

ELŻBIETA BEDNARSKA i MARTA LENARTOWSKA

*Pracownia Biologii Rozwoju
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń
e-mail: ebedn@biol.uni.torun.pl
mlenart@biol.uni.torun.pl*

MECHANIZMY SAMONIEZGODNOŚCI U ROŚLIN KWIATOWYCH

WSTĘP

Procesy płciowe zabezpieczają różnorodność osobniczą wszystkich gatunków zasiedlających Ziemię. Aby zwiększyć szansę na zmienność osobniczą, łączące się podczas zapłodnienia gamety nie powinny pochodzić od tego samego osobnika. Krzyżowe zapłodnienie, dzięki któremu następuje stała wymiana genów między genetycznie odmiennymi osobnikami, warunkuje bowiem większą plastyczność gatunku i umożliwia przystosowanie się do zmiennych warunków środowiskowych. Dlatego też w toku ewolucji przewagę uzyskały te organizmy, które rozmnażają się płciowo drogą zapłodnienia krzyżowego. U większości zwierząt międzyosobnicze zapłodnienie zapewnia rozdzielność płciową, która u wyżej stojących w drabinie ewolucyjnej taksonów jest jedynym sposobem rozmnażania. Dzięki niej męskie i żeńskie gamety produkowane są przez odmiennie genetycznie organizmy. Rozdzielność płciowa nie występuje jednakże aż u ok. 70% okrytonasiennych. Zatem przeważająca liczba najbardziej zaawansowanych w rozwoju roślin wytwarza obupłciowe kwiaty, w których produkowane są zarówno żeńskie, jak i męskie gamety. Skąd zatem bierze się duże, umożliwiające sukces ewolucyjny, zróżnicowanie osobnicze gatunków Angiospermae? U większości obupłciowych roślin kwiatowych powstały mechanizmy, które służą do zabezpieczenia przed samozapłodnie-

niem. Jednym z najpowszechniejszych mechanizmów jest **samoniezgodność** (DE NETTANCOURT 2001). Dzięki samoniezgodności (SI) słupek rozpoznaje czy został zapyłony pyłkiem z własnego kwiatu (wsobnie), czy też pyłkiem od genetycznie innego osobnika (krzyżowo). W zależności od mechanizmu SI zahamowanie wsobnego (niezgodnego) pyłku następuje na powierzchni znamienia lub w szyjce słupka. Jako zgodny rozpoznawany jest pyłek pochodzący z zapylenia krzyżowego i tylko ten wyrasta w łagiewkę pyłkową, która po przerośnięciu szyjki słupka przenosi męski materiał genetyczny do woreczka zalążkowego.

Szacuje się, że ponad 250 000 gatunków Angiospermae posiada system samoniezgodności, który jest determinowany przez jeden lub więcej loci (patrz BEDNARSKA 1992). Ogólnie samoniezgodność dzieli się na heteromorficzną i homomorficzną. Typ heteromorficzny występuje u roślin produkujących obupłciowe, lecz zróżnicowane morfologicznie kwiaty, np. u *Primula*. Samoniezgodność homomorficzną posiadają rośliny, których wszystkie osobniki wytwarzają identyczne kwiaty. W obecnym artykule zostanie omówiona samoniezgodność homomorficzna.

Badania genetyki klasycznej wykazywały, że samoniezgodność homomorficzna jest kontrolowana przez jeden wieloalleliczny gen *S*, który ulega ekspresji w organach generatyw-

nych, decydując o fenotypie słupka i pyłku. W przypadku, gdy zapylenie prowadzi do spotkania się pyłku i słupka o tym samym fenotypie SI następuje zahamowanie rozwoju męskiego gametofitu. Przez dziesięciolecia trudno było wyjaśnić w jaki sposób białka będące produktem ekspresji tego samego genu prowadzą do rozpoznania i odrzucenia niezgodnego pyłku. W połowie ubiegłego wieku zaobserwowano, że drogą mutagenезы można uzyskać niezależnie samozgodne mutanty żeńskie (mutanty „słupkowe”), czyli produkujące niezgodny pyłek, lecz pozbawione zdolności jego zahamowania, oraz samozgodne mutanty męskie, tj. wytwarzające słupki zdolne do dyskryminacji

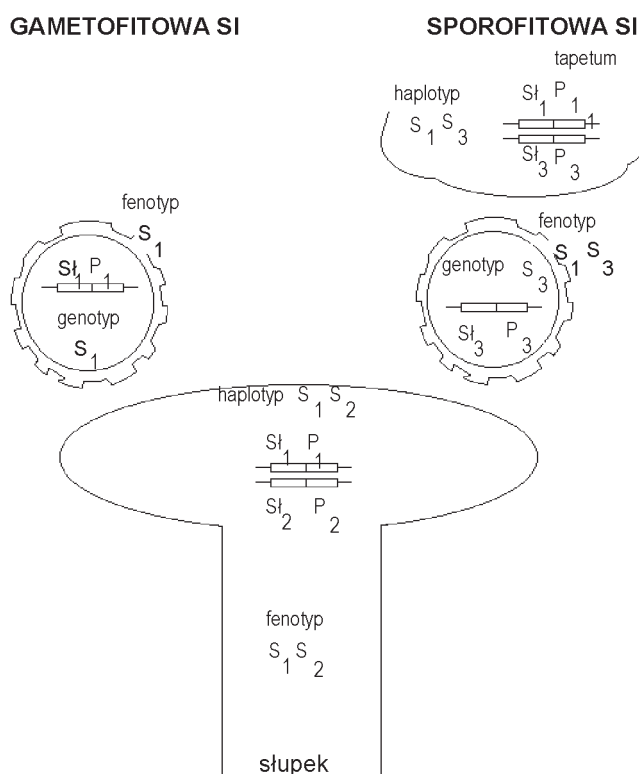
pyłku i samozgodny pyłek (mutanty „pyłkowe”). Aby wyjaśnić to zjawisko założono, że gen *S* zbudowany jest z trzech obszarów: (1) wspólnego dla pyłku i słupka, który jest odpowiedzialny za zróżnicowanie alleliczne genu, (2) specyficznego dla pyłku i (3) specyficznego dla słupka, które ulegają ekspresji tylko w męskim lub żeńskim organie rozmnażania (KNOX 1984). Jednakże dopiero rozwój metod biologii molekularnej pozwolił na poznanie genetycznej kontroli SI oraz przybliżył zrozumienie złożonych mechanizmów funkcjonowania tego procesu.

GENETYCZNA DETERMINACJA SAMONIEZGODNOŚCI

Badania samozgodnych „słupkowych” i „pyłkowych” mutantów oraz eksperymenty na roślinach transgeniczných ujawniły, że fenotypy SI pyłku i słupka są determinowane przez różne geny zlokalizowane w jednym locus (Ryc. 1). Obecnie wiadomo, że w locus *S* występują co najmniej dwa wieloalleliczne geny, z których jeden determinuje fenotyp *S* słupka, a drugi – pyłku. W odcinku locus *S* występuje supresja segregacji, zatem wszystkie geny dziedziczą się jako jedna jednostka. Z tego też powodu nie były wykrywane przy zastosowaniu

metod genetyki klasycznej. Ponieważ locus *S* jest kompleksem wielogenowym, na określenie jego różnych wariantów wprowadzono pojęcie „haplotyp”. Terminu „allel” używa się natomiast dla rozróżnienia wariantów poszczególnych genów obecnych w locus *S* (MCCUBBIN i KAO 2000).

Fenotyp *S* słupka determinowany jest przez podwójny haplotyp, bowiem ekspresja słupkowego genu *S* ma miejsce w diploidalnych komórkach szlaku transmisyjnego. Występują tam zatem typowe zależności dominacji,



Ryc. 1. Genetyczna determinacja samoniezgodności (SI) obupłciowych roślin kwiatowych.

Za SI odpowiada wielogenowy kompleks zlokalizowany w locus *S*, który funkcjonuje jako pojedyncza jednostka dziedziczna. Różne *S*-loci nazywane są haplotypami, termin allele używa się do określenia różnych wariantów pojedynczego polimorficznego genu obecnego w locus *S*. Diploidalne komórki słupka oraz pylnika wyposażone są w podwójny haplotyp *S*, w komórkach pomejotycznych (pyłku/łagiewce pyłkowej) występuje haplotyp pojedynczy. W locus *S* obecne są co najmniej dwa geny: pierwszy ulega ekspresji w diploidalnych komórkach słupka (SI) i determinuje fenotyp *S* żeńskiego organu rozmnażania, drugi (*P*), który determinuje fenotyp *S* męskiego gametofitu, podlega ekspresji bądź w pyłku/łagiewce pyłkowej – samoniezgodność gametofitowa (GSI), bądź w diploidalnych komórkach pylnika – samoniezgodność sporofitowa (SSI) (wg MCCUBBINA i KAO 2000).

współdominacji i recesji poszczególnych haplotypów *S*. Bardziej skomplikowana sytuacja występuje w sposobie determinacji fenotypu *S* pyłku (Ryc. 1). Decyduje o nim bądź diploidalny genotyp rośliny macierzystej, bądź haploidalny genotyp ziarna pyłku. Biorąc pod uwagę sposób determinacji fenotypu *S* pyłku samoniezgodność dzieli się na gametofitową (GSI) i sporofitową (SSI). Samoniezgodność gametofitowa występuje u tych gatunków roślin, u których fenotyp pyłku jest wynikiem ekspresji genu *S* występującego w pojedynczym haplocyplu pyłku. Natomiast w samoniezgodności sporofitowej fenotyp pyłku determinuje ekspresja obydwu alleli genu *S*, obecnego w podwójnym haplocyplu sporofitowych tkanek pylnika, głównie w tapetum. W

tym przypadku o fenotypie pyłku decyduje, podobnie jak w słupku, zjawisko dominacji i współdominacji haplotypów *S*.

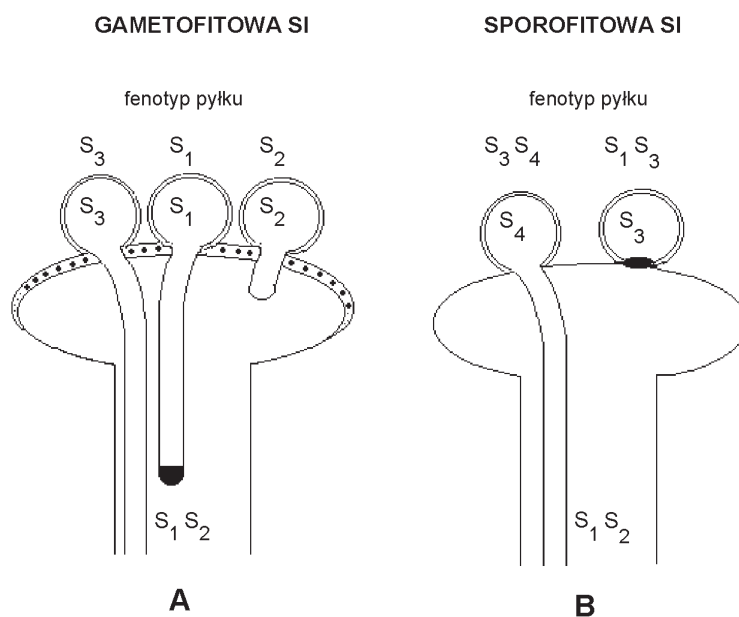
W artykule przedstawiono molekularne podstawy rozpoznania i odrzucenia niezgodnych ziaren pyłkowych u obupłciowych roślin kwiatowych, u których występuje homomorficzny typ samoniezgodności. Dotychczasowe badania pozwoliły poznać funkcjonowanie trzech różnych sposobów dyskryminacji wsobnych ziaren pyłkowych. U roślin posiadających gametofitową SI opisano dwa mechanizmy określane jako: (1) typ Solanaceae i (2) typ Papaveraceae, natomiast u roślin ze sporofitową SI znany jest jeden mechanizm występujący u Brassicaceae.

SAMONIEZGODNOŚĆ GAMETOFITOWA

TYP SOLANACEAE

Samoniezgodność typu Solanaceae została dotąd opisana u 3 rodzin Angiospermae: Rosaceae, Solanaceae i Scrophulariaceae. Ten typ

samoniezgodności jest prawdopodobnie najstarszym mechanizmem dyskryminacji wsobnych ziaren pyłku, pojawił się bowiem bardzo wcześnie u przodków obecnie żyjących roślin kwiatowych.



Ryc. 2. Rozpoznanie i hamowanie niezgodnych ziaren pyłkowych.

A. W GSI jako niezgodny rozpoznawany jest pyłek, którego haplotyp *S* (i tym samym fenotyp) jest identyczny jak jeden z dwu haplotypów *S* słupka ($S_1 S_2$). W GSI typu Solanaceae (pyłek S_1) zahamowanie rozwoju męskiego gametofitu ma miejsce dopiero w górnej części szyjki słupka, natomiast w typie Papaveraceae (pyłek S_2) – już w znamieniu. W słupku rosną tylko te ziarna pyłkowe, których haplotyp (S_3) jest różny od obydwu haplotypów słupka ($S_1 S_2$). B. W SSI za niezgodny uznany zostaje pyłek wytworzony przez roślinę, która posiada co najmniej jeden haplotyp ($S_1 S_3$) tożsamy z jednym z dwu haplotypów słupka ($S_1 S_2$). Zahamowanie rozwoju pyłku odbywa się na powierzchni znamienia, łagiewka nie wrasta do słupka. Słupki penetrują łagiewki ziaren pyłkowych produkowanych przez roślinę, której obydwie haplotypy ($S_3 S_4$) są różne od haplotypów słupka (wg DE NETTANCOURTA 2001).

Mechanizm rozpoznania i dyskryminacji pyłku w gametofitowej samoniezgodności typu Solanaceae funkcjonuje w górnej części szyjki słupka (Ryc. 2A). Po zapyleniu na znamieniu kielkuje zarówno pyłek zgodny, jak i niezgodny – wszystkie łagiewki wrastają do szyjki słupka. Jednakże już w podznamieniowej części szyjki rozpoczyna się hamowanie wzrostu łagiewek, które mają ten sam haplotyp co słupek i są rozpoznane jako niezgodne. Zatrzymanie ich wzrostu jest efektem działania produktu genu *S* słupka, który ze szlaku transmisyjnego wnika do cytoplazmy łagiewek pyłkowych.

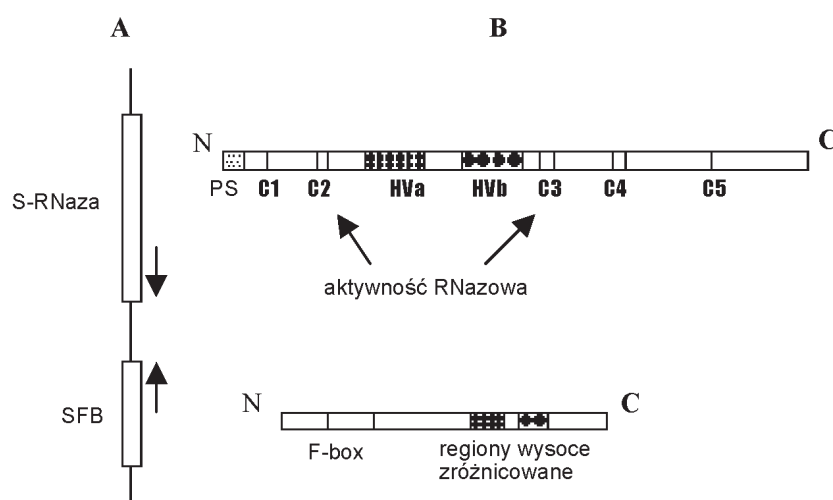
Determinanty samoniezgodności

W locus *S* roślin posiadających GSI typu Solanaceae zlokalizowano jak dotąd dwa geny – je-

plotype specific F-box protein) (USHIJIMA i współaut. 2003). Produktem genu *S* pyłku jest cytozolowe białko funkcjonujące prawdopodobnie jako inhibitor RNazy.

Białko specyficzne dla słupka, które segreguje zgodnie z haplotypem *S* i determinuje jego fenotyp samoniezgodności zostało zidentyfikowane już w 1986 r. (ANDERSON i współaut. 1986). Aktywność słupkowych białek *S* w wywoływaniu samoniezgodności została wielokrotnie potwierdzona eksperymentalnie. Zarówno oczyszczone białka *S*, jak i wyizolowane ekstrakty słupkowe w sposób specyficzny dla haplotypu hamują rosnące *in vitro* łagiewki pyłkowe (MCCUBBIN i KAO 2000).

Obecnie znanych jest kilkadziesiąt białek *S* będących wynikiem ekspresji wielu alleli genu *S* u różnych gatunków, m.in. *Nicotiana glauca*, *Petunia inflata*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon peruvianum*, *Prunus dulcis* (MCCU-



Ryc. 3. Schemat budowy locus *S* i białek *S* u roślin posiadających GSI typu Solanaceae.

A. W locus *S* zlokalizowane są dwa geny, aktywny w słupku gen *S-RNazy* oraz ulegający ekspresji w pyłku gen *SFB*. Strzałki pokazują kierunek transkrypcji. B. Gen *S-RNazy* koduje białko zawierające peptyd sygnałowy (PS), 5 domen konserwowanych (C1–C5), z których dwie (C2 i C3) odpowiadają centrum aktywnemu RNazy oraz dwa regiony wysoce zróżnicowane (HV a i HV b) odzwierciedlające alleliczny polimorfizm genu. C. W genie *SFB* wyróżnia się konserwowane sekwencje kodujące domenę F-box oraz dwa regiony wysoce zróżnicowane, prawdopodobnie uczestniczące w rozpoznaniu *S-Rnazy* (wg MCCUBBINA i KAO 2000, USHIJIMAY i współaut. 2003).

den determinuje fenotyp *S* słupka, drugi – pyłku (Ryc. 3A). Słupkowy gen *S* koduje wydzielnicze białko o aktywności rybonukleazy, stąd nosi nazwę *S-RNazy*. Gen ten zidentyfikowano u wszystkich do tej pory badanych roślin (MCCUBBIN i KAO 2000). S-haplotypową specyficzność pyłku kontroluje odkryty dopiero w tym roku u dwu gatunków *Prunus* gen, który nazwano *SLF* (ang. S-locus F-box) (ENTANI i współaut. 2003) lub *SFB* (ang. S-ha-

BBIN i KAO 2000, CERTAL i współaut. 2002). Gen *S* ulega ekspresji w komórkach transmisyjnych szyjki słupka, a dojrzałe białka *S* lokalizuje się na terenie apoplastu szlaku transmisyjnego, głównie w górnej części słupka, tj. na drodze wzrostu łagiewek pyłkowych w strefie ich hamowania (MCCUBBIN i KAO 2000).

Białka *S* są wysoce polimorficzne, ich masa cząsteczkowa u Solanaceae waha się od 22 kDa do 34 kDa (MCCUBBIN i KAO 2000), a u *Prunus*

dulcis ok. 40 kDa (CERTAL i współaut. 2002). Porównanie różnych białek S ujawniło, że zróżnicowanie ich sekwencji aminokwasowych może być bardzo duże, wynosi bowiem od 4% do 65% (MATTON i współaut. 1997). Co ciekawe, białka S różnych gatunków mogą być bardziej podobne do siebie aniżeli białka S tego samego gatunku.

Pomimo tak dużego zróżnicowania ogólny plan budowy białek S jest podobny (Ryc. 3B). Wszystkie białka S są zasadowymi N-glikozylowanymi glikoproteinami, w których wyróżnić można 5 regionów konserwowanych i 1 lub 2 regiony wysoce zróżnicowane. Na N-końcu występuje krótki peptyd sygnałowy, który jest nieobecny w dojrzałym białku, co wskazuje, iż są to białka o charakterze wydzielniczym (KAO i HUANG 1994, MATSUURA i współaut. 2001, ZUCCHERELLI i współaut. 2002).

Wyodrębnione regiony konserwowane określa się jako: C1, C2, C3, C4 i C5. Większość obecnych tam aminokwasów ma charakter hydrofobowy i prawdopodobnie tworzą one część rdzeniową dojrzałego białka. Dokładna analiza sekwencji aminokwasowej ujawniła, że w konserwowanych regionach C2 i C3 zlokalizowane są sekwencje, które występują w centrum aktywnym grzybowego enzymu rybonukleazy Rh, należącego do rodziny T2 RNaz (MCCLURE i współaut. 1989, KAO i HUANG 1994, MATSUURA i współaut. 2001, CERTAL i współaut. 2002). W regionach C2 i C3 zlokalizowane są dwie reszty histydyny, które są odpowiedzialne za katalityczną funkcję RNazy. Zatem produktem genu S słupka, który determinuje jego fenotyp S, jest białko posiadające aktywność RNazy. Dalsze badania ujawniły, że aktywność RNazowa białek S jest konieczna do wywołania reakcji samoniezgodności. Eksperymenty ze zmodyfikowanymi białkami S, w których regiony odpowiedzialne za ich enzymatyczną funkcję zostały zmutowane, pokazały, że białka pozbawione rybonukleazowej aktywności nie są zdolne do wywołania odpowiedzi samoniezgodności. Mutanty *Petunia inflata* transformowane genem S_3 , w którym kodon histydyny odpowiedzialnej za funkcję katalityczną RNazy został zmieniony na kodon asparaginy, nie były zdolne do zahamowania wzrostu niezgodnych łagiewek pyłkowych, tj. o genotypie S_3 (HUANG i współaut. 1994, MCCUBBIN i współaut. 1997).

Który z RNA łagiewki pyłkowej jest substratem dla S-RNazy nie zostało jeszcze ostatecznie wyjaśnione. Bierze się pod uwagę zarówno

rRNA, jak i mRNA (MCCUBBIN i KAO 2000). Istnieją dowody, iż łagiewki pyłkowe nie syntetyzują rRNA oraz, że ich wzrost nie wymaga transkrypcji nowego mRNA. Synteza białek oparta jest na składnikach, które powstają podczas dojrzewania pyłku w pylniku (MASCARENHAS 1993). W sytuacji braku nowych transkryptów degradacja któregośkolwiek z RNA prowadzi do zatrzymania biosyntezy białek i zahamowania wzrostu łagiewki.

Regiony wysoce zróżnicowane S-RNazy odzwierciedlają alleliczny polimorfizm genu S i są odpowiedzialne za haplotypową specyficzność słupka (MCCUBBIN i KAO 2000, MATSUURA i współaut. 2001). U Solanaceae wstępują dwa takie regiony (nazywane HVa i HVb, ang. hypervariable), natomiast u Rosaceae jeden (odpowiadający sekwencją aminokwasową HVa Solanaceae). Występujące tam dodatkowo naładowane aminokwasy są silnie hydrofilowe, dzięki czemu mogą być ekspozowane na powierzchni dojrzałego białka S. Obecność hydrofilowych, wysoce zróżnicowanych sekwencji na powierzchni białka S słupka została ostatnio potwierdzona metodami krystalograficznymi u *Prunus dulcis* (MATSUURA i współaut. 2001). Taka lokalizacja regionów HV sugeruje, że odgrywają one ważną rolę w interakcji z produktem genu S pyłku i uczestniczą w jego rozpoznaniu w sposób zależny od haplotypu. Dowody na to, iż regiony HV są odpowiedzialne za haplotypową specyficzność reakcji samoniezgodności pochodzą z badań roślin transgenicznych. Rośliny, które transformowano chimerycznym genem *S-RNazy*, tj. posiadającym regiony HVa i HVb innego allelu aniżeli allel wyjściowy, uzyskiwały fenotyp odpowiadający sekwencji nowo wprowadzonych regionów HV. Na przykład rośliny z chimerycznym genem $S_{11,13}$, w którym regiony HV pochodziły od allelu S_{13} , a pozostała część białka od allelu S_{11} , zatrzymywały wzrost łagiewek pyłkowych o haplociepie S_{13} , lecz nie hamowały pyłku S_{11} (VERICA i współaut. 1998). W haplotypowej specyficzności S-RNazy nie uczestniczą reszty cukrowe glikoproteiny. Wymiana glikozylowanej asparaginy na aminokwas nie podlegający glikozylacji nie miała żadnego wpływu na rozpoznanie i odrzucenie niezgodnych ziaren pyłkowych (KARUNANANDAA i współaut. 1994).

Zrozumienie molekularnego mechanizmu działania słupkowej S-RNazy w dyskryminacji wsobnego pyłku wymagało poznania produktu genu S pyłku. Próbuje się wyjaśnić udział

białek S pyłku w funkcjonowaniu opartego na RNazie systemu samoniezgodności stworzono dwa hipotetyczne modele (MCCUBBIN i KAO 2000). Model pierwszy zakładał, że produktem genu *S* pyłku jest zlokalizowany w błonie łagiewki transbłonowy receptor/przenośnik, który w haplotypowo specyficzny sposób transportuje S-RNazę do łagiewki pyłkowej. Według drugiego, alternatywnego modelu produkt genu *S* pyłku funkcjonuje jako cytoplazmatyczny inhibitor hamujący aktywność wszystkich S-RNaz, które nie pochodzą od tego samego haplotypu. Wyjaśnienie, który z tych modeli jest prawdziwy nie było możliwe przed identyfikacją i charakterystyką genu *S* pyłku. Założono, że poszukiwany gen musi: (1) być zlokalizowany w locus *S*, (2) segregować zgodnie z haplotypem *S*, (3) posiadać wysoce zróżnicowane sekwencje specyficzne dla haplotypu *S*, (4) jego ekspresja powinna być specyficzna dla pyłku. Pierwsze próby odnalezienia genu *S* w pyłku podjęto u *Petunia hybrida* (SIMS i ORDANIC 2001). W pobliżu genu *S-RNazy* ujawniono gen, który ulegał specyficznej ekspresji tylko w pyłku. Kodowane przez niego białko nazwano PhSBP1 (ang. *Petunia hybrida* S-binding protein). Białko to wiązało się z dużą specyficznością ze słupkową S-RNazą, co sugerowało że może uczestniczyć w reakcji SI. Wiązanie PhSBP1 z S-RNazą nie było jednakże haplotypowo specyficzne. Ten fakt raczej wyklucza, iż jest to produkt genu *S*. Być może białko to pełni rolę pomocniczą w regulacji S-RNazy słupkowej.

Identyfikacja genu *S* pyłku zakończyła się sukcesem dopiero w tym roku u dwu gatunków *Prunus* (USHIJIMA i współaut. 2003, ENTANI i współaut. 2003). W odcinku DNA zawierającym locus *S* udało się odnaleźć gen, który spełniał wszystkie kryteria genu *S* (gen *SLF/SFB*). Prawdopodobny pyłkowy gen *S* zlokalizowany jest wewnątrz locus *S* i w zależności od haplotypu jego fizyczna odległość od genu *S-RNazy* wynosi od 1.6 kb do > 10 kb. W kodowanym przez niego białku nie zidentyfikowano peptydu sygnałowego, co wskazuje, iż jest to białko funkcjonujące na terenie cytozolu (Ryc. 3B). W kierunku N-końca białko SLF/SFB posiada jeden konserwowany region zawierający charakterystyczny motyw zwany F-box. Białka z motywem F-box są składnikami enzymu ligazy E_3 typu SCF i wchodzi w skład kompleksu, który katalizuje ubiquitytację białek przeznaczonych do trawienia w proteosomach. Obecność motywu F-box stanowi

mocny argument na rzecz hipotezy, że białko *S* pyłku funkcjonuje jako inhibitor S-RNazy, uczestnicząc w jego degradacji.

Analiza wydedukowanej sekwencji aminokwasowej ujawniła wysoki, porównywalny do S-RNazy, polimorfizm białka kodowanego przez gen *SFB*. Specyficzne dla haplotypu zróżnicowanie sekwencji wynosiło od 22,6% do 31,6%. Na tak wysoki polimorfizm białek kodowanych przez różne allele *S* pyłku składa się szereg krótkich, zróżnicowanych sekwencji znajdujących się w całym łańcuchu oraz, przede wszystkim, obecność dwu wysoce zróżnicowanych regionów w kierunku C-końca białka. Regiony te są zapewne odpowiedzialne za alleliczną specyficzność białek *S* pyłku. Ich rola wydaje się być zatem porównywalna do regionów HV w S-RNazie. Zawierające hydrofilowe aminokwasy regiony wysoce zróżnicowane białka SFB są prawdopodobnie wyeksponowane na powierzchni pofałdowanego białka i odgrywają istotną rolę w rozpoznaniu S-RNazy.

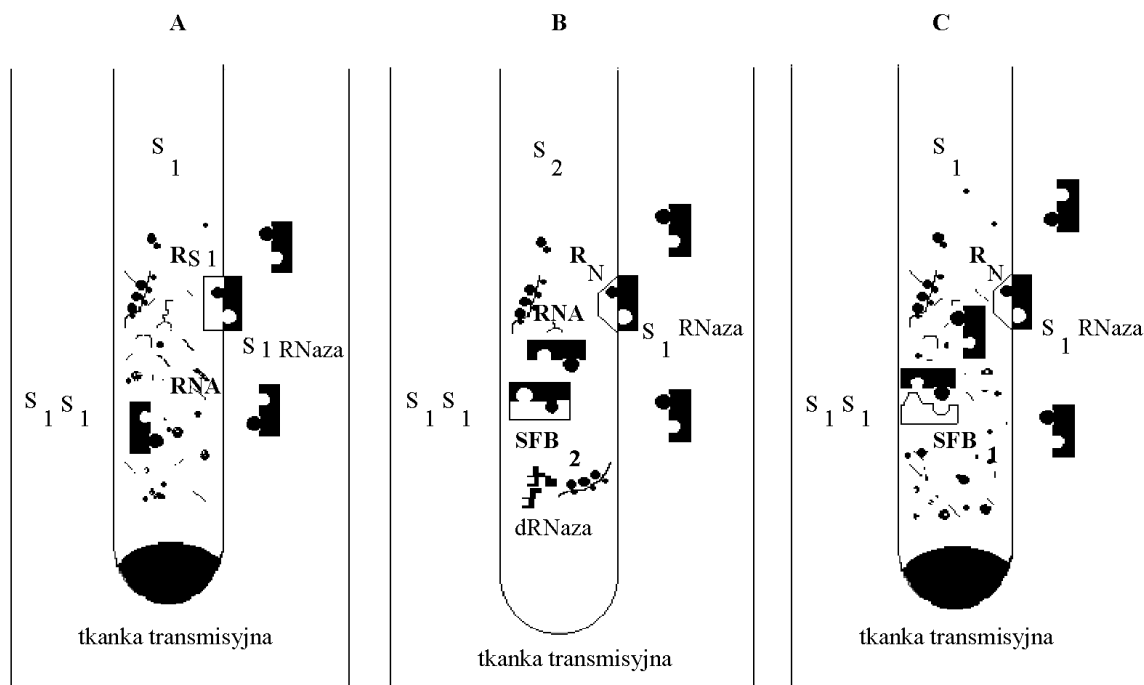
Gen *SLF/SFB* ulega specyficznej ekspresji w dojrzewających i kielkujących ziarnach pyłkowych badanych gatunków *Prunus*. W innych organach, np. w słupku czy liściach, gen nie jest aktywny (ENTANI i współaut. 2003, USHIJIMA i współaut. 2003). Pozostaje to w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami, że u tych roślin fenotyp *S* pyłku jest determinowany gametofitowo. Zatem na obecnym etapie badań gen *SLF/SFB* jest najpoważniejszym kandydatem na gen *S* pyłku w samoniezgodności opartej na S-RNazie. Dowodów na taką jego funkcję mogą dostarczyć, podobnie jak w przypadku S-RNazy, badania z użyciem roślin transgenicznych.

Model molekularnego funkcjonowania GSI typu Solanaceae

Informacje dotyczące budowy locus *S* oraz udowodnione (w przypadku S-RNazy) i przypuszczalne (dla białka SFB/SLB) działanie produktów słupkowego i pyłkowego genu *S*, stały się podstawą do stworzenia hipotetycznego modelu molekularnego funkcjonowania SI typu Solanaceae (MCCUBBIN i KAO 2000, USHIJIMA i współaut. 2003). Model zakładający, że produkt genu *S* jest zlokalizowanym w błonie łagiewki receptorem/przenośnikiem S-RNazy opierał się na założeniu, że jej wnikiwanie do łagiewki jest specyficzne dla haplotypu i słupkowa S-RNaza penetruje tylko niezgodne

łagiewki pyłkowe (Ryc. 4A). Po wnikięciu do cytoplazmy enzym degraduje RNA łagiewki pyłkowej i dochodzi do zatrzymania jej wzrostu. Jednak badania immunocytochemiczne ujawniły, że słupkowa S-RNaza jest pobierana przez każdą łagiewkę pyłkową, która rośnie w

wych. W cytoplazmie łagiewki obecny jest produkt genu *S* pyłku, który ma właściwości odróżniania i regulacji aktywności S-RNazy. Produktem tym jest białko SLF/SFB, posiadające domenę specyficzną dla haplotypu (regiony wysoce zróżnicowane) oraz domenę inhibitorową,



Ryc. 4. Molekularny mechanizm hamowania niezgodnego pyłku w GSI typu Solanaceae.

A. Model receptorowy. Pobieranie S-RNazy do łagiewki pyłkowej jest allelo-specyficzne i ma miejsce tylko w przypadku, gdy haplotyp słupka i pyłku są takie same. Pyłkowy produkt genu *S* funkcjonuje jako błonowy receptor (R_{S1}), który rozpoznaje słupkową S-RNazę (S_1 -RNazę) i uczestniczy w jej transporcie do cytoplazmy niezgodnej łagiewki. Efektem aktywności słupkowej S-RNazy jest degradacja RNA łagiewki i zatrzymanie jej wzrostu. B, C. Model inhibitorowy. Słupkowa S-RNaza wnika niespecyficznie do cytoplazmy łagiewki, zarówno zgodnej (B), jak i niezgodnej (C). B. Gdy haplotyp słupka (S_1S_1) jest inny aniżeli pyłku (S_2), produkt genu *S* pyłku działa jako inhibitor S-RNazy (SFB_2), który uczestniczy w ubikwitynozależnej lizie S_1 -RNazy (dRNaza-zdegradowana S-RNaza). C. Jeżeli słupkowa S-RNaza i pyłkowy inhibitor (SFB_1) są wynikiem ekspresji genów tego samego haplotypu (S_1) enzym pozostaje aktywny i dochodzi do degradacji RNA łagiewki pyłkowej (wg MCCUBBINA i KAO 2000, USHIJIMAY i współaut. 2003).

szlaku transmisyjnym szyjki słupka, tj. bez względu na to czy jest to łagiewka wsobna, czy też zgodna (LUU i współaut. 2000). Zatem wyniki tych badań raczej wykluczają taki sposób rozpoznawania i hamowania wsobnych łagiewek pyłkowych.

Obecnie najbardziej prawdopodobny wydaje się być model, w którym białko *S* pyłku działa jako inhibitor aktywności S-RNazy słupkowej (Ryc. 4B, C). Tuż przed otwarciem kwiatu do apoplastu szlaku transmisyjnego szyjki słupka wydzielana jest S-RNaza wyposażona w specyficzne dla allelu domeny (domeny HV) rozpoznawane przez białko *S* pyłku. Po zapyleniu słupkowa S-RNaza wnika niezależnie od haplotypu do wszystkich łagiewek pyłko-

uczestniczącą w hamowaniu aktywności RNazy (F-box). Po zapyleniu zgodnym do łagiewki wnika RNaza będąca produktem innego haplotypu aniżeli haplotyp pyłku (Ryc. 4B). W tym przypadku allelo-specyficzne regiony pyłkowego i słupkowego produktu genu *S* nie wiążą się wcale lub w sposób, który nie zmienia inhibitorowej aktywności białka SFB. Aktywne białko SFB, dzięki obecności domeny F-box, uczestniczy w ubikwitynacji „toksycznej” S-RNazy – enzym zostaje skierowany na drogę proteosomalnej degradacji. Zdegradowane białko nie wpływa na metabolizm łagiewki, która kontynuuje wzrost w kierunku zalążni.

Sytuacja radykalnie zmienia się po zapyleniu wsobnym, gdy haplotyp pyłku jest taki sam

jak słupka (Ryc. 4C). Specyficzne dla haplotypu domeny białka SFB i region HV S-RNazy wchodzi w interakcję, która prowadzi do zahamowania inhibitorowej aktywności białka SFB. Niewykluczone, że odbywa się to na drodze zablokowania domeny F-box, co uniemożliwia ubikwitynację S-RNazy. Nie ulegająca degradacji S-RNaza powoduje rozpad RNA łagiewki pyłkowej (rRNA, mRNA?), w efekcie czego następuje zatrzymanie jej wzrostu.

TYP PAPAVERACEAE

Mechanizm samoniezgodności typu *Papaveraceae* został opisany u dziko rosnącego maku, w populacji którego występuje 40–50 różnych haplotypów S (MCCUBBIN i KAO 2000). U tego gatunku rozpoznanie i odrzucenie niezgodnych ziaren pyłkowych odbywa się już w znamieniu, niezgodne łagiewki nie penetrują słupka (Ryc. 2A).

Do tej pory udało się sklonować i poznać budowę niektórych białek S produkowanych przez komórki znamienia. Znany jest zatem determinant samoniezgodności słupka. Jakie białka są wynikiem ekspresji genu S w ziarnie pyłkowym jeszcze nie wiadomo.

Prowadzone w ciągu ostatniej dekady badania zespołu Franklin-Tong dostarczyły przekonujących dowodów, że u *Papaver rhoeas* rozpoznanie i odrzucenie samoniezgodnego pyłku oparte jest na reakcji typu sygnał-receptor i włącza wapniową drogę przekazywania informacji. Od dawna wiadomo, że jony Ca^{2+} pełnią kluczową rolę w regulacji kiełkowania pyłku i wzroście łagiewek pyłkowych (patrz BEDNARSKA i LENARTOWSKA 2000a). Wiele procesów uczestniczących w ukierunkowanym wzroście łagiewki, m.in. funkcjonowanie cytoszkieletu, fuzja pęcherzyków budujących błonę i ścianę łagiewki pyłkowej, są regulowane przy udziale jonów Ca^{2+} . Utrzymanie podwyższonego stężenia Ca^{2+} w wierzchołku łagiewki (tzw. ang. tip-focused gradient Ca^{2+}) jest konieczne do prawidłowego wzrostu łagiewki, natomiast lokalne zmiany stężenia Ca^{2+} w cytozolu są kluczowe dla ukierunkowania wierzchołka łagiewki (patrz BEDNARSKA i LENARTOWSKA 2000b).

Ta powszechna droga regulacji wzrostu łagiewki „została wykorzystana” w mechanizmie funkcjonowania samoniezgodności u gatunków *Papaver*. W złożony układ sygnalizacyjny włączone są: cząsteczki sygnałowe, które

wydzielane są z komórek znamienia (białka S znamienia), receptory obecne w błonie ziarna pyłkowego/łagiewki pyłkowej (białka S pyłku) oraz aktywowana kompleksem ligand-receptor kaskada wewnątrzkomórkowych procesów, prowadząca do zahamowania niezgodnych łagiewek pyłkowych (patrz RUDD i FRANKLIN-TONG 2003).

Determinanty samoniezgodności

Syntetyzowane w komórkach znamienia cząsteczki sygnałowe (ligandy) są to małe (~15kDa) białka, których synteza jest wyrazem ekspresji genu S znamienia. Udział białek S znamienia w wywoływaniu reakcji samoniezgodności został udowodniony w warunkach eksperymentalnych. Dodanie do pożywki białek S, ekstrahowanych ze znamienia o tym samym haplocie co hodowane *in vitro* łagiewki pyłkowej, powoduje gwałtowne zatrzymanie ich wzrostu (FOOTE i współaut. 1994).

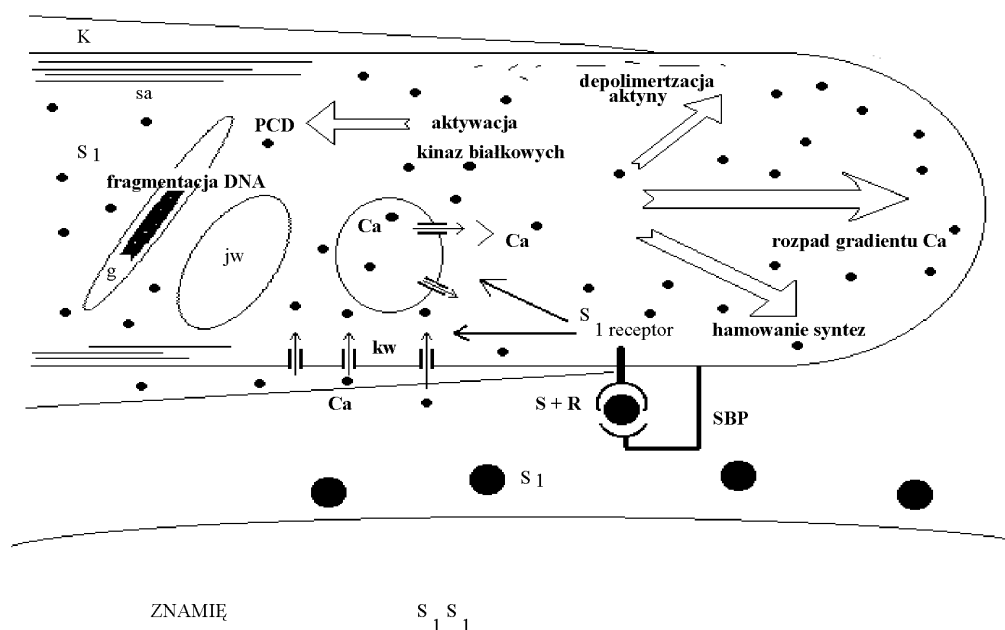
Białka S mają charakter wydzielniczy, lokalizowane są w matriks zewnątrzkomórkowej znamienia (RUDD i FRANKLIN-TONG 2003). Porównanie sekwencji nukleotydowych, a następnie aminokwasowych różnych białek S znamienia ujawniło, że są to białka wysoce polimorficzne. Zróżnicowanie sekwencji aminokwasowych w obrębie porównywanych białek wynosiło od 51,3% do 63,7% (KURUP i współaut. 1998, MCCUBBIN i KAO 2000). Jednakże w przeciwieństwie do białek S *Solanaaceae*, słupkowe białka S *Papaver* nie posiadają wyraźnie wyodrębnionych, wysoce zróżnicowanych sekwencji specyficznych dla poszczególnych alleli genu S znamienia. Decydujące o odmienności allelicznej sekwencje aminokwasowe odnajdywano w całym białku. Pomiedzy nimi znajdują się liczne, krótkie odcinki konserwowane, odpowiedzialne za ogólny mechanizm funkcjonowania SI u maku (FOOTE i współaut. 1994). Pomimo tak dużego zróżnicowania białka S znamienia posiadają identyczną strukturę trzeciorzędową. Badania mutantów wskazują, że za ich funkcjonowanie jako cząstek sygnałowych odpowiada jedna z hydrofilowych domen, w obrębie której znajduje się kilka wysoce konserwowanych aminokwasów (KAKEDA i współaut. 1998).

Niektóre z poznanych białek S znamienia są N-glikozylowane, jednakże reszty cukrowe nie wydają się mieć znaczenia w ich funkcjonowa-

niu. W warunkach eksperymentalnych hamowanie wzrostu łagiewek pyłkowych obserwowano zarówno po dodaniu „dzikich” białek wyekstrahowanych ze znamienia, jak i po dodaniu białek zrekombinowanych, pozbawionych reszt cukrowych (FRANKLIN-TONG i współaut. 1995).

Powszechnie przyjmuje się, że sygnałowe białko S znamienia – w sposób specyficzny dla haplotypu – wchodzi w interakcję z receptorami, których produkcja jest wynikiem ekspresji genu *S* pyłku. Jednakże jak dotąd obecności receptorowych białek S w błonie ziarna pyłko-

gandy znamienia są to proteoglikany o masie cząsteczkowej od 70 do 120 kDa, które nazwano SBP (ang. S-binding protein). W interakcji z ligandem istotną rolę pełni część węglowodanowa proteoglikanu, bowiem ekstrakcja reszt cukrowych zapobiega powstawaniu kompleksu białko S znamienia–SBP pyłku (JORDAN i współaut. 1999). Powstanie takiego kompleksu jest konieczne do wywołania S-specyficznej odpowiedzi, tj. do zahamowania wzrostu łagiewki pyłkowej. Czy białka SBP funkcjonują jako błonowe receptory – nie wiadomo. Okazało się bowiem, że wiązanie białek S znamienia z SBP



Ryc. 5. Molekularny mechanizm rozpoznania i hamowania niezgodnego pyłku w GSI typu Papaveraceae.

Komórki znamienia produkują i wydzielają białka S (S_1), które pełnią rolę cząstek sygnałowych (ligandów) rozpoznawanych przez przypuszczalne błonowe S receptory pyłku/łagiewki pyłkowej (S_1 receptor). Pyłkowymi receptorami są prawdopodobnie proteoglikany, których część cukrowa – przy udziale białka pomocniczego SBP – wiąże się specyficznie z sygnałem znamienia. Powstanie kompleksu $S + R$ uruchamia kaskadę zdarzeń prowadzącą do transdukcji sygnału i odpowiedzi komórkowej. Kaskada sygnalizacyjna obejmuje: (1) wzrost poziomu $[Ca^{2+}]_i$ w wyniku uwalniania jonów zmagazynowanych w organellach komórkowych i pobierania zewnątrzkomórkowych Ca^{2+} przez kanały wapniowe, (2) aktywację zależnych od kalmoduliny i/lub Ca^{2+} kinaz białkowych, które regulują specyficzne dla SI białka docelowe. Szybka, odwracalna odpowiedź niezgodnego pyłku jest zahamowanie wzrostu łagiewki pyłkowej, czemu towarzyszą takie zjawiska jak: (1) rozpad gradientu Ca^{2+} , (2) depolimeryzacja aktyny, (3) hamowanie syntezy związków koniecznych do wzrostu wierzchołka łagiewki. Nieodwracalną, późną odpowiedzią jest uruchomienie zjawiska programowanej śmierci komórki (PCD) i fragmentacja DNA jąder pyłkowych. K – ściana kalozowa, kw – kanał wapniowy, g – komórka generatywna, jw – jądro wegetatywne, sa – włókna aktynowe (wg RUDDA i FRANKLIN-TONGA 2003).

wego/łagiewki pyłkowej nie udało się zidentyfikować. Badania prowadzone metodami Western blott dostarczyły dowodów, że białka S znamienia (ligandy) wiążą się do niektórych transbłonowych białek ekstrahowanych z błony ziarna pyłkowego/łagiewki pyłkowej (HEARN i współaut. 1996). Białka pyłku, które wiążą S-li-

pyłku następuje nie tylko w przypadku samoniezgodności partnerów, nie jest więc haplotypowo-specyficzne. Obecnie przypuszcza się, że SBP pełnią raczej rolę pomocniczą, uczestnicząc w wiązaniu białka S znamienia z miejscem receptorowym białka S pyłku/łagiewki pyłkowej (RUDD i FRANKLIN-TONG 2003).

Model molekularnego funkcjonowania GSI typu
Papaveraceae

Powstanie specyficznego dla samoniezgodnych haplotypów przypuszczalnego kompleksu S-ligand znamienia + S-receptor pyłku uruchamia szereg procesów na terenie cytoplazmy, prowadząc ostatecznie do zatrzymania wzrostu łagiewki pyłkowej (Ryc. 5). Kaskada sygnalizacyjna obejmuje takie procesy jak:

- wzrost poziomu cytozolowego $[Ca^{2+}]_i$;
- aktywację zależnych od Ca^{2+} kinaz białkowych;
- fosforylację specyficznych dla SI białek.

Efektom uruchomienia tej drogi sygnalizacyjnej jest szybka, bo obserwowana już po kilkudziesięciu sekundach, odpowiedź niezgodnego pyłku. Odpowiedź ta ujawnia się rozpadem cytoszkieletu aktynowego oraz przypuszczalnym zahamowaniem syntezy białek błonowych i węglowodanowych polimerów ścianowych, które to procesy w ciągu 1–2 min. prowadzą do zatrzymania wzrostu łagiewki. Odpowiedzią późną, która jest indukowana już po zatrzymaniu wzrostu łagiewki (240–400 s. po wywołaniu smoniezgodności), jest wejście kielkującego pyłku na drogę programowanej śmierci komórki (PCD) (MCCUBBIN i KAO 2000, RUDD i FRANKLIN-TONG 2003).

W warunkach eksperymentalnych proces SI najprościej indukuje się poprzez dodanie do hodowli łagiewek pyłkowych oczyszczonych niezgodnych białek S z ekstraktów znamienia. Jako kontrolę stosuje się dodatek zgodnych białek S, bądź niezgodnych denaturowanych wysoką temperaturą. Pierwszym rejestrowanym zjawiskiem po indukcji SI jest przejściowy wzrost poziomu Ca^{2+} w cytozolu łagiewek pyłkowych (FRANKLIN-TONG i współaut. 1995, STRAATMAN i współaut. 2001). W ciągu sekund następuje podwyższenie poziomu $[Ca^{2+}]_i$ do ok. $1,5 \mu M$ w podwierzchołkowym regionie łagiewki, gdzie znajduje się komórka generatywna i jądro wegetatywne. W warunkach nieindukcyjnych tak wysoki poziom $[Ca^{2+}]_i$ występuje tylko w regionie apikalnym łagiewki, natomiast w strefie podwierzchołkowej poziom ten jest wielokrotnie niższy, tj. $0,1\text{--}0,2 \mu M$ (patrz BEDNARSKA i LENARTOWSKA 2000b). Podwyższony poziom $[Ca^{2+}]_i$ utrzymuje się przez ~ 10 min., po czym wraca do wartości podstawowych. Podobnych zmian nie obserwowano po podaniu zgodnych lub denaturowanych niezgodnych białek S. Dowodzi to, iż obserwowany proces jest specyficzny dla SI. Przeprowadzone badania pozwalają stwier-

dzić, że u *Papaver rhoeas* jony Ca^{2+} pełnią rolę wtórnego przekaźnika w kaskadzie transdukcji sygnału samoniezgodności (FRANKLIN-TONG i współaut. 2002). Podwyższony poziom $[Ca^{2+}]_i$ bezpośrednio lub w sposób zależny od kalmoduliny stymuluje aktywację specyficznych kinaz białkowych, co – poprzez kaskadę dalszych procesów biochemicznych – prowadzi do odpowiedzi komórkowej.

Wysoki, oscylujący poziom $[Ca^{2+}]_i$ występuje w wierzchołku każdej prawidłowo rosnącej łagiewki pyłkowej (patrz BEDNARSKA i LENARTOWSKA 2000a, b). Powszechnie przyjmuje się, że to w błonie wierzchołka funkcjonuje mechanizm odpowiedzialny za regulację poziomu $[Ca^{2+}]_i$ – tam zlokalizowane są kanały wapniowe oraz pompy jonowe. Co jest zatem źródłem gwałtownego wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ w strefie oddalonej od wierzchołka nawet o $100 \mu m$? Na obecnym etapie badań uważa się, że podczas indukcji SI następuje zarówno uruchomienie wewnątrzkomórkowej puli Ca^{2+} zmagazynowanej w organellach komórkowych, jak i pobieranie jonów egzogennych (FRANKLIN-TONG i współaut. 2002). Przypuszcza się, że kompleks białek S znamienia i pyłku reguluje aktywność kanałów wapniowych obecnych w podwierzchołkowej plazmolemie łagiewki oraz błonie organelli sekwestrujących Ca^{2+} .

Badania z zastosowaniem jono-selektywnych mikroelektrod ujawniły, że indukcja SI prowadzi do ponad 13-krotnego wzrostu pobierania egzogennych Ca^{2+} w miejscu oddalonym ok. $50 \mu m$ od wierzchołka łagiewki (STRAATMAN i współaut. 2001). W tej strefie ściana łagiewki posiada warstwę kalozową, którą uważa się za barierę w swobodnym przepływie jonów. Nasze ostatnie badania u *Petunia hybrida* wykazały, że w kalozowej ścianie łagiewki występuje białko kalretikolino-podobne (LENARTOWSKA i współaut. 2002). Kalretikulina jest białkiem wiążącym i magazynującym Ca^{2+} , głównie w świetle ER (patrz LIBIK 1998). Niewykluczone zatem, że zlokalizowane w ścianie kalozowej białko kalretikolino-podobne jest źródłem egzogennej puli Ca^{2+} , które mogą być pobierane do cytozolu łagiewki pyłkowej. Podwyższenie $[Ca^{2+}]_i$ w podwierzchołkowej strefie łagiewki pyłkowej staje się początkiem kaskady zjawisk, które u *Papaver rhoeas* ostatecznie prowadzą do śmierci niezgodnego pyłku. Wkrótce po wzroście $[Ca^{2+}]_i$ następuje rozpad gradientu wapnia i gwałtowne zatrzymanie wzrostu łagiewki (FRANKLIN-TONG i współaut. 2002). To wcze-

sne hamowanie łagiewek jest odwracalne. Po wypłukaniu niezgodnych białek S znamienia łagiewki kontynuują wzrost. W warunkach ponadoptymalnego poziomu $[Ca^{2+}]_i$, prawdopodobnie już w strefie podwierzchołkowej, następuje inaktywacja aneksyn, które są konieczne do fuzji pęcherzyków z apikalną błoną łagiewki (patrz BEDNARSKA i LENARTOWSKA 2000b).

Dobrze udokumentowanym zjawiskiem indukowanym wzrostem $[Ca^{2+}]_i$ po wywołaniu SI jest gwałtowna zmiana w funkcjonowaniu cytoszkieletu aktynowego. W ciągu 1–2 min. następuje depolimeryzacja F-aktyny i rozpad cytoszkieletu łagiewki (SNOWMANN i współaut. 2002, STAIGER i FRANKLIN-TONG 2003). Proces ten rozpoczyna się w czasie hamowania wzrostu łagiewki, można więc uznać, że „odpowiedź aktynowa” jest jedną z przyczyn gwałtownego zatrzymania rozwoju niezgodnych ziaren pyłkowych.

Ca^{2+} , działające jako wtórny przekaznik, aktywują zależne od Ca^{2+} kinazy białkowe, w efekcie czego następuje przejściowa fosforylacja specyficznych dla SI białek. Do tej pory zidentyfikowano kilka białek pyłkowych, których fosforylacja jest stymulowana przez niezgodne białka S (białko p26, p68 i p52), prawdopodobnie za pośrednictwem zależnej od Ca^{2+} kinazy białkowej (CDPK) (RUDD i FRANKLIN-TONG 2003). Badania genu oraz białka p26 ujawniły, że jest to rozpuszczalna nieorganiczna pirofosfataza. Zależna od Ca^{2+} fosforylacja tego enzymu prowadzi do jego inaktywacji i zaburzeń w metabolizmie ATP. Uważa się, że zjawisko to ma miejsce podczas indukcji SI u *Papaver*. Rezultatem jest hamowanie zależnej od ATP syntezy biopolimerów takich jak łańcuchy węglowodanowe (np. pektyny) oraz białka, które są niezbędne do wzrostu błony i ściany łagiewki pyłkowej (RUDD i współaut. 1996).

Innym białkiem, którego aktywność regulowana jest na drodze sygnałowania wapniowego podczas SI u *Papaver rhoeas*, jest pyłkowe białko p52. Dowody biochemiczne wskazują, że p52 jest homologiem kinaz białkowych, które

są powszechnie aktywowane u roślin w odpowiedzi na stres i nazywane są MAPK (ang. mitogen-activated protein kinase). Aktywację pyłkowego białka p52 obserwowano zarówno w warunkach *in vitro*, tj. po indukcji niezgodności za pomocą białek S znamienia, jak i po niezgodnym zapyleniu *in vivo*. Maksymalną aktywację tej kinazy białkowej stwierdzono dopiero 10 min. po indukcji SI, zatem już po zatrzymaniu wzrostu łagiewki pyłkowej. Wskazuje to, że nie odgrywa ono istotnej roli we wczesnych, odwracalnych zjawiskach hamowania pyłku. Do tej pory nie wiadomo jaką funkcję pełni białko p52 w mechanizmie odpowiedzi SI. Z badań na innych modelach komórkowych wiadomo, że klasa MAPK białek odgrywa ważną rolę w indukowaniu programowanej śmierci komórki (PCD) podczas odpowiedzi na stres (YANG i współaut. 2001). Aczkolwiek brak na to bezpośrednich dowodów sugeruje się, że podobnie jak białka MAPK, białko p52 włączone jest w indukowanie PCD niezgodnego pyłku *Papaver* (RUDD i FRANKLIN-TONG 2003).

Najnowsze badania dostarczyły wielu argumentów, iż ostatecznym celem kaskady sygnałowania wapniowego podczas SI u *Papaver rhoeas* jest indukcja programowanej śmierci komórki. Wiadomo, że pomimo różnic w mechanizmie i regulacji PCD u zwierząt i roślin (JACKOWSKI 1997) proces ten prowadzi do specyficznej fragmentacji jądrowego DNA, tj. pocięcia go na oligosomalne fragmenty (WIDŁAK 2002). JORDAN i współaut. (2000) wykazali, że indukcja SI u *Papaver rhoeas* prowadzi do śmierci łagiewek pyłkowych, z którą związana jest fragmentacja DNA jądrowego. Specyficzną dla SI fragmentację DNA można było wykryć dopiero wiele godzin po wywołaniu tego zjawiska. Ponieważ cięcie DNA jest jednym z późnych zjawisk PCD, należy zatem przypuszczać, że indukcja programowanej śmierci komórki następuje dużo wcześniej. Wejście łagiewek pyłkowych na drogę PCD jest zapewne zjawiskiem, które prowadzi do nieodwracalnego zahamowania niezgodnych ziaren pyłkowych.

SAMONIEZGODNOŚĆ SPOROFITOWA

Występujący u Brassicaceae system samoniezgodności sporofitowej jest jednym z najlepiej poznanych. W tym typie samoniezgodności rozpoznanie i odrzucenie niezgodnych zia-

ren pyłkowych odbywa się na powierzchni znamienia (Ryc. 2B). Niezgodne ziarna pyłkowe najczęściej wcale nie kiełkują, bądź – w przypadku uruchomienia kiełkowania –

krótkie lagiewki nie penetrują znamienia. Cytologicznym efektem zahamowania niezgodnych ziaren pyłkowych jest tzw. odpowiedź kaloza. W aperturze pyłku lub na wierzchołku kielkującej lagiewki oraz w ścianie papili, do której przylega ziarno pyłku syntetyzowana jest kaloza (DE NETTANCOURT 2001).

Dzięki badaniom molekularnym u Brassicaceae scharakteryzowano zarówno geny obecne w locus S, jak i białka będące efektem ich ekspresji. Okazało się, że żeńskim determinantem samoniezgodności jest białko obecne w błonie papili znamienia, natomiast męskim – białko występujące w tzw. opłaszczeniu pyłku (TAKAYAMA i ISOGAI 2003). Rozpoznanie i odrzucenie niezgodnych ziaren pyłkowych oparte jest – podobnie jak u Papaveraceae – na reakcji typu ligand–receptor. Jednakże u Brassicaceae ligandem jest białko pyłku, natomiast receptorem – białko znamienia. Do tej pory nie udało się natomiast jednoznacznie określić jakie wewnątrzkomórkowe mechanizmy pro-

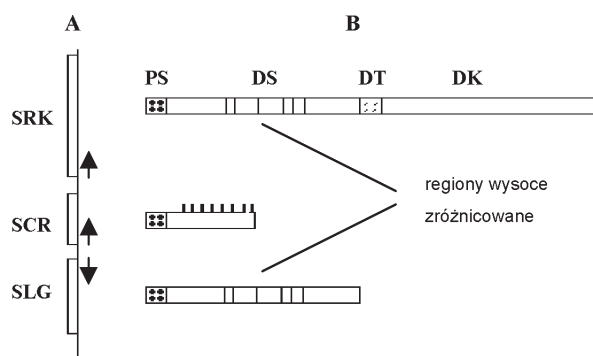
wadzące do zahamowania pyłku uruchamia powstanie kompleksu ligand–receptor.

DETERMINANTY SAMONIEZGODNOŚCI

W locus S u *Brassica* zlokalizowane są trzy wieloalleliczne geny, z których dwa ulegają ekspresji w znamieniu, trzeci – w pylniku (Ryc. 6A). Cały locus S jest wysoce polimorficzny, np. u *B. campestris* ujawniono więcej niż 100 różnych haplotypów (NOU i współaut. 1993). Geny, których ekspresja ma miejsce w komórkach znamienia to *SRK* (ang. S-locus receptor kinase) i *SLG* (ang. S-locus glycoprotein). Pomiędzy nimi zlokalizowany jest gen *SCR* (ang. S-locus cysteine-rich protein), który jest aktywny tylko w pylniku (TAKAYAMA i ISOGAI 2003). Wszystkie geny obecne w S-locus kodują białka posiadające na N-końcu krótki peptyd sygnałowy, co świadczy, iż są to białka o charakterze wydzielniczym.

Gen *SRK* koduje transbłonową glikoproteinę, która funkcjonuje jako serynowo-treoninowa kinaza receptorowa w papilach znamienia (TAKASAKI i współaut. 2000). Białko to zbudowane jest z 3 domen – zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i wewnątrzkomórkowej. W domenie zewnątrzkomórkowej, poza wycinanym peptydem sygnałowym, wyróżnia się trzy regiony wysoce polimorficzne, 12 konserwowanych reszt cysteinowych w kierunku końca C oraz miejsca N-glikozylacji, które wiążą się z resztami cukrowymi. Trzy regiony wysoce zróżnicowane, które poprzedzielane są sekwencjami bardziej konserwowanymi, odpowiadają za alleliczne zróżnicowanie genu *SRK*. Glikozylowana domena zewnątrzkomórkowa nazywana jest S-domeną, która rozpoznaje i wiąże ligand pyłkowy. Reakcja ta jest allelo-specyficzna, tak że do powstania kompleksu S+R dochodzi tylko w przypadku, gdy żeński i męski determinant samoniezgodności pochodzą z tego samego haplotypu (KACHROO i współaut. 2001, TAKAYAMA i wsp. 2001). Za krótkim odcinkiem transbłonowym występuje domena wewnątrzkomórkowa, która ma właściwości serynowo-treoninowej kinazy białkowej.

Drugim genem ulegającym ekspresji w znamieniu jest gen *SLG*. Koduje on wysoce polimorficzne białko o charakterze wydzielniczym (KEMP i DOUGHTY 2003). Porównanie sekwencji genu *SRK* i *SLG* ujawniło, że glikoproteina *SLG* jest w wysokim stopniu homologiczna do zewnątrzkomórkowej domeny *SRK*. Posiada od-



Ryc. 6. Schemat budowy locus S i białek S u Brassicaceae.

A. W locus S obecne są trzy geny – *SRK*, *SCR* i *SLG*. *SRK* i *SLG* ulegają ekspresji w znamieniu, *SCR* – głównie w tapetum pylnika. strzałki pokazują kierunek transkrypcji. B. Gen *SRK* koduje białko transbłonowe zbudowane z 3 domen: (1) poprzedzonej peptydem sygnałowym (PS) zewnątrzkomórkowej domeny S (DS), która zawiera trzy wysoce polimorficzne regiony odzwierciedlające zróżnicowanie alleliczne genu, (2) krótkiej domeny transbłonowej (DT) oraz (3) wewnątrzkomórkowej, konserwowanej domeny (DK) o właściwościach serynowo-treoninowej kinazy białkowej. Gen *SLG* koduje białko wydzielnicze, które jest w wysokim stopniu homologiczne do zewnątrzkomórkowej domeny genu *SRK* – posiada odcinany peptyd sygnałowy (PS) oraz trzy regiony wysoce zróżnicowane. Aktywny w pylniku gen *SCR* koduje małe białko wydzielnicze lokalizowane w opłaszczeniu pyłku, w którym jedynymi konserwowanymi cechami jest obecność 8 cystein (pionowe kreski) oraz glicyna na C-końcu (wg SCHOPFERA i współaut. 1999, MCCUBBINA i KAO 2000).

cinany peptyd sygnałowy, trzy regiony wysoce zróżnicowane oraz konserwowane reszty cysteinowe i miejsca N-glikozylacji. Białko SLG jest wydzielane do ściany papili znamienia i – jak na to wskazują badania immunocytochemiczne – jest go 10–100 razy więcej aniżeli białka SRK. Do tej pory nie wiadomo jaką ostatecznie rolę pełni białko SLG w reakcji samoniezgodności. Okazało się bowiem, że nie jest ono absolutnie konieczne do zahamowania niezgodnego pyłku. Opisano 3 haplotypy *B. oleracea*, które nie produkują glikoproteiny SLG, a mimo to funkcjonuje u nich sprawny system rozpoznania i odrzucenia niezgodnego pyłku (SUZUKI i współaut. 2000). Na podstawie zgromadzonych dowodów, pochodzących głównie z badań roślin transgenicznych, wskazuje się na 4 przypuszczalne funkcje białka SLG, które mogą być odmienne u różnych haplotypów *Brassica*. Białka SLG mogą: (1) być koniecznym składnikiem kompleksu receptorowego, (2) uczestniczyć w post-transkrypcyjnym dojrzewaniu SRK, (3) brać udział w adhezji pyłku do znamienia, (4) funkcjonować jako przenośnik liganda pyłkowego.

Aczkolwiek SRK jest jedynym znanym białkiem znamienia absolutnie koniecznym do wywołania samoniezgodności, uważa się, że współdziałają z nim inne białka, z którymi SRK tworzy funkcjonalny kompleks receptorowy. Badania na mutantach i roślinach transgenicznych dowodzą, że u większości haplotypów *Brassica* to właśnie glikoproteina SLG tworząc kompleks z receptorem SRK umożliwia wiązanie pyłkowego liganda (TAKAYAMA i wsp. 2001).

Istnieją też dowody na udział SLG w dojrzewaniu SRK. Droga mutagenetyzacji uzyskano rośliny *Brassica*, które posiadały aktywny gen *SRK* i uszkodzony gen *SLG*. Pomimo, że u tych roślin transkrypcja genu *SRK* była na normalnym poziomie, rośliny nie wytwarzały dojrziałych białek SRK i były samozgodne. Prawdopodobnie przyczyną samozgodności był brak SLG, które są konieczne do post-transkrypcyjnego dojrzewania receptora SRK (DIXIT i współaut. 2000).

Adhezja pyłku do powierzchni papili znamienia jest pierwszym etapem prowadzącym do zgodnego zapylenia, tj. do jego hydratacji i kiełkowania łagiewki pyłkowej. Na udział SLG w tym procesie wskazują eksperymenty z zastosowaniem specyficznych przeciwciał anty-SLG. Siła adhezji między pyłkiem a papilą ulegała znacznej redukcji w przypadku, gdy znamiona przed zapyleniem były traktowane

specyficznymi dla haplotypu S anty-SLG. Uważa się, że przyczyną tego zjawiska było zamaskowanie przez przeciwciała pewnych specyficznych miejsc w SLG, które wiążą się z pyłkowymi molekułami uczestniczącymi w adhezji. Jedną z takich molekuł jest białko PCP-A1 (ang. pollen coat protein-A1), które w warunkach *in vitro* wiąże się z SLG. Wiązanie to jest jednakże niezależne od haplotypu, zatem proces ten nie wydaje się być w sposób bezpośredni włączony w zjawisko SI (KEMP i DOUGHTY 2003).

Funkcja SLG jako przenośnika molekularnego dla liganda pyłkowego była sugerowana od dawna. Występujące wolno w ścianie papili białko SLG, dzięki swej wysokiej homologii z S-domeną SRK, może wiązać się z pyłkowym ligandem i przenosić go do zakotwiczonego w błonie receptora. Badania *S₆* haplotypu *Brassica* ujawniły, że istotnie pyłkowy ligand wiąże się z białkiem SLG w sposób allelo-specyficzny, co wskazuje na fizjologiczny charakter reakcji. Wiązanie liganda pyłkowego z SLG jest znacznie słabsze aniżeli z receptorem SRK. Wydaje się to dodatkowo potwierdzać, iż SLG funkcjonuje jako cząsteczka pośrednicząca między ligandem a receptorem (KACHROO i współaut. 2001).

Po scharakteryzowaniu zlokalizowanych w locus S genów znamienia i odkryciu receptorowej funkcji białka SRK, stało się jasne, że męskim determinantem samoniezgodności będzie cząsteczka sygnałowa. Od dawna zakładano, że ligandem dla SRK jest molekula obecna w opłaszczaniu pyłku, bowiem w testach *in vitro* to ekstrakty sporodermy zdolne były do wywołania reakcji samoniezgodności. Dlatego też badania zmierzające do poznania męskiego determinanta samoniezgodności zostały skoncentrowane na odnalezieniu specyficznego dla pylnika, polimorficznego genu obecnego w locus S, który koduje pyłkowe białko segregujące zgodnie z haplotypem S. Gen odnaleziono dzięki wyizolowaniu i zsekwencjonowaniu długiego odcinka locus S, w którym poza genami *SRK* i *SLG* znajdowały się dodatkowe jednostki transkrypcyjne, w tym jedna spełniająca kryteria białka S. Odkrycia dokonano w 1999 r. jednocześnie w USA i Japonii. Gen kodujący męski determinant samoniezgodności nazwano *SP11* (ang. S-locus protein 11) (SUZUKI i współaut. 1999) lub *SCR* (ang. S-locus cysteine rich protein) (SCHOPFER i współaut. 1999). Wysoce polimorficzny gen *SP11/SCR* koduje małe, bogate w cysteinę białko zbudowane z

50–66 aminokwasów (6–8 kDa). Jedynymi konserwowanymi cechami dojrzałego białka większości S-haplotypów jest obecność 8 reszt cysteiny i glicyny (Ryc. 6B). Reszty cysteiny odpowiedzialne są za powstawanie wewnątrz-molekularnych mostów dwusiarczkowych (TAKAYAMA i współaut. 2001) i niewykluczone, że jedna lub więcej reszt cysteinowych uczestniczy też w tworzeniu homodimerów białka SCR (KACHROO i współaut. 2001). Białko SCR/SP11 posiada odcinaną sekwencję sygnałową, lokalizuje się je na powierzchni ziarna pyłkowego, w lipidowym opłaszczeniu pyłku (SHIBA i współaut. 2001). Pomimo iż białko funkcjonuje w pyłku, miejscem ekspresji genu *SCR/SP11* są przede wszystkim sporofitowe komórki tapetum, skąd białko jest eksportowane do sporodermy (SHIBA i współaut. 2002). Tylko w niektórych haplotypach *Brassica* (np. S_8) gen *SP11*, obok ekspresji tapetalnej, ujawniał również ekspresję gametofitową, tj. w mikrosporze (TAKAYAMA i współaut. 2000). Wykazanie za pomocą metod biologii molekularnej, że gen *SCR/SP11* u wszystkich haplotypów *S Brassica* ulega ekspresji w tapetum potwierdziło badania genetyki klasycznej, iż fenotyp samoniezgodności u tych roślin jest determinowany sporofitowo.

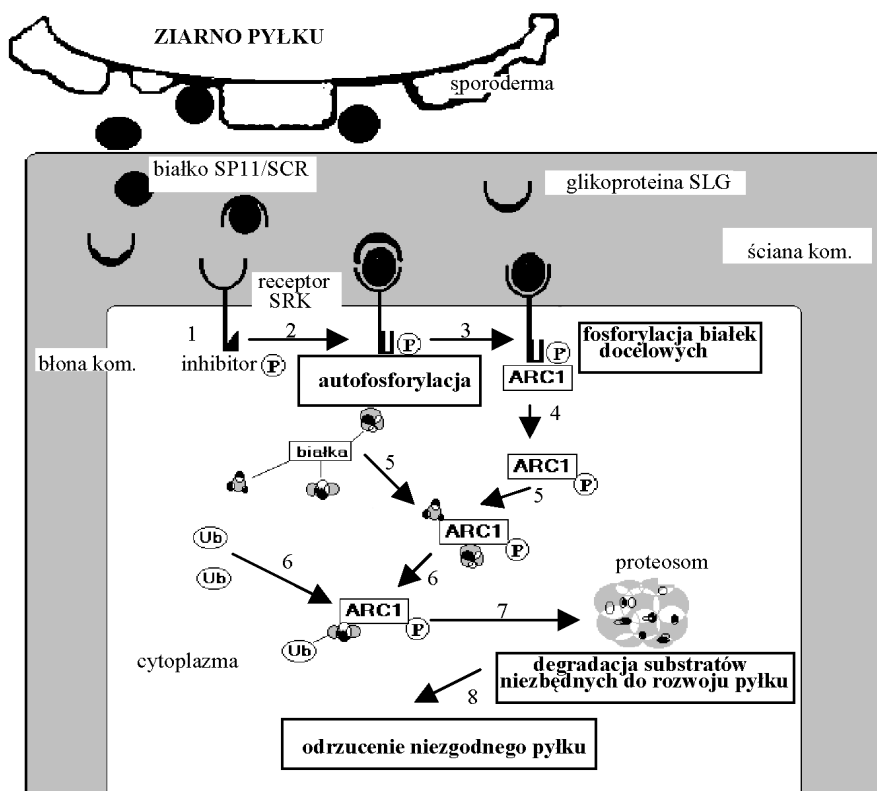
Sporofitowa determinacja fenotypu samoniezgodności u Brassicaceae rodzi pytanie dotyczące wzajemnych relacji między haplotypami obecnymi w diploidalnych komórkach, w których dochodzi do ekspresji genów *S*. Wiadomo, że zarówno w znamieniu, jak i w ziarnie pyłkowym bardzo powszechna jest kodominacja haplotypów, aczkolwiek występują tam też związki dominujące. Co ciekawe, poziomy dominacji poszczególnych haplotypów są niezależne i różnie regulowane w pylniku i znamieniu, np. haplotyp S_{52} jest dominujący w pylniku, lecz kodominujący w znamieniu (TAKASAKI i współaut. 1999, UYENOYAMA 2000). Badania molekularne wykazały, że w pylniku związki dominacji między haplotypami regulowane są na poziomie transkrypcji RNA. Dominujący allel genu *SCR* powoduje supresję transkrypcji allelu recesywnego (SHIBA i współaut. 2002, KUSABA i współaut. 2002). Natomiast w znamieniu, bez względu na poziom dominacji, transkrybowane są obydwie haplotypy (HATAKEYAMA i współaut. 2001). Wskazuje to, iż dominacja genu *SRK* regulowana jest post-transkrypcyjnie, niewykluczone, że dopiero podczas dojrzewania lub funkcjonowania białka SRK.

MODEL MOLEKULARNEGO FUNKCJONOWANIA SSI U BRASSICACEAE

Zapylenie inicjuje bezpośredni fizyczny kontakt między sporoderłą ziarna pyłkowego a ścianą papili znamienia (Ryc. 7). W ciągu minut ze sporodermy uwalniane jest lipidowo-białkowe opłaszczenie – między pyłkiem a powierzchnią papili tworzy się tzw. stopka odpowiedzialna m.in. za adhezję i uwodnienie pyłku (DICKINSON 1995). Wraz z zawartością opłaszczenia do stopki spływają białka SCR/SP11, które przez mikrokanały w kutikuli znamienia bardzo szybko wchodzą do ściany papili i docierają do kompleksu receptorowego znamienia. Zwykle w ciągu 45 min. następuje odrzucenie niezgodnego pyłku. Wskazuje to, iż jest to wystarczający czas do zajścia takich procesów jak powstanie kompleksu ligand-receptor, rozpoznanie pyłku, transdukcja sygnału i uruchomienie kaskady zdarzeń wewnątrzkomórkowych prowadzących do zahamowania lub promocji rozwoju pyłku.

Specyficzna dla haplotypu interakcja między pyłkowym ligandem (białko SP11/SCR) a receptorem znamienia (białko SRK) jest u *Brassica* dobrze udokumentowana. Jednakże dalsze etapy kaskady sygnalizacyjnej w komórkach znamienia nie są jeszcze w pełni poznane. Nie wiadomo w jaki sposób interakcja między SCR/SP11 a SRK prowadzi do aktywacji receptora i wywołania samoniezgodności. Istnieją dowody biochemiczne, iż po związaniu się S-domeny SRK z ligandem pyłkowym następuje autofosforylacja wewnątrzkomórkowej domeny receptora. Autofosforylacja uaktywnia kinazową funkcję receptora, dzięki czemu może dojść do fosforylacji i regulacji aktywności innych wewnątrzkomórkowych białek docelowych. Zatem zjawisko autofosforylacji SRK uważane jest za inicjację transdukcji sygnału na inne wewnątrzkomórkowe molekuly (SCHLESSINGER 2000).

Ponieważ zasadniczą rolę w indukcji samoniezgodności u *Brassica* odgrywa fosforylacja SRK, w komórkach znamienia musi funkcjonować precyzyjny mechanizm regulujący ten proces. Niekontrolowana fosforylacja, powodująca konstytutywną aktywność receptora SRK, prowadziłaby bowiem do hamowania także zgodnych ziaren pyłkowych, w efekcie czego rośliny takie byłyby bezpłodne. Eksperymentalne badania ujawniły, że w warunkach *in vitro* SRK może ulegać autofosforylacji także w nieobecności pyłkowego liganda (GIRAN-



Ryc. 7. Molekularny mechanizm hamowania niezgodnego pyłku w SSI typu Brassicaceae.

Zapylenie prowadzi do uwolnienia ze sporodermy pyłku sygnałowego białka SP11/SCR (liganda), które przy udziale "ruchomej" glikoproteiny SLG wchodzi w interakcję z S-domeną receptora SRK (1). Interakcja ta jest specyficzna dla haplotypu i ma miejsce tylko w przypadku zapylenia pyłkiem o tym samym fenotypie co słupek. Efektem związania pyłkowego liganda jest oddysocjowanie od SRK inhibitora fosforylacji, co prowadzi do autofosforylacji wewnątrzkomórkowej, kinazowej domeny receptora SRK (2). Dzięki temu kinazowa domena SRK staje się aktywna i może – poprzez fosforylację – regulować funkcjonowanie innych, docelowych dla SI białek (3). Takim docelowym białkiem jest przenoszące ubikwitynę białko ARC1, które ulega fosforylacji po związaniu się z kinazową domeną SRK (4). Ufosforylowane, aktywne białko ARC1 wiąże inne cytozolowe białka, które są niezbędne do rozwoju pyłku (5). Związane z ARC1 białka ulegają ubikwitynacji (Ub), (6) i przemieszczają się do proteosomów, gdzie ulegają degradacji (7). Brak substratów koniecznych do kiełkowania pyłku prowadzi do jego odrzucenia (wg NASRALLAHA 2000, STONE'A i współaut. 2003).

TON i współaut. 2000). Dlatego też sądzi się, że w komórkach niezapyłonego znamienia kinazowa aktywność receptora jest hamowana przez specyficzne czynniki białkowe, takie jak fosfatazy białkowe czy opisane ostatnio dwie tioredoksyny (THL1 i THL2) (KEMP i DOUGHTY 2003). Hamowanie kinazowej aktywności SRK jest odwracalne i regulowane w sposób zależny od haplotypu przez białka opłaszczania pyłku (CABRILLAC i współaut. 2001).

Jedyną do tej pory dobrze scharakteryzowaną molekułą wewnątrzkomórkową, która współdziała z SRK jest białko ARC1 (ang. arm repeat-containing protein 1). Białko to w sposób specyficzny wiąże się z kinazową domeną SRK, a jego ekspresja ograniczona jest do komórek znamienia (STONE i współaut. 2003). Udział ARC1 w procesie samoniezgodności potwier-

dziły badania roślin transgenicznych. Rośliny, które nie produkowały białka ARC1 stawały się samozgodne (STONE i współaut. 1999).

Białko ARC1 jest rozpuszczalnym białkiem cytozolowym, które dzięki obecności sekwencji sygnałowych może przemieszczać się między jądrem a cytoplazmą (STONE i współaut. 2003). W białku obecna jest tzw. domena U-box, która funkcjonuje jako przenośnik ubikwityny. Wskazuje to, iż ARC1 może uczestniczyć w proteosomalnej degradacji białek. Poznanie i charakterystyka białka ARC1 pozwoliła na postawienie hipotezy, iż kaskada wewnątrzkomórkowej sygnalizacji inicjowana kompleksem SCR+SRK prowadzi do proteosomalnej degradacji specyficznych białek obecnych w papili znamienia (Ryc. 7). Zgodnie z hipotezą STONE i współaut. (2003) aktywacja SRK przez ligand pyłkowy

(SCR/SP11) prowadzi do odblokowania receptora, czego efektem jest autofosforylacja jego domeny kinazowej. Następnie do ufosforylowanej domeny SRK przyłącza się cytozolowe białko ARC1. Dzięki kinazowej aktywności SRK dochodzi z kolei do fosforylacji ARC1. Ufosforylowane, aktywne białko ARC1 wędrując przez cytozol wiąże specyficzne dla SI substraty, które ulegają ubiquitynacji. Przyłączanie ubiquityny stanowi proces „napiętnowania” białek przeznaczonych do pozalizosomalnej degradacji. Powstały kompleks białkowy przemieszcza się do proteosomów znajdujących się na cytozolowej powierzchni ER. Tam z kolei ARC1 uczest-

niczy w degradacji białek, które są uznawane za docelowe w kaskadzie transdukcji sygnału samoniezgodności. Substraty, w których ubiquitynacji i degradacji uczestniczy białko ARC1 nie są znane. Sugeruje się, że mogą to być ślupkowe białka, które są niezbędne do zgodnego zapyle-
nia. Efektem degradacji czynników biorących udział w promocji hydratacji i kiełkowania pyłku jest zatem zablokowanie rozwoju tych ziaren pyłkowych, które w wyniku powstania specyficznego dla haplotypu kompleksu SCR+SRK zostały rozpoznane jako samoniezgodne.

UWAGI KOŃCOWE

Zjawisko samoniezgodności przyczyniło się do sukcesu ewolucyjnego roślin Angiospermae. Mechanizmy rozpoznania i odrzucenia wsobnego pyłku zabezpieczały obupłciowe rośliny kwiatowe przed samozapłodnieniem. Dzięki temu możliwa była duża zmienność osobnicza, która umożliwiała roślinom zarówno przystosowanie do zmieniającego się środowiska, jak i postęp ewolucyjny.

Na podstawie badań filogenetycznych ocenia się, że system SI pojawił się u wspólnego przodka Angiospermae ok. 70 mln. lat temu. W tzw. proto-S locus obecny był gen *S-RNazy*, którego ekspresja przyczyniła się do

powstania najstarszego mechanizmu SI. W toku ewolucji system SI oparty na RNazie był kilkakrotnie „gubiony” i zastępowany innymi mechanizmami. Świadczy o tym fakt, iż u obecnie żyjących Angiospermae samoniezgodność zarówno na poziomie genetycznym, jak i molekularnym jest determinowana różnie u różnych roślin. W każdym przypadku nowy system SI rozwijał się w oparciu o geny, które już były obecne w genomie i determinowały inne procesy, takie jak np. przekazywanie informacji drogą wapniową czy przy udziale receptorowych kinaz białkowych.

SELF-INCOMPATIBILITY IN FLOWERING PLANTS

S u m m a r y

Many hermaphrodite flowering plants possess the mechanisms called self-incompatibility (SI), which prevent self-fertilization and promote out-crossing. SI enables the pistil to distinguish between self (genetically related) and non-self (genetically unrelated) pollen. Self pollen is rejected either at the stigma surface or in the style. Non-self pollen is accepted and its tube grows down through the style to reach the ovary where fertilization takes place. In most species the self/non-self recognitin in SI is controlled by a single S-locus containing two or more separate polymorphic genes, one determining the female and the other the male S-haplotype specificity. Because the S-locus is a multigene complex, the term haplotype is used to denote variants of the locus, and the term allele to denote variants of each gene in the S-locus.

There are two major types of SI systems, gamatophytic and sporophytic. In gametophytic SI, the phenotype of pollen is determined by its own S-haplotype and pollen is recognized by pistil as self when the haploid pollen matches either of the two S-haplotypes of the diploid pistil. In sporophytic SI, the

phenotype of pollen is determined by the S-haplotype of its diploid parent. The pollen is recognized by the pistil as self if either of the two S-haplotypes carried by its parent matches one of the two S-haplotypes carried by the pistil.

Although SI is controlled by a single S-locus, in the various plants the mechanisms employed are different. So far, three distinct systems have been characterized in some detail at the molecular level in widely divergent plant families. This article describes molecular SI mechanisms in Solanaceae and Papaveraceae that possess gamatophytic self-incompatibility (GSI), and in Brassicaceae that possess sporophytic self-incompatibility (SSI).

Self-incompatible members of the Solanaceae species reject pollen via the action of a style S-locus-encoded ribonuclease (S-RNase). This S-RNase is held to degrade RNA molecules present in incompatible pollen tubes, which leads to an arrest of pollen tube in the style. In Papaveraceae, SI operates through a calcium-dependent signal transduction pathway located in the pollen that involves also phosphorylation of downstream proteins. Activation of this signalling cas-

cade leads to the arrest of pollen tube growth on the stigma. The SI system in members of the Brassicaceae is based on the interaction between stigmatic plasma-membrane receptor (SRK) and pollen ligand

(SCR). The signalling process downstream in the pistil causes pollen rejection on the stigma surface.

LITERATURA

- ANDERSON M. A., CCORNISH E. C., MAU S.-L., WILLIAMS E. G., HOGARD R., ATKINSON A., 1986. *Cloning of cDNA for stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in Nicotiana glauca*. *Nature* 321, 38–44.
- BEDNARSKA E., 1992. *Interakcje międzykomórkowe podczas płciowego rozmnażania roślin kwiatowych*. *Post. Biol. Kom.* 19, 293–310.
- BEDNARSKA E., LENARTOWSKA M., 2000a. *Rola Ca^{2+} w płciowym rozmnażaniu roślin okrytonasiennych*. *Wiad. Bot.* 44, 23–34.
- BEDNARSKA E., LENARTOWSKA M., 2000b. *Rola wapniowego systemu przekazywania sygnałów w regulacji wzrostu łagiewek pyłkowych*. *Post. Biol. Kom.* 27, 467–479.
- CABRILLAC D., COCK J. M., DUMAS C., GAUDE T., 2001. *The S-locus receptor kinase is inhibited by thioridoxins and activated by pollen coat proteins*. *Nature* 410, 220–223.
- CERTAL A. C., ALMEIDA R. B., BOŠKOVIĆ R., OLIVEIRA M. M., FEIJO J. A., 2002. *Structural and molecular analysis of self-incompatibility in almond (Prunus dulcis)*. *Sex. Plant Reprod.* 15, 13–20.
- DE NETTANCOURT D., 2001. *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- DICKINSON H., 1995. *Dry stigmas, water and self-incompatibility in Brassica*. *Sex. Plant Reprod.* 8, 1–10.
- DIXIT R., NASRALLAH M. E., NASRALLAH J. B., 2000. *Post-transcriptional maturation of the S receptor kinase of Brassica correlates with co-expression of the S-locus glycoprotein in the stigmas of two Brassica strains and in transgenic tobacco plants*. *Plant Physiol.* 124, 297–311.
- ENTANI T., IWANI M., SHIBA H., CHE F. S., ISOGAI A., TAKAYAMA S., 2003. *Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of Prunus mume: identification of a pollen-expressed F-box with allelic diversity*. *Genes Cell* 8, 203–213.
- FOOTE H. C. C., RIDE J. P., FRANKLIN-TONG V. E., WALKER E. A., LAWRENCE M. J., FRANKLIN F. C. H., 1994. *Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S-) gene from Papaver rhoeas L.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2265–2269.
- FRANKLIN-TONG V. E., HOLDAWAY-CLARKE T. L., STRAATMAN K. R., KUNKEL J. G., HEPLER P. K., 2002. *Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of Papaver rhoeas*. *Plant J.* 29, 333–345.
- FRANKLIN-TONG V. E., RIDE J. P., FRANKLIN F. C. H., 1995. *Recombinant stigmatic self-incompatibility (S-) protein elicits a Ca^{2+} transient in pollen of Papaver rhoeas*. *Plant J.* 8, 299–307.
- GIRANTON J. L., DUMAS C., COCK J. M., GAUDE T., 2000. *The integral membrane S-locus receptor kinase of Brassica has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers in planta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3759–3764.
- HATAKEYAMA K., TAKASAKI T., SUZUKI G., NISHIO T., WATANABE M., ISOGAI A., HINATA K., 2001. *The S receptor kinase gene determines dominance relationships in stigma expression of self-incompatibility in Brassica*. *Plant J.* 26, 69–76.
- HEARN M. J., FRANKLIN F. C. H., RIDE J. P., 1996. *Identification of a membrane glycoprotein in pollen of Papaver rhoeas which binds stigmatic self-incompatibility (S-) proteins*. *Plant J.* 9, 467–475.
- HUANG S., LEE H.-S., KARUNANANDAA B., KAO T.-H., 1994. *Ribonuclease activity of Petunia inflata S proteins is essential for rejection of self-pollen*. *Plant Cell* 6, 1021–1028.
- JACKOWSKI G., 1997. *Programowana śmierć komórki u roślin i zwierząt*. *Wszecławiat* 98, 216–219.
- JORDAN N. D., FRANKLIN F. C. H., FRANKLIN-TONG V. E., 2000. *Evidence for DNA fragmentation triggered in the self-incompatibility response in pollen of Papaver rhoeas*. *Plant J.* 23, 471–479.
- JORDAN N. D., KAKEDA K., CONNER A., RIDE J. P., FRANKLIN-TONG V. E., FRANKLIN F. C. H., 1999. *S-protein mutants indicate a functional role for SBP in the self-incompatibility reaction of Papaver rhoeas*. *Plant J.* 20, 119–126.
- KACHROO A., SCHOPFER C. R., NASRALLAH M. E., NASRALLAH J. B., 2001. *Allele-specific receptor-ligand interactions in Brassica self-incompatibility*. *Science* 293, 1824–1826.
- KAKEDA K., JORDAN N. D., CONNER A., RIDE J. P., FRANKLIN-TONG V. E., FRANKLIN F. C. H., 1998. *Identification of residues in a hydrophilic loop of the Papaver rhoeas S protein that play a crucial role in recognition of incompatible pollen*. *Plant Cell* 10, 1723–1732.
- KAO T.-H., HUANG S., 1994. *Gametophytic self-incompatibility: a mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction*. *Plant Physiol.* 105, 461–466.
- KARUNANANDAA B., HUANG S., KAO T.-H., 1994. *Carbohydrate moiety of the Petunia inflata S₃ protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil*. *Plant Cell* 6, 1933–1940.
- KEMP B. P., DOUGHTY J., 2003. *Just how complex is the Brassica S-receptor complex?* *J. Exp. Bot.* 54, 157–168.
- KNOX R. B., 1984. *Pollen-pistil interaction*. [W:] *Cellular interactions*. LINSKENS H. F. i HESLOP-HARRISON J. (red.). Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 508–608.
- KURUP S., RIDE J. P., JORDAN N., FLETCHER G., FRANKLIN-TONG V. E., FRANKLIN F. C. H., 1998. *Identification and cloning of related self-incompatibility*

- ty S-genes in *Papaver rhoeas* and *Papaver nudicaule*. *Sex. Plant Reprod.* 11, 192–198.
- KUSABA M., TUNG C. W., NASRALLAH M. E., NASRALLAH J. B., 2002. *Monoallelic expression and dominance interactions in anthers of self-incompatible Arabidopsis lyrata*. *Plant Physiol.* 128, 17–20.
- LENARTOWSKA M., KARAŚ K., MARSHALL J., NAPIER R., BEDNARSKA E., 2002. *Immunocytochemical evidence of calreticulin-like protein in the pollen tubes and styles of Petunia hybrida Hort.* *Protoplasma* 219, 23–30.
- LIBIK M., 1998. *Kalretikulina – charakterystyka biochemiczna i funkcje w komórkach roślinnych*. *Post. Biol. Kom.* 25, 501–509.
- LUU D. T., QIN X., MORSE D., CAPPADOCIA M., 2000. *S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gamatophytic self-incompatibility*. *Nature* 407, 649–651.
- MASCARENHAS J. P., 1993. *Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation*. *Plant Cell* 5, 1303–1314.
- MATSUURA T., SAKAI H., UNNO M., IDA K., SATO M., SAKIYAM F., NORIOKA S., 2001. *Crystal structure at 1.5-Å resolution of Pyrus pyrifolia pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility*. *J. Biol. Chem.* 276, 45261–45269.
- MATTON D. P., MAES O., LAUBLIN G., XIKE Q., BERTRAND CH., MORSE D., CAPPADOCIA M., 1997. *Hypervariable domains of self-incompatibility Rnases mediate allele-specific pollen recognition*. *Plant Cell* 9, 1757–1766.
- MCCLURE B. A., HARING V., EBERT P. R., ANDERSON M. A., CORNISH E. C., 1989. *Style self-incompatibility gene products of Nicotiana glauca are ribonuclease*. *Nature* 342, 955–957.
- MCCUBBIN A. G., KAO T.-H., 2000. *Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions*. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 16, 333–364.
- MCCUBBIN A. G., CHUNG Y.-Y., KAO T.-H., 1997. *A mutant S₃ RNase of Petunia inflata lacking RNase activity has an allele-specific dominant negative effect on self-incompatibility interactions*. *Plant Cell* 9, 85–95.
- NASRALLAH J. B. 2000. *Cell-cell signaling in the self-incompatibility response*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 368–373.
- NOU I. S., WATANABE M., ISOGAI A., HINATA K., 1993. *Comparison of S-alleles and S-glycoproteins between two wild populations of Brassica campestris in Turkey and Japan*. *Sex. Plant Reprod.* 6, 79–86.
- RUDD J. J., FRANKLIN-TONG V. E., 2003. *Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of Papaver rhoeas*. *J. Exp. Bot.* 54, 141–148.
- RUDD J. J., FRANKLIN F. C. H., LORD J. M., FRANKLIN-TONG V. E., 1996. *Increased phosphorylation of a 26-kD pollen protein is induced by the self-incompatibility response in Papaver rhoeas*. *Plant Cell*, 8, 713–724.
- SCHLESSINGER J., 2000. *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell* 103, 211–225.
- SCHOPFER C. R., NASRALLAH M. E., NASRALLAH J. B., 1999. *The male determinant of self-incompatibility in Brassica*. *Science* 286, 1697–1700.
- SHIBA H., IWANO M., ENTANI T., ISHIMOTO K., SHIMOSATO H., CHE F. S., SATTA Y., ITO A., TAKADA Y., WANTANABE M., ISOGAI A., TAKAYAMA S., 2002. *The dominance of alleles controlling self-incompatibility in Brassica pollen is regulated at the RNA level*. *Plant Cell*, 14, 491–504.
- SHIBA H., TAKAYAMA S., IWANO M., SHIMOSATO H., FUNATO M., NAKAGAWA T., CHE F. S., SUZUKI G., WATANABE M., HINATA K., ISOGAI A., 2001. *A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of Brassica species*. *Plant Physiol.* 125, 2095–2103.
- SIMS T. L., ORDANIC M., 2001. *Identification of a S-ribonuclease-binding protein in Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* 47, 771–7783.
- SNOWMAN B. N., KOVAR D. R., SHEVCHENKO G., FRANKLIN-TONG V. E., STAIGER C. J., 2002. *Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response*. *Plant Cell* 14, 2613–2626.
- STAIGER C. J., FRANKLIN-TONG V. E., 2003. *The actin cytoskeleton is a target of the self-incompatibility response in Papaver rhoeas*. *J. Exp. Bot.* 54, 103–113.
- STONE S. L., ARNOLDO M., GORING D. R., 1999. *A breakdown of Brassica self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants*. *Science* 286, 1729–1731.
- STONE S. L., ANDERSON E. M., MULLEN R. T., GORING D. R., 2003. *ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen*. *Plant Cell* 15, 885–898.
- STRAATMAN K. R., DOVE S. K., HOLDAWAY-CLARKE T., HEPLER P. K., KUNKEL J. G., FRANKLIN-TONG V. E., 2001. *Calcium signalling in pollen of Papaver rhoeas undergoing the self-incompatibility (SI) response*. *Sex. Plant Reprod.* 14, 105–110.
- SUZUKI G., KAI N., HIROSE T., FUKUI K., NISHIO T., TAKAYAMA S., ISOGAI A., WATANABE M., HINATA K., 1999. *Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S₉ haplotype of Brassica campestris (syn. rapa)*. *Genetics* 153, 391–400.
- SUZUKI T., KUSABA M., MATSUSHITA M., OKAZAKI K., NISHIO T., 2000. *Characterization of Brassica S-haplotypes lacking S-locus glycoprotein*. *FEBS Letters* 482, 102–108.
- TAKASAKI T., HATAKEYAMA K., WATANABE M., TORIYAMA K., ISOGAI A., HINATA K., 1999. *Introduction of SLG (S locus glycoprotein) alters the phenotype of endogenous S haplotype, but confers no new S haplotype specificity in Brassica rapa L.* *Plant Mol. Biol.* 40, 659–668.
- TAKASAKI T., HATAKEYAMA K., SUZUKI G., WATANABE M., ISOGAI A., HINATA K., 2000. *The S receptor kinase determines self-incompatibility in Brassica stigmata*. *Nature* 403, 913–916.
- TAKAYAMA S., ISOGAI A., 2003. *Molecular mechanism of self-recognition in Brassica self-incompatibility*. *J. Exp. Bot.* 54, 149–156.
- TAKAYAMA S., SHIBA H., IWANO M., SHIMOSATO H., CHE F.-S., KAI N., WATANABE M., SUZUKI G., HINATA K., ISOGAI A., 2000. *The pollen determinant of self-incompatibility*

- lity in Brassica campestris*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 1920–1925.
- TAKAYAMA S., SHIMOSATO H., SHIBA H., FUNATO M., CHE F. S., WATANABE M., IWANO M., ISOGAI A., 2001. *Direct ligand–receptor complex interaction controls Brassica self-incompatibility*. Nature 413, 534–538.
- USHIJIMA K., SASSA H., DANDEKAR A. M., GRADZIEL T. M., TAO R., HIRANO H., 2003. *Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism*. Plant Cell 15, 771–781.
- UYENOYAMA M. K., 2000. *Evolutionary dynamics of self-incompatibility alleles in Brassica*. Genetics 156, 351–359.
- VERICA J. A., MCCUBBIN., KAO T.-H., 1998. *Are the hypervariable regions of S Rnases sufficient for allele-specific recognition of pollen?* Plant Cell 10, 314–316.
- WIDLAK P., 2002. *Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie*. Post. Biol. Kom. 27, 583–597.
- YANG K. Y., LIU Y., ZHANG S., 2001. *Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 98, 373–378.
- ZUCCHERELLI S., TASSINARI P., BROOthaertis W., TARTARINI S., DONDINI L., SANSVINI S., 2002. *S-allele characterization in self-incompatible pear (Pyrus communis L.)*. Sex. Plant. Reprod. 15, 153–158.