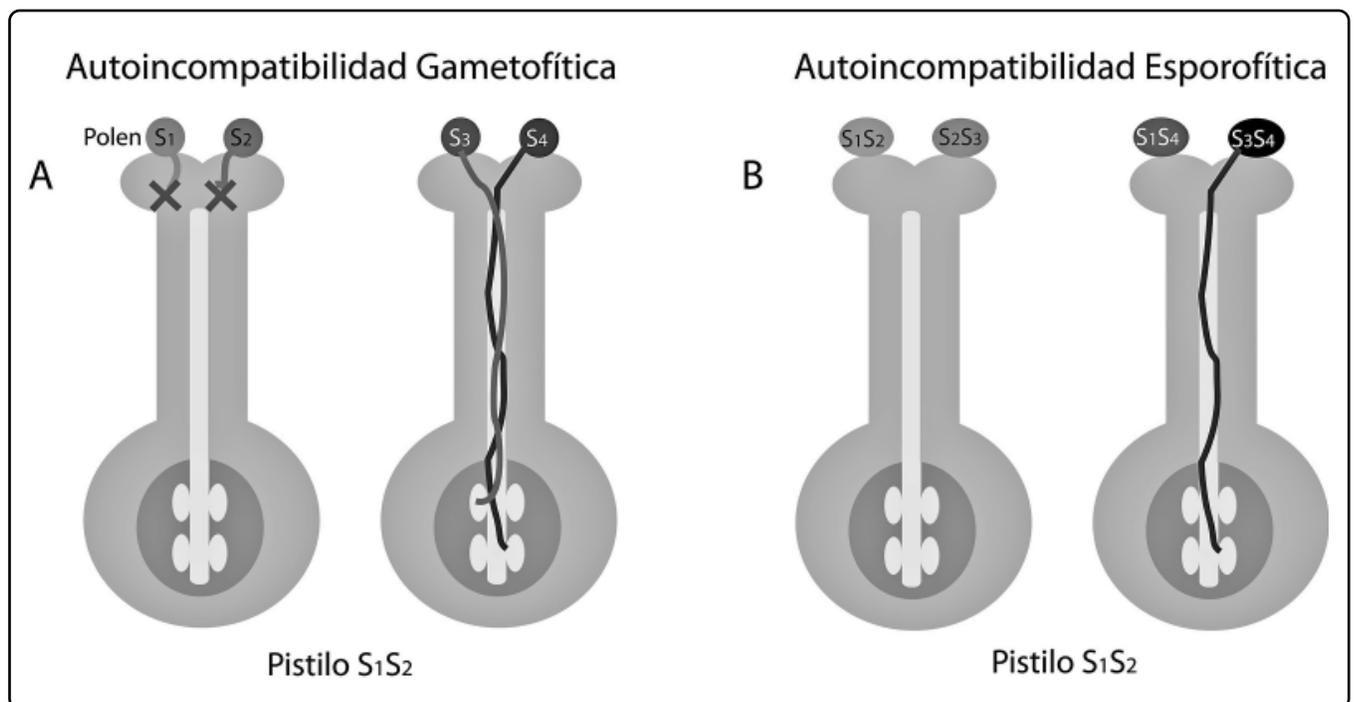


Figura 2. A) Rechazo del polen en sistemas de AI gametofítica (AIG). La AIG es determinada por el haplotipo *S* del genoma haploide del polen, el polen que tenga los haplotipos S_1 o S_2 serán rechazados (izquierda), mientras que el polen S_3 podrá ser germinado y aceptado para fertilizar la planta S_1S_2 (derecha). El polen incompatible usualmente germina pero su crecimiento es inhibido en el estilo. B) Rechazo del polen en el sistema de AI esporofítica (AIE). La AIE es determinada por el haplotipo *S* del genotipo diploide, en este caso S_1S_2 , S_2S_3 , S_3S_4 y S_1S_4 . El polen será rechazado en la superficie del estigma, si algunas de las dos proteínas *S* en la cubierta coinciden con una de las proteínas *S* expresadas en el pistilo (S_1S_2) como se observa a la izquierda. Si no existe coincidencia alélica de ninguna proteína *S* de la cubierta (derecha), el polen podrá germinar y ser aceptado para fecundar al óvulo.

propio polen, debido a la incapacidad de la S-RNasa para degradar el RNA del tubo polínico (TP). Ésta fue una evidencia sólida de que la actividad de la ribonucleasa era necesaria en la respuesta de AI¹⁴.

Hasta el momento, se conoce que las S-RNasas entran al TP tanto en cruza compatibles como incompatibles y son almacenadas en una de sus vacuolas. En cruza incompatibles, se observa la ruptura de la vacuola liberando a las S-RNasas al citoplasma del TP, donde degradan su RNA e inhiben su crecimiento. Por otro lado, en una cruce compatible la vacuola con las S-RNasas se mantiene estable¹⁹ permitiéndole al TP alcanzar el ovario.

Determinante masculina (SLF/SFB)

Estudios moleculares recientes revelaron que la determinante masculina del locus *S* en sistemas de AI basados en S-RNasa es SLF (*S*-Locus F box) en Solanaceae y Plantaginaceae y SFB en Rosaceae²⁰. Experimentos de ganancia de función en Plantaginaceae y Solanaceae demostraron que el gen *SLF* determina la respuesta de AI en el polen^{21,22}.

SLF es un gen de aproximadamente 1,4 kb que es expresado únicamente en la antera y en los granos de polen, y su expresión es haplotipo *S* específica. *SLF* codifica una proteína que contiene un dominio con una caja F en su extremo amino terminal²², al igual que dos dominios variables (Va y Vb) y dos dominios hipervariables (HVa y HVb) hacia el extremo carboxilo terminal^{23,24}.

La mayoría de las proteínas con caja F, están involucradas en la degradación de proteínas mediada por ubiquitilación y el proteosoma 26S. Las proteínas con caja F usualmente funcionan como un adaptador que une a proteínas sustrato específico al complejo SCF-E3, es por ello que se asume que SLF podría participar en un complejo SCF (SKP1/Culina/Caja F)^{25,26}.

Mediante ensayos de doble híbrido en levadura, se encontró que SLF de *Arthrinium hispanicum* interacciona con una proteína homóloga de SKP1, denominado SSK1 (SLF-interacting SKP1 like-1)²⁷.

Con base en ensayos *in vitro* y de doble híbrido en levaduras, se determinó que las interacciones físicas entre la S-RNasa y SLF con un haplotipo *S* diferente eran más fuertes que las interacciones entre la S-RNasa y SLF con un haplotipo *S* idéntico²⁸. Estos datos permiten suponer que en una cruce compatible SLF podría interaccionar con alta afinidad con las S-RNasas no específicas y mediar su degradación mediante ubiquitilación y el proteosoma 26S, mientras que en una cruce incompatible la interacción *S* específica entre SLF y la S-RNasa sería más débil y, por lo tanto, no ocurriría la ubiquitilación²⁸. Aunque también existe la posibilidad de que tanto las S-RNasas *S* específicas como las no *S* específicas podrían ser ubiquitiladas, pero con diferentes

grados (mono y poliubiquitilación) y de esta manera ser transportadas a diferentes destinos²⁵.

Mediante estudios de inmunocitoquímica se detectó la localización de SLF en el citoplasma del TP y en la periferia del retículo endoplásmico²⁹. Diferentes experimentos han demostrado que la cara citosólica de las membranas del retículo endoplásmico es el mayor sitio de degradación proteosomal, lo cual concuerda con el modelo propuesto de ubiquitilación de las S-RNasas³⁰.

La limitada diversidad alélica de SLF (aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos) comparada con la de las S-RNasas es incongruente, ya que la cercanía de estos genes en el locus *S* y su inexistente recombinación, hace suponer que ambos genes deberían tener tasas de mutación similares, para que SLF pudiera reconocer un gran repertorio de S-RNasas altamente divergente en el TP. Sin embargo, en especies AI de Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae se ha observado que en el loci *S*, existe una sola copia del gen de la S-RNasa y múltiples genes tipo *SLF*. Trabajos realizados en *Petunia inflata* demuestran que hay varios genes tipo *SLF* ligados al locus *S* y cada una de estas variantes, podría interactuar con un subconjunto específico de S-RNasas con diferente haplotipo *S*, compensando así la poca diversidad genética de la determinante masculina con respecto a la de las S-RNasas³¹. De esta manera, las isoformas de SLF actuarían de una manera colaborativa para contender contra diferentes S-RNasas.

¿Más genes involucrados?

La interacción *S* específica entre la S-RNasa y SLF determina, por definición, el rechazo o la aceptación del polen. Sin embargo, se han encontrado otros genes no ligados al locus *S* y que son esenciales en el mecanismo de la AI, los cuales son conocidos como genes modificadores (GM). Los GM se clasifican en tres grupos^{32,33}:

El grupo I que está integrado por genes cuyos productos afectan directamente la expresión de las determinantes de especificidad (*S-RNasa* y *SLF*).

El grupo II está compuesto por factores que interaccionan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad sin afectar su expresión. Por lo tanto, son factores que se requieren específicamente para el rechazo del polen. Un ejemplo de GM pertenecientes a este grupo son *HT-B* (*High Top-Band*), *120K* y *NaStEP* (*N. alata Stigma Expressed Protein*)³⁴⁻³⁶.

El grupo III incluye genes que participan tanto en la respuesta de AI como en procesos generales durante la polinización y en la interacción polen-pistilo. En este grupo podrían clasificarse a las proteínas TTS, PELPIII, NaTrxh, SBP1 y NaPEPII^{37-40,28} (Bravo-Alberto y Cruz-García, no publicado).

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

HT-B

Fue identificado por su expresión preferencial en estilos de *N. alata* (especie AI) pero no en aquéllos de *N. plumbaginifolia* (especie autocompatible)³⁴.

HT-B es una proteína de 8.6 kDa, con un dominio constituido de 20 residuos de asparagina y ácido aspártico hacia el extremo carboxilo⁴¹. HT-B únicamente es expresada en pistilos maduros de plantas AI y se ha descrito en tres géneros de la familia Solanaceae: *Solanum*, *Nicotiana* y *Petunia*^{34,39,42,43}.

Experimentos de inmunolocalización en *Nicotiana* muestran que *HT-B* ingresa tanto a los TPs compatibles como incompatibles, pero que en las cruza compatibles esta proteína es degradada en el interior del TP¹⁹.

Experimentos para suprimir la expresión de *HT-B* mostraron que las plantas transgénicas de *Solanum*, *Nicotiana* y *Petunia*^{34,39,42-44} fueron incapaces de rechazar su propio polen.

Asimismo, Kondo *et al.* (2002), determinaron que aunque el gen *HT-B* también está presente en especies autocompatibles, su secuencia contiene codones de paro prematuros, por lo que no es posible generar una proteína funcional.

120K

120K es una arabinogalactoproteína de 120 kDa, es por ello que se conoce así, se localiza en el pistilo de especies autocompatibles e incompatibles de *Nicotiana*³⁵.

La función de 120K fue probada mediante su supresión por RNAi (RNA interferente). El fenotipo observado en las plantas transgénicas fue la incapacidad de rechazar el polen con el mismo haplotipo *S* que el pistilo receptor, poniendo de manifiesto la participación de 120K en la AI³⁵.

Mediante estudios de inmunolocalización se determinó que 120K, al igual que la S-RNasa, se incorpora desde la matriz extracelular del estilo a las vacuolas de los TPs en crecimiento, tanto en cruza compatibles como incompatibles¹⁹.

NaStEP

NaStEP se expresa única y abundantemente en estigmas maduros de diferentes especies incompatibles de *Nicotiana*⁴⁵. NaStEP es una proteína que pertenece a los inhibidores de proteasa tipo Kunitz, los cuales forman parte de la familia de inhibidores de tripsina⁴⁶. En congruencia con esto, recientemente se encontró que NaStEP en efecto es un inhibidor de proteasas, ya que es capaz de inhibir la actividad de la proteasa subtilisina³⁶; sin

embargo, se desconoce con certeza si es la actividad de inhibidor de proteasas la que participa en el mecanismo del rechazo del polen.

La proteína NaStEP es almacenada en las vacuolas de las células del estigma, de donde es liberada cuando los estigmas son polinizados⁴⁵. Una vez que NaStEP se encuentra en el exudado estigmático, esta proteína entra a los TPs no importando su haplotipo *S*³⁶.

Experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana* demostraron que cuando *NaStEP* se encuentra silenciado por un RNAi, se pierde la capacidad de reconocer y rechazar el polen con el mismo haplotipo *S* que el pistilo, lo que indica claramente que *NaStEP* es un gen estigmático esencial en el rechazo del polen en *Nicotiana*³⁶.

Un fenómeno interesante que sucede en un entorno genético con *NaStEP* silenciado, es que la proteína HT-B se degrada en los TPs incompatibles y compatibles³⁶, un hecho contrario a lo que ocurre en plantas silvestres AI de *N. alata*, donde HT-B sólo es degradada en los TPs de cruza compatibles¹⁹. Este dato es relevante, ya que permite proponer a NaStEP como un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en la respuesta de AI en *Nicotiana*.

Interacciones entre proteínas involucradas en el mecanismo de AI

El mecanismo de la AI puede ser considerado un rompecabezas, en el cual aún faltan muchas piezas por descubrir, es por ello que se han buscado las proteínas que pueden interactuar con los actores hasta ahora conocidos como las determinantes (S-RNasa y SLF) y los genes modificadores estilares (HT-B, NaStEP y 120K). A pesar de que se han encontrado diversas interacciones físicas entre las proteínas involucradas en el mecanismo de AI, se desconoce el papel que estos complejos moleculares puedan jugar en el mecanismo de rechazo o aceptación del polen. En la Tabla I se muestran los complejos proteicos que se han descrito a la fecha mediante pull-down, por ensayos de doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae* o por co-inmunoprecipitación. La formación de tres de estos complejos ocurre entre proteínas estilares (por ejemplo: NaStEP-HT-B y S-RNasa-120K-PELP III), entre proteínas del polen (por ejemplo: SLF-SSK1; SLF-SBP1), entre proteínas del estilo y del polen (por ejemplo: S-RNasa-SLF, S-RNasa-SBP1, 120K-NaPCCP). Aunque la funcionalidad de estos complejos no se ha demostrado *in planta* mediante experimentos de pérdida o ganancia de función, garantizan estudios futuros para determinar su función en la respuesta del rechazo del polen y el orden en que éstos actúan.

Como se puede deducir de la Tabla I, se conocen ya varios de los componentes involucrados en la AI dependiente de S-RNasas; sin embargo, existen evidencias genéticas y bioquímicas que indican que en el mecanismo molecular del

Proteína anzuelo	Proteína con la que interactúa	Función de la proteína interactora	Referencia
S-RNasa	SLF ^{a,b,c}	Determinante masculina	Qiao <i>et al.</i> , 2004 ²¹ Hua y Kao, 2006 ²⁸
	SBP1 ^{a,b} (S-RNasa Binding Protein 1)	Posible componente del complejo E3 ligasa	Hua y Kao, 2006 ²⁸ Hua <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁹
	120K ^{b,c}	Gen modificador	Cruz-García <i>et al.</i> , 2005 ⁴⁷
	TTS ^{b,c}	Incrementa el crecimiento del TP	Cruz-García <i>et al.</i> , 2005 ⁴⁷
	PELPIII ^{b,c} (proteína tipo extensina)	Desconocida	Cruz-García <i>et al.</i> , 2005 ⁴⁷
	PGPS/D3 ^{b,c}	Desconocida	Guo <i>et al.</i> , 2006 ⁴⁸
SLF	S-RNasa ^{a,b,c}	Determinante femenina	Qiao <i>et al.</i> , 2004 ²¹ Hua y Kao, 2006 ²⁸
	SSK1 ^{a,b}	Adaptador que une a SLF y una proteína tipo Culina-1	Huang <i>et al.</i> , 2006 ²⁷
	SBP ^{a,b}	Posible componente del complejo E3 ligasa	Hua y Kao, 2006 ²⁸
120K	S-RNasa ^{b,c}	Determinante femenina	Cruz-García <i>et al.</i> , 2005 ⁴⁷
	SBP1 ^b	Posible componente del complejo E3 ligasa	Hua y Kao, 2006 ²⁸ Hua <i>et al.</i> , 2008 ⁴⁹
	NaPCCP ^b	Posible transporte de arabinogalactoproteínas	Lee <i>et al.</i> , 2008 ⁵⁰
HT-B	NaStEP ^a	Gen modificador	García-Valencia y Cruz-García, no publicado

Interacciones físicas demostradas por ensayos de doble híbrido en *S. cerevisiae*^(a), por *pull-down*^(b), o por co-inmunoprecipitación^(c), respectivamente.

Tabla 1. Interacciones físicas entre proteínas involucradas en la AI dependiente de S-RNasas.

rechazo del polen hay otros actores, cuya contribución es esencial en la AI. Es por ello que en nuestro grupo de investigación nos hemos dado a la tarea de identificar nuevos GM tanto del pistilo como del polen, hasta el momento hemos identificado tres genes (*NaPEPII*, *NaSIPP* y *NaP11*) con un alto potencial de participar en el rechazo del polen. Para evaluar si estos genes son esenciales para el rechazo del polen en *N. alata* se están realizando experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana*.

Modelo de rechazo del polen

El siguiente modelo del mecanismo del rechazo del polen trata de incorporar a las determinantes de especificidad y a los GM, que se sabe por experimentos de pérdida de función, son esenciales en el rechazo del polen en solanáceas.

En este modelo (Figura 3) se propone que una vez que los granos de polen llegan al estigma estos germinan sin importar su haplotipo *S*, y sus TPs se dirigen al ovario a través del tejido de transmisión del estilo. Durante esta jornada los TPs van incorporando a su citoplasma, probablemente por endocitosis, proteínas como la S-RNasa, 120K, HT-B, y NaStEP^{19,36}. Algunas

proteínas como las S-RNasas y 120K son compartimentalizadas en una de las vacuolas de los TPs¹⁹.

Por definición la interacción *S* específica entre la S-RNasa (determinante femenina) y SLF (determinante masculina) desencadena la cascada bioquímica que conduce al rechazo o aceptación del polen.

Además, se propone que la interacción *S* específica entre la S-RNasa y SLF en una cruce incompatible estabiliza a la proteína HT-B, la que directa o indirectamente ocasionaría la liberación masiva de las S-RNasas al citoplasma del TP, por una ruptura de la vacuola que las contiene, lo cual es precedido por desorganización de los filamentos de actina⁵¹. Una vez en el citoplasma del TP las S-RNasas actúan como citotoxinas degradando su RNA y ocasionando eventualmente su muerte. Por lo contrario, en una cruce compatible, HT-B es degradada en el TP y la vacuola con las S-RNasas permanece intacta permitiendo que el TP alcance el ovario¹⁹. Bajo este escenario, la proteína NaStEP juega un papel muy importante protegiendo la degradación prematura de HT-B en el TP, ya que esta incorpora al TP una vez que los granos de polen han germinado en el

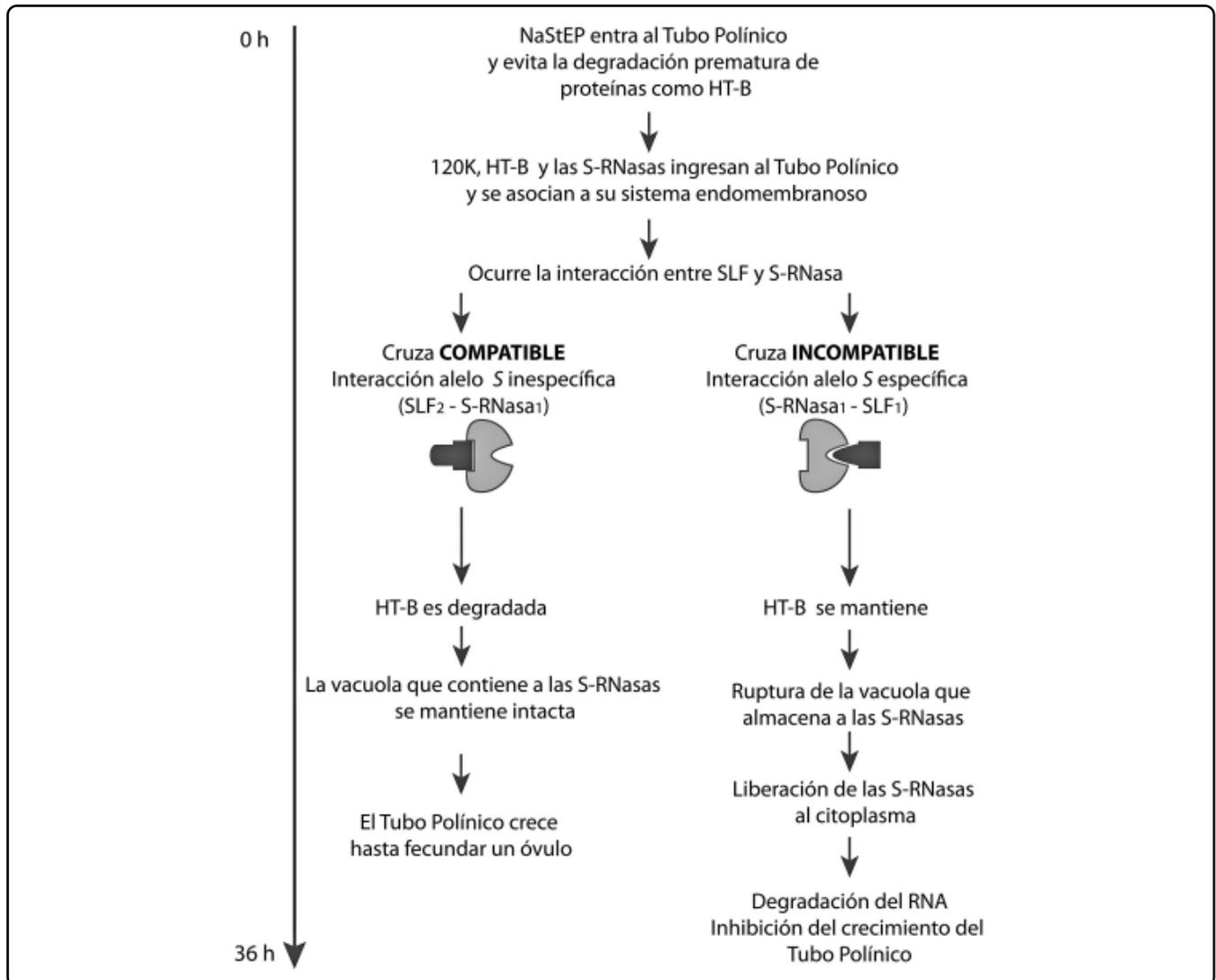


Figura 3. Modelo del mecanismo de rechazo del polen propio basado en S-RNasa. Se indica en una línea de tiempo, de 0 a 36 horas posteriores a la polinización, los diferentes eventos que han sido demostrados tanto en polinizaciones compatibles como en incompatibles.

estigma, en plantas transgénicas de *Nicotiana* que no acumulan a NaStEP, la proteína HT-B es degradada en el TP tanto en cruza compatibles e incompatibles, ocasionando que los TP alcancen los ovarios en ambos tipos de cruza³⁶.

PERSPECTIVAS

A pesar de los importantes avances que se han logrado en el estudio de la AI en sistemas basados en S-RNasa, es evidente que aún existen varias preguntas por responder como: ¿SLF ubiquitila diferencialmente a las S-RNasas o se auto-ubiquitila para su degradación por el proteosoma 26S?, ¿qué otras proteínas participan en el mecanismo bioquímico del rechazo del polen?, ¿cómo se degrada o estabiliza la proteína HT-B en el TP?, ¿cuáles son las señales que promueven la liberación de las S-RNasas del

compartimento vacuolar?, ¿cómo es que la proteína NaStEP regula la estabilidad de HT-B?, ¿cuál es el mecanismo por el que HT-B afecta la estabilidad de la vacuola que contiene a las S-RNasas?

El entendimiento de la AI pueden proveer una oportunidad sin precedentes para manipular las barreras intra e inter-específicas presentes en las plantas y su futura aplicación en la agricultura.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado parcialmente por DGAPA (IN210312) y el CONACyT (81968). Carlos E. Bravo Alberto y Liliana E. García Valencia son apoyados con una beca de doctorado por el CONACyT.

REFERENCIAS

1. Hunter, P. Me, myself and I. The genetics and molecular biology behind self-incompatibility and the avoidance of inbreeding in plants. *EMBO Rep.* **10**(12), 1297-1300 (2009).
2. De Nettancourt, D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants (Heidelberg Springer, New York, 2001).
3. Darwin, C. The Effect of Cross and Self-fertilization in the Vegetable Kingdom (John Murray, London, 1876).
4. Cruz-García, F. & McClure, B. in Current Trends in the Embryology of Angiosperms (ed. Bhojwani, S.S. & Soh, W.Y.) 167-196 (Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2001).
5. Dickinson, H., Crabbe, M. & Gaude, T. Sporophytic self-incompatibility systems: S gene products. *Int. Rev. Cytol.* **140**, 525-561 (1992).
6. Newbigin, E., Anderson, M. & Clarke, A. Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* **5**, 1315-1324 (1993).
7. Nasrallah, J. & Nasrallah, M. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* **5**, 1325-1335 (1993).
8. Takayama, S. & Isogai, A. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **15**, 467-487 (2005).
9. Franklin-Tong. Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity and mechanism (Heidelberg Springer, Berlin, 2008).
10. McClure, B. Darwin's foundation for investigating self-incompatibility and the progress toward a physiological model for S-RNase-based SI. *J. Exp. Bot.* **60**, 1069-1081 (2009).
11. McClure, B., Cruz-García, F. & Romero, C. Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann. Bot.* **108**(4), 647-658 (2011).
12. Bredimeijer, G. & Blaas, J. S-Specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theor. Appl. Genet.* **59**, 185-190 (1981).
13. McClure, B. *et al.* Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**, 955-957 (1989).
14. Huang, S., Lee, H., Karunanandaa, B. & Kao, T. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* **6**(7), 1021-1028 (1994).
15. Lee, H.S., Huang, S. & Kao, T. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**, 560-563 (1994).
16. Murffet, J., Atherton, T., Mou, B., Gasser, C. & McClure, B. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**, 563-566 (1994).
17. Murffet, J. *et al.* S-RNase and inter-specific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self- incompatible and self-compatible species. *Plant Cell* **8**, 943- 958 (1996).
18. Ioerger, T., Gohlke, J., Xu, B. & Kao, T. Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* **4**, 81-87 (1991).
19. Goldraij, A. *et al.* Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self compatible *Nicotiana glauca*. *Nature* **439**, 805-810 (2006).
20. Ushijima, K. *et al.* The S haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* **39**(4), 573-586 (2004).
21. Qiao, H. *et al.* 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*. *Plant Cell* **16**, 582-595 (2004).
22. Sijacic, P. *et al.* Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self incompatibility. *Nature* **429**, 302- 305 (2004).
23. Ikeda, K. *et al.* Primary structural features of S-haplotype-specific F box protein, SFB, in *Prunus*. *Sex. Plant Reprod.* **16**, 235-243 (2004).
24. Yamame, H. & Tao, R. Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of S-genotyping in Rosaceous fruit trees. *Engei Gakkai Zasshi* **78**, 137-157 (2009).
25. Zhang, Y., Zhao, Z. & Xue, Y. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 21- 42 (2009).
26. Chen, G. *et al.* "A life or death decision" for pollen tubes in S-RNase-based self-incompatibility. *J. Exp. Bot.* **61**(7), 2027-2037 (2010).
27. Huang, J., Zhao, L., Yang, Q. & Xue, Y. AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *Plant J.* **46**, 780-793(2006).
28. Hua, Z. & Kao, T. 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 (2006).
29. Wang, H. & Xue, Y. Subcellular localization of the S locus F-box protein AhSLF-S₂ in pollen and pollen tubes of self-incompatible *Antirrhinum*. *J. Integr. Plant Biol.* **47**, 76-83 (2005).
30. Sommer, T., Jarosch, E. & Lenk, U. Compartment-specific functions of the ubiquitin-proteasome pathway. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **142**, 97-160 (2001).
31. Kubo, K. *et al.* Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based Self-incompatibility. *Science* **330**, 796-799 (2010).
32. McClure, B., Cruz-García, F., Beecher, B. & Sulaman, W. Factors affecting inter and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana glauca*. *Ann. Bot.* **85**, 113-123 (2000).
33. McClure, B. New views of S-RNase-based self-incompatibility. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**(6), 639-646 (2006).
34. McClure, B., Mou, B., Canevascini, S. & Bernatzky, R. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana glauca*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13548-13553 (1999).
35. Hancock, C., Kent, L. & McClure, B. The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana glauca*. *Plant J.* **43**, 716-723 (2005).
36. Jiménez-Durán, K. *et al.* NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of the HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. *Plant Physiol.* **161**, 97-107 (2013).
37. Cheung, A., Wang, H. & Wu, H. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**, 383-393 (1995).
38. De Graaf, B., Knuiman, B., Derksen, J. & Mariani, C. Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of *Nicotiana glauca*. *J. Exp. Bot.* **54**(380), 55-63 (2003).
39. O'Brien, M. *et al.* Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self- incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Plant J.* **32**, 985-996 (2002).
40. Juárez-Díaz, J. *et al.* A novel Thioredoxin *h* is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **281**, 3418-3424 (2006).
41. Kondo, K. & McClure, B. New microsome-associated HT-family

- proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family. *Mol. Plant* **1**(4), 634-644 (2008).
42. Kondo, K. *et al.* Cultivated tomato has defects in both *S-RNase* and *HT* genes required for stylar function of self- incompatibility. *Plant J.* **29**, 627-636 (2002).
43. Sassa, H. & Hirano, H. Identification of a new class of pistil-specific proteins of *Petunia inflata* that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT. *Mol. Genet. Genomics* **275**, 97-104 (2006).
44. Puerta, A., Ushijima, K., Koba, T. & Sassa, H. Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor *HT-B* of *Petunia*. *J. Exp. Bot.* **60**, 1309-1318 (2009).
45. Busot, G. *et al.* Pollination in *Nicotiana alata* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *J. Exp. Bot.* **59**(11), 3187-3201 (2008).
46. Oliva, M., Silva, M., Sallai, R., Brito, M. & Sampaio, M. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie* **92**, 1667-1673 (2010).
47. Cruz-García, F., Hancock, C., Kim, D. & McClure, B. Stylar glycoproteins bind to S-RNase *in vitro*. *Plant J.* **42**, 295- 304 (2005).
48. Guo, Y., Zhang, Y. & Xue, Y. *Petunia* germinating pollen S/D3 interacts with S-RNases in *Petunia hybrida* Vilm. *J. Integr. Plant Biol.* **48**, 584-590 (2006).
49. Hua, Z.H., Fields, A. & Kao, T.H. Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Mol. Plant* **1**(4), 575-585 (2008).
50. Lee, C., Swatek, K. & McClure, B. Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana alata* pistil arabinogalactan proteins. *J. Biol. Chem.* **283**(40), 26965-26973 (2008).
51. Roldán, J., Rojas, H. & Goldraij, A. Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the *in vivo* self-incompatibility response in *Nicotiana alata*. *Ann. Bot.* **110**(4), 787-795 (2012).