

ARTÍCULO DE REVISIÓN
S-RNasas, más que solo ribonu-
cleasas en el rechazo del polen

ARTÍCULO DE REVISIÓN

LAS S-RNASAS: T2 RIBONUCLEASAS ESPECIALIZADAS EN EVITAR LA AUTOFECUNDACIÓN EN ANGIOSPERMAS USANDO MECANISMOS DIVERSOS QUE VAN MÁS ALLÁ DE SU ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA

Emilio García-Caffarel (1), Javier Andrés Juárez-Díaz* (1)

(1) Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, CDMX, México.

*Autor de correspondencia correo E: j.a.juarezdiaz@ciencias.unam.mx

Resumen

Las ribonucleasas, por definición, son enzimas con actividad hidrolítica que degradan al RNA. Existe una gran variedad de estas enzimas; en este trabajo nos centramos en la familia T2 para discutir, en particular, lo que se sabe sobre las ribonucleasas más estudiadas de este grupo: las S-RNasas. Las S-RNasas son clave para evitar la autopolinización en varias familias de angiospermas, actuando como la determinante S femenina del sistema de autoincompatibilidad conocido como “basado en S-RNasas”. Esto implica que están involucradas de manera muy precisa en el reconocimiento y discriminación del polen propio y del no propio, para rechazar al propio. Esta función de gran relevancia evolutiva, ampliamente distribuida en las angiospermas, involucra atributos enzimáticos –por su actividad de ribonucleasa– y estructurales, así como su capacidad para interactuar con otras proteínas. Por lo tanto, la función de las S-RNasas en el rechazo específico del polen propio es compleja desde el punto de vista bioquímico (estructural, enzimático y de interacción) y celular (localización y transporte). Conforme surgen evidencias al respecto, es claro que el papel biológico de las S-RNasas no solo recae en su función catalítica como ribonucleasas, sino que, en realidad, su mecanismo de acción es más complejo. La comprensión de la complejidad de este mecanismo de acción subraya la importancia de continuar investigando para desentrañar completamente su papel biológico en la reproducción y evolución de las angiospermas.

PALABRAS CLAVE

autoincompatibilidad,
polen,
pistilo,
polinización

Abstract

Ribonucleases, by definition, are enzymes with hydrolytic activity that degrade RNA. There is a wide variety of these enzymes; however, in this study, we focus on the T2 family to particularly discuss what is known about the most studied ribonucleases in this group: the S-RNases. S-RNases are essential to prevent self-pollination in several angiosperm families, acting as the female S-determinant of the “S-RNase-based” self-incompatibility system. This implies that they are involved in a very precise way in the recognition and discrimination of self and non-self-pollen, to reject self-pollen. This function of great evolutionary relevance, which is widely distributed in angiosperms, involves both enzymatic attributes due to their ribonuclease activity, structural features, and their ability to interact with other proteins. Therefore, the role of S-RNases in the self-pollen specific rejection is complex from a biochemical (structural, enzymatic, and interaction abilities) and cellular (localization and transport) standpoint. As evidence emerges, it becomes clear that the biological role of S-RNases lies not only in their catalytic function as ribonucleases but also, in a more complex mechanism of action. Understanding the complexity of this mechanism of action underscores the importance of continuing research to fully unravel its biological role in the reproduction and evolution of angiosperms.

KEYWORDS

Self-incompatibility,
pollen,
pistil,
pollination

Las T2 RNAsas

Las ribonucleasas (RNAsas) se definen ampliamente como enzimas hidrolíticas que degradan el RNA (1). En esta revisión nos enfocamos en las RNAsas de la familia T2 que, además de presentar una amplia distribución, —se encuentran en hongos, plantas, animales, protistas, bacterias y virus— (2,3), es a la que pertenecen las S-RNAsas (4). Las T2 RNAsas, denominadas así por su similitud con la RNasa T2 de *Aspergillus oryzae* (2), son endorribonucleasas que, en un paso de transfosforilación y otro de hidrólisis, cortan RNA de cadena sencilla (ssRNA) (4) y producen mono- u oligonucleótidos con un fosfato 3' terminal mediante un intermediario de fosfato cíclico 2',3' (Fig. 1). Estas enzimas se distinguen por contener dos motivos conservados en el sitio activo (CAS I y CAS II), que contienen a los aminoácidos de importancia catalítica, particularmente a las dos histidinas catalíticas —His46 e His109 en la RNasa de *Rhizopus niveus* (GenBank: BAA02042.1) (5)— (Fig. 1 y 2).

Todas las T2 RNAsas presentan una estructura tipo ($\alpha + \beta$) y contienen al menos seis hélices α y siete hebras β (2) (Fig. 2). Las T2 RNAsas conservan estructuralmente tres hélices α (α_2 , α_3 y α_4) y seis hebras β , resaltando una hoja plegada β central de cuatro hebras β antiparalelas — β_1 , β_2 , β_4 y β_5 — (3). En su centro, las T2 RNAsas contienen residuos hidrofóbicos que se localizan en posiciones similares (2,6). Los motivos CAS I y CAS II se localizan, respectivamente, en la hebra β_2 y la hélice α_3 (Fig.

2) (7,8). También están identificados dos sitios de unión al sustrato, denominados B1 y B2, que mediante interacciones hidrofóbicas unen, respectivamente, las bases nitrogenadas de los sitios 5' y 3' del enlace por romperse (4). Así mismo, es necesario mencionar que la mayoría de estas enzimas son glicoproteínas. El contenido de la fracción glicosídica es variable y pueden estar tanto N- como O-glicosiladas (9).

Otros elementos ampliamente conservados entre las T2 RNAsas son los residuos de cisteína y los puentes disulfuro que forman. Aunque el número de puentes disulfuro es variable (9), dos de ellos están conservados en todas las T2 RNAsas y se consideran esenciales para su estructura y función (3,8). Estos puentes se forman entre Cys63-Cys112 y Cys182-Cys213, tomando como referencia de posición la secuencia de la RNasa Rh de *R. niveus* (Fig. 2) (7).

Las T2 RNAsas de plantas

En plantas, las T2 RNAsas son muy diversas y, de acuerdo con los análisis filogenéticos, se dividen en las clases I, II y III. Las clases I y II tienen su origen en las algas verdes y angiospermas, respectivamente; la clase III es exclusiva del grupo de las eudicotiledóneas (10). La clase III contiene a las S-RNAsas y es el grupo más estudiado; las clases I y II contienen a las tipo S-RNAsas (RNAsas S-like) (10-14).

En particular, las S-RNAsas son ribonucleasas con una función muy específica, que es evitar la autofe-

cundación en lo que se conoce como sistema de auto-incompatibilidad (AI) (15,16). Por otro lado, las RNasas *S-like* participan en varios fenómenos distintos a la AI (17). Además, una distinción importante entre ambos tipos se presenta en su secuencia

de aminoácidos, donde se han identificado patrones característicos para cada grupo (18). Estudios genómicos de las T2 RNasas vegetales indican que características como un punto isoeléctrico básico (14) y la presencia de un solo intrón –con la excepción de

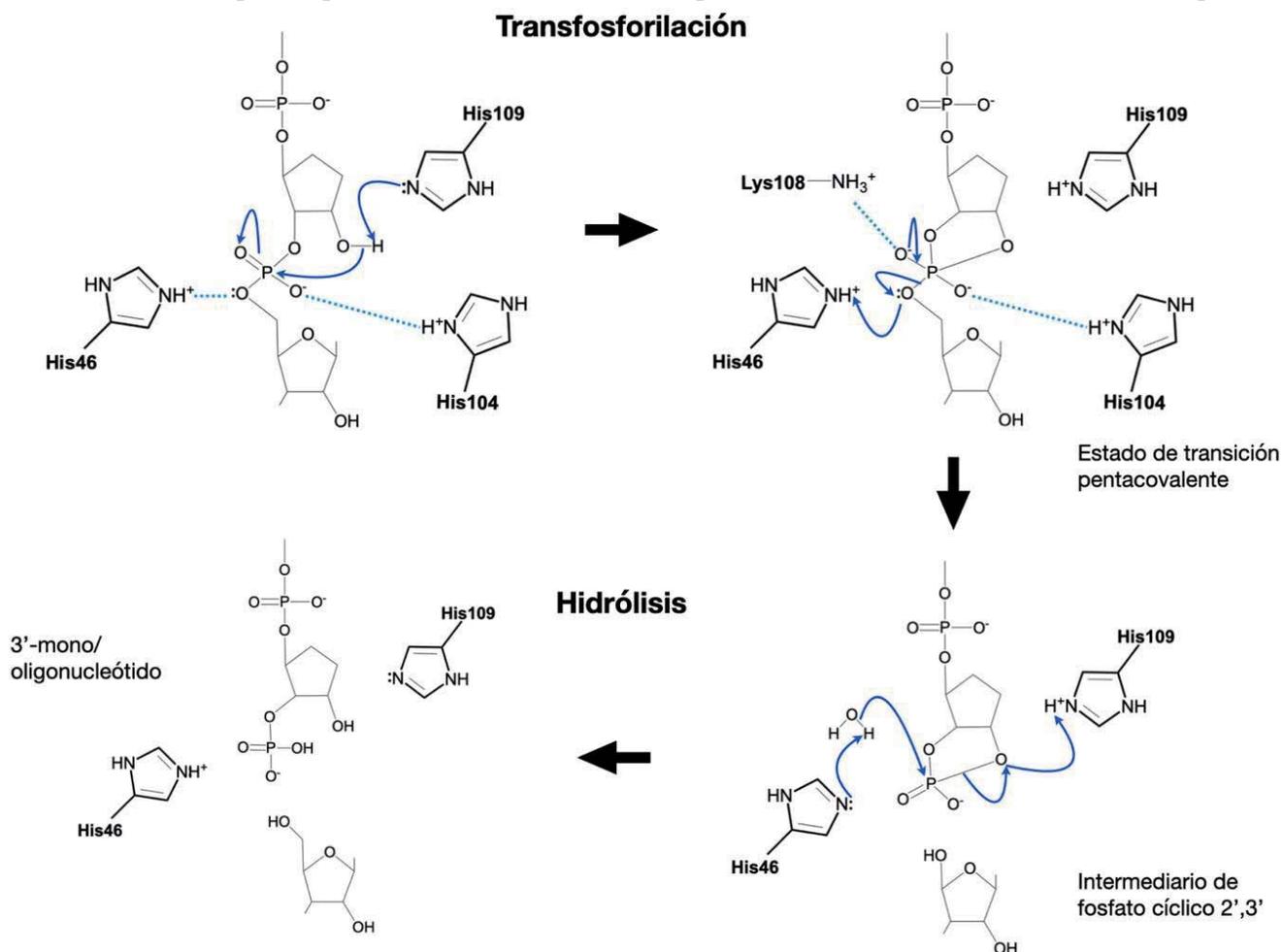


Figura 1. Mecanismo de reacción de las T2 RNasas. Estas enzimas catalizan una reacción general ácido-base, involucrando un paso de transfosforilación y otro de hidrólisis para la degradación del RNA (3,5). En el paso de transfosforilación, los residuos de histidina catalíticos, His46 e His109 de la T2 RNasa de *R. niveus*, actúan como ácido y base general, respectivamente. En el estado de transición se observa la formación de un intermediario pentacovalente, que se estabiliza por los residuos Lys108 e His104. Subsecuentemente, en la reacción de hidrólisis se invierten los papeles de las histidinas catalíticas: His46 actúa como base general e His109 como ácido general. Al finalizar la reacción, se libera un mono u oligonucleótido con un fosfato en el extremo 3'.

Prunus, que tiene dos– en una región particular de su secuencia permiten diferenciar a las S-RNasas de otras T2 RNasas vegetales (11,14).

Estructura de las S-RNasas

Las S-RNasas contienen ciertas regiones particulares en su estructura primaria; cinco regiones altamente conservadas (C1, C2, C3, C4, y C5) y dos altamente variables (HVa y HVb) (Fig. 3) (19,20). Las regiones C2 y C3 se solapan con los motivos CAS I y CAS II, respectivamente y, por lo tanto, se conservan en todas las T2 RNasas (17,18). Las

regiones C1, C4 y C5 son hidrofóbicas y en ellas se ubican los residuos que forman parte del núcleo hidrofóbico de estas proteínas (Fig. 3) (19). Por otro lado, las regiones hipervariables son altamente hidrofílicas y tridimensionalmente se encuentran contiguas y expuestas al solvente (Fig. 3) (21). Esto, como más adelante se abordará, sugiere que participan en el reconocimiento alelo *S* específico que se requiere en la AI (22). Es importante notar que particularmente las S-RNasas de Rosaceae no poseen una región C4 propiamente homóloga a la que se encuentra en Solanaceae, sino que poseen una región conservada (RC4) en una posición similar (23,24).

Además, poseen una sola región hipervariable RHV, que se alinea en gran medida con la región HVa de Solanaceae (24). Sin embargo, se ha observado que, a pesar de que la región RHV se encuentra expuesta al solvente (25), no es suficiente para el rechazo del polen alelo *S* específico (26).

Otro elemento que también tienen las S-RNasas, y que está ampliamente conservado en todas las T2 RNasas vegetales, es el contar con cuatro puentes disulfuro (Fig. 3) –dos de ellos estrictamente conservados en todas las T2 RNasas (Fig. 2)– (8,27). Estos puentes disulfuro se consideran esenciales estructural y funcionalmente (3).

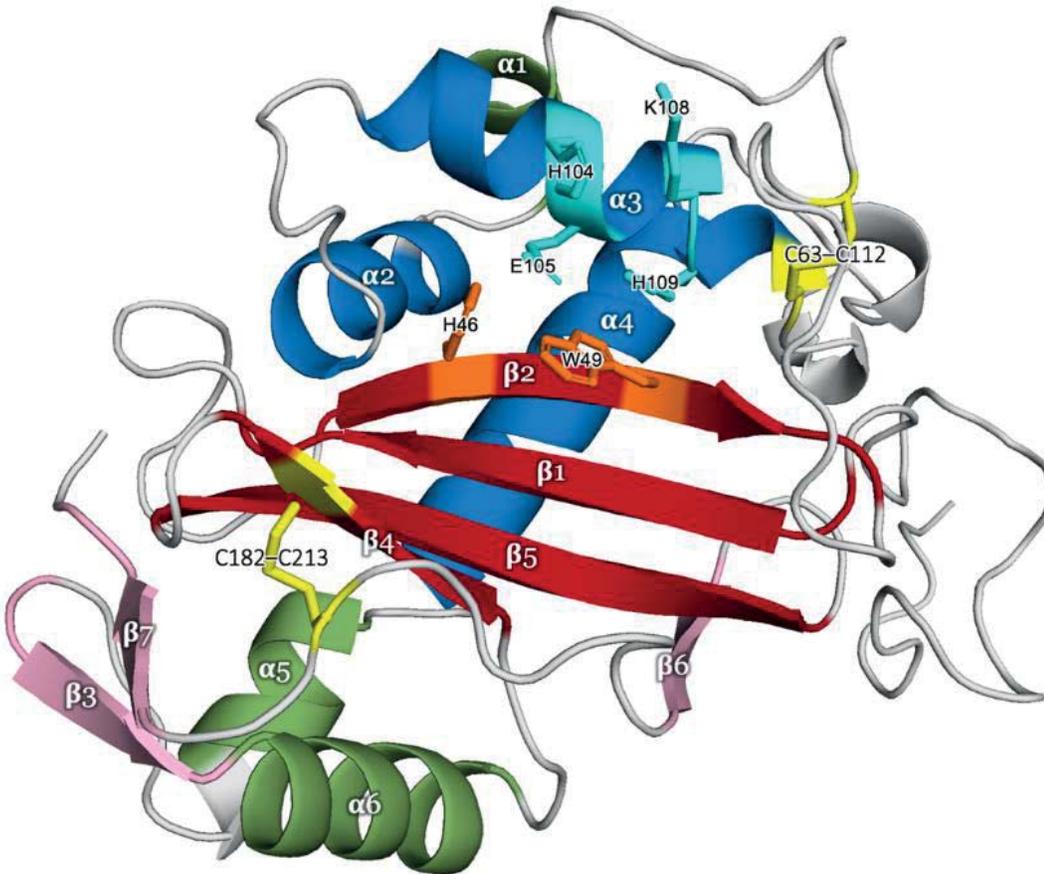


Figura 2. Estructura terciaria de la T2 RNasa de *Rhizopus niveus* (RNasa Rh). Esta enzima posee la estructura tipo ($\alpha+\beta$) característica de las T2 RNasas, presenta seis hélices α ($\alpha1-\alpha6$) y siete hebras β ($\beta1-\beta7$). La hoja plegada central conservada está conformada por las hebras $\beta1$, $\beta2$, $\beta4$ y $\beta5$ (rojo). Las hélices α conservadas son $\alpha2$, $\alpha3$ y $\alpha4$ (azul). También se muestran los residuos de importancia catalítica de los segmentos CAS I (naranja) y CAS II (cian); así como los puentes disulfuro (amarillo) conservados entre las T2 RNasas. Esta figura se generó en PyMOL utilizando la RNasa Rh (PDB 1BOL) como molde.

El sistema de autoincompatibilidad basado en S-RNasas

El amplio estudio de las S-RNasas se debe a su participación en el fenómeno de la AI, el cual es un mecanismo genético que impide que una planta hermafrodita fértil produzca cigotos al autopolinizarse (28). Por lo tanto, éste es un sistema de discriminación y reconocimiento entre el polen propio y el no propio que, al rechazar al polen propio, evita la autofecundación y promueve la variabilidad genética en la descendencia (29). Para que esto ocurra, existe un control genético muy estricto que reside en el *locus* multialélico *S*, dentro del cual están codificadas las determinantes de especificidad alélica –las determinantes S– femenina (pistilo) y masculina (polen), las que se encuentran estrechamente ligadas (28,29).

Uno de los sistemas de AI más distribuidos en las angiospermas es el conocido como “basado en S-

RNasas” (30). Se ha identificado en Solanaceae, Rosaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, Rutaceae y Cactaceae (30-33). En este sistema, el *locus S* codifica una S-RNasa como la determinante S femenina (expresada en el pistilo), y a un gen o un grupo de genes que codifican proteínas con caja F (SLF) (29) como la determinante S masculina (expresada en polen). El resultado de la interacción entre ambas determinantes S da como resultado dos alternativas: (a) rechazo del polen propio (cruza incompatible); o (b) aceptación del polen no propio, permitiendo la fecundación (cruza compatible) (28,34). Otra característica importante de este sistema es que es gametofítico, lo que significa que el fenotipo de reconocimiento del polen está determinado por su propio haplotipo *S* (*i.e.* el haplotipo del gametofito masculino), y no por el genotipo *S* diploide del esporofito que lo originó (Fig. 4) (28), como ocurre en la familia Brassicaceae (29,35). Esto quiere decir que una planta S_1S_2 produce el 50% del polen con el

haplotipo S_1 y el otro 50% con S_2 (Fig. 4), que corresponde al fenotipo de reconocimiento alélico, que es haploide. En el pistilo de esta planta –órgano diploide– se expresan ambos alelos de las S-RNasas (S_1 y S_2), con una interacción de codominancia, por lo que reconocerá a ambos tipos de polen como propios y se rechazarán (Fig. 4). Una cruce compa-

tible sería $S_1S_2 \times S_3S_4$, pues ambos haplotipos de polen, S_3 y S_4 , son diferentes a los alelos presentes en la planta receptora (S_1 y S_2); una cruce $S_1S_2 \times S_2S_3$ sería semicompatible porque el polen con haplotipo S_2 será rechazado (cruce incompatible) y los S_3 será aceptado (cruce compatible) (Fig. 4).

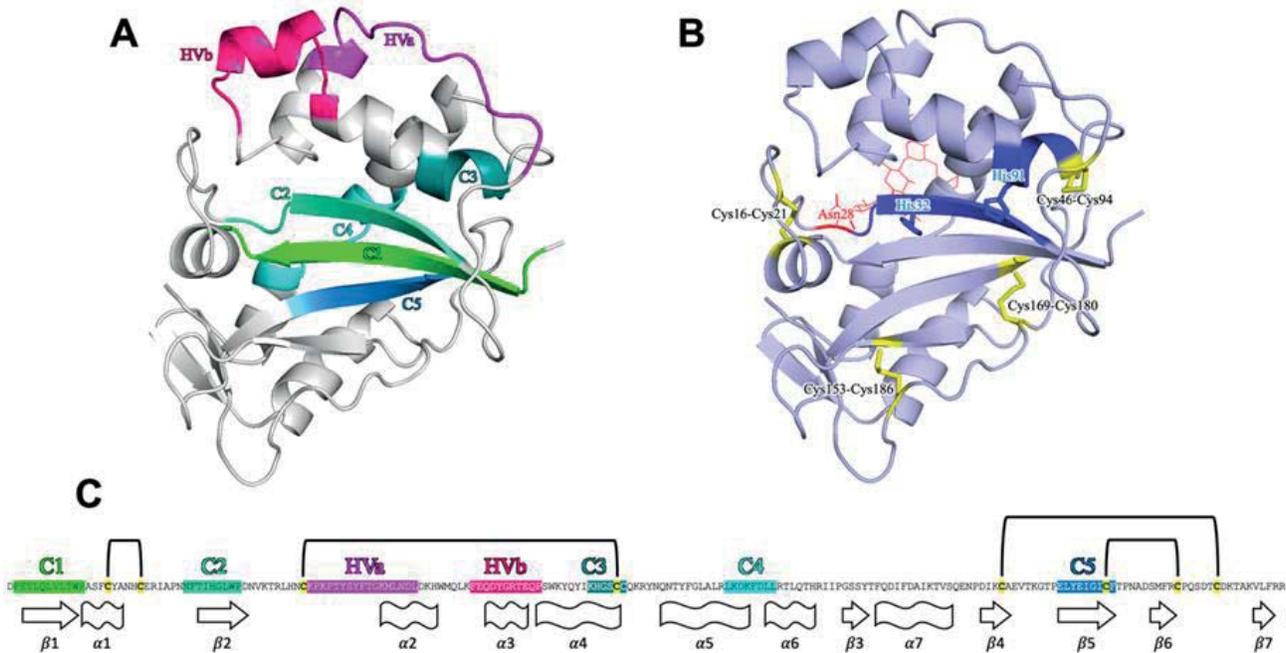


Figura 3. Estructura de las S-RNasas. **A.** Estructura terciaria de la S_{F11} -RNasa, donde se muestran las cinco regiones conservadas (C1, C2, C3, C4, y C5) y las dos regiones hipervariables (HV_a y HV_b) de las S-RNasas. **B.** Estructura terciaria de la S_{F11} -RNasa, donde se observan: (a) el sitio de glicosilación en Asn28 (rojo); (b) los sitios conservados CASI y CASII (azul oscuro), donde se encuentran las histidinas catalíticas His32 e His91; y (c) los ocho residuos de cisteína que forman los cuatro puentes disulfuro (amarillo) que se conservan en todas las S-RNasas. **C.** Estructura primaria de la S_{F11} -RNasa. Las regiones conservadas e hipervariables se encuentran resaltadas con el mismo código de color que en **A.** En amarillo se indica la posición de los ocho residuos de cisteína conservados; los pares de Cys involucrados en puentes disulfuro están conectados por líneas. Debajo de la secuencia también se indican las estructuras secundarias (β 1- β 7 y α 1- α 7). **A** y **B.** Figuras generadas en PyMOL utilizando la S_{F11} -RNasa (PDB 1100) como molde.

La S-RNasa actúa como citotoxina en el tubo polínico al degradar el RNA en una cruce incompatible

En especies que presentan AI basada en S-RNasas, éstas se expresan principalmente en la porción superior del estilo (Fig. 4) –llegando a su máximo en la antesis–. Se secretan a la matriz extracelular del tejido de transmisión (36), que es por donde crecen los tubos polínicos (TP) hacia el ovario (Fig. 5). Su participación en la AI se definió cuando se observó en plantas transgénicas que tanto la presencia de las S-RNasas como su actividad de ribonucleasa resultan esenciales para que ocurra el rechazo del polen alelo S específico (15,37,38). Dada su naturaleza de ribonucleasa (39), se planteó un modelo en el cual las S-RNasas actúan como

citotoxinas al degradar el RNA de los TP incompatibles, inhibiendo así su crecimiento (Fig. 5) (16).

Un reto interesante fue vislumbrar cómo es que en las cruces compatibles se evita la citotoxicidad de las S-RNasas. El modelo conocido como “modelo del receptor” postulaba que las S-RNasas sólo podrían entrar a los TP incompatibles –hipotetizándose que la determinante S masculina sería un receptor– (40). Sin embargo, experimentos subsecuentes demostraron que, sin importar el tipo de polen –compatible o incompatible–, las S-RNasas se incorporan a los TP indiscriminadamente, es decir, las S-RNasas se translocan al citoplasma tanto del polen propio como del no propio (Fig. 5) (41,42). Por lo tanto, dentro del TP debe existir un mecanismo que detoxifique/inhiba a las S-RNasas no propias. Actualmente se sabe que esta misma función la lleva a

cabo la determinante S masculina, que se expresa en el polen (43). Sin embargo, a pesar de que las S-RNasas se incorporan a TP tanto compatibles como incompatibles, no se localizan libres en el citoplasma, sino compartimentalizadas en una vacuola. De manera interesante, esta vacuola se mantiene intacta en los TP compatibles y se degrada en los incompatibles,

liberando a las S-RNasas (Fig. 5), generando como explicación al modelo de compartimentalización (42). Esto implica un control mucho más complejo en el sistema de AI, en el que se sabe que otros genes, denominados genes modificadores, están involucrados para que ocurra el rechazo del polen alelo S específico (29,44).

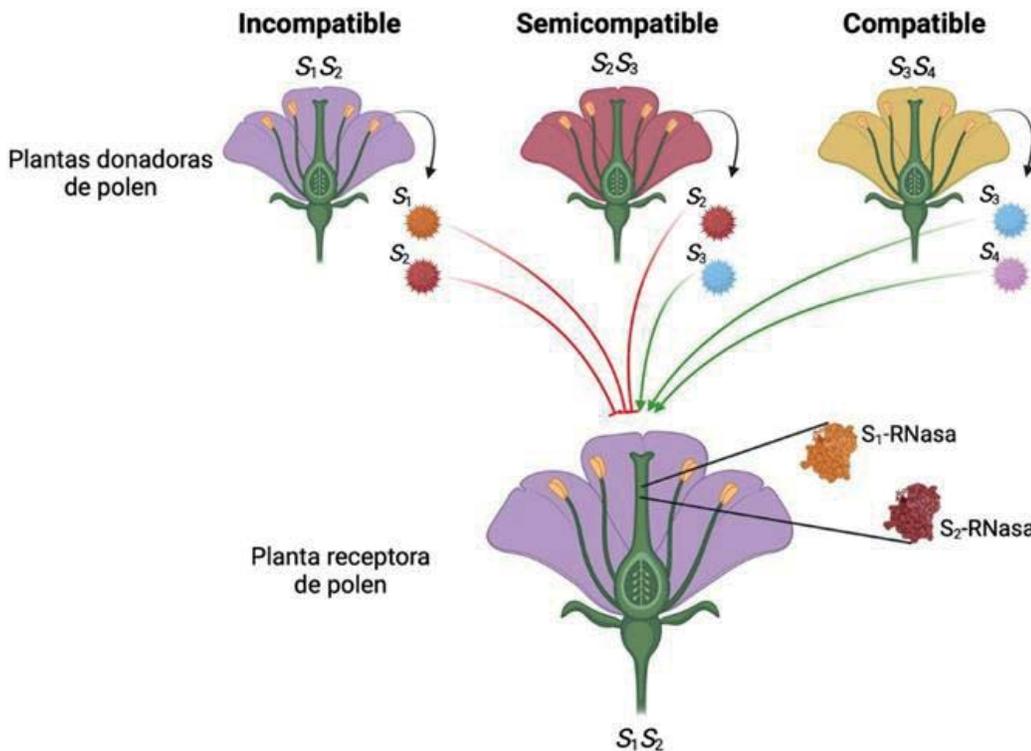


Figura 4. Tipos de cruza en plantas con el sistema de autoincompatibilidad gametofítico, como lo es el basado en S-RNasas. Una planta S_1S_2 expresa en el pistilo (conformado por células diploides) a ambos alelos de la determinante S femenina, en este caso a la S_1 - y a la S_2 -RNasa. En las anteras se producen los granos de polen, que corresponden al gametofito masculino, por lo que son haploides. Cruza incompatible: en una planta S_1S_2 , el 50% del polen tiene el haplotipo S_1 y 50% el haplotipo S_2 . Ambos haplotipos son reconocidos como propios en el pistilo de la planta S_1S_2 y son rechazados. Cruza semicompatible: en una planta S_2S_3 , el 50% del polen tiene el haplotipo S_2 y 50% el haplotipo S_3 . Al cruzarla con la planta S_1S_2 , se distingue entre el polen propio (S_2) para rechazarlo y aceptar al no propio (S_3). Cruza compatible: el genotipo de la planta donadora de polen es S_3S_4 , por lo que todos los granos de polen –tanto S_3 como S_4 – son reconocidos como no propios en una planta S_1S_2 y son aceptados. Figura creada en BioRender.

compatible: en una planta S_2S_3 , el 50% del polen tiene el haplotipo S_2 y 50% el haplotipo S_3 . Al cruzarla con la planta S_1S_2 , se distingue entre el polen propio (S_2) para rechazarlo y aceptar al no propio (S_3). Cruza compatible: el genotipo de la planta donadora de polen es S_3S_4 , por lo que todos los granos de polen –tanto S_3 como S_4 – son reconocidos como no propios en una planta S_1S_2 y son aceptados. Figura creada en BioRender.

La determinante S masculina conduce a la degradación de las S-RNasas no propias

La determinante S masculina es un conjunto de genes *SLF* (*S*-locus *F*-box protein), los cuales codifican proteínas SLF que promueven la degradación de las S-RNasas en las cruza compatibles (45-47). Esto sucede mediante un reconocimiento no propio, es decir, cada SLF reconoce y degrada a las S-RNasas no propias, sin poder reconocer a las S-RNasas propias, modelo conocido como de cooperatividad (47,48). Aunque el mecanismo es bastante complejo, a grandes rasgos, lo que sucede es que SLF forma parte del complejo SCF-ubiquitina ligasa, encargado de poliubiquitinar a las S-RNasas no propias para dirigir su degradación por la vía del proteosoma 26S (Fig. 5) (49-51).

Es interesante que en *Prunus*, la determinante S masculina está determinada por un solo gen (*SFB*)

(52,53), pero en este caso reconoce a las S-RNasas propias y las protege de la degradación. Por lo tanto, la hipótesis es que existe un factor que, de alguna manera, induce la degradación de las S-RNasas no propias, ya que no son protegidas por SFB (53).

Mecanismos de acción de las S-RNasas que implican funciones adicionales a su actividad de ribonucleasa

Además de que las S-RNasas propias actúan como citotoxinas sobre los TP incompatibles debido al simple hecho de ser ribonucleasas, a partir de diversas evidencias provenientes de distintas especies, se sugiere que participan en mecanismos de acción adicionales, haciendo su función más compleja de lo esperado (Fig. 6). Un ejemplo de ello proviene de observaciones de cruza compatibles e incompatibles en *Nicotiana alata*. En esta especie, al incorporarse las S-RNasas a los TP, se localizan, en una

etapa temprana, en compartimentos vacuolares en ambos tipos de cruza (Fig. 5) (42). Más tarde, en cruzas incompatibles se degradan estos compartimentos, liberando las S-RNasas al citosol; mientras que en cruzas compatibles los compartimentos permanecen y las S-RNasas continúan secuestradas –aunque estables– (Fig. 5) (42). A partir de estas observaciones, el modelo de compartimentalización

de la AI postula que la citotoxicidad de las S-RNasas se evita en cruzas compatibles mediante su alojamiento en vacuolas y que alguna pequeña fracción de las S-RNasas se dirige al citosol mediante un transporte retrógrado para interactuar con SLF (42). Esto evidentemente sería distinto a lo que se propone con el modelo de cooperatividad, en el cual la citotoxicidad de las S-RNasas se evita totalmente mediante su degradación.

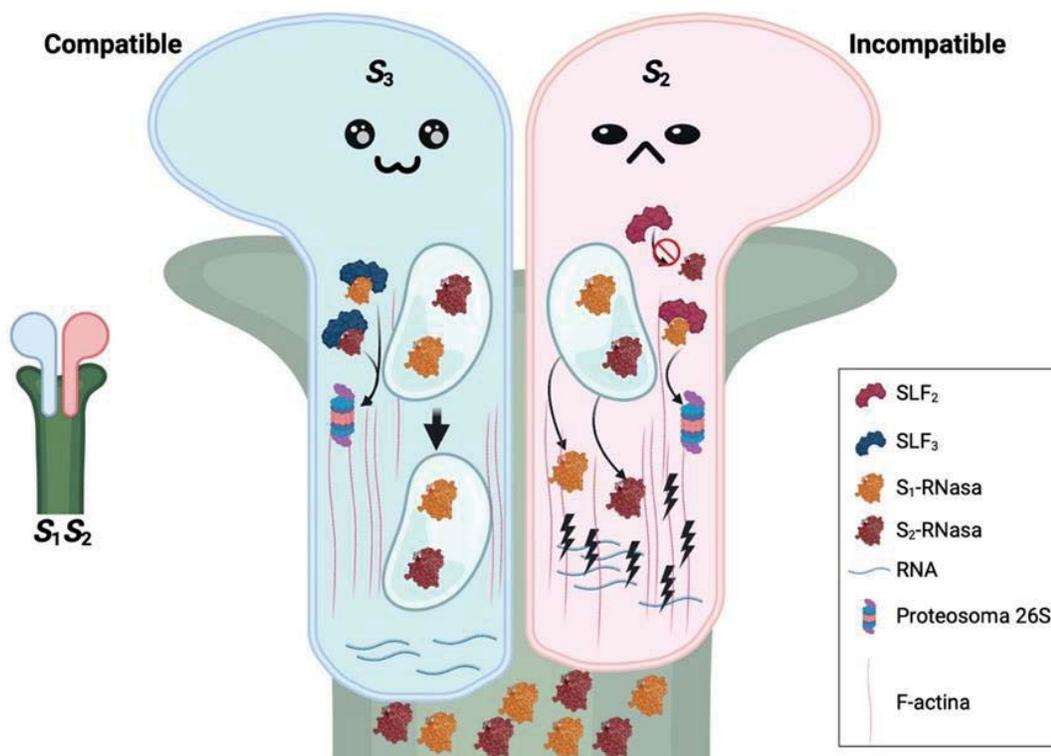


Figura 5. Esquema de algunos de los mecanismos de acción de las S-RNasas en cruzas compatibles e incompatibles. La planta receptora S_1S_2 expresa ambas variantes alélicas de la S-RNasa, las cuales se incorporarán tanto a tubos polínicos con haplotipo S_3 (compatible) como S_2 (incompatible). En ambos casos, en etapas tempranas de la polinización, las S-RNasas se mantienen compartimentalizadas en una vacuola. Una fracción de las S-RNasas en el citosol interactúa con SLF. En el caso de una cruz compatible (polen S_3), SLF_3 reconoce

como no propias a ambas S-RNasas y dirige su degradación vía el proteosoma 26S; de manera paralela, o como se evidencia en el modelo de compartimentalización, la vacuola se mantiene intacta, conteniendo a las S-RNasas. En una cruz incompatible (polen S_2), SLF_2 reconoce como no propia a la S_1 -RNasa, y dirige su degradación, pero no reconoce a la S_2 -RNasa, por lo que no hay interacción y no se degrada; en consecuencia, sería capaz de interactuar y promover la despolimerización de los filamentos de actina. Adicionalmente, la vacuola se degrada y se liberan las S-RNasas al citosol. Las S-RNasas sin degradar más las liberadas en el citosol llevan a cabo su efecto citotóxico sobre el tubo polínico incompatible degradando el RNA. Figura creada en BioRender.

Otro mecanismo de acción adicional de las S-RNasas proviene de la identificación, también en *N. alata*, de una interacción entre la S-RNasa y la tiorredoxina NaTrxh (54). La NaTrxh, codificada por un gen modificador de este sistema de AI, interactúa fuertemente con la S-RNasa *in vitro* y además es capaz de reducirla (54). Esta reducción ocurre únicamente sobre un puente disulfuro de la S-RNasa (Cys155-Cys185 de la S_{C10} -RNasa de *N. alata*) y resulta en un aumento de su actividad de ribonucleasa (55). Es interesante que la actividad de oxidorreductasa de la NaTrxh es esencial para la AI, lo cual indica que el aumento de actividad de ribonucleasa en las S-RNasas también es necesario para

que ocurra el rechazo del polen en cruzas incompatibles (Fig. 6) (55). Además, como el puente disulfuro reducido por la NaTrxh está absolutamente conservado entre todas las S-/T2 RNasas (8,55), podría estar funcionando como interruptor de actividad en las S-RNasas durante el fenómeno de AI.

La función de los puentes disulfuro como interruptores –algunos facilitados por tiorredoxinas– ya se ha observado en otras proteínas, como CD4 (56). Es peculiar el caso de la RNASET2 de humanos, donde una mutación que impide la formación del puente disulfuro homólogo al reducido en la S-RNasa por la NaTrxh produce leucoencefalopatía quística (57).

En diversos trabajos se propone que, además de su actividad de ribonucleasa, las S-RNasas presentan una función de despolimerización sobre el citoesqueleto, en particular sobre los filamentos de actina (Fig. 5 y 6) (58-61), cuya integridad es esencial para el crecimiento apical del TP (Fig. 6) (62). La alteración del citoesqueleto de actina se ha observado *in vivo* durante el rechazo del polen propio en varias especies, sobre todo la evidencia es clara en *Papaver rhoeas*, que presenta un sistema de AI diferente al basado en S-RNasas, pero en el que la despolimerización y rearreglo de la actina es un paso crucial en la cascada de señales que resulta en la muerte celular programada del polen incompatible (29,63). La disrupción de la F-actina ocurre en cruas incompatibles, mas no en compatibles en *N. alata*, y precede a la degradación de la vacuola (Fig. 6) (59).

En los TP de *Pyrus bretschneideri*, las S-RNasas interactúan con la actina independientemente de la variante alélica y también generan la despolimerización del citoesqueleto de actina (Fig. 6) (61). En *P. bretschneideri* también se elucidó la importancia de una prolina conservada durante la interacción S-RNasa-actina, así como una vía que retrasa la señalización de AI hasta que se alcanza un punto de no retorno (61). En *Solanum chacoense* se observó que la interacción entre las S-RNasas y la actina depende del factor de elongación de la traducción eEF1A como intermediario (60). En el mismo estudio se sugiere que la captura de las S-RNasas por eEF1A –hasta su saturación– podría explicar la existencia de un umbral en la cantidad de S-RNasas necesarias para que haya una respuesta de AI. Otra interacción indirecta entre las S-RNasas y la actina se observó durante etapas tempranas de la AI de *Malus domestica*. En este caso se observó que las S-RNasas son capaces de unirse a la proteína de unión a actina, MdMVG, inhibiendo su actividad de corte de actina; esta actividad es necesaria para el crecimiento del TP (Fig. 6) (64).

También se han reportado otros mecanismos de acción distintos o adicionales a los efectos degradativos del RNA que tienen las S-RNasas. En los TP de *Pyrus*, la exposición a S-RNasas genera afectaciones mitocondriales (Fig. 6), colapsando su potencial de membrana, dando como resultado la liberación de citocromo *c* al citosol (65). Además, se observó que las S-RNasas interrumpen la formación de especies reactivas de oxígeno y la localización apical de las mismas, lo cual afecta negativamente el crecimiento del TP mediante la disminución de las corrientes de Ca^{2+} (Fig. 6), la despolimerización de F-actina (Fig. 6) y la degradación del DNA nuclear (65,66). Adicionalmente, en *Pyrus*, se ha

reportado que las S-RNasas inducen la acidificación del citoplasma, lo que resulta en la reducción de la diacilglicerol cinasa 4 (DGK4) y en cambios morfológicos en la vacuola (67). En resumen, todos estos trabajos apoyan la conclusión de que, en última instancia, se desencadena la muerte celular programada de los TP incompatibles y de que las S-RNasas no solo actúan como ribonucleasas en este sistema (61,65,66).

También en *Pyrus* se ha visto que las S-RNasas propias inhiben el crecimiento de los TP al reprimir la cascada de señalización PbABF.D.2-PbLRXA2.1/PbLRXA2.2, la cual estimula el crecimiento de los TP y atenúa el efecto inhibitorio de las S-RNasas estabilizando el citoesqueleto y promoviendo la integridad de la pared celular (68). De manera similar, durante cruas incompatibles, las S-RNasas también reprimen la expresión de genes *COBRA*, involucrados en el crecimiento del TP (Fig. 6), mediante la alteración de la expresión/actividad de factores río arriba (69). Las S-RNasas también suprimen, aunque indirectamente, la expresión de pectin metilesterasas (PME), las cuales a su vez son esenciales en la elongación e integridad de los TP (Fig. 6) (70). La disminución en PME lleva a un incremento en la cantidad de pectinas metil-esterificadas, lo cual induce el hinchamiento de la punta del TP, una característica que presentan durante la respuesta de AI (70).

Otro mecanismo de acción, reportado en *M. domestica*, involucra la unión de la S-RNasa con la pirofosfatasa inorgánica del manzano (MdPPa). Esta interacción genera, mediante una inhibición no competitiva, que se inhiba la actividad de la MdPPa, lo que genera una reducción en el crecimiento del TP al disminuir el fosfato disponible a partir de la ruptura del pirofosfato (Fig. 6); además de que también se inhibe la aminoacilación del tRNA, lo cual interfiere con la traducción de proteínas (71). Así mismo, una investigación reciente propone un mecanismo de acción en el cual las S-RNasas forman condensados (SRC, de *S-RNase condensates*) que son esenciales para la respuesta de AI en *Petunia hybrida* (70). Se postula que en el extremo carboxilo de las S-RNasas, existe un dominio intrínsecamente desordenado, el cual es necesario para la formación de los SRC y es sensible al estado redox (Fig. 6). Los SRC se forman únicamente en cruas incompatibles, ya que las S-RNasas no son degradadas, y su formación es favorecida por un ambiente reductor, así como por los genes modificadores *PhHT-B* y *PhTrxh*. Finalmente, los SRC actúan secuestrando proteínas de unión a actina, lo cual genera la despolimerización del citoesqueleto de actina (Fig. 6) (72).

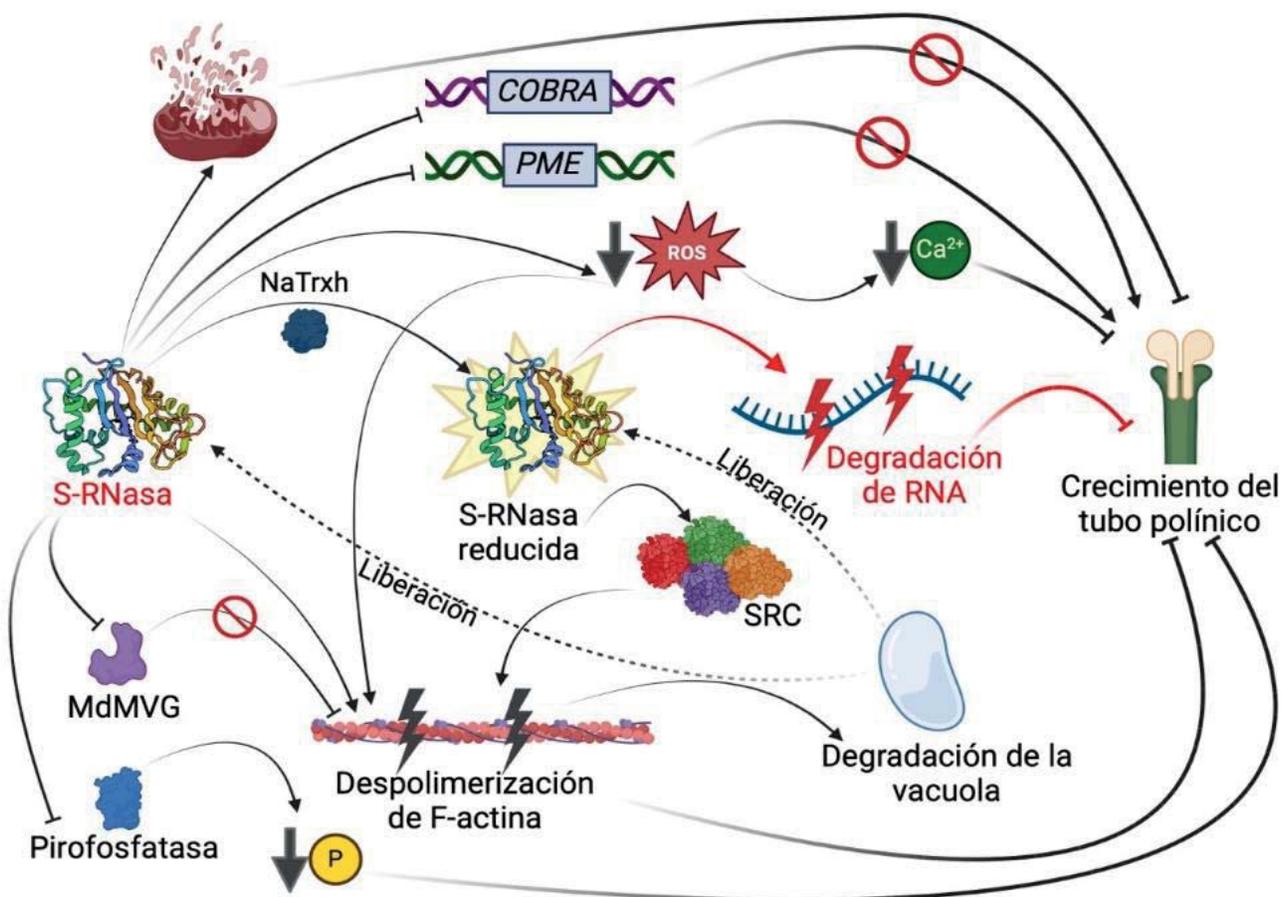


Figura 6. Mecanismos por los cuales las S-RNasas actúan en el rechazo del polen alelo S específico en el sistema de AI basado en S-RNasas. La actividad de ribonucleasa de las S-RNasas es esencial para la inhibición del tubo polínico (flechas rojas). Sin embargo, para que la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa sea suficiente para inhibir el crecimiento del TP incompatible, debe reducirse por la NaTrxh (en *N. alata*; posiblemente también ocurra con la PhTrxh de *P. hybrida*). Este ambiente reductor, a su vez, promueve la formación de los condensados de S-RNasa (SRC), los cuales provocan la despolimerización del citoesqueleto de actina. La integridad de los filamentos de actina es fundamental para el crecimiento apical del tubo polínico. Las S-RNasas pueden, de manera directa, despolimerizar estos filamentos; y de manera indirecta, lo provocan al interactuar e inhibir a MdMVG (proteína de unión a actina). La despolimerización de la actina, además, precede —y es posible que provoque— la degradación de la vacuola, liberando a las S-RNasas (no es claro si se liberan reducidas o no; flechas punteadas) y así ejercer el efecto citotóxico sobre el tubo polínico. Por otro lado, las S-RNasas generan el colapso del potencial membranar de la mitocondria, así como la interrupción de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), afectando las corrientes de Ca^{2+} , así como provocando la despolimerización de los filamentos de actina. Los genes *COBRA* están involucrados en el crecimiento del TP y las S-RNasas reprimen su expresión, al igual que los genes *PME* (pectin metil esterases) —aunque de manera indirecta—. En ambos casos se ve afectado el crecimiento del TP. Finalmente, la unión e inhibición por la S-RNasa sobre la pirofosfatasa (MdPPa de manzano) disminuye la disponibilidad de fosfato, lo que afecta negativamente el crecimiento del TP. Figura creada en BioRender.

Es necesario mencionar que falta información con respecto a la participación de genes modificadores en varios de los mecanismos recién mencionados. Otra cuestión importante por resaltar es la existencia de distintos mecanismos moleculares de la AI basada en S-RNasas. Un ejemplo de esto son los dos mecanismos de AI que se han observado en la familia Rosaceae. Por un lado, en *Prunus* se presenta un reconocimiento propio y hay un solo gen que codifica la determinante S masculina que promueve la citotoxicidad de las S-RNasas propias;

mientras que en *Malus/Pyrus/Sorbus* el reconocimiento es no propio y hay varios genes de la determinante S masculina —como ocurre en Solanaceae— que detoxifican las S-RNasas no propias (73).

Conclusiones

La S-RNasas pertenecen a la familia de las ribonucleasas T2 y se agrupan particularmente en la clase III de las T2 RNasas de plantas. Con respecto

a su estructura terciaria, las S-RNasas son muy similares: conformación tipo ($\alpha+\beta$), con ocho hélices α y siete hebras β . En su estructura primaria se encuentran cinco regiones conservadas y dos hipervariables; aunque esto varía ligeramente en las S-RNasas de Rosaceae. Las S-RNasas funcionan como la determinante S femenina en el sistema de AI basado en S-RNasas. Se expresan en el pistilo y, al ser ribonucleasas, funcionan como citotoxinas dentro de los TP en cruza incompatibles, ya sea porque no son reconocidas por SLF o porque se liberan de la vacuola. En cruza compatibles, dentro de los TP, se evita la citotoxicidad de las S-RNasas al mantenerse compartamentalizadas en una vacuola y/o se detoxifican gracias a las proteínas SLF/SFB, que participan en el reconocimiento de las S-RNasas no propias para promover su degradación por la vía del proteosoma 26S.

Diversos estudios evidencian la posibilidad de que la AI basada en S-RNasas consiste en varias formas de AI en las que la S-RNasa es esencial, pero cuyo mecanismo de acción es variable entre distintas

especies. Estos mecanismos de acción incluyen la compartamentalización vacuolar, la activación por medio de la reducción, la inducción de la despolimerización de F-actina, la formación de condensados, la alteración de la localización apical de las especies reactivas de oxígeno y la represión de la expresión de genes involucrados en el crecimiento del TP. Por lo tanto, estas enzimas, cuya característica distintiva es la actividad hidrolítica sobre el RNA, en realidad también cuentan con otras propiedades que les proveen la capacidad de participar en mecanismos tan complejos y específicos como la reproducción sexual, siendo clave en la distinción y rechazo del polen propio en el sistema de AI en las angiospermas. 

Agradecimientos

El presente trabajo forma parte de la Tesis de Licenciatura (Biología) de EGC con financiamiento PAPIIT-UNAM IN207823 (JAJD), así como apoyo por parte de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Referencias

1. Egami F, Nakamura K. Classification of Enzymes Attacking RNA. En: Microbial Ribonucleases. Molecular Biology Biochemistry and Biophysics, vol 6. Editores: Egami F, Nakamura K. Springer-Verlag New York; 1969. p. 3-6.
2. Deshpande RA, Shankar V. Ribonucleases from T2 family. Crit Rev Microbiol. 2002; 28(2):79-122.
3. Irie M. Structure-function relationships of acid ribonucleases: lysosomal, vacuolar, and periplasmic enzymes. Pharmacol Ther. 1999; 81(2):77-89.
4. Luhtala N, Parker R. T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. Trends Biochem Sci. 2010; 35(5):253-259.
5. Irie M, Ohgi K, Iwama M, Koizumi M, Sasayama E, Harada K, Yano Y, Udagawa J, Kawasaki M. Role of histidine 46 in the hydrolysis and the reverse transphosphorylation reaction of RNase Rh from *Rhizopus niveus*. J Biochem. 1997; 121(5):849-853.
6. Rodriguez SM, Panjikar S, Van Belle K, Wyns L, Messens J, Loris R. Nonspecific base recognition mediated by water bridges and hydrophobic stacking in ribonuclease I from *Escherichia coli*. Protein Sci. 2008; 17(4):681-690.
7. Kurihara H, Nonaka T, Mitsui Y, Ohgi K, Irie M, Nakamura KT. The crystal structure of ribonuclease Rh from *Rhizopus niveus* at 2.0 Å resolution. J Mol Biol. 1996; 255(2):310-320.
8. Tanaka N, Arai J, Inokuchi N, Koyama T, Ohgi K, Irie M, Nakamura KT. Crystal structure of a plant ribonuclease, RNase LE. J Mol Biol. 2000; 298(5):859-873.
9. MacIntosh GC. RNase T2 family: enzymatic properties, functional diversity, and evolution of ancient ribonucleases. En: Nicholson A, editor. Ribonucleases. Nucleic Acids and Molecular Biology. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. p. 89-114.
10. Lv S, Qiao X, Zhang W, Li Q, Wang P, Zhang S, Wu J. The origin and evolution of RNase T2 family and gametophytic self-incompatibility system in plants. Genome Biol Evol. 2022; 14(7):evac093.

11. Igić B, Kohn JR. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(23):13167-13171.
12. Hillwig MS, Liu X, Liu G, Thornburg RW, MacIntosh GC. *Petunia* nectar proteins have ribonuclease activity. *J Exp Bot*. 2010; 61(11):2951-2965.
13. MacIntosh GC, Hillwig MS, Meyer A, Flagel L. RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants. *Mol Genet Genomics*. 2010; 283(4):381-396.
14. Ramanauskas K, Igić B. The evolutionary history of plant T2/S-type ribonucleases. *PeerJ*. 2017; 5:e3790.
15. Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gassert CS, McClure BA. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*. 1994; 367(6463):563-566.
16. McClure BA, Gray JE, Anderson MA, Clarke AE. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*. 1990; 347(6295):757-760.
17. Green PJ. The ribonucleases of higher plants. *Annu Rev Plant Biol*. 1994; 45(1):421-445.
18. Vieira J, Fonseca NA, Vieira CP. An S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system evolved only once in eudicots. *J Mol Evol*. 2008; 67(2):179-190.
19. Ioerger TR, Gohlke JR, Xu B, Kao TH. Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex Plant Reprod*. 1991; 4(2):81-87.
20. Tsai DS, Lee HS, Post LC, Kreiling KM, Kao TH. Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sex Plant Reprod*. 1992; 5(4):256-263.
21. Ida K, Norioka S, Yamamoto M, Kumasaka T, Yamashita E, Newbiggin ED, Clarke AE, Sakiyama F, Sato M. The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* S_{FI1}-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J Mol Biol*. 2001; 314(1):103-112.
22. Matton DP, Maes O, Laublin G, Xike Q, Bertrand C, Morse D, Cappadocia M. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell*. 1997; 9(10):1757-1766.
23. Sassa H, Nishio T, Kowiyama Y, Hirano H, Koba T, Ikehashi H. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol Gen Genet*. 1996; 250(5):547-557.
24. Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar AM, Gradziel TM, Hirano H. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Mol Gen Genet*. 1998; 260(2):261-268.
25. Matsuura T, Sakai H, Unno M, Ida K, Sato M, Sakiyama F, Norioka S. Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *J Biol Chem*. 2001; 276(48):45261-45269.
26. Zisovich AH, Stern RA, Sapir G, Shafir S, Goldway M. The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sex Plant Reprod*. 2004; 17(13):151-156.
27. Ishimizu T, Norioka S, Kanai M, Clarke AE, Sakiyama F. Location of cysteine and cystine residues in S-ribonucleases associated with gametophytic self-incompatibility. *Eur J Biochem*. 1996; 242(3):627-635.
28. de Nettancourt D. (1977). *Incompatibility in Angiosperms*. Springer-Verlag. Berlin. 230 pp.
29. Goring D, Cruz-Garcia F, Franklin-Tong V. Self-incompatibility. *eLS*. 2022; 3(3):1-12.
30. Kao TH, Tsukamoto T. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*. 2004; 16(Supp. 1):S72-S83.
31. Asquini E, Gerdol M, Gasperini D, Igić B, Graziosi G, Pallavicini A. S-RNase-like sequences in styles of Coffea (Rubiaceae). Evidence for S-RNase based gametophytic self-incompatibility? *Trop Plant Biol*. 2011; 4(4):237-249.
32. Liang M, Cao Z, Zhu A, Liu Y, Tao M, Yang H, Xu Q Jr, Wang S, Liu J, Li Y, Chen C, Xie Z, Deng C, Ye J, Guo W, Xu Q, Xia R, Larkin RM, Deng M, Bosch M, Franklin-Tong VE, Chai L. Evolution of self-compatibility by a mutant S_m-RNase in citrus. *Nat Plants*. 2020; 6(2):131-142.
33. Ramanauskas K, Igić B. RNase-based self-incompatibility in cacti. *New Phytol*. 2021; 231(5):2039-2049.
34. de Nettancourt, D. (2001). *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants* (Vol. 3). Springer-Verlag. Berlin. 322 pp.

35. Takayama S, Isogai A. Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2005; 56(1): 467-489.
36. Anderson MA, Cornish EC, Mau SL, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Bonig I, Grego B, Simpson R, Roche PJ, Haley JD, Penschow JD, Niall HD, Tregear GW, Coghlan JP, Crawford RJ, Clarke AE. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature.* 1986; 321(6065):38-44.
37. Lee HS, Huang S, Kao TH. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature.* 1994; 367(6463):560-563.
38. Huang S, Lee HS, Karunanandaa B, Kao TH. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell.* 1994; 6(7):1021-1028.
39. McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke, AE. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature.* 1989; 342(6252):955-957.
40. Kao TH, McCubbin AG. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(22):12059-12065.
41. Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature.* 2000; 407(6804):649-651.
42. Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-García F, McClure B. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature.* 2006; 439(7078):805-810.
43. Fujii S, Kubo KI, Takayama S. Non-self-and self-recognition models in plant self-incompatibility. *Nat Plants.* 2016; 2(9):16130.
44. McClure B, Cruz-García F, Romero C. Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann. Bot.* 2011; 108(4):647-658.
45. Qiao H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y, Xue Y. 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.* 2004; 16(3):582-595.
46. Hua Z, Kao TH. 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.* 2006; 18(10):2531-2553.
47. Kubo KI, Entani T, Takara A, Wang N, Fields AM, Hua Z, Toyoda M, Kawashima SH, Ando T, Isogai A, Kao TH, Takayama S. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science.* 2010; 330(6005):796-799.
48. Sun L, Williams JS, Li S, Wu L, Khatri WA, Stone PG, Keebaugh MD, Kao TH. S-locus F-box proteins are solely responsible for S-RNase-based self-incompatibility of *Petunia* pollen. *Plant Cell.* 2018; 30(12):2959-2972.
49. Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell.* 1996; 86(2):263-274.
50. Entani T, Kubo KI, Isogai S, Fukao Y, Shirakawa M, Isogai A, Takayama S. Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of S-RNase in a solanaceous cross-compatibility reaction. *Plant J.* 2014; 78(6):1014-1021.
51. Liu W, Fan J, Li J, Song Y, Li Q, Zhang YE, Xue Y. SCF(SLF)-mediated cytosolic degradation of S-RNase is required for cross-pollen compatibility in S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Front Genet.* 2014; 5:228.
52. Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell.* 2003; 15(3):771-781.
53. Sonneveld T, Tobutt, KR, Vaughan SP, Robbins TP. Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-Box gene. *Plant Cell.* 2005; 17(1):37-51.
54. Juárez-Díaz JA, McClure B, Vázquez-Santana S, Guevara-García A, León-Mejía P, Márquez-Guzmán J, Cruz-García F. A novel thioredoxin *h* is secreted in *Nicotiana alata* and reduces S-RNase *in vitro*. *J Biol Chem.* 2006; 281(6):3418-3424.
55. Torres-Rodríguez MD, Cruz-Zamora Y, Juárez-Díaz JA, Mooney B, McClure BA, Cruz-García F. NaTrxh is an essential protein for pollen rejection in *Nicotiana* by increasing S-RNase activity. *Plant J.* 2020; 103(4):1304-1317.

56. Hogg PJ. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci.* 2003; 28(4):210-214.
57. Henneke M, Diekmann S, Ohlenbusch A, Kaiser J, Engelbrecht V, Kohlschütter A, Krätzner R, Madruga-Garrido M, Mayer M, Opitz L, Rodriguez D, Rüschemdorf F, Schumacher J, Thiele H, Thoms S, Steinfeld R, Nürnberg P, Gärtner J. RNASET2-deficient cystic leukoencephalopathy resembles congenital cytomegalovirus brain infection. *Nat Genet.* 2009; 41(7):773-775.
58. Liu ZQ, Xu GH, Zhang SL. *Pyrus pyrifolia* stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes in vitro. *Protoplasma.* 2007; 232(1-2):61-67.
59. Roldán JA, Rojas HJ, Goldraij A. Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the in vivo self-incompatibility response in *Nicotiana glauca*. *Ann Bot.* 2012; 110(4):787-795.
60. Souillard J, Boivin N, Morse D, Cappadocia, M. (2014). eEF1A is an S-RNase binding factor in self-incompatible *Solanum chacoense*. *PLoS One.* 2014; 9(2):e90206.
61. Chen J, Wang P, De Graaf BH, Zhang H, Jiao H, Tang C, Zhang S, Wu J. Phosphatidic acid counteracts S-RNase signaling in pollen by stabilizing the actin cytoskeleton. *Plant Cell.* 2018; 30(5):1023-1039.
62. Chebli Y, Geitmann A. Mechanical principles governing pollen tube growth. *Funct Plant Sci Biotechnol.* 2007; 1(2):232-245.
63. Poulter NS, Staiger CJ, Rappoport JZ, Franklin-Tong VE. Actin-binding proteins implicated in the formation of the punctate actin foci stimulated by the self-incompatibility response in *Papaver*. *Plant Physiol.* 2010; 152(3):1274-1283.
64. Yang Q, Meng D, Gu Z, Li W, Chen Q, Li Y, Yuan H, Yu J, Liu C, Li T. Apple S-RNase interacts with an actin-binding protein, MdMVG, to reduce pollen tube growth by inhibiting its actin-severing activity at the early stage of self-pollination induction. *Plant J.* 2018; 95(1):41-56.
65. Wang CL, Xu GH, Jiang XT, Chen G, Wu J, Wu HQ, Zhang SL. S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia* in vitro. *Plant J.* 2009; 57(2):220-229.
66. Wang CL, Wu J, Xu GH, Gao YB, Chen G, Wu JY, Wu HQ, Zhang SL. S-RNase disrupts tip-localized reactive oxygen species and induces nuclear DNA degradation in incompatible pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*. *J Cell Sci.* 2010; 123(24):4301-4309.
67. Kong XX, Mei JW, Zhang J, Liu X, Wu JY, Wang CL. Turnover of diacylglycerol kinase 4 by cytoplasmic acidification induces vacuole morphological change and nuclear DNA degradation in the early stage of pear self-incompatibility response. *J Integr Plant Biol.* 2021; 63(12): 2123-2135.
68. Wu L, Liu X, Zhang MY, Qi KJ, Jiang XT, Yao JL, Zhang SL, Gu C. Self S-RNase inhibits ABF-LRX signaling to arrest pollen tube growth to achieve self-incompatibility in pear. *Plant J.* 2023; 113(3):595-609.
69. Wu L, Xu Y, Qi K, Jiang X, He M, Cui Y, Bao J, Gu C, Zhang S. Self S-RNase reduces the expression of two pollen-specific COBRA genes to inhibit pollen tube growth in pear. *Mol Hortic.* 2023; 3(1):26.
70. Tang C, Wang P, Zhu X, Qi K, Xie Z, Zhang H, Li X, Gao H, Gu T, Gu C, Li S, de Graaf BHJ, Zhang S, Wu J. Acetylation of inorganic pyrophosphatase by S-RNase signaling induces pollen tube tip swelling by repressing pectin methylesterase. *Plant Cell.* 2023; 35(9), 3544–3565
71. Li W, Meng D, Gu Z, Yang Q, Yuan H, Li Y, Chen Q, Yu J, Liu C, Li, T. Apple S-RNase triggers inhibition of tRNA aminoacylation by interacting with a soluble inorganic pyrophosphatase in growing self-pollen tubes in vitro. *New Phytol.* 2018; 218(2):579-593.
72. Tian H, Zhang H, Huang H, Zhang YE, Xue Y. Phase separation of S-RNase promotes self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *J Integr Plant Biol.* 2024; 66(5):986-1006.
73. Matsumoto D, Tao R. Distinct self-recognition in the *Prunus* S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system. *Hort J.* 2016; 85(4):289-305.