

Ariel Goldraj, ingeniero agrónomo y doctor en química, es investigador en el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CIQUIBIC-CONICET), y en la facultad de ciencias químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, en Argentina.



BOTÁNICA

Control de la polinización molecular

De los distintos tipos de polen que recibe una planta, ¿cómo elige esta el más apropiado para reproducirse?

Ariel Goldraj

LAS PLANTAS CARECEN DE LA CAPACIDAD DE DESPLAZARSE. SON ORGANISMOS SÉSILES. Debido a ello, existe un componente importante de azar en la polinización, sobre la que ejercen un escaso control. Reciben de modo pasivo, y con pocas posibilidades de selección, el polen transportado hasta las flores por agentes externos, principalmente el viento y los insectos. Sin embargo, el arribo del polen viable no es garantía de éxito. Los diminutos granos deben recorrer un largo camino y superar varias barreras para lograr la fecundación.

En las Angiospermas, las plantas que forman flores y semillas, la reproducción sexual es un proceso complejo. Se inicia con la polinización, la llegada del grano de polen procedente de las anteras masculinas a los tejidos femeninos organizados en el pistilo. Este último consta de tres estructuras básicas: el estigma en la parte superior, el ovario en la inferior (donde se ubican los óvulos) y el estilo, una estructura tubular que une el estigma con el ovario. Al llegar al estigma, el grano de polen se hidrata y germina emitiendo el tubo polínico, el cual crece a

través del estilo hasta llegar al ovario. Allí, el tubo penetra en el óvulo y alcanza el saco embrionario, una estructura multicelular que contiene el gameto femenino. En el interior del saco, el tubo descarga dos células espermáticas. Una de ellas, el gameto masculino, se fusiona con la célula huevo, o gameto femenino, para formar el cigoto; a partir de este surge, mediante divisiones celulares sucesivas, el embrión que dará lugar a una nueva planta. La otra célula espermática se une con los dos núcleos de la célula central del saco y origina el endosperma, el tejido

EN SÍNTESIS

Las plantas con flores han desarrollado estrategias complejas para controlar la fecundación. De todos los granos de polen que llegan al pistilo, la planta favorece la germinación y el crecimiento de los más apropiados para la supervivencia de la especie.

Uno de los mecanismos más extendidos en la reproducción vegetal es la autoincompatibilidad, un sistema que actúa como una eficaz barrera para reconocer y rechazar el polen propio o el genéticamente relacionado.

De este modo, los vegetales evitan la endogamia y promueven la diversidad genética.

nutricio que alimentará al embrión en sus primeros estadios de crecimiento. El embrión y el endosperma están protegidos dentro de la semilla, que en las Angiospermas se desarrolla, a su vez, en el interior del fruto. Este evento de doble fusión de células y núcleos masculinos y femeninos fue descubierto hace más de cien años y se conoce como fecundación doble.

Las plantas han desarrollado diversas estrategias para el reconocimiento y control del polen una vez que este establece contacto con el estigma. Tal control está destinado a favorecer la germinación y el crecimiento del polen más apropiado y que mejor garantiza la supervivencia de la especie ante los cambios del entorno.

En el presente artículo se presentarán y desarrollarán los conceptos más importantes de uno de los mecanismos de reproducción más difundidos en el reino vegetal: la autoincompatibilidad. Se trata de un sistema eficaz que permite identificar y rechazar el polen procedente de la misma planta o de cualquier otra con la que comparta rasgos genéticos comunes.

RECONOCER EL POLEN PROPIO Y EL AJENO

Cuando el polen germina y el tubo polínico crece hasta el ovario, se considera que hay una relación compatible entre el polen y el pistilo. Por el contrario, existe incompatibilidad entre ambos cuando el pistilo impide que el polen germine o crezca con normalidad tras la germinación.

La incompatibilidad interespecífica ocurre cuando el polen pertenece a una especie diferente de la del pistilo que lo recibe y tiende a evitar, entre otros problemas, la formación de híbridos, que con frecuencia origina plantas estériles. Cuando el polen y el pistilo pertenecen a la misma especie, se habla de incompatibilidad intraespecífica o autoincompatibilidad. Este mecanismo está controlado a nivel genético y permite a una planta reconocer y rechazar su propio polen o el genéticamente relacionado. Se evita, de este modo, la endocria (o endogamia) y se favorece la variabilidad genética, lo que redundará en un mejor rendimiento de la progenie.

Existen varias formas de autoincompatibilidad en la naturaleza, presentes en distintas familias de plantas. Aquellas donde el fenómeno ha sido más estudiado son las Solanáceas,

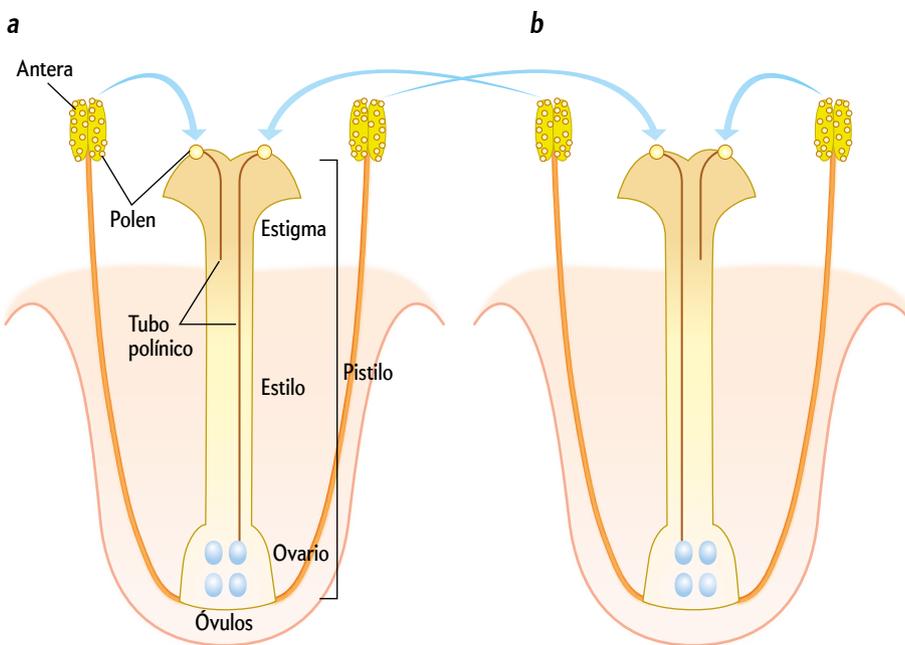
las Rosáceas, las Plantagináceas, las Papaveráceas y las Brasicáceas. En las cuatro primeras familias, la autoincompatibilidad es de tipo gametofítica; en ellas el rechazo o aceptación del polen por el pistilo depende de la carga genética presente en el grano de polen o el tubo polínico. Por el contrario, en las Brasicáceas la autoincompatibilidad es de tipo esporofítica, esto es, viene determinada por la carga genética del progenitor del cual deriva el polen. Debido a la diversidad y complejidad de los diferentes mecanismos de autoincompatibilidad, en este trabajo me centraré solo en los progresos alcanzados en la de tipo gametofítica; haré especial énfasis en la familia de las Solanáceas, cuyos géneros más estudiados han sido *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum*.

En este grupo de plantas, la autoincompatibilidad se basa sobre todo en la acción de una enzima, la ribonucleasa S (RNasa-S), producida en abundancia en el pistilo. En este sistema, el polen germina en el estigma y el tubo polínico comienza a crecer a través del estilo. Si el polen resulta compatible, el crecimiento hacia el ovario continuará sin detenerse. Pero si es incompatible, el desarrollo del tubo se interrumpirá en la parte superior del estilo y el polen será rechazado.

CONTROL GENÉTICO

El reconocimiento entre el polen y el pistilo está controlado genéticamente por el locus S. (Un locus corresponde a una región de ADN que alberga un gen o un grupo de genes más o menos cercanos entre sí.) En su versión más sencilla, el locus S contiene dos genes estrechamente ligados, de modo que la progenie siempre hereda ambos juntos.

Uno de estos genes determina la especificidad del polen y el otro la del pistilo. La especificidad constituye el rasgo que permite al pistilo reconocer y discriminar el origen del tubo polínico que crece en su interior. Ambos genes son polimórficos, es decir, cada uno de ellos presenta distintas variantes, ligeramente diferentes entre sí, llamadas alelos. Existe una serie de alelos para el gen que determina la especificidad del polen (S_{1po} , S_{2po} , S_{3po} , ..., S_{npo}) y otra para el de la especificidad del pistilo (S_{1pi} , S_{2pi} , S_{3pi} , ..., S_{npi}). Ambos alelos, al heredarse juntos, constituyen un haplotipo, designado, de forma simplificada, por el número

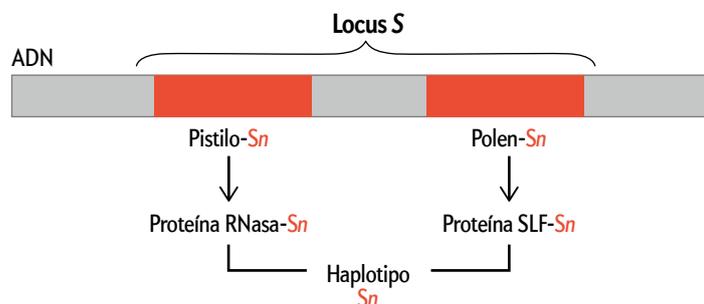


EL POLEN producido en las anteras es transportado por el viento o por insectos hasta el pistilo, la parte femenina de la flor, formada por el estigma, el estilo y el ovario. En el estigma, el grano de polen se hidrata y germina emitiendo un tubo polínico que crece a través del estilo. Cuando el polen de la planta *a* llega al pistilo de la planta *b* (o viceversa), el tubo resulta compatible y se alarga hasta llegar al ovario, donde fecunda a un óvulo. Por el contrario, cuando el polen proviene de la propia planta, el crecimiento del tubo se detiene en el estigma o en la parte superior del estilo, con lo que se evita la fecundación.

SALVO INDICACIÓN CONTRARIA, TODAS LAS ILUSTRACIONES SON CORTESÍA DEL AUTOR

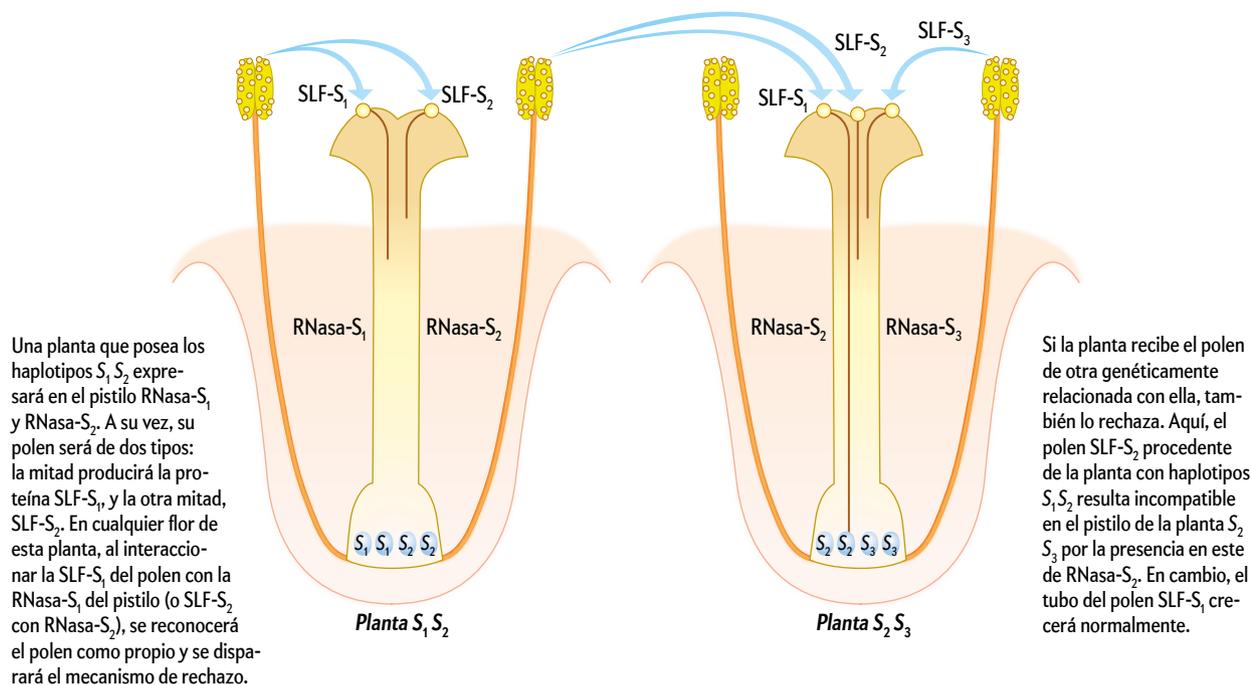
Reconocimiento genético entre polen y pistilo

El sistema de autoincompatibilidad, que permite a la planta seleccionar el polen más adecuado, está controlado genéticamente por el locus *S*. Este constituye una porción del ADN que alberga dos genes. Uno de ellos determina la especificidad del pistilo y el otro la del polen. El par génico del locus *S* presenta variantes ($S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$) llamadas haplotipos. Los productos de estos genes son las proteínas RNasa-*S* y SLF, sintetizadas en el pistilo y el polen, respectivamente. Estas moléculas se encargan del reconocimiento entre la parte femenina y masculina de la flor, lo que en última instancia determinará si se produce o no la fecundación.



Rechazo o aceptación

La mayoría de los tejidos de las plantas, al presentar una dotación cromosómica doble, poseen dos haplotipos para el locus *S*. Pero en los gametos la información genética está reducida a la mitad, por lo que el polen produce una sola variante de SLF. El pistilo, al formar parte del cuerpo vegetativo, expresa dos variantes de RNasa-*S*. El rechazo o aceptación del polen dependerá de si coincide o no el haplotipo de este con cualquiera de los dos del pistilo.



que sigue a la letra *S* ($S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$). De esta manera, mientras que los alelos son las variantes de un mismo gen, los haplotipos representan las variantes de los pares alélicos que ocupan el locus *S*. El haplotipo es la señal de especificidad que permite identificar a la vez la procedencia del polen y la del pistilo. Al transmitirse a la progenie de forma conjunta, queda garantizado el rasgo de autoincompatibilidad en toda ella.

Los genes del locus *S* contienen la información necesaria para sintetizar las proteínas que llevan a cabo el reconocimiento entre

el polen y el pistilo. La proteína que establece la especificidad del pistilo fue descubierta a finales de los años ochenta del siglo xx por el equipo de Adrienne Clarke, de la Universidad de Melbourne, mientras trabajaba con *Nicotiana glauca*, una especie autoincompatible emparentada con la planta del tabaco. Se trata de la molécula RNasa-*S*, antes mencionada, que se sintetiza solo en el pistilo. Por otro lado, la proteína que determina la especificidad del polen fue descrita hace unos diez años por el laboratorio de Teh-hui Kao, de la Universidad del Estado de

Pensilvania; se denomina SLF (abreviatura de *S Locus F-Box protein*) y pertenece a un grupo de proteínas con una secuencia de aminoácidos conocida como caja F. La expresión de SLF se halla limitada al polen y a los tubos polínicos.

La planta reconoce el polen propio a través de la señal de especificidad que proporciona el haplotipo. Recordemos que, como sucede en todos los organismos superiores, los tejidos de las plantas presentan la información genética duplicada en dos cadenas de ADN. En cambio, en los gametos o células reproductoras, la información genética se limita a una sola cadena. En consecuencia, el polen expresa una sola variante de SLF, mientras que el pistilo, al formar parte del cuerpo vegetativo o esporófito de la planta, expresa dos variantes de RNasa-S.

En la polinización, el tubo polínico atraviesa el estilo y expresa la proteína SLF, la cual se piensa que establece algún tipo de interacción molecular con las RNasa-S del pistilo. Cuando el haplotipo de SLF coincide con cualquiera de los dos haplotipos de la RNasa-S del pistilo, el polen es reconocido como propio y es rechazado, es decir, se considera incompatible. Si el haplotipo de SLF difiere del de las RNasa-S, el polen es compatible y continúa su crecimiento.

MECANISMO BIOQUÍMICO

En 1990, Clarke y sus colaboradores descubrieron que el ácido ribonucleico (ARN) del polen era degradado en los cruzamientos incompatibles pero no en los compatibles. La RNasa-S aparecía como responsable de dicha degradación. Más tarde, Teh-hui Kao y sus colaboradores demostraron que las plantas de *Petunia inflata* en las que se había modificado el gen de la RNasa-S, de modo que se suprimía su actividad enzimática, no rechazaban el polen propio. Tales resultados llevaron a formular un modelo de autoincompatibilidad. Según este, la RNasa-S ejerce un efecto citotóxico sobre el tubo polínico incompatible mediante la degradación de su ARN, con lo que se evita la fecundación.

En general, este modelo es aceptado para explicar el mecanismo de rechazo del polen incompatible. Sin embargo, subsiste un interesante debate para responder a la pregunta de cómo evitan los tubos polínicos compatibles la acción citotóxica de la RNasa-S. Dicho de otro modo, en una polinización compatible, una vez que SLF y RNasa-S «se reconocen» como de distinto haplotipo, ¿cómo se impide que la RNasa-S degrade el ARN del polen? Antes del descubrimiento de SLF, se pensó que una proteína del polen responsable del reconocimiento podría alojarse en la membrana plasmática del tubo polínico, desde donde controlaría el ingreso en él de las RNasas-S del pistilo: permitiría así el paso de aquellas con haplotipo idéntico al del polen, pero rechazaría las que lo tuvieran distinto. De esta manera se garantizaba la integridad de los tubos polínicos compatibles.

En el año 2000, el grupo de Mario Capadoccia, de la Universidad de Montreal, demostró que en la especie *Solanum chacoense*, las RNasas-S penetraban en los tubos polínicos con independencia del haplotipo que presentaran, es decir, coincidieran o no los haplotipos de estas con los del polen. Este hallazgo acentuó el interrogante acerca del mecanismo de control de las RNasas-S en las polinizaciones compatibles. Según una idea planteada hacía varios años y que cobró fuerza después de los hallazgos del grupo de Capadoccia, la actividad catalítica de la RNasa-S en los tubos polínicos compatibles sería inhibida por algún factor propio del polen.

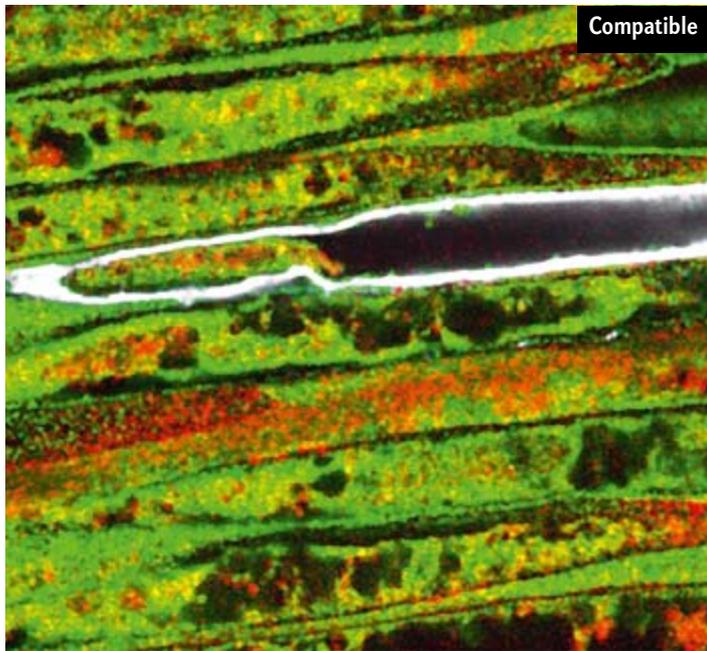
Un interesante modelo para explicar el control de la citotoxicidad de la RNasa-S surgió cuando se descubrió la naturaleza de la proteína SLF. En su extremo amina presenta una secuencia de aminoácidos característica, la caja F antes mencionada. Las proteínas con caja F forman parte de una maquinaria encargada de señalar aquellas proteínas que la célula necesita eliminar. La señalización consiste en añadir a la proteína que será degradada una cadena lineal de varias moléculas de un compuesto de bajo peso molecular llamado ubiquitina. De esta manera, la molécula ubiquitinada puede ser identificada por el proteosoma

26 S, un complejo macromolecular que realiza tareas de limpieza en la célula, destruyendo aquellas proteínas que resultan innecesarias.

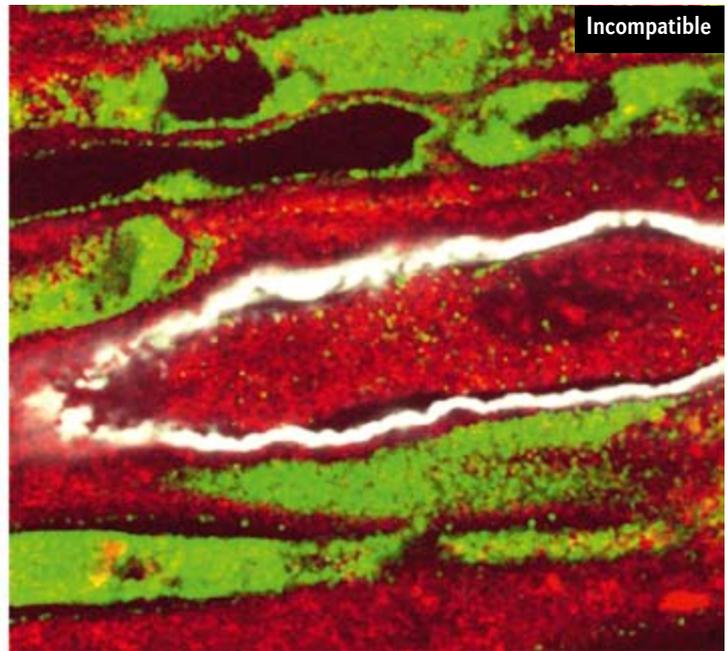
La SLF podría entonces dirigir la ubiquitinación de la RNasa-S toda vez que la reconociera como no propia o de distinto haplotipo (en las polinizaciones compatibles). La RNasa-S así señalizada sería degradada por el proteosoma, con lo que se despejaría el camino para que el tubo polínico con-



NICOTIANA ALATA es una de las especies utilizadas como modelo para el estudio de la autoincompatibilidad, estrategia que le permite rechazar el polen propio o genéticamente relacionado. Esta planta, conocida como tabaco ornamental, pertenece a la familia Solanáceas y es nativa del noreste de Argentina, este de Paraguay y sur de Brasil. Sus flores, completamente abiertas por la noche, emanan una suave fragancia a jazmín que atrae a los insectos polinizadores.



Compatible



Incompatible

TREINTA Y SEIS HORAS DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN de una planta de *Nicotiana alata*, la RNasa-S (rojo) permanece confinada en el interior de la vacuola de tubos polínicos compatibles, delimitados en blanco. La molécula 120k (verde) se asocia a la membrana de la vacuola y resalta el contorno de esta (izquierda). En los tubos polínicos incompatibles, la RNasa-S no aparece confinada y tiende a ocupar todo el espacio del tubo, mientras que la señal de 120k es escasa o nula, lo que indica que la vacuola ha perdido su organización (derecha). Fuera del tubo, en el tejido de transmisión del pistilo, las señales de RNasa-S y 120k son abundantes y semejantes en ambos tipos de polinizaciones. (Imagen obtenida mediante técnicas de inmunocitoquímica, con anticuerpos contra 120k, RNasa-S y calosa, el componente mayoritario de la pared celular del tubo polínico.)

tinuara creciendo hacia el ovario. Por lo tanto, en los cruzamientos compatibles las RNasas-S no serían inactivadas por un inhibidor, sino que serían degradadas después de ingresar en el tubo polínico.

CONFINAMIENTO DE LA RNASA-S

En tiempo reciente, gracias a una estrategia que permite conocer el lugar que ocupa la RNasa-S en el tubo polínico, se ha planteado un modelo alternativo para explicar el mecanismo de control sobre la RNasa-S en las polinizaciones compatibles. Mediante técnicas de inmunocitoquímica y microscopía, con el empleo de anticuerpos unidos a reactivos fluorescentes, es posible establecer la localización de las moléculas a las que se unen los anticuerpos de forma selectiva. La estrategia fue aplicada por el laboratorio de Bruce McClure y sus colaboradores, de la Universidad de Missouri, en secciones de pistilos polinizados de *Nicotiana alata*. De esta manera, al utilizar anticuerpos contra la RNasa-S y contra la calosa, un carbohidrato constituyente de la pared celular del polen, pudo determinarse la localización de las RNasas-S en el interior del tubo polínico.

Estos experimentos, además de confirmar los resultados obtenidos por el laboratorio de Mario Capadoccia, demostraron que los niveles de RNasa-S en tubos polínicos compatibles se asemejaban a los observados en tubos incompatibles. Es decir, la RNasa-S no parecía ser degradada, al menos de forma generalizada, en los cruzamientos compatibles.

En este contexto, otra manera de explicar la compatibilidad consistía en suponer que la RNasa-S estuviera presente pero sin actividad enzimática, debido al efecto de un posible inhibidor. O bien, que la RNasa-S se hallara aislada del citoplasma

donde reside su sustrato, el ARN del polen en este caso. Para estudiar esta última hipótesis, se utilizó un tercer anticuerpo dirigido contra la pirofosfatasa vacuolar, una enzima que en las plantas se localiza en el tonoplasto, la membrana de la vacuola. La vacuola es un orgánulo de la célula vegetal con múltiples funciones, entre ellas la de servir como reservorio de enzimas líticas o degradativas, como las nucleasas y las proteasas. El confinamiento de estas enzimas resulta indispensable para preservar la integridad de las proteínas y los ácidos nucleicos de la célula; garantiza la destrucción del material celular de manera controlada y en el momento oportuno. El empleo simultáneo de anticuerpos para detectar la RNasa-S, la pared celular del tubo polínico y el tonoplasto (ensayo de triple marcado), permitió detectar la RNasa-S confinada en el interior de la vacuola en los tubos compatibles.

Tal confinamiento se observó durante todo el tiempo que los tubos polínicos empleaban en llegar hasta el ovario. El mismo ensayo de inmunocitoquímica se repitió en pistilos polinizados con polen incompatible. En este caso, la RNasa-S permanecía dentro de la vacuola en la mayoría de los tubos examinados. Sin embargo, transcurrido cierto tiempo, se produjo un cambio drástico en la localización de la enzima. Ya no se hallaba confinada, sino que estaba dispersa y llenaba todo el espacio del tubo polínico. En concordancia con este resultado, casi no se detectaba la pirofosfatasa del tonoplasto, lo que sugería un colapso o ruptura de dicha membrana.

Este resultado se consideró de gran relevancia, puesto que brindaba una explicación acerca de otro mecanismo posible que empleaban los tubos polínicos compatibles para eludir la toxicidad de la RNasa-S y continuar su crecimiento a través del

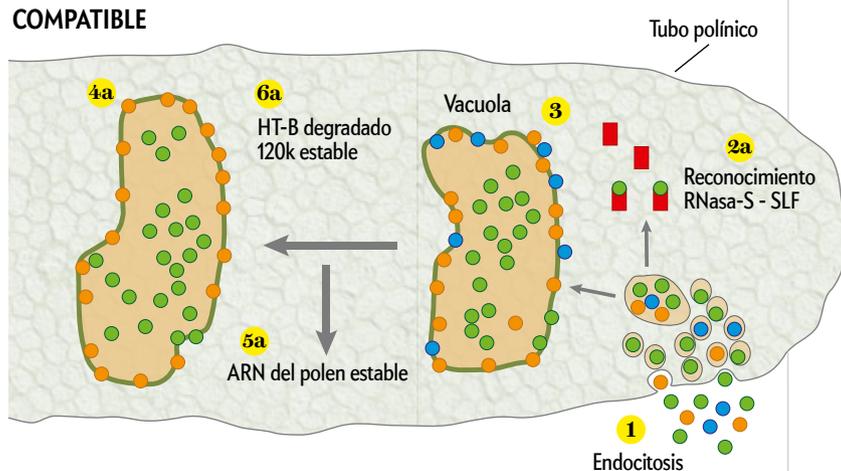
Hipótesis global de la autoincompatibilidad

Las pruebas experimentales reunidas hasta el momento en *Nicotiana alata* permiten proponer un modelo global sobre el sistema de autoincompatibilidad basado en la proteína RNasa-S, que determina si la polinización es compatible (arriba) o incompatible (abajo). A continuación se describen las etapas del proceso.

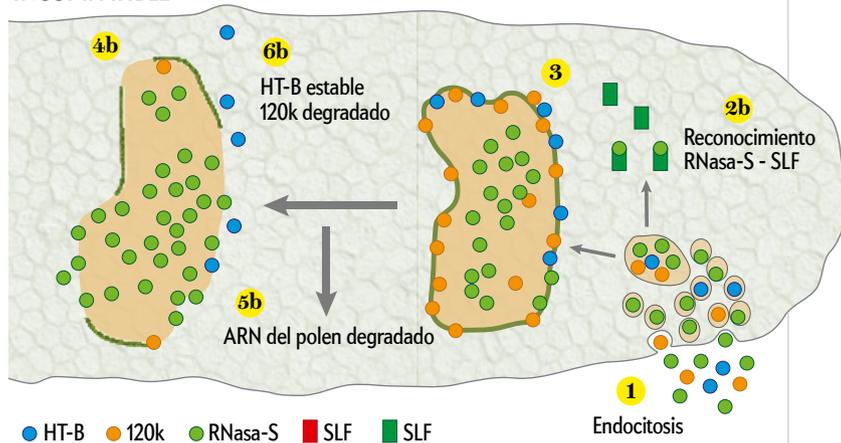
Las moléculas RNasa-S, 120k y HT-B, que se hallan en el pistilo, acceden al tubo polínico por endocitosis **1**: su membrana las rodea y forma vesículas que mantienen su contenido separado del citoplasma del tubo polínico. Una cantidad minoritaria de RNasa-S accede al citoplasma del polen para interactuar con la proteína SLF en una reacción de reconocimiento entre el polen y el pistilo. Si SLF (rojo) posee un haplotipo distinto al de la RNasa-S, el resultado de la interacción da lugar a una polinización compatible **2a**; si ambos coinciden (verde), resultará incompatible **2b**. Por otro lado, las vesículas van fusionándose hasta formar una vacuola **3**. La RNasa-S permanece en el interior de esta y el factor 120k se asocia a su membrana.

Si en el reconocimiento se detecta compatibilidad, la RNasa-S se mantiene en el interior de la vacuola organizada **4a** y no se destruye el ARN del polen **5a**; HT-B se degrada y 120k permanece estable **6a**. Si se detecta incompatibilidad, la vacuola se desorganiza **4b** y la RNasa-S es liberada al citoplasma, donde destruye el ARN del polen **5b**; HT-B permanece estable y 120k se degrada **6b**.

COMPATIBLE



INCOMPATIBLE



● HT-B ● 120k ● RNasa-S ■ SLF ■ SLF

estilo. Al estar incluida en la vacuola, sin acceso al citoplasma, la RNasa-S no puede degradar el ARN del polen, con lo que se garantiza la compatibilidad. En los tubos polínicos incompatibles, la alteración o ruptura de la membrana de la vacuola liberaría la RNasa-S que, de esta forma, accedería al citoplasma y al ARN del polen para su destrucción.

Es posible que los dos modelos que intentan explicar el mecanismo de evasión de la citotoxicidad de las RNasas-S en el polen compatible sean correctos. Ambos modelos, el que sostiene la degradación de las RNasas-S no propias en el tubo polínico y el que propone el confinamiento de las RNasas-S en la vacuola del tubo, reúnen importantes evidencias experimentales.

Si bien hasta el momento no se ha podido demostrar la degradación masiva de las RNasas-S en tubos compatibles, no puede descartarse que una pequeña parte de estas sean degradadas. En este sentido, es importante volver a considerar el doble rol de la RNasa-S en los sistemas de autoincompatibilidad: por un lado, reconoce el polen por interacción con la proteína SLF y, por otro, ejerce una acción citotóxica sobre el polen incompatible, imprescindible para el rechazo de este.

La función de reconocimiento del polen supone una interacción estrecha entre RNasa-S y SLF. ¿Dónde ocurre esta in-

teracción? Al menos en el género *Antirrhinum*, los datos obtenidos por el laboratorio de Yongbiao Xue, del Instituto de Genética y Biología Evolutiva, en Pekín, indican que la proteína SLF reside en el citoplasma y en el retículo endoplásmico del tubo polínico; se halla por tanto separada de la RNasa-S que se aloja en el interior de la vacuola. Si bien aún no se ha demostrado de modo definitivo, puede que cierta cantidad de RNasa-S, tal vez pequeña respecto del total de la enzima en la vacuola, acceda al citoplasma para poder interactuar con SLF. Tras lo cual, en las polinizaciones compatibles, sería degradada por el proteosoma y se evitaría la destrucción del ARN del polen.

EL PAPEL DE OTRAS PROTEÍNAS

Además de RNasa-S y SLF, otras proteínas producidas en el pistilo resultan indispensables en el mecanismo de autoincompatibilidad. El laboratorio de McClure ha caracterizado dos de estas moléculas en *Nicotiana alata*, denominadas HT-B y 120k; también ha hallado plantas mutantes respecto a un tercer factor aún no caracterizado, el 4936. En tiempo reciente, Felipe Cruz García y sus colaboradores, de la Universidad Nacional Autónoma de México, han identificado un nuevo factor, denominado NaStEP (*Nicotiana alata stigma expressed protein*).

Las plantas transgénicas a las que se suprimió la expresión de los genes responsables de la síntesis de HT-B, 120k y NaStEP perdieron la capacidad de rechazar el polen propio, aun cuando seguían presentando niveles de RNasa-S normales. A diferencia del gen de la RNasa-S, los genes de HT-B 120k y NaStEP no son polimórficos. En plantas que expresan RNasa-S de distintos haplotipos, las moléculas HT-B, 120k y NaStEP son idénticas, lo que significa que estas no contribuyen a la especificidad del reconocimiento entre polen y pistilo.

Aunque no se conoce aún la función específica de HT-B, 120k y NaStEP en la maquinaria de rechazo del polen, hace poco se han revelado algunos detalles de la interacción que establecen estas proteínas del pistilo con el tubo polínico. Las moléculas RNasa-S, HT-B, 120k y NaStEP son producidas por las células del tejido central, o de transmisión, del pistilo y son segregadas al espacio extracelular, desde donde son asimiladas por el tubo polínico en crecimiento. Experimentos de inmunocitoquímica han revelado que 120k se aloja en el tonoplasto del tubo polínico y demarca los límites del compartimento donde es almacenada la RNasa-S, igual que lo hace la pirofosfatasa antes mencionada. Por otro lado, los estudios bioquímicos que revelan el comportamiento de las moléculas en solución han demostrado que, en ciertas condiciones, el factor 120k tiende a «pegarse» a la RNasa-S. Se especula entonces con la posibilidad de que 120k, probablemente junto con otras proteínas del pistilo, faciliten el alojamiento de RNasa-S en el interior de la vacuola del tubo polínico.

La función de HT-B también ha comenzado a ser estudiada en ensayos bioquímicos y de inmunocitoquímica. Se ha comprobado que en las polinizaciones compatibles la estabilidad de HT-B es mucho menor que en las incompatibles. Este hallazgo concuerda con el hecho de que, en las plantas transgénicas con una expresión de HT-B muy reducida o nula, las polinizaciones resultan siempre compatibles, independientemente del haplotipo del polen utilizado en el ensayo. Ello sugiere que la degradación de HT-B es un requisito indispensable para la compatibilidad.

MODELO GLOBAL

Si bien el papel de 120k y de HT-B necesita ser precisado con más detalle, existen algunas relaciones interesantes entre los fenómenos observados que permiten hacer especulaciones sobre la forma en que opera el mecanismo de autoincompatibilidad dependiente de la RNasa-S.

Es probable que el tubo polínico, en su viaje por el estilo, incorpore por endocitosis las proteínas que están en la matriz extracelular del tejido de transmisión del pistilo. Mediante este mecanismo, porciones de la membrana celular del tubo polínico se invaginan y se adentran en el tubo, formando vesículas. Estas contienen las moléculas endocitadas que, de esta manera, ingresan al tubo polínico aisladas del citoplasma. Las vesículas siguen lo que se conoce como ruta o tráfico de endomembranas: tienden a fusionarse con compartimentos mayores que, a su vez, también se unen y forman vacuolas. A través de esta ruta la RNasa-S llegaría al interior de la vacuola y la molécula 120k a la membrana de esta. Puede que el factor HT-B también establezca alguna clase de interacción que lo mantenga localizado en el sistema de membranas internas del tubo polínico.

Una parte minoritaria de RNasa-S accedería al citoplasma (posiblemente a partir del retículo endoplásmico, un orgánulo celular que constituye un sistema de membranas), donde interaccionaría con SLF para llevar a cabo el reconocimiento entre el polen y el pistilo. Tal interacción marcará el destino del tubo

polínico. Si la RNasa-S y la SLF poseen el mismo haplotipo, HT-B se mantendrá estable y puede que ello desencadene la desorganización de la membrana vacuolar (y la degradación de 120k), con la consiguiente liberación de la RNasa-S al citoplasma del tubo polínico. El ARN del polen queda así expuesto a la acción degradativa de la RNasa-S. Otras enzimas hidrolíticas habitualmente almacenadas en la vacuola también podrían contribuir a la detención del crecimiento y rechazo del tubo. Si, por el contrario, la RNasa-S y la SLF poseen haplotipos distintos, la molécula HT-B es degradada por un mecanismo aún no conocido. La membrana de la vacuola se mantiene intacta, delimitada por 120k, con la RNasa-S confinada en su interior. En este caso, el tubo polínico mantiene su integridad y continúa alargándose hasta el ovario, donde fecundará al óvulo.

En los últimos años, el progreso en el conocimiento del sistema de autoincompatibilidad dependiente de RNasa-S ha sido sustancial. Después de describir la RNasa-S como el factor de especificidad y reconocimiento del pistilo, pasaron casi quince años hasta que se logró identificar SLF, el factor que determina la especificidad del polen. Igualmente, el hallazgo del confinamiento de la RNasa-S y la interacción de SLF con proteínas de la maquinaria de ubiquitinación han aportado elementos clave para entender la compatibilidad.

Como cabría esperar, estos avances han hecho plantear a su vez nuevos interrogantes. Por lo que se refiere a los factores del locus *S*, aún no se conoce exactamente cómo, cuándo y dónde interaccionan RNasa-S y SLF en la reacción de reconocimiento entre el polen y el pistilo. Respecto a los factores no ligados al locus *S*, además de HT-B, 120k y NaStEP, ¿existen otras moléculas indispensables para el rechazo del polen? ¿Cómo se integran espacial y temporalmente estas en las distintas situaciones que conllevan las polinizaciones compatibles y las incompatibles?

Las respuestas a estas preguntas contribuirán a entender no solo los sistemas de autoincompatibilidad basados en la RNasa-S, sino también otros sistemas presentes en especies menos estudiadas. La importancia de resolver tales cuestiones se hace evidente si se tiene en cuenta que más del 50 por ciento de las plantas con flores muestran algún tipo de autoincompatibilidad. El conocimiento de este fenómeno resulta por tanto fundamental para entender la reproducción en el mundo vegetal.

PARA SABER MÁS

Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. P. Sijacic et al. en *Nature*, vol. 429, págs. 302-305, 2004.

The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. T-h. Kao, T. Tsukamoto en *Plant Cell*, vol. 16, págs. 72-83, 2004.

Gametophytic self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in «self» pollen tube inhibition. B. McClure y V. Franklin-Tong en *Planta*, vol. 226, págs. 233-245, 2006.

Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. A. Goldraij et al. en *Nature*, vol. 439, págs. 805-810, 2006.

Self-incompatibility in flowering plants. Evolution, diversity and mechanisms. V. E. Franklin-Tong. Springer; Berlín, Heidelberg, 2008.

S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia inflata*. X. Meng, P. Sun y T-h. Kao en *Annals of Botany*, vol. 108, págs. 637-646, 2010.

NaStEP: A proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. K. Jiménez Durán et al. en *Plant Physiology*, vol. 161, págs. 97-107, 2013.