

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Petr Šesták

Mechanismy pylové inkompatibility u zástupců čeledi *Brassicaceae*
The mechanisms of pollen incompatibility in the *Brassicaceae* family

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Jan Fíla, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. David Honys, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Děkuji mému školiteli RNDr. Janu Fílovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivý přístup a pomoc, kterou mi poskytl při zpracování této bakalářské práce. Také chci poděkovat všem členům Laboratoře biologie pylu za velmi příjemné pracovní prostředí, které ovlivnilo směřování mého dalšího studia. Dík patří rovněž mé rodině za jejich podporu během studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 4. 2021

.....

Petr Šesták

Abstrakt

Sporofytická inkompatibilita (SI) je jedním ze systémů, kterým krytosemenné rostliny zabraňují opylení vlastním pylem nebo pylem geneticky příbuzné rostliny. Nejvíce je prozkoumána u čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), především díky jejímu hospodářskému významu a zároveň do ní patří modelové rostlině huseníčku rolnímu (*Arabidopsis thaliana*). V posledních třiceti letech došlo díky pokrokům v molekulárně biologických metodách k charakterizaci velké části signalizační kaskády, která vede k odmítnutí inkompatibilního pylu. Dále je studována funkce různých buněčných struktur (např. cytoskeletu, exocystu nebo proteazomu) zapojených do inkompatibilní odpovědi při opylení, a to především mikroskopickým pozorováním živých buněk. V neposlední řadě je zkoumán vliv abiotických stresových podmínek na fungování SI. Cílem práce je shrnutí nových poznatků o molekulárních mechanismech SI u čeledi *Brassicaceae*, popis procesů vedoucích k vyklíčení kompatibilního pylového zrna a rovněž charakterizace nově popsanych proteinů účastnících se buněčné signalizace vedoucí k odmítnutí inkompatibilního pylu.

Klíčová slova: pylová zrna, pylová inkompatibilita, sporofytická inkompatibilita, S-lokus
Brassicaceae

Abstract

Sporophytic incompatibility (SI) represents one of the systems by which angiosperms prevent pollination by their own pollen or by the pollen from a genetically related plant. It is mostly studied in the *Brassicaceae* family, mainly due to its agricultural importance. Another reason is that the model plant *Arabidopsis thaliana* belongs to this family. In the last three decades, advances in molecular biological methods enabled the characterization of a large part of the signalling cascade that leads to the rejection of incompatible pollen. Then, the functions of various cellular components (e.g. cytoskeleton, exocyst or proteasome) involved in the incompatible response to pollination are studied mainly by live cell microscopy. Last but not least, the function of SI under various abiotic stresses was described to reveal their influence on SI mechanisms. The aim of this bachelor thesis is to summarize the new discoveries characterizing the molecular mechanisms of SI in the *Brassicaceae* family, to describe the processes leading to the germination of compatible pollen grain and to characterize the newly described proteins involved in cellular signalling leading to the rejection of incompatible pollen.

Key words: pollen grain, pollen incompatibility, sporophytic incompatibility, *Brassicaceae*, S-locus

Seznam použitých zkratek

| | |
|-------------|---|
| ACA13 | Ca ²⁺ -ATPáza 13 |
| AP2 | adaptorový proteinový komplex 2 |
| APK1b | proteinová kináza 1b (ang. <i>protein kinase 1b</i>) |
| ARC1 | protein s opakující se ARM doménou 1 (ang. <i>ARM-repeat-containing protein 1</i>) |
| <i>cer</i> | <i>eceriferum</i> |
| <i>esmd</i> | <i>esmeralda</i> |
| Exo70A1 | podjednotka komplexu exocyst protein A1 |
| <i>fdh</i> | <i>fiddlehead</i> |
| GI | gametofytická inkompatibilita |
| GLO1 | glyoxaláza 1 |
| MLPK | proteinová kináza M-lokusu (ang. <i>M-locus protein kinase</i>) |
| mRNA | mediátorová ribonukleová kyselina |
| PCP-A | proteiny pylového obalu třídy A (ang. <i>pollen coat protein class A</i>) |
| PCP-B | proteiny pylového obalu třídy B (ang. <i>pollen coat protein class B</i>) |
| PUB protein | rostlinný U-boxový protein (ang. <i>plant U-box protein</i>) |
| <i>qua</i> | <i>quasimodo</i> |
| SCR | S-lokusový na cystein bohatý protein (ang. <i>S-locus cystein rich protein</i>) |
| SI | sporofytická inkompatibilita |
| S-lokus | sterilní lokus (angl. <i>self-sterility locus</i>) |
| SLG | S-lokusový glykoprotein |
| SRK | S-lokusová receptorová kináza |

Obsah

| | |
|--|----|
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Pylová inkompatibilita a její druhy | 4 |
| 2.1 Sporofytická inkompatibilita | 6 |
| 2.1.1 Heteromorfní inkompatibilita | 7 |
| 2.2 Gametofytická inkompatibilita | 8 |
| 3 Principy interakce blizny a pylu u čeledi <i>Brassicaceae</i> | 10 |
| 3.1 Adheze pylu k blizně | 10 |
| 3.2 Rehydratace kompatibilního pylu | 12 |
| 3.3 Klíčení pylové láčky | 13 |
| 4 Molekulární podstata SI u čeledi <i>Brassicaceae</i> | 15 |
| 4.1 Další geny zapojené do sporofytické inkompatibility | 16 |
| 4.2 Signalizační molekuly zapojené do sporofytické inkompatibility | 18 |
| 5 Studium pylové inkompatibility u rodu <i>Arabidopsis</i> | 21 |
| 5.1 Ortologní geny sporofytické inkompatibility přítomné v rodu <i>Arabidopsis</i> | 22 |
| 5.2 Funkce cytoskeletu ve sporofytické inkompatibilitě | 24 |
| 5.3 Vliv zvýšené teploty na fungování sporofytické inkompatibility | 25 |
| 6 Závěr | 26 |
| Seznam použité literatury | 27 |

1 ÚVOD

Pro úspěšné pohlavní rozmnožování rostlin je zapotřebí opylení, tedy přenos pylu z tyčinek na pestík, které je u krytosemenných rostlin zprostředkováno opylovači, větrem, případně vodou. Na bliznu se při opylení nepřenáší pouze pyl daného druhu, ale může se na ní ocitnout i pyl jiného druhu, případně její vlastní a blizna tak musí mezi nimi rozlišovat. Na správném rozpoznání pylového zrna je závislý jeho další osud, pokud ho blizna nerozpozná, není mu dovoleno vyklíčit, vytvořit pylovou láčku a oplodnit vaječnou buňku v zárodečném vaku. Opylení květu pylem ze stejné rostliny je nazýváno samosprašení (samoopylení) a může vést u většiny druhů k oplození a vzniku potomků. Rostlina se tím však připraví o velkou část výhod plynoucích z cizosprašnosti, mezi které patří zachování genetické variability při kombinaci alel od různých jedinců a udržování heterozygotů v populaci.

Schopnost samosprašnosti a následného samooplození u rostlin si povšiml již Charles Darwin (1809-1882). Podrobněji se tomuto fenoménu věnoval ve své knize *The Effects of Cross and Self-Fertilisation in the Vegetable Kingdom*, která byla vydána již v roce 1876. Při svých experimentech, které popisuje ve zmíněném díle, se zaměřil především na vliv příbuzenského rozmnožování (inbreeding; extrémním případem je samooplození, kdy dochází ke vzniku nového jedince z genetické informace jediného jedince). Během pokusů byly rostliny cíleně opylovány svým vlastním pylem po několik generací. Brzy bylo u potomků takto rozmnožovaných rostlin patrné zhoršení v pozorovaných znacích při porovnání s nešlechtěnými rostlinami. Darwin tedy došel k závěru, že samosprašnost a příbuzenské křížení je škodlivé, snižuje variabilitu a není dlouhodobě udržitelné (Darwin, 1876). Postupem času však vědci došli k závěru, že samosprašnost má i své klady a v přírodě se nevyskytuje bezúčelně.

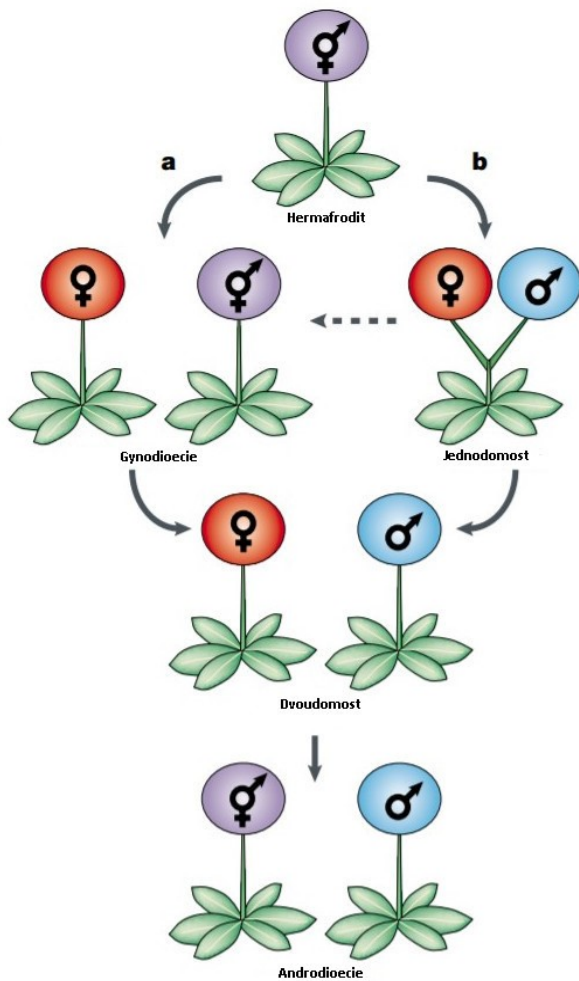
Za určitých podmínek je samosprašení výhodnou strategií, která zajišťuje pokračování druhu, například když nebyl v době rozmnožování v dosahu žádný vhodný partner, v případě rostlin spíše žádný vhodný přenašeč pylu. Pro daného jedince je výhodnější se rozmnožit i s rizikem, že jeho potomci budou mít sníženou životaschopnost, než zahynout a nevytvořit vůbec žádné potomky. Dále se samosprašnost uplatní, při předávání výhodných vlastností rostliny další generaci. Při samosprašnosti dochází při vzniku gamet k rekombinaci chromozomů během meiózy a jejich náhodnému rozchodu do gamet, ale nedojde ke smíchání gamet dvou rozdílných jedinců, čímž vznikne pouze mírně upravený genom se stejnými

alelami, jaké nese rodičovský jedinec. Při cizosprašení dojde ke kombinaci dvou gamet různých jedinců, čímž se dosud výhodné alely dostanou do jiných vztahů s cizími alelami a může tak zaniknout prospěšnost původních alel pro rostlinu. Druhů, pro které je samosprašnost jediným způsobem rozmnožování, je velice málo, mnoho druhů rostlin totiž zakládá své rozmnožování na kombinaci samosprašnosti a cizosprašnosti (shrnutí v Barrett *et al.*, 2003).

Výhod samosprašnosti rostlina využije, když není k dispozici vhodný opylovač, při růstu ve stabilním prostředí, nebo při kolonizaci nového území. To, že rostlina k produkci semen nepotřebuje partnera, jí umožní vytvořit populaci na novém stanovišti. Když se poté dostane na toto stanoviště nový jedinec (ideálně geneticky nepříbuzný), jsou rostliny schopny sprážit se mezi sebou a tím obnovit ztracenou genetickou variabilitu, která jim umožní lepší přizpůsobení se nové lokalitě. Další využití nalezne samosprašnost u rostlin již přizpůsobených podmínkám daného stanoviště. Tyto rostliny mají takovou kombinaci alel, která je pro ně na této lokalitě velmi výhodná. Bylo by pro ně tedy nejlepší ji předat potomkům v co nejméně pozmeněném stavu a nevnášet do genetické informace jiné alely, jejichž přítomnost by mohla potomkům uškodit, a proto se často uchylují k samosprašnosti (shrnutí v Jarne a Charlesworth, 1993).

Přes jisté výhody samosprašnosti nemalá část rostlinných druhů založila své pohlavní rozmnožování výhradně na cizosprašnosti a vyvinula proto řadu mechanismů, kterými zabraňuje samosprašnosti a brání se tak vůči vzniku homozygotů, kteří mohou být méně životaschopní kvůli akumulaci recesivních alel se skrytou škodlivou funkcí. Některé druhy se vydaly cestou časového oddělení dozrávání pestíku a tyčinek v témže oboupohlavném květu (shrnutí v Goodwillie a Weber, 2018). Protože se v takovém květu nevyskytnou oba zralé pohlavní orgány současně, nemůže dojít k samosprašení.

Další možností je prostorové oddělení tyčinek a pestíku, nebo vznik jednopohlavných květů. Ty se mohly vyskytovat společně na jedné rostlině, čímž vznikla jednodomost, nebo v populaci vznikly rostliny nesoucí pouze samičí květy a hermafroditické rostliny, gynodioecie. Od tohoto uspořádání je již krok k přejítí na dvoudomost, tedy systém, kdy rostlina tvoří buď samičí nebo samčí květy (obr. 1) (shrnutí v Barrett, 2002). Posledním mechanismem zabraňujícím samosprašnosti je pylová inkompatibilita, které se bude věnovat zbývající část této práce.



Obrázek 1: Dvě hlavní vývojové cesty od rostlin s oboupohlavními květy ke dvoudomosti.

Ke vzniku gynodioecie (a) dojde genetickými změnami, které vedou ke vzniku samičích a hermafroditických rostlin. Změny poté mohou pokračovat, až dojde k přeměně zbývajících hermafroditických rostlin na rostliny samčí a dojde ke vzniku dvoudomosti.

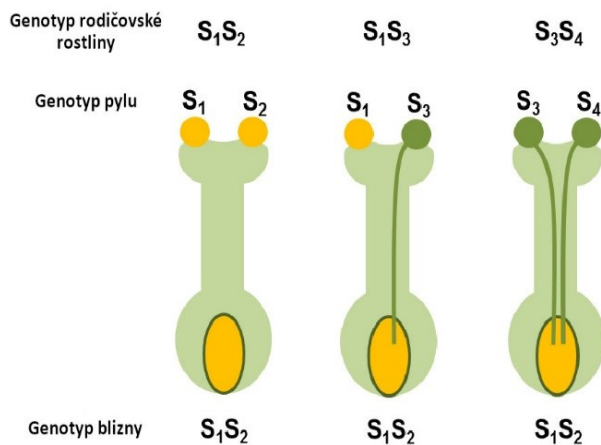
Vývojová větev jdoucí přes jednodomost (b) pravděpodobně zahrnovala disruptivní selekci, která zapříčinila vznik pohlavně specializovaných květů. Další vývoj poté může pokračovat ke dvoudomosti, nebo také ke gynodioecii.

Z dvoudomosti se může vzácně vyvinout další rozdělení pohlaví v květech tzv. androdioecie. V takových populacích se vyskytují samčí a hermafroditické rostliny. Upraveno podle Barrett, (2002)

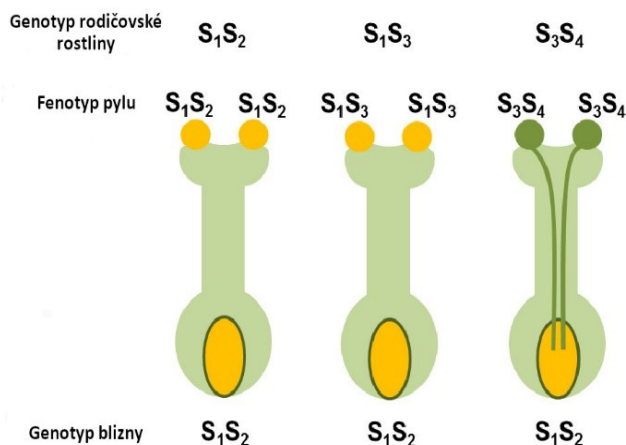
2 PYLOVÁ INKOMPATIBILITA A JEJÍ DRUHY

Pylová inkompatibilita je široce rozšířený systém zajišťující cizosprašnost u zhruba poloviny druhů krytosemenných rostlin (shrnutí v de Nettancourt, 1977). Rostliny s oboupohlavnými květy uplatnily tento systém pro rozpoznání vlastního pylu a pylu nepříbuzné rostliny stejného druhu, aby zabránily samosprašení a udržely tak genetickou variabilitu ve svých populacích. Pylová inkompatibilita se vyvinula nezávisle na sobě u mnoha

(A) Gametofytická inkompatibilita (GI)



(B) Sporofytická inkompatibilita (SI)



čeledí krytosemenných a je obecně dělena na gametofytickou inkompatibilitu (GI) a sporofytickou inkompatibilitu (SI). Podle postupně objevovaných molekulárních principů inkompatibility u různých čeledí dochází k dalšímu podrobnějšímu dělení v rámci dvou výše zmíněných skupin (shrnutí v Charlesworth *et al.*, 2005). Názvy obou základních typů pylových inkompatibilit jsou odvozeny od stadia rostliny (sporofyt/gametofyt), které dává vzniknout pylovým determinantům inkompatibility. V případě SI je determinant exprimován buňkami tapeta a transportován do exiny, svrchní vrstvy buněčné stěny pylového zrna (Iwano *et al.*, 2003). Determinant GI je oproti tomu tvořen vegetativní buňkou pylového zrna a je lokalizován v cytoplazmě (Wang a Xue, 2005).

Obrázek 2: Schéma fungování jednolokusové gametofytické (GI) a sporofytické inkompatibility (SI)..

(A) V případě GI je rozpoznávaný genotyp pylu haploidní a pro kompatibilní opylení je potřeba, aby se haplotyp pylu lišil od alel nesených pestíkem. V tomto případě pouze pyl s jinými S-alelami než S_1 a S_2 je kompatibilní. Pouze polovina pylu z rostliny s alelami S_1S_3 bude kompatibilní, protože nese alelu S_3 . (B) U SI jsou bliznou rozpoznávány obě S-alely nesené pylem. Pro úspěšné opylení se nesmí ani jedna z S-alel pylu shodovat s S-alelami pestíku. Na obrázku je vyobrazena situace, kdy veškerý pyl z otcovské rostliny s alelami S_1S_3 je inkompatibilní, protože alela S_1 je společná blizně i pylu. Upraveno podle Manzanares, (2013)

Výzkum pylové inkompatibility započal na přelomu 19. a 20. století. Jedny z prvních experimentů provedl německý botanik Carl Erich Correns (1864-1933) na řeřišnici luční (*Cardamine pratensis*, čeleď *Brassicaceae*), přičemž publikoval své závěry o fungování inkompatibility již v roce 1912 (Correns, 1912). Ve své hypotéze předpokládal, že pylová inkompatibilita je způsobena dvěma inhibujícími faktory/geny v aktivní B/G a inaktivní formě b/g obsaženými v blizně, které blokují růst pylové láčky. Při křížení rostlin s myšleným genotypem BbGg se potomci těchto rostlin rozdělily do čtyř skupin podle Mendelových zákonů (tab. 1). Jejich genotypy tedy byly BG + Bg + bG + bg. První skupina (BG) byla při zpětném křížení inkompatibilní s oběma rodiči, prostřední dvě skupiny (Bg a bG) byly inkompatibilní vždy s rodičem, jehož aktivní alelu nesly, a poslední skupina (bg) byla kompatibilní s oběma rodičovskými rostlinami, jelikož nenesou aktivní alelu ani jednoho z nich.

| | | |
|----------|----------|----------|
| | G | g |
| B | BG | Bg |
| b | bG | bg |

Tabulka 1: Genotypový štěpný poměr rostlin s genotypem Bb a Gg

Genotypy vzniklé podle C. Corrense u autoinkompatibilní řeřišnice luční. Pokud nese mateřská rostlina alespoň jeden stejný aktivní gen jako pyl, nedojde k oplození. V případě, že pyl nebo mateřská rostlina nese pouze inaktivní formy, je spojení kompatibilní s jakýmkoli genotypem.

Pozornost výzkumníků se dále zaměřila na jiné druhy, především na tabák křídlatý (*Nicotiana glauca*) a tabák *Nicotiana glauca* (Compton, 1913; East, 1915), aby ověřili pravdivost Corrensovy hypotézy i u dalších druhů. Protože se obecná platnost Corrensovy teorie nepotvrdila, formulovali East a Mangelsdorf další a nazvali jí teorií opozičních faktorů. Předpokládali, že v rostlinách nedochází k inhibici růstu pylových láček, ale naopak rostlina podporuje v růstu pouze ten pyl, který nese jinou alelu než má ona sama. V praxi tedy rostlina nesoucí alely S_1S_2 opylená pylem rostliny s alelami S_1S_3 podpoří výhradně růst pylu s alelou S_3 (East a Mangelsdorf, 1925).

Později bylo pozorováno klíčení pylových zrn a růst jejich láček u různých inkompatibilních druhů. Jako první bylo zaznamenáno neklíčení inkompatibilního pylu u zelí pekingského (*Brassica pekinensis*). I když pyl v několika případech vyklíčil, nebyla láčka schopna proniknout do buněk blizny a stáčela se pouze po povrchu (Stout, 1931). Stejně chování vykazoval pyl kokošky pastuší tobolky (*Capsella bursa-pastoris*) (Riley, 1932). U tabáku křídlatého bylo pozorováno prorůstání inkompatibilní láčky bliznou, ale znenadání u ní

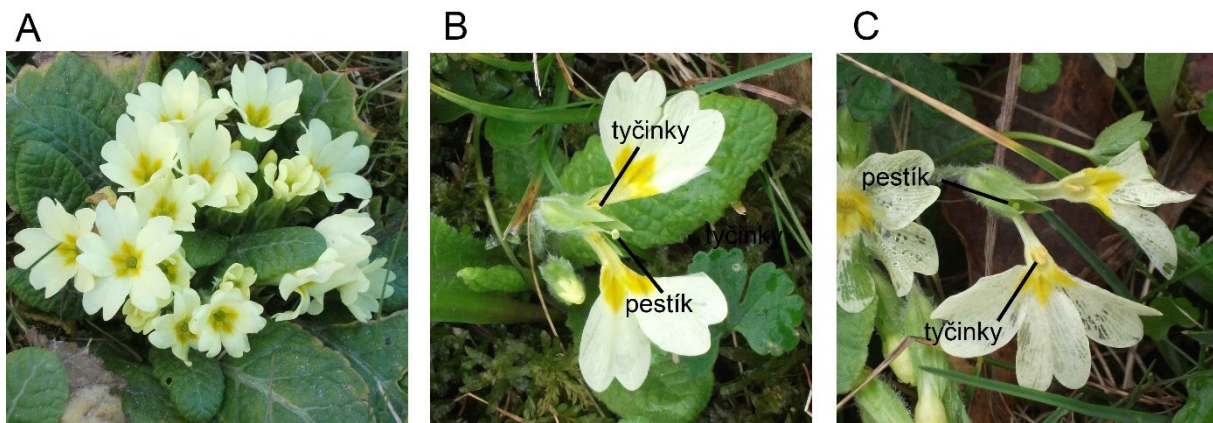
docházelo k zastavení růstu a nebyla tak schopná oplodnit zárodečný vak v semeníku (East, 1934). Do té doby pozorované odlišnosti při křížení různých inkompatibilních rostlin shrnul K. Mather (1911-1990). Představil svou myšlenku, že o inkompatibilitě či kompatibilitě pylového zrna může rozhodovat jak samotný haploidní genom daného pylu, tak i diploidní genom rostliny, která mu dala vzniknout (Mather, 1944). Z této myšlenky se později stal základ současného rozdělení na GI a SI, které podrobněji popíšu v navazujícím textu.

2.1 Sporofytická inkompatibilita

Poprvé byla sporofytická inkompatibilita (SI) popsána u škardy smrduté (*Crepis foetida*) z čeledi *Asteraceae* (Hughes a Babcock, 1950). U tohoto druhu byla již dříve pozorována pylová inkompatibilita, ale teprve při podrobnějším výzkumu bylo odhaleno, že výsledky křížení se odlišují od podobného experimentu provedeném na tabáku (*Nicotiana glauca*). Autoři došli k závěru, že na inkompatibilitě pylu se podílí i genotyp rodičovské rostliny a ne pouze genotyp pylu, jak tomu je například u výše zmíněného tabáku (Hughes a Babcock, 1950). Později byl stejný druh inkompatibility popsán i u dalších druhů z různých čeledí, například u čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*), brukvovité (*Brassicaceae*) a svlačcovité (*Convolvulaceae*) (shrnuto v Hiscock *et al.*, 2003). Většina poznatků o molekulárních mechanismech SI pochází ze studia čeledi *Brassicaceae*. Výhodou studia SI u této čeledi je, že se v ní nacházejí hospodářsky významné druhy a rovněž do ní patří i modelová rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Pokusy při křížení brukve zelné (*Brassica oleracea*) potvrdily hypotézu, že SI je řízena jedním lokusem, později nazvaným S-lokus (z angličtiny *self-incompatibility locus*), s několika alelami. Pyl nese v tomto typu inkompatibility obě alely S-lokusu a blizna je dokáže rozpoznat. Pokud se alespoň jedna z alel shoduje s alelou nesenou bliznou, pyl je vyhodnocen jako inkompatibilní a nedochází k jeho vyklíčení (Sampson, 1957). Mezi jednotlivými alelami byly rovněž pozorovány různé stupně jejich dominance, což umožňuje vznik rostlin nesoucích dvě stejné S-alely (Thomson a Taylor, 1966). Později byl S-lokus lokalizován na chromozomu a bylo v něm rozlišena sekvence pro několik genů zodpovědných za SI, označení S-lokus však již zůstalo (Boyes a Nasrallah, 1993). Další výzkum se v současnosti zaměřuje na odhalení dalších genů, jimiž kódované proteiny se podílejí na odpovědi blizny na inkompatibilní opylení.

2.1.1 Heteromorfní inkompatibilita

Jako zvláštní druh SI byla popsána heteromorfní inkompatibilita. Rostliny s tímto typem inkompatibility jsou již na první pohled dobře rozeznatelné díky rozdílům ve stavbě květů mezi jedinci stejného druhu. Již Charles Darwin si povšiml, že u prvosenky bezlodyžné (*Primula vulgaris*) se vyskytují dva od sebe odlišné květy (Obr. 3). Květy s krátkým pestíkem a dlouhými tyčinkami (tzv. *thumb*) a květy s dlouhým pestíkem a krátkými tyčinkami (tzv. *pin*). Rovněž zaznamenal, že k tvorbě semen dojde pouze při opylení krátkého pestíku pylem z krátké blizny



Obrázek 3: Distylie u prvosenky bezlodyžné (*Primula vulgaris*)

(A) Celá rostlina v průběhu kvetení. (B) Květ s dlouhým pestíkem a krátkými tyčinkami, tzv. *pin*. (C) Květ *thumb*, který je charakteristický dlouhými tyčinkami a krátkým pestíkem. Převzato z Balážová *et al.*, (2016).

a stejně tak u delších forem. Nikdy tak nemohlo dojít k vytvoření semen opylením blizny pylem ze stejného květu (Darwin, 1862). Pro tento jev se používá označení distylie. Později popsal další variantu heteromorfních rostlin při studiu kypřeje vrbice (*Lythrum salicaria*). Tento druh tvořil další formu pestíků a tyčinek, označovanou jako střední. V květu se poté vykytovala jedna z forem pestíku a tyčinky byly zastoupeny zbývajícími dvěma. K oplození docházelo při opylení pestíku pylem ze stejné formy tyčinek (Darwin, 1864). Varianta se třemi morfami se nazývá tristylie. Obecnější označení zahrnující oba pojmy je heterostylie.

Heterostylie se vykytuje u alespoň 28 čeledí krytosemenných rostlin a u 199 rodů. Nejčastěji je dnes studována distylie prvosenek (rod *Primula*) z čeledi prvosenkovitých (*Primulaceae*) a tristylie u šřavelu (rod *Oxalis*) z čeledi šřavelovitých (*Oxalidaceae*) (shrnuto v Naiki, 2012). Nejnovější poznatky o genetickém mechanismu distylie u prvosenky uvádějí, že fenotyp je řízen skupinou úzce spojených genů souhrnně nazývaných S-lokus, nebo také S-supergen. Tento S-lokus je přítomen jedenkrát v diploidním genomu pouze u rostlin s variantou květů *thumb*. Rostliny s variantou *pin* S-lokus zcela postrádají (Li *et al.*, 2016). Při porovnání transkriptomu (získaného metodou sekvenace nové generace) prvosenky jarní (*Primula veris*)

a prvosenky bezlodyžné (*Primula vulgaris*) bylo identifikováno 113 kandidátních genů, které vykazují významné rozdíly v expresi u jednotlivých květních forem (Nowak *et al.*, 2015).

Při studiu šťavelu (rod *Oxalis*) bylo potvrzeno, že tristylie je řízena dvěma lokusy, S a M. Oba mají dominantní alelu S/M a recesivní alelu s/m. Pokud je v genotypu alela S, rostlina vytváří květy s dlouhým pestíkem. Alela S je epistatická k alele M, která zapříčiňuje tvorbu středního pestíku. Pokud rostlina nese genotyp *ssmm*, má květy s krátkým pestíkem (Weller, 1976). V posledních letech proběhl výzkum tristylie i u tokozelky (*Eichhornia paniculata*) z čeledi modráskovité (*Pontederiaceae*). Tento druh vykazuje stejný genetický model tristylie jako byl popsán výše. Nejdůležitějším objevem u tohoto druhu je pravděpodobná lokalizace S a M lokusu na chromozomech. To umožní v budoucím výzkumu zúžit výběr genů, které se podílejí na tvorbě tristylie (Arunkumar *et al.*, 2017).

2.2 Gametofytická inkompatibilita

Gametofytická inkompatibilita (GI) byla popsána u čeledí lilkovité (*Solanaceae*), růžovité (*Rosaceae*), krtičníkovité (*Scrophulariaceae*), bobovité (*Fabaceae*), pupalkovité (*Onagraceae*), zvonkovité (*Campanulaceae*), makovité (*Papaveraceae*) a lipnicovité (*Poaceae*) (shrnutu v Franklin-Tong a Franklin, 2003). Její fungování je založeno na jednom mnohoalelickém S-lokusu. Inkompatibilita pylového zrna je určována alelou, kterou má pyl ve svém haploidním genomu, zatímco blizna nese obě alely. Když dojde k opylení pylem nesoucím stejnou alelu jako je jedna z alel blizny, nastane inkompatibilní reakce (East a Mangelsdorf, 1925). Tento typ pylové inkompatibility je méně striktní než SI, u níž musí pyl nést odlišné obě alely od alely blizny. Oproti SI, která byla podrobněji popsána pouze u čeledi *Brassicaceae*, byly u GI objeveny již dva různé molekulární mechanismy zabraňující opylení inkompatibilním pylem (shrnutu v McClure a Franklin-Tong, 2006). Různé mechanismy naznačují, že GI vznikla v průběhu evoluce několikrát nezávisle na sobě.

U většiny čeledí s GI byl popsán systém založený na SRNázách. Tento princip byl poprvé objeven u tabáku křídlatého (*Nicotiana glauca*) z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Bylo dokázáno, že RNázy vyskytující se v pestíku tabáku křídlatého zabraňují růstu pylové láčky (Anderson *et al.*, 1986). Jako determinant pylové inkompatibility byly později nalezeny SLF geny (z angličtiny *S-locus F-box*). Proteiny kódované těmito geny byly specificky exprimovány v pyly a při inkompatibilním opylení reagovaly s SRNázou v blizně a vedly tak k zastavení

růstu pylové láčky (Sijacic *et al.*, 2004). Další výzkum se snaží odhalit geny související s touto reakcí.

Odlišný mechanismus GI byl popsán u čeledi makovité (*Papaveraceae*). Místo SRNáz bylo spuštění inkompatibilní reakce pozorováno s nárůstem koncentrace Ca^{2+} v buňkách blizny (Franklin-Tong *et al.*, 1993). Tento nárůst spouští kaskádu reakcí, která vede k programované buněčné smrti pylové láčky, čímž je dána nezvratnost inkompatibilního opylení (Thomas a Franklin-Tong, 2004).

Úvodem jsme se seznámili s různými druhy pylové inkompatibility vyskytujících se u krytosemenných rostlin. Podrobněji bude v navazujícím textu rozebrána SI u čeledi *Brassicaceae*, na které je v současnosti prováděn nejintenzivnější výzkum snažící se objasnit molekulární mechanismy SI. Všechny nové poznatky získané o všech druzích pylové inkompatibility naleznou své uplatnění v zemědělství, kde mohou pomoci při šlechtění nových hybridních druhů plodin.

3 PRINCIPY INTERAKCE BLIZNY A PYLU U ČELEDI

BRASSICACEAE

Zjednodušeně se interakce mezi pylem a bliznou skládá ze čtyř částí: přilnutí pylu k blizně, rozpoznání kompatibilního pylu, hydratace pylového zrna a vyklíčení pylové láčky. Každá z těchto fází vyžaduje nejenom molekulární signalizaci mezi pylem a bliznou, ale zahrnuje i řadu biochemických a biofyzikálních procesů. Tyto procesy se liší u jednotlivých rostlinných druhů, přičemž v následující kapitole budou popsána zjištění vztahující se k čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Jednotlivé fáze jsou zprostředkovány rychlou komunikací mezi pylem a bliznou, která předchází a posléze napomáhá růstu pylové láčky a oplození vaječné buňky.

3.1 Adheze pylu k blizně

K první komunikaci mezi pylem a pestíkem dochází na blizně. Schopnost blizny rozpoznat kompatibilní, nekompatibilní a pyl jiného druhu závisí i na typu blizny. U krytosemenných rostlin byly popsány dva typy blizen, mokré a suché, které se odlišují schopností povrchové sekrece. Mokré blizny mají výraznou povrchovou sekreci, která zachytává veškerý pyl a umožňuje mu vyklíčit. Oproti tomu povrchová sekrece u suchých blizen chybí a pyl je proto závislý na komunikaci s bliznou, která určuje, která zrna vyklíčí (Heslop-Harrison a Shivanna, 1977). Blizna u brukvovitých rostlin byla popsána jako suchá a pokrytá jednobuněčnými papilami (Heslop-Harrison a Shivanna, 1977). Jako hlavní složky buněčné stěny papil, které umožňují přilnutí pylu, byly nalezeny glykoproteiny. Experiment, který to potvrdil, byl velmi jednoduchý. Blizny ošetřené proteázou nebyly schopny kvůli rozštěpeným proteinům navázat na svůj povrch pyl. Tento efekt však trval pouze dvě hodiny. Po této době již stačily buňky blizny vytvořit nové proteiny, které nahradily již nefunkční, rozštěpené proteiny, což vedlo k obnovení původních vlastností blizny (Stead *et al.*, 1980). Podobný pokus byl proveden i na pylu, kdy byly z buněčné stěny pylu chemicky vymyty glykoproteiny, které byly poté smíchány s vyextrahovanými glykoproteiny z blizny a byla pozorována jejich vzájemná interakce, při níž došlo k jejich spojení (Doughty *et al.*, 1993). Za použití transmisní elektronové mikroskopie byla popsána vytvoření adhezní zóny při kontaktu exiny (vnější vrstvy buněčné stěny pylového zrna) s buněčnou stěnou papilární buňky (Kandasamy *et al.*, 1994). Rovněž bylo popsáno navázání v fragmentů buněčné stěny pylu na

papilární buňku, což potvrdilo, že adhezi pylu nepředchází žádná buněčná komunikace mezi pylem a bliznou. Jde tedy o čistě chemickou interakci mezi složkami exiny a buněčných stěn papilárních buněk (Zinkl *et al.*, 1999).

Pro přesnější objasnění, které geny a obsažené látky jsou zodpovědné za správné přilnutí pylu k blizně u brukvovitých rostlin, byly využity mutantní rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (například Lolle a Cheung, 1993; Verger *et al.*, 2016). Význam lipidů přítomných v buněčné stěně pylu při hydrataci byl studován na mutantech nazvaných *eceriferum* (*cer*; z latiny nemající vosk). Tyto rostliny mají defekt v syntéze dlouhých lipidových molekul, což se projevuje nepřítomností voskové vrstvy na pokožce stonku a šesulí. Kromě toho pylová zrna *cer* mutantů postrádají lipidy uložené v luminách (dutinách) exiny, kvůli čemuž pyl nedokáže hydratovat na blizně a následně vyklíčit. Tento efekt však může být zvrácen, když je opylení mutantním pylem provedeno za vysoké vzdušné vlhkosti (Preuss *et al.*, 1993; Hülskamp *et al.*, 1995; Aarts *et al.*, 1995). Pro studium funkce lipidů při přilnutí pylu k blizně byl vytvořen mutant *fiddlehead* (*fdh*). Za běžných podmínek je pyl schopen vyklíčit pouze na zralé blizně a na žádné jiné části květu (Kandasamy *et al.*, 1994). To neplatí pro *fdh* mutanty. Ti umožňují hydrataci a klíčení pylu na kterékoli epidermální buňce na nadzemní části rostliny (Lolle a Cheung, 1993). Dále byla u těchto mutantů zjištěna zvýšená koncentrace lipidů s dlouhým řetězcem (Lolle *et al.*, 1997). Výzkum na dvou výše zmíněných mutantech dokázal nezastupitelnou roli dlouhých lipidů při interakci pylu s bliznou.

Další látky obsažené v buněčné stěně, které v tomto případě hrají roli v adhezi buněk celé rostliny, nejen pylu a blizny, jsou pektiny. Původní objev zapojení pektinu do adheze buněk byl proveden na mutantu *quasimodo* (*qua*). Mutace v genech QUA1 a QUA2 se na fenotypu projevuje trpasličím vzrůstem rostliny a sníženou přilnavostí buněk kvůli menší koncentraci pektinů v buněčné stěně (Mouille *et al.*, 2007). Původní předpoklad autorů byl, že QUA geny se podílejí na řízení syntézy pektinů. Nejnovější poznatky ale spíše naznačují, že tyto geny jsou součástí signalizační kaskády odpovídající na obsah pektinů v buněčné stěně. Tomu napovídá i charakterizace genu ESMEALDA (ESMD), který pravděpodobně kóduje fukosyltransferázu (Verger *et al.*, 2016). Mutace v tomto genu se neprojevuje žádným fenotypovým rozdílem od divokých rostlin. Když byly v jedné rostlině vyřazeny geny QUA1, QUA2 a současně i ESMD, došlo k zvrácení fenotypu způsobeného mutací v QUA genech. QUA geny jsou pravděpodobně s ESMD genem v jedné signalizační dráze ovlivňující adhezi buněk a slouží zároveň jako supresory ESMD genu (Verger *et al.*, 2016).

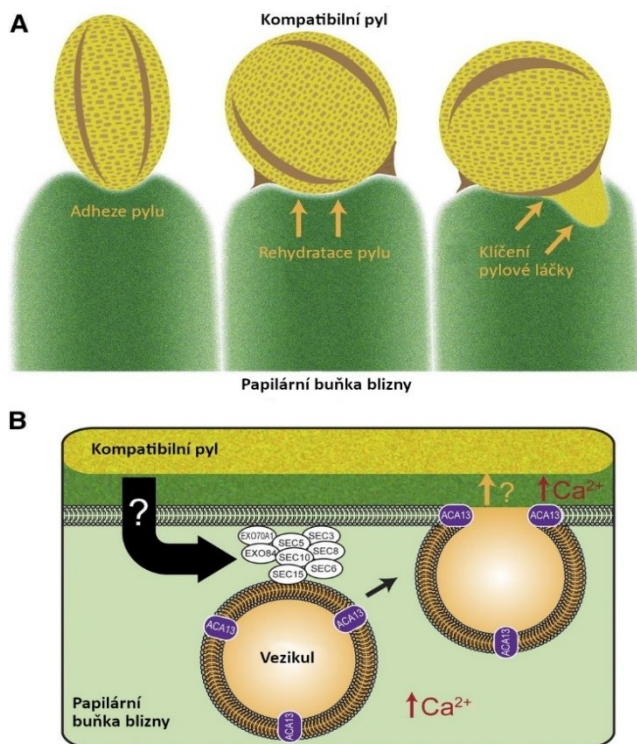
3.2 Rehydratace kompatibilního pylu

Po přilnutí pylového zrna k blizně následuje rozpoznání kompatibilního pylu. Dosud objevené molekulární mechanismy tohoto procesu budou popsány v následující kapitole. Při opylení vhodným pylem dále nastává proces jeho hydratace. Tato fáze je nezbytná, aby se pyl stal metabolicky aktivním a mohl poté vyklíčit a vytvořit pylovou láčku. Ukazuje se, že klíčovou roli při hydrataci pylu mají malé na cystein bohaté proteiny lokalizované v buněčné stěně pylu patřící do skupiny proteinů pylového obalu B (z angličtiny *pollen coat proteins class B*; PCP-B). Slouží jako regulátory hydratace pylu při navázání kompatibilní interakce. PCP-B skupina proteinů je v huseníčku rolním kódována čtyřmi geny. Při mutaci ve více PCP-B genech současně je poškozena hydratace pylu, což vede ke snížení jeho přilnavosti k blizně a k opoždění klíčení pylové láčky (Wang *et al.*, 2017). Již dříve byla popsána skupina PCP třídy A, která interaguje s proteinem příbuzným s S-lokusem1 (z angličtiny *S-locus related protein 1*) a S-lokusovým glykoproteinem (SLG), který se účastní inkompatibilní signalizace. Proto se budou pravděpodobně účastnit signalizace mezi pylem a bliznou, ale přesná úloha PCP-A dosud nebyla popsána (Doughty *et al.*, 1998; Takayama *et al.*, 2000).

Jedním z důležitých signálů po rozpoznání kompatibilního pylového zrna je změna koncentrace vápenatých kationtů Ca^{2+} v papilární buňce (Iwano *et al.*, 2004). Pro sledování hladiny Ca^{2+} byl použit protein cameleon, který mění svou konformaci po navázání Ca^{2+} . Změna konformace je spojena i se změnou vlnové délky vyzařovaného světla. Byly pozorovány tři změny koncentrace Ca^{2+} v papilárních buňkách během interakce s kompatibilním pylem (Iwano *et al.*, 2004). První se projevila v místě kontaktu pylu s papilou během hydratace pylu. Druhá změna se stejnou lokalizací proběhla při klíčení pylového zrna a třetí, nejsilnější nárůst koncentrace Ca^{2+} , se objevil před proniknutím pylové láčky do papily (Iwano *et al.*, 2004).

Dalším prvkem zapojeným do hydratace pylu je exocyst, především pak jeho podjednotka Exo70A1. Tato podjednotka je zapojena rovněž v inkompatibilní odpovědi u brukve řepky. Exo70A1 byl lokalizován v celé plazmatické membráně papilárních buněk (Samuel *et al.*, 2009). Přesto se zdá, že Exo70A1 je aktivní při fúzování váčků s cytoplazmatickou membránou pouze v místě kontaktu s pylem. Zapojení zbývajících sedmi podjednotek do hydratace pylu bylo rovněž popsáno, ale je třeba dalšího výzkumu pro objasnění jejich přesné funkce (Safavian *et al.*, 2015). Obsah transportních váčků není znám, ale předpokládá se, že obsahují látky pro hydrataci pylu a pro rozvolnění buněčné stěny k

usnadnění průniku pylové láčky (Safavian a Goring, 2013). Aquaporiny, které by usnadnily přenos vody do pylu, jsou jedním z možných proteinů transportovaných pomocí těchto váčků (Obr. 4). Nedávno byly popsány dva aquaporiny podílející se na hydrataci pylu. Nebyl ale dosud potvrzen jejich transport s využitím exocystu (Windari *et al.*, 2021).



Obrázek 4: Předpokládaný model fungování exocystu během kompatibilní interakce pylu s bliznou v *Arabidopsis thaliana*.

(A) První fáze reakce na kompatibilní opylení 1) buněčná stěna pylu a papily interagují a dojde k přilnutí pylu. 2) pylové zrno je rehydratováno. 3) Pylová láčka klíčí a prorůstá papilární buňkou.

(B) Po kompatibilním opylení dojde k dosud neznámému signálu (znázorněný černou šipkou), u něhož se předpokládá, že spouští skládání komplexu podjednotek exocystu. Exocyst zajišťuje transport váčků s látkami potřebnými k zahájení hydratace a růstu pylové láčky z kompatibilního pylového zrna. Jedním z možných transportovaných proteinů je Ca^{2+} -ATPáza 13 (ACA13) (Iwano *et al.*, 2014). U dalších transportovaných proteinů (oranžová šipka) je předpokládána funkce v transportu vody k hydrataci pylu a při rozvolnění buněčné stěny papilární buňky pro snadnější průnik pylové láčky.

Upraveno podle Safavian *et al.*, (2015)

3.3 Klíčení pylové láčky

Po hydrataci pylu nastává fáze klíčení pylové láčky, tím je v následujícím textu chápán proces, který naruší buněčnou stěnu pylu a umožní růst pylové láčky. Základní strukturní složkou exiny je sporopolenin, vysoce odolný biopolymer, který umožňuje pylu přežít i po dlouhou dobu nehostinné podmínky vnějšího prostředí. Aby došlo k narušení této struktury, je zapotřebí silné enzymatické aktivity. Jako nejpravděpodobnější enzymy toho schopné se jeví enzymy s obdobnou enzymatickou aktivitou jakou mají peroxidáza a kataláza (Edlund *et al.*, 2017). Při experimentu byla použita směs peroxidázy, katalázy a peroxidu vodíku, která dokázala lokálně narušit exinu většiny pylových zrn huseníčku rolního. Pravděpodobný mechanismus celého procesu je následující. Při reakci peroxidu vodíku produkovaného papilární buňkou s katalázou, je peroxid vodíku rozložen a je vytvořeno teplo společně s krátce se vyskytujícími vysoce reaktivními kyslíkovými radikály. Ty jsou využity peroxidázou při oxidaci sporopoleninu (Edlund *et al.*, 2017). Přestože byl peroxid vodíku na blizně detekován, není znám mechanismus, kterým buňky spouští jeho tvorbu. Uvažuje se o zapojení Ca^{2+} , jehož

zvýšená koncentrace byla pozorována těsně před vyklíčením pylové láčky (Iwano *et al.*, 2004). Účast Ca^{2+} se jeví jako velmi pravděpodobná, protože v proteomu blizny hořčice habešské (*Brassica carinata*) bylo identifikováno 17 transportérů Ca^{2+} a v proteomu pylu jich bylo dokonce 23 (Robinson *et al.*, 2021). Mezi nimi i ortolog Ca^{2+} inhibované ATPázy 9 vyskytující se v huseníčku rolním. Mutace v genu pro ATPázu 9 vede k částečné sterilitě pylu (Schiøtt *et al.*, 2004).

Tato kapitola shrnula nové poznatky o molekulárních interakcích mezi pylem a bliznou, které předcházejí růstu pylové láčky a následnému oplození vaječné buňky. Došlo k objasnění fungování mechanismu přilnutí pylu k blizně, který funguje na interakci složek buněčných stěn pylového zrna a papilární buňky. Tím je zajištěna stabilní pozice pylu na blizně, která je nutná pro další komunikaci. Ta zajišťuje rozpoznání kompatibilního pylu a jeho následnou hydrataci, na níž se podle nejnovějších poznatků podílí komplex exocyst. Rovněž došlo k popsání pravděpodobného mechanismu, který umožňuje narušení buněčné stěny pylu a následné vyklíčení pylové láčky.

4 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA SI U ČELEDI *BRASSICACEAE*

V této kapitole si popíšeme postupný proces objasňování molekulárních mechanismů homomorfní sporofytické pylové inkompatibility a dosud objevené proteiny, které zajišťují její funkci u brukvovitých rostlin. Jelikož do této čeledi patří i hospodářsky významné rostliny, jako je brukev řepák (*Brassica rapa*), brukev zelná (*Brassica oleraceae*) a brukev řepka (*Brassica napus*), je porozumění fungování SI u čeledi *Brassicaceae* důležité i z komerčního hlediska. Znalosti této problematiky se využijí například při šlechtění nových kultivarů a hybridů výše zmíněných rostlin. Po představení základních proteinů zodpovědných za rozpoznání inkompatibilního pylového zrna, si přiblížíme i funkci dalších proteinů, které s nimi interagují. Dále bude popsáno několik signálních molekul, které se taktéž podílejí na fungování SI.

U homomorfní sporofytické pylové inkompatibility dochází k rozpoznání nekompatibilního pylu již na papilárních buňkách blizny během několika prvních minut po opylení. Nekompatibilní pylová zrna ve většině případů nevyklíčí v pylovou láčku kvůli selhání rehydratace pylu. Pokud k růstu pylové láčky dojde, není schopna prorazit povrchem blizny a roste pouze po jejím povrchu a následně umírá (Stout, 1931). Od počátku 30. let 20. století se předpokládalo, že dochází k buněčné interakci mezi pylovým zrnem a povrchem blizny. Další hypotéza vycházela z myšlenky, že celý systém je založen na skupině genů. Tyto geny by spolu interagovaly a jejich vzájemné působení by určovalo, zda je pyl inkompatibilní či nikoliv. Jednotlivé alely genů by byly v recesivním, dominantním nebo kodominantním vztahu. (Bateman, 1955). Později byly oba předpoklady potvrzeny a tato skupina genů byla nazvána S-lokusem (z anglického *self-incompatibility locus*). Transkript jednoho z genů kódujících S-lokus byl pomocí *in situ* hybridizace lokalizován v papilárních buňkách blizny. Tento transkript byl pozorován pouze ve zralých papilárních buňkách a nevyskytoval se v žádném jiném typu buněk blizny (Nasrallah *et al.*, 1988). Přesněji byly glykoproteiny specifické pro S-lokus lokalizovány za využití imunocytochemických metod v buněčné stěně především v místech přiléhajících k plazmatické membráně. U mladších papilárních buněk byly glykoproteiny nalezeny v cytoplazmě a u nejmladších papilárních buněk nebyly nalezeny vůbec. Absence glykoproteinů u nejmladších buněk byla vysvětlena aktivací exprese jejich genů až v pozdějším vývoji buňky. (Kandasamy *et al.*, 1989). Konkrétně byl v S-lokusu rozlišen gen pro S-lokusovou receptorovou kinázu (SRK) a S-lokusový glykoprotein (SLG). Podle nukleotidové sekvence genomové DNA a kódující DNA byla SRK charakterizována jako transmembránový receptor se specifickou serin/threoninovou kinázovou aktivitou. SRK je polymorfní gen, který

dává vzniknout velkému množství alternativních transkriptů kódujících odlišné proteiny. Popsána byla i vysoce homologní extracelulární doména SRK a SLG (Nasrallah *et al.*, 1987; Stein *et al.*, 1991). Kromě papilárních buněk blizny byla pozorována transkripce S-lokusu, konkrétně SLG genu, i v buňkách tyčinek (Toriyama *et al.*, 1991). Dále bylo dokázáno, že nefunkční gen pro SRK způsobí ztrátu pylové inkompatibility a umožní rostlině získat schopnost samosprašení (Nasrallah *et al.*, 1994). Při podrobnějším zkoumání SRK a SLG bylo zjištěno, že tyto dva proteiny spolu interagují a že SLG může pomáhat ve stabilizaci SRK (Yu *et al.*, 1996). Jelikož SRK byla považována za samičí determinant SI kvůli své expresi v papilárních buňkách, hledal se i samčí determinant SI, který byl pravděpodobně specificky exprimován v tyčinkách.

Jako poslední z genů lokalizovaných na S-lokusu a zodpovědných za SI byl popsán S-lokusový na cystein bohatý protein (z angličtiny *S-locus cystein rich protein*, SCR; také známý jako *S-locus protein 11*). Tento gen je exprimován pouze v tyčinkách a je stejně vysoce polymorfní jako SRK. Byl to onen hledaný samčí determinant SI. Bylo experimentálně dokázáno, že SCR je nezbytnou součástí SI a že slouží jako ligand pro SRK receptor (Takayama *et al.*, 2001). Transkripční aktivita genu pro SCR byla pozorována pouze po vzniku haploidních mikrospor, přestože SCR je aktivní až při kontaktu pylového zrna s bliznou. Tato nesrovnalost byla vysvětlena pozorovanou expresí genu v buňkách tapeta, které dávají vzniknout několika složkám buněčné stěny pylového zrna, především exině (Schopfer *et al.*, 1999; Takayama, *et al.*, 2000). Lokalizace SCR v buněčné stěně pylového zrna byla potvrzena díky imunoelektronové mikroskopii (Shiba *et al.*, 2001).

Během studia jednotlivých alelických forem genů pro SLG, SRK a SCR u brukve zelné a brukve řepáku bylo po osekvenování S-lokusu u několika desítek jedinců zjištěno, že v některých sekvencích nebyly přítomny sekvence pro SLG. Přesto i rostliny bez SLG genu nebyly samosprašné. Z tohoto důvodu není SLG považován za nezbytnou součást SI. (Sato *et al.*, 2002).

4.1 Další geny zapojené do sporofytické inkompatibility

Po odhalení základních součástí SI se pozornost výzkumníků obrátila na popsání celé signální kaskády, na jejímž počátku stojí interakce SCR a SRK a na konci níž je signál, který zabraňuje vyklíčení nekompatibilního pylového zrna. Mezi prvními jejími částmi byl popsán protein *ARM-repeat-containing protein 1* (ARC1). Tento protein patří do rodiny PUB proteinů

(z angličtiny *plant U-box proteins*; řadí se do rodiny ubiquitin ligáz), které jsou charakteristické svou vysoce konzervovanou U-box doménou složenou z asi 70 aminokyselin. Váže se na SRK kinázovou doménu. Také bylo popsáno, že snížení množství mRNA tohoto genu je spojeno se zhoršeným fungováním SI u brukve řepky. Jeho funkcí je v přítomnosti aktivované SRK podporovat ubiquitinylaci a následnou proteazomální degradaci kompatibilních faktorů v pestíku, což nakonec vede k odmítnutí inkompatibilního pylu (Stone *et al.*, 1999; Stone *et al.*, 2003). V návazných pokusech byly hledány proteiny interagující s ARC1. U brukve řepky byla popsána interakce ARC1 s Exo70A1, což je podjednotka komplexu exocyst. Ztráta funkce Exo70A1 vede u *Brassica rapus* a *A. thaliana* k odmítnutí kompatibilního pylu a naopak zvýšená exprese vede u inkompatibilní brukve řepky k částečnému narušení funkce SI a může tedy dojít i k opylení vlastním pylem. Exo70A1 se účastní hydratace pylu na blizně a při inkompatibilní odpovědi je spoluzodpovědný za odmítnutí rehydratace pylového zrna (Samuel *et al.*, 2009). ARC1 rovněž reguluje množství glyoxalázy 1 (GLO1). GLO1 je enzym potřebný pro detoxikaci methylglyoxalu, což je cytotoxický vedlejší produkt glykolýzy. Methylglyoxal slouží v papilárních buňkách jako jeden z faktorů odpovídající za SI. Při snížení koncentrace GLO1 dojde ke zvýšení množství methylglyoxalu, což vyvolá inkompatibilní odpověď (Sankaranarayanan *et al.*, 2015). Při nadměrné expresi GLO1 se hladina methylglyoxalu sníží a to vede až k narušení SI u *Brassica napus*. Po opylení nekompatibilním pylem dojde ke zvýšení koncentrace methylglyoxalu. S tím je spojena i zvýšená exprese genů reagujících na tuto látku, včetně GLO1. ARC1 aktivovaný inkompatibilní reakci zprostředkovává degradaci GLO1 a dochází tak k udržení zvýšené koncentrace methylglyoxalu v papilární buňce (Sankaranarayanan *et al.*, 2015).

Dalším proteinem účastnícím se této signalizace je proteinová kináza M-loku (z angličtiny *M-locus protein kinase*, MLPK). Tato kináza je lokalizována v plazmatické membráně papilárních buněk a byly popsány dvě její formy lišící se pouze v N-terminální sekvenci. Za použití biomolekulární fluorescenční komplementace (BiFC) byla dokázána interakce obou forem MLPK s SRK. Při vyřazení genu pro MLPK došlo k zastavení signalizace nutné pro odmítnutí inkompatibilního pylu a mutantní rostlina se tak stala samosprašnou. Pro správnou funkci MLPK je rovněž nutné její umístění v plazmatické membráně. Při zásahu do sekvence N-konce, MLPK ztratila svou původní lokalizaci a mutantní rostliny opět nebyly schopné aktivovat SI. Přestože není přesná fyziologická funkce MLPK ještě objasněna, je její funkce v SI neopomenutelná (Kakita *et al.*, 2007). Výzkum v tomto směru není zdaleka možné považovat za ukončený. V další studii bylo identifikováno devatenáct unikátních proteinů,

jejichž množství se snižovalo po inkompatibilním opylení. Funkce těchto proteinů je predikována v biosyntetických drahách, během signalizace, v organizaci cytoskeletu a při exocytóze (Samuel *et al.*, 2011). Jedním z identifikovaných proteinů byl již dříve popsáný *S-locus related-1 protein* (SLR1), který pomáhá kompatibilnímu pylu přilnout na buňky blizny (Luu *et al.*, 1999). Jeho degradace při rozpoznání inkompatibilního pylu zabrání pylovému zrnu přilnout k papilárním buňkám, takže nemůže dojít k rehydrataci pylu.

Svou úlohu při SI hraje i cytoskelet a jeho přestavby v papilárních buňkách. Zatímco při kompatibilním opylení dochází k polymerizaci aktinu, což napomáhá transportu látek nutných pro hydrataci pylu a klíčení pylové láčky, opylení inkompatibilním pylem vede k reorganizaci a pravděpodobně depolymerizaci aktinu (Iwano *et al.*, 2007). Pozorování těchto procesů bylo možné díky rhodanin-faloidinovému, barvení aktinu. Role aktinu byla potvrzena při použití cytochalasinu B, který inhibuje polymeraci aktinu. Po jeho aplikaci do papilárních buněk byla výrazně zpomalena hydratace pylu a růst pylových láček (Iwano *et al.*, 2007).

Rovněž bylo studováno i případné zapojení mikrotubulů. V tomto případě byly aplikovány dvě látky působící na mikrotubuly: taxol, který zabraňuje depolymerizaci, a oryzalin, který naopak brání polymerizaci. Při inkompatibilním opylení nebyl pozorován vliv ani jednoho z mikrotubulárních jedů. Během kompatibilního opylení však po aplikaci taxolu došlo ke snížení množství hydratovaného pylu a vyklíčených pylových láček. Oryzalin pak vykazoval opačné působení, kdy podporoval hydrataci pylu a jeho klíčení. Funkce mikrotubulární sítě proto bude podrobena dalšímu výzkumu (Samuel *et al.*, 2011).

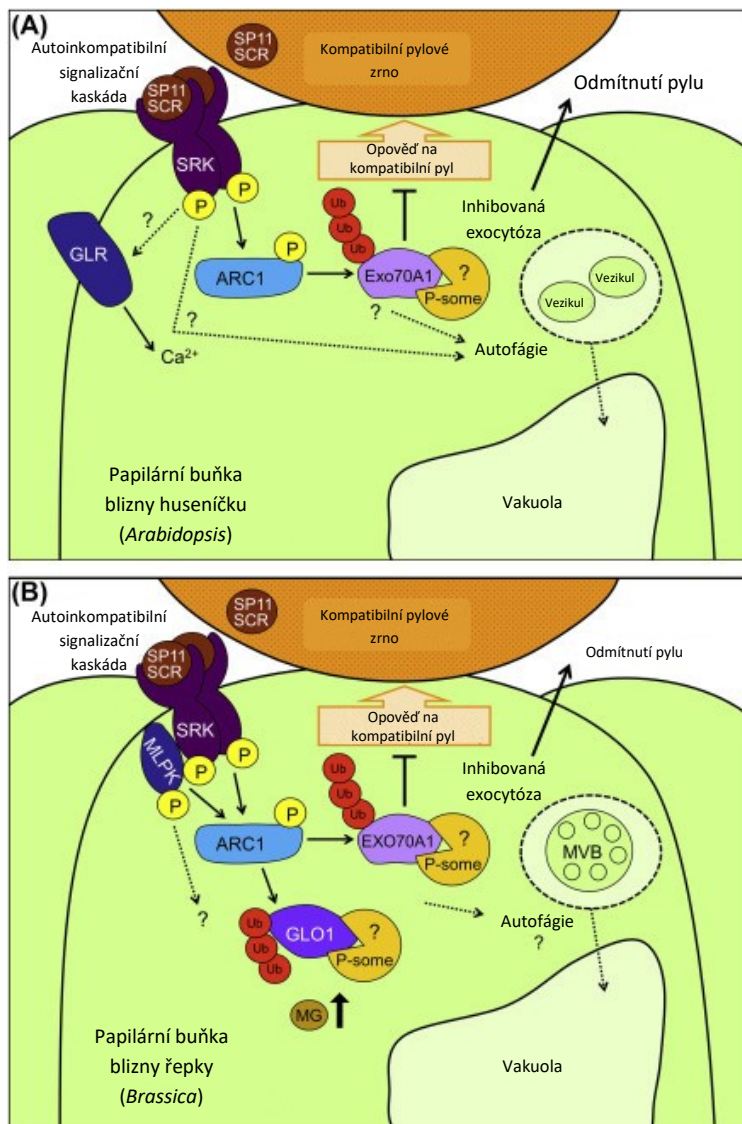
4.2 Signalizační molekuly zapojené do sporofytické inkompatibility

Kromě hledání asociovaných proteinů k některému ze základních prvků SI se výzkum zaměřuje i na jiné signální molekuly. Jednou z významných signálních molekul v rostlinných buňkách jsou vápenaté kationty Ca^{2+} . Bylo dokázáno, že zvýšení koncentrace Ca^{2+} v papilárních buňkách po interakci mezi SRK a SCR vede k odmítnutí inkompatibilního pylového zrna, zatímco při opylení kompatibilním pylem zůstává hladina Ca^{2+} na stejné nebo pouze mírně vyšší úrovni. Jako hlavní zprostředkovatel tohoto signálu byl určen receptorový kanál podobný glutamátovému kanálu (z angličtiny *glutamate-like receptor channel*, GLR). Mutanti v genu pro GLR kanál měli omezenou schopnost odpovědi na inkompatibilní pyl, takže

tento pyl byl rovněž schopen vyklíčit. Při umělém navýšení koncentrace Ca^{2+} v papilárních buňkách naopak došlo i k odmítnutí kompatibilního pylu a byla zastavena jeho hydratace na povrchu blizny (Iwano *et al.*, 2015).

Vedle koncentrace vápenatých iontů se v signalizaci odpovědi na inkompatibilní opylení účastní i etylen. Etylen je plynným rostlinným hormonem, který reguluje širokou škálu vývojových procesů v rostlině, od klíčení semen, dozrávání plodů, senescenci, po odpověď na abiotické a biotické stresy (shrnutu v Iqbal *et al.*, 2017). Při experimentech byl na buňky pestíku aplikován ethefon, syntetická látka rozkládající se na etylen. Na ošetřených pestících docházelo ke klíčení inkompatibilního pylu. Rovněž byla pozorována programovaná buněčná smrt papilárních buněk. Když však byly pestíky vystaveny inhibitoru syntézy etylenu chloridu kobaltnatému CoCl_2 , nebo inhibitoru signalizace etylenu dusičnanu stříbrnému AgNO_3 , nedošlo k vyklíčení pylu i při opylení kompatibilním pylem (Su *et al.*, 2020). Ukázalo se, že programovaná buněčná smrt papilárních buněk způsobená etylenem, je nezbytná pro úspěšné opylení u brukve řepáku. Tento poznatek nabízí i praktické využití. Jelikož má většina brukvovitých plodin SI, je poměrně složité je šlechtit a vytvářet hybridní kultivary. Po ošetření brukve řepáku ethafonem však došlo k narušení fungování SI, což umožní vznik efektivních způsobů inbredních linií plodin se zachovanou SI. Proteiny zodpovědné za reakci papilárních buněk na etylen a jeho přesné zařazení do signalizační dráhy nebylo dosud přesně určeno. Jedním z kandidátních proteinů, na který se zaměří další výzkum, je na etylen necitlivý protein 3 (z angličtiny *ethylen-insensitive protein 3*) (Su *et al.*, 2020).

Přestože není dosud znám celý molekulární mechanismus fungování sporofytické inkompatibility u čeledi *Brassicaceae*, došlo v posledních 30 letech k výraznému posunu v chápání jeho fungování. Byly popsány základní proteiny (SCR, SRK, SLG) zodpovědné za rozpoznání inkompatibilního pylu, došlo k charakterizování funkce několika dalších proteinů v signalizační kaskádě SI (ARC1, GLO1, Exo70A1, MLPK) a dokonce se podařilo prokázat roli signalizačních molekul (Ca^{2+} , etylen), které na první pohled se SI nesouvisejí. I přes tento obrovský skok čeká vědce mnoho práce a experimentů, než dojde k objasnění všech záhad sporofytické inkompatibility.



Obrázek 5: Model pylové inkompatibility u rodu huseníček (*Arabidopsis*) a řepka (*Brassica*)

Schéma interakce pylu s papilární buňkou a následné buněčné odpovědi při rozpoznání inkompatibilního pylu v huseníčku (A) a řepce (B). Oba druhy sdílí řadu podobností, ale v některých krocích se odlišují. Pylový determinant inkompatibility SCR se váže na SRK blízky stejné alely S-locusu. To vede k autofosforylaci SRK a následně k fosforylaci a aktivaci ARC1. Aktivovaný ARC1 ubiquitinyluje Exo70A1, který je degradován v proteazomu. Procesy vedoucí k hydrataci kompatibilního pylu (např. exocytóza) jsou zablokovány a pylové zrnko je odmítnuto. (A) V huseníčku bylo popsáno zvýšení koncentrace Ca^{2+} v důsledku aktivace GLR kanálu. Tím je spuštěna autofágie, která odstraní sekretorické váčky (vezikuly). Přesné mechanismy vedoucí k autofágii vezikulů nejsou dosud známy. V řepce (B) ARC1 ubiquitinyluje i GLO1 a způsobuje tak jeho degradaci v proteazomu. Ta je zodpovědná za zvýšení hladiny cytotoxického methylglyoxalu, jehož pravděpodobnou funkcí je modifikace faktorů kompatibilní odpovědi a poškození jejich funkce. Multivezikulární tělíska (z angličtiny *multivesicular bodies*, MVB), která jsou zapojena do transportu extracelulárních váček pro kompatibilní odpověď, jsou nasměrována do vakuoly, pravděpodobně procesem autofágie. Upraveno podle Jany *et al.*, (2019)

5 STUDIUM PYLOVÉ INKOMPATIBILITY U RODU *ARABIDOPSIS*

Mimo výše zmíněných hospodářsky významných rostlin rodu *Brassica* se SI studuje od počátku tohoto tisíciletí i u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Přestože je tento druh samosprašný, dostal se na přední místo při studiu SI díky úspěšnému celogenomovému osekvenování v roce 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Další předností huseníčku rolního jsou blízké příbuzné druhy řeřišničník Hallerův (*Arabidopsis halleri*) a řeřišničník skalní (*Arabidopsis lyrata*)¹, které mají SI a jsou striktně cizosprašné. Také rostliny rodu *Arabidopsis* nebyly nikdy v minulosti cíleně pěstovány člověkem, což umožňuje studium SI v přírodních populacích, které nebyly objektem cíleného šlechtění. V následujícím textu si objasníme výhody studia SI u modelové rostliny huseníčku rolního a řeřišničníku skalního a význam vyšlechtění linií huseníčku s aktivní SI. Také budou shrnuty nejnovější poznatky (jako je vliv aktinového cytoskeletu, ztráta funkce při vystavení vysoké teplotě a další) o SI zjištěné právě na rostlinách rodu *Arabidopsis*.

Rod *Arabidopsis* se od rodu *Brassica* oddělil asi před 15-20 miliony let (Yang *et al.*, 1999). K samotnému oddělení druhů huseníčku rolního a řeřišničníku skalního a Hallerova došlo asi před 5 miliony let (Koch *et al.*, 2001). Po těchto zjištěních a zařazení druhů do fylogenetického stromu brukvovitých byl další výzkum zaměřen na odhalení původu SI a na rozdíly v S-lokusu mezi jednotlivými druhy. Při analýze S-lokusu u *A. lyrata* bylo zjištěno, že tento lokus obsahuje dva úzce spojené ortologní geny, gen pro SRK a gen pro SCR. Tyto proteiny umožňují rozpoznání inkompatibilního pylu na papilárních buňkách pestíku. Oproti S-lokusu brukve řepáku však genom řeřišničníku skalního nezahrnuje gen pro SLG. Rovněž se geny *A. lyrata* pro SRK a SCR liší od genů brukve svým uspořádáním v S-lokusu a délkou své sekvence. Porovnání S-lokusů obou druhů naznačuje, že od oddělení rodů prodělal S-lokus několik duplikací, a že byl přemístěn mezi dvěma vzdálenými pozicemi na chromozomu během oddělení vývoje brukve a řeřišničníku. Další analýza potvrdila přítomnost ortologních genů pro SRK a SCR i u samosprašného huseníčku rolního (Kusaba *et al.*, 2001).

Jelikož se přeměna cizosprašných rostlin na rostliny samosprašné objevuje velmi často v přírodních i domestikovaných rostlinných populacích, pokusili se vědci navodit obrácený

¹ Na základě analýzy DNA byly do rodu *Arabidopsis* zařazeny některé z druhů rodu *Cardaminopsis*, kam patřily i druhy řeřišničník skalní a řeřišničník Hallerův, dříve pojmenované jako *Cardaminopsis petrarea* a *Cardaminopsis halleri* (Al-Shehbaz a O'Kane, 2002)

proces. Jejich cílem bylo získat autoinkompatibilní rostlinu z běžně samosprašného druhu huseníčku rolního. To se podařilo vložením genů pro SRK a SCR z *A. lyrata* do genomu huseníčku rolního (Nasrallah *et al.*, 2002). První generace transformovaných rostlin byla stále samosprašná, ale některé rostliny vykazovaly snížení množství vyklíčeného pylu na blizně. U potomků těchto jedinců se však již objevila silná inkompatibilní reakce při opylení vlastním pylem a byly tak získány linie huseníčku rolního se SI (Nasrallah *et al.*, 2002). Analýzou S- lokusu huseníčku rolního bylo zjištěno, že je vykazován výrazný polymorfismus v genech potřebných pro SI, přestože jsou všechny známé populace *A. thaliana* samosprašné. Nádavkem k tomuto polymorfismu je ukrytá schopnost exprese genů potřebných pro SI, která se objeví pouze po vložení genů z autoinkompatibilní *A. lyrata* (Nasrallah *et al.*, 2004). V upřesňující studii byl polymorfismus potvrzen pouze u genu pro SRK u všech tří druhů (*A. lyrata*, *A. thaliana*, *A. halleri*), zatímco gen kódující SCR polymorfismus *A. thaliana* postrádal. To vedlo autory výzkumu k myšlence, že ztráta pylové inkompatibility proběhla u huseníčku rolního relativně nedávno z důvodu fixace nefunkční alely genu SCR v populaci. Při výpočtu mutační rychlosti vyšlo, že přechod k samosprašnosti huseníčku rolního se mohl odehrát nanejvýše před 413 tisíci lety. Autoři z toho usuzují, že huseníček rolní měl funkční SI alespoň 91,7 % doby od svého vzniku jako samostatný druh (Bechsgaard *et al.*, 2006).

5.1 Ortologní geny sporofytické inkompatibility přítomné v rodu *Arabidopsis*

Po vytvoření stabilních transgenních linií *A. thaliana* s funkční SI se u těchto rostlin začal studovat vliv dalších proteinů účastnících se inkompatibilní odpovědi, jejichž role v SI byla poprvé popsána u brukve řepáku. APK1b v *A. thaliana* je považován za ortolog genu pro MLPK u *Brassica rapa*. APK1b sdílí s MLPK asi 76 % podobnost své genomové sekvence a má rovněž dvě alternativní formy. Pro otestování zapojení APK1b do SI byly vytvořeny mutantní rostliny huseníčku rolního s vyřazeným genem pro APK1b. Tito mutantní byli uměle zkříženi s transgenními *A. thaliana* s funkční SI. Teprve ve třetí generaci byly získány rostliny, u nichž nebyl detekován transkript APK1b, přesto však měli tito jedinci silnou inkompatibilní odpověď. Výsledkem experimentů bylo zjištění, že APK1b není součástí signalizační dráhy SI u *A. thaliana* (Kitashiba *et al.*, 2011).

Další gen popsáný u brukve je ARC1. Ortolog tohoto genu nalezený v genomu huseníčku rolního je ale pouze fragmentovaným pseudogenem, který postrádá většinu své

kódující sekvence (Kitashiba *et al.*, 2011). Při výzkumu ortologů u dalších druhů z čeledi *Brassicaceae* bylo zjištěno, že u několika druhů, které ztratily SI, došlo k rozpadu nebo deleci ARC1 genu. Z těchto pozorování byla odvozena hypotéza, že ARC1 ztrácí svou funkci při přechodu druhu k samosprášení. Pro otestování hypotézy byly připraveny transgenní rostliny *A. lyrata*, u nichž byla pomocí RNA interference zablokována translace mRNA ARC1. U rostlin řeřišničníku skalního bez ARC1 došlo k narušení SI obdobně jako u brukve řepáku. To ukazuje konzervovanou roli ARC1 ve SI napříč čeledí *Brassicaceae* (Indriolo *et al.*, 2012). V navazující studii byl ARC1 gen spolu s geny pro SRK a SCR z *A. lyrata* vložen do ekotypu huseníčku rolního *Columbia-0*, u něhož při vložení genů výhradně pro SRK a SCR nedošlo ke vzniku SI. Cílem experimentu bylo ověřit, zda je ARC1 potřebný pro obnovu funkce SI. Výsledek pokusu funkci ARC1 v signalizaci SI potvrdil. Při vložení všech tří genů část transgenních rostlin vykazovala silnou inkompatibilní odpověď při samosprášení. Neočekávaně byla u získaných transgenních rostlin pozorována herkogamie (prostorové oddělení pestíku a tyčinek v květu). Přestože je u *A. lyrata* pestík vždy vyšší než tyčinky, nebyla tato morfologie květu nikdy dříve pozorována u ekotypu *A. thaliana Columbia-0* (Indriolo *et al.*, 2014). Tento fenotyp nebyl ani popsán u transgenních rostlin ekotypu *Columbia-0*, které exprimovaly funkční SRK a SCR. Po přeměření délky pestíku a tyčinek u divokých a transgenních rostlin, bylo zjištěno, že herkogamie je způsobena prodloužením pestíku (Indriolo *et al.*, 2014). Později byl obdobný experiment zopakován s použitím genu pro ARC1, SRK a SCR z *A. halleri* a *Brassica rapa*. Geny z brukve nebyly schopny obnovit funkci SI u *A. thaliana*. Geny původem z *A. halleri* byly schopné znovu aktivovat SI u ekotypu *Columbia-0*. Tím byla nezávisle dokázána role ARC1 v signální dráze pro odmítnutí inkompatibilního pylu u huseníčku. Dále byla sledována i úroveň exprese jednotlivých genů pro ARC1, SRK a SCR různého původu v transgenních rostlinách. Zde se žádná souvislost mezi jejich zvýšenou či sníženou koncentrací v papilárních buňkách na funkci SI neprokázala (Zhang *et al.*, 2019).

Přestože huseníček rolní nemá funkční gen pro ARC1, bylo u něho otestováno potenciální zapojení Exo70A1 do signalizace u transgenních rostlin exprimujících *A/SRK* a *A/SCR*. Opětovně měl Exo70A1 nalezený v genomu huseníčku vysokou sekvenční podobnost s Exo70A1 z brukve řepáku. Nadměrnou expresí Exo70A1 nedošlo u transgenních huseníčků k oslabení SI (Kitashiba *et al.*, 2011).

Společný původ má rovněž gen pro GLO1 v brukvi a huseníčku rolním. V genomech huseníčku rolního a řeřišničníku skalního byly nalezeny paralogní geny s velkou sekvenční

podobností ke genu GLO1 v brukvi. Při nadměrné expresi GLO1 v brukvi řepáku bylo pozorováno narušení funkce SI, což umožnilo samosprášení. Pro ověření výsledku byly připraveny transgenní rostliny huseníčku s vloženým nadměrně exprimovaným genem GLO1 z brukve a geny pro ARC1, SCR SRK z *A. lyrata*. Mutantní rostliny poté nevykazovaly vlastnosti SI, zatímco rostliny bez vloženého genu pro GLO1 ano. Expresе všech genů byla potvrzena metodou kvantitativní rtqPCR. Tím se dokázala role GLO1 při regulaci inkompatibilní odpovědi (Kenney *et al.*, 2020).

5.2 Funkce cytoskeletu ve sporofytické inkompatibilitě

Pro správné fungování SI je nutné, aby SRK byla začleněná v cytoplasmatické membráně papilárních buněk. Významným mechanismem pro transport proteinů do cytoplasmatické membrány je klatrinem zprostředkovaná endocytóza (z anglického *clathrin-mediated endocytosis*). Na té se podílí adaptorový proteinový komplex 2 (z anglického *adaptor protein complex 2*, AP2). Přestože SRK nese doménu pro možnou interakci s AP2, nebylo dokázáno, že by byla AP2 nezbytná pro transport SRK do cytoplasmatické membrány pomocí klatrinových váčků. Předpokládá se, že role AP2 není nezbytná pro fungování SI u autoinkompatibilních linií huseníčku rolního (Yamamoto *et al.*, 2018).

K objasnění role aktinového cytoskeletu během SI, jehož zapojení bylo dříve popsáno u brukve řepáku (Iwano *et al.*, 2007), byly provedeny mikroskopické analýzy živých buněk (z angličtiny *live-cell imaging*). Tento druh mikroskopie umožňuje pozorovat procesy v živých buňkách bez jejich poškození v průběhu daného časového intervalu. Proto byla sledována dynamika aktinu v daném časovém intervalu. Před opylením byl aktinový cytoskelet tvořen převážně svazky umístěnými u podélné osy buněk blizny. Po opylení kompatibilním pylem došlo k soustředění aktinu v místech kontaktu buňky s pylovým zrnem (Rozier *et al.*, 2020). Zvýšené množství aktinu bylo pozorováno rovněž těsně před vyklíčením pylové láčky v místě kontaktu pylu s bliznou a při jejím prorůstání bylo sledováno přemístění aktinu podél pylové láčky. Při opylení papilární buňky několika kompatibilními pylovými zrny současně, bylo soustředění aktinu v místě kontaktu zaznamenáno u každého z nich. Žádné podobné soustředění aktinu nebylo zachyceno při opylení inkompatibilním pylem.

Autoři rovněž sledovali úroveň hydratace jednotlivých pylových zrn. Zjistili, že kompatibilní pyl je téměř okamžitě po dopadu na bliznu hydratován a po deseti minutách je pylové zrno kompletně zavodněno (Rozier *et al.*, 2020). Za stejnou dobu hydratace u většiny

inkompatibilního pylu ani nezapočne. I když 19 % inkompatibilního pylu jevílo známky hydratace, tato pylová zrna nikdy nevyklíčila (Rozier *et al.*, 2020). Při zvýšené vzdušné vlhkosti, která napomohla samovolné hydrataci pylu, vyklíčil také inkompatibilní pyl, ale pylové láčky rostly pomalu a nebyly schopné proniknout buněčnou stěnou do papilární buňky. Aktinový cytoskelet napomáhá hydrataci pylu ve dvou fázích. Po počáteční fázi, která zajistí dosažení určitého obsahu vody v pylovém zrnu, nastane druhá fáze. Během ní dojde k drastickému poklesu množství vody v cytoplasmě pylu a začne růst pylové láčky. Veškerá popsaná pozorování byla provedena na transgenním huseníčku rolním se SI v *semi in-vivo* podmínkách (Rozier *et al.*, 2020).

5.3 Vliv zvýšené teploty na fungování sporofytické inkompatibility

U linií *A. thaliana* se SI, byl rovněž popsán vliv zvýšené teploty na funkci pylové inkompatibility. Při vystavení blizen opylených inkompatibilním pylem při teplotě 29 °C po dobu 16 hodin nedošlo k vyklíčení pylu a SI nebyla ovlivněna zvýšenou teplotou. Když však byla blizna vystavena teplotnímu stresu po dobu 6 hodin než byla opylena, došlo k vyklíčení několika inkompatibilních pylových zrn. Prodloužení doby teplotního stresu před opylením na 16 hodin způsobilo, že při porovnání počtu vyklíčeného inkompatibilního a kompatibilního pylu bylo srovnatelné. Autoři si dále položili otázku, jestli zvýšená teplota poškozuje fungování SI v pylu, nebo v blizně. Proto byly rostliny vystaveny teplotnímu stresu a následně opyleny pylem z kontrolních rostlin. Proveden byl i opačný postup, kdy se na kontrolní bliznu nanasíl pyl ze stresované rostliny (Yamamoto *et al.*, 2019). V prvním případě došlo k vyklíčení a růstu pylové láčky, zatímco ve druhém bylo vyklíčení pylového zrna inhibováno. Z toho lze usoudit, že zvýšená teplota ovlivňuje SRK, která je zodpovědná za rozpoznání inkompatibilního pylu na blizně, a nemá vliv na SCR, který se vyskytuje v pylu. Při vnitrobuněčné lokalizaci SRK bylo pozorováno snížené množství SRK v cytoplazmatické membráně, pokud k vystavení zvýšené teplotě došlo během vývoje papilárních buněk. To potvrdilo, že nesprávná lokalizace SRK způsobená vysokou teplotou vede k poškození funkce SI (Yamamoto *et al.*, 2019).

V této kapitole byl popsán význam transgenních rostlin huseníčku rolního během výzkumu SI u čeledi *Brassicaceae*. Nejenom že linie *A. thaliana* s aktivní SI umožňují ověřit funkci proteinů dříve popsaných jako součást signalizace SI u brukve na novém rodu, ale jsou také zdrojem poznání o evolučním vývoji SI. Dále je díky nim možné postupně popsat proces, který vedl ke ztrátě SI u huseníčku rolního a využít nových poznatků u jiných druhů.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout známé poznatky o sporofytické inkompatibilitě (SI) brukvovitých rostlin, především pak u rodů řepka (*Brassica*) a huseníček (*Arabidopsis*), na kterých stále probíhá intenzivní výzkum této problematiky. Během posledních třiceti let došlo k významnému posunu v pochopení molekulárních mechanismů a evolučního vzniku SI, především díky pokroku v molekulárně biologických metodách, které umožnily detailní charakterizaci genů S-lokusu včetně odhalení jejich sekvencí. S tím je spojeno i odhalení dalších proteinů, které interagují s proteiny kódovanými geny S-lokusu a dohromady vytváří signalizační kaskádu vedoucí k rozpoznání inkompatibilního pylu. Velkou zásluhu při objasňování mechanismů SI u čeledi *Brassicaceae* má rovněž vytvoření transgenních rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), u nichž se podařilo obnovit SI, ačkoliv se jedná o samosprašný druh. Následný výzkum provedený na těchto rostlinách odhalil mírně odlišné fungování SI než u řepky a zároveň poodhalil, k jakým změnám v genomu musí dojít, aby se z cizosprašného druhu stala samosprašná rostlina. S pokroky na poli mikroskopie zahrnující pozorování živých buněk v *semi-in vivo* systémech bylo umožněno pozorování interagujících proteinů v reálném čase, čímž byla získána data o změnách lokalizace procesů SI v buňce. S postupujícími změnami klimatu je rovněž řešena otázka vlivu vyšších teplot na průběh opylení a zároveň na případné změny ve fungování pylových inkompatibilních systémů, které mohou být způsobeny vzrůstajícími teplotami.

Přestože jsou nové poznatky o SI velice obsáhlé, není tato oblast výzkumu rozmnožování rostlin rozhodně vyčerpána a na vědce stále čeká množství objevů potřebných pro popsání fungování SI nejen u čeledi brukvovitých ale i u dalších čeledí se stejným nebo obdobným systémem pylové inkompatibility.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aarts, M.G., Keijzer, C.J., Stiekema, W.J. a Pereira, A.** (1995) Molecular characterization of the CER1 gene of Arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell*, **7**, 2115–2127.
- Al-Shehbaz, I.A. a O’Kane, S.L.** (2002) Taxonomy and phylogeny of Arabidopsis (Brassicaceae). *Arab. B.*, **1**, e0001.
- Anderson, M.A., Cornish, E.C., Mau, S.L., et al.** (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, **321**, 38–44.
- Arunkumar, R., Wang, W., Wright, S.I. a Barrett, S.C.H.** (2017) The genetic architecture of tristylly and its breakdown to self-fertilization. *Mol. Ecol.*, **26**, 752–765.
- Balážová, A., Kolář, F., Fila, J., Mikát, M. a Baláž, V.** (2016) *Rozmnožování z pohledu evoluce*, Praha: Academia.
- Barrett, S.C.H.** (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 274–284.
- Barrett, S.C.H., Richards, A.J., Bayliss, M.W., Charlesworth, D. a Abbott, R.J.** (2003) Mating strategies in flowering plants: The outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **358**, 991–1004.
- Bateman, A.J.** (1955) Self-incompatibility systems in angiosperms III. Cruciferae. *Heredity (Edinb.)*, 53–68.
- Bechsgaard, J.S., Castric, V., Charlesworth, D., Vekemans, X. a Schierup, M.H.** (2006) The transition to self-compatibility in *Arabidopsis thaliana* and evolution within S-haplotypes over 10 Myr. *Mol. Biol. Evol.*, **23**, 1741–1750.
- Boyes, D.C. a Nasrallah, J.B.** (1993) Physical linkage of the SLG and SRK genes at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *MGG Mol. Gen. Genet.*, **236**, 369–373.
- Charlesworth, D., Vekemans, X., Castric, V. a Glémin, S.** (2005) Plant self-incompatibility systems: A molecular evolutionary perspective. *New Phytol.*, **168**, 61–69.
- Compton, R.H.** (1913) Phenomena and problems of self-sterility. *New Phytol.*, **12**, 197–206.
- Correns, C.** (1912) Selbststerilität und Individualstoffe. *Festschr. d. med.-nat. Ges., Versamml. deutsch. Naturf. u. Ärzte. Münster*, **84**.
- Darwin, C.** (1864) On the sexual relations of the three forms of *Lythrum salicaria*. *Bot. J. Linn. Soc.*, 169–196.

- Darwin, C.** (1862) On the two forms, or dimorphic condition, in the species of *Primula*, and on their remarkable sexual relations. *Bot. J. Linn. Soc.*, **6**, 77–96.
- Darwin, C.** (1876) *The effects of cross and self-fertilisation in the vegetable kingdom*, London: John Murray, Albemarle Street.
- Doughty, J., Dixon, S., Hiscock, S.J., Willis, A.C., Parkin, I.A.P. a Dickinson, H.G.** (1998) PCP-A1, a defensin-like Brassica pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *Plant Cell*, **10**, 1333–1347.
- Doughty, J., Hedderson, F., McCubbin, A. a Dickinson, H.** (1993) Interaction between a coating-borne peptide of the Brassica pollen grain and stigmatic S (self-incompatibility)-locus-specific glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 467–471.
- East, E.M.** (1934) Norms of pollen-tube growth in incompatible matings of self-sterile plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **20**, 225–230.
- East, E.M.** (1915) The phenomenon of self-sterility. *Amer. Nat.*, 77–87.
- East, E.M. a Mangelsdorf, A.J.** (1925) A New Interpretation of the hereditary behavior of self-sterile plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **11**, 166–171.
- Edlund, A.F., Olsen, K., Mendoza, C., Wang, J., Buckley, T., Nguyen, M., Callahan, B. a Owen, H.A.** (2017) Pollen wall degradation in the brassicaceae permits cell emergence after pollination. *Am. J. Bot.*, **104**, 1266–1273.
- Franklin-Tong, V.E. a Franklin, F.C.H.** (2003) The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **358**, 1025–1032.
- Franklin-Tong, V.E., Ride, J.P., Read, N.D., Trewavas, A.J. a Christopher, F.** (1993) The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant J.*, **4**, 163–177.
- Goodwillie, C. a Weber, J.J.** (2018) The best of both worlds? A review of delayed selfing in flowering plants. *Am. J. Bot.*, **105**, 641–655.
- Heslop-Harrison, Y. a Shivanna, K.R.** (1977) The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.*, **41**, 1233–1258.
- Hiscock, S.J., Tabah, D.A., Charlesworth, D. a Stephenson, A.G.** (2003) The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **358**, 1037–1045.
- Hughes, M.B. a Babcock, E.B.** (1950) Selfincompatibility in *Crepis foetida* (L.) subsp. *rhoadifolia* (bieb.) Schinz et Keller. *Genetics*, **35**, 570–588.

- Hülkamp, M., Kopczak, S.D., Horejsi, T.F., Kihl, B.K. a Pruitt, R.E.** (1995) Identification of genes required for pollen-stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **8**, 703–714.
- Indriolo, E., Safavian, D. a Goring, D.R.** (2014) The ARC1 E3 ligase promotes two different self-pollen avoidance traits in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **26**, 1525–1543.
- Indriolo, E., Tharmapalan, P., Wright, S.I. a Goring, D.R.** (2012) The ARC1 E3 ligase gene is frequently deleted in self-compatible brassicaceae species and has a conserved role in *arabidopsis lyrata* self-pollen rejection. *Plant Cell*, **24**, 4607–4620.
- Iqbal, N., Khan, N.A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A. a Khan, M.I.R.** (2017) Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Front. Plant Sci.*, **8**, 1–19.
- Iwano, M., Igarashi, M., Tarutani, Y., et al.** (2014) A pollen coat-inducible autoinhibited Ca²⁺-ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the brassicaceae. *Plant Cell*, **26**, 636–649.
- Iwano, M., Ito, K., Fujii, S., et al.** (2015) Calcium signalling mediates self-incompatibility response in the Brassicaceae. *Nat. Plants*, **1**, 1–8.
- Iwano, M., Shiba, H., Funato, M., Shimosato, H., Takayama, S. a Isogai, A.** (2003) Immunohistochemical studies on translocation of pollen S-haplotype determinant in self-incompatibility of *Brassica rapa*. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 428–436.
- Iwano, M., Shiba, H., Matoba, K., et al.** (2007) Actin dynamics in papilla cells of *Brassica rapa* during self- and cross-pollination. *Plant Physiol.*, **144**, 72–81.
- Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F.S., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A. a Isogai, A.** (2004) Ca²⁺ dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **136**, 3562–3571.
- Jany, E., Nelles, H. a Goring, D.R.** (2019) *The molecular and cellular regulation of brassicaceae self-incompatibility and Self-pollen rejection*, Elsevier Ltd.
- Jarne, P. a Charlesworth, D.** (1993) The evolution of the selfing rate in functionally hermaphrodite plants and animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **24**, 441–466.
- Kakita, M., Murase, K., Iwano, M., Matsumoto, T., Watanabe, M., Shiba, H., Isogai, A. a Takayama, S.** (2007) Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with S-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell*, **19**, 3961–3973.
- Kandasamy, M.K., Nasrallah, J.B. a Nasrallah, M.E.** (1994) Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Development*, **120**, 3405–3418.

- Kandasamy, M.K., Paolillo, D.J., Faraday, C.D., Nasrallah, J.B. a Nasrallah, M.E.** (1989) The S-locus specific glycoproteins of Brassica accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. *Dev. Biol.*, **134**, 462–472.
- Kenney, P., Sankaranarayanan, S., Balogh, M. a Indriolo, E.** (2020) Expression of Brassica napus GLO1 is sufficient to breakdown artificial self-incompatibility in Arabidopsis thaliana. *Plant Reprod.*, **33**, 159–171.
- Kitashiba, H., Liu, P., Nishio, T., Nasrallah, J.B. a Nasrallah, M.E.** (2011) Functional test of Brassica self-incompatibility modifiers in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 18173–18178.
- Koch, M., Haubold, B. a Mitchell-Olds, T.** (2001) Molecular systematics of the brassicaceae: Evidence from coding plastidic matK and nuclear Chs sequences. *Am. J. Bot.*, **88**, 534–544.
- Kusaba, M., Dwyer, K., Hendershot, J., Vrebalov, J., Nasrallah, J.B. a Nasrallah, M.E.** (2001) Self-incompatibility in the genus Arabidopsis: Characterization of the S locus in the outcrossing *A. lyrata* and its autogamous relative *A. thaliana*. *Plant Cell*, **13**, 627–643.
- Li, J., Cocker, J.M., Wright, J., et al.** (2016) Genetic architecture and evolution of the S locus supergene in *Primula vulgaris*. *Nat. Plants*, **2**, 1–7.
- Lolle, S.J., Berlyn, G.P., Engstrom, E.M., Krolkowski, K.A., Reiter, W.D. a Pruitt, R.E.** (1997) Developmental regulation of cell interactions in the Arabidopsis fiddlehead-1 mutant: A role for the epidermal cell wall and cuticle. *Dev. Biol.*, **189**, 311–321.
- Lolle, S.J. a Cheung, A.Y.** (1993) Promiscuous germination and growth of wildtype pollen from Arabidopsis and related species on the shoot of the Arabidopsis mutant, fiddlehead. *Dev. Biol.*, **155**, 250–258.
- Luu, D.T., Marty-Mazars, D., Trick, M., Dumas, C. a Heizmann, P.** (1999) Pollen-stigma adhesion in Brassica spp involves SLG and SLR1 glycoproteins. *Plant Cell*, **11**, 251–262.
- Manzanares, C.** (2013) Genetics of self-incompatibility in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Philosophy*.
- Mather, K.** (1944) Genetical Control of Incompatibility in Angiosperms and Fungi. *Nature*, **153**, 392–394.
- McClure, B.A. a Franklin-Tong, V.** (2006) Gametophytic self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in „self“ pollen tube inhibition. *Planta*, **224**, 233–245.
- Mouille, G., Ralet, M.C., Cavelier, C., et al.** (2007) Homogalacturonan synthesis in Arabidopsis thaliana requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *Plant J.*, **50**, 605–614.

- Naiki, A.** (2012) Heterostyly and the possibility of its breakdown by polyploidization. *Plant Species Biol.*, **27**, 3–29.
- Nasrallah, J.B., Kao, T.H., Chen, C.H., Goldberg, M.L. a Nasrallah, M.E.** (1987) Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the S locus of *Brassica oleracea*. *Nature*, **326**, 617–619.
- Nasrallah, J.B., Rundle, S.J. a Nasrallah, M.E.** (1994) Genetic evidence for the requirement of the *Brassica* S locus receptor kinase gene in the self-incompatibility response. *Plant J.*, **5**, 373–384.
- Nasrallah, J.B., Yu, S.-M. a Nasrallah, M.E.** (1988) Self-incompatibility genes of *Brassica oleracea*: Expression, isolation, and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 5551–5555.
- Nasrallah, M.E., Liu, P. a Nasrallah, J.B.** (2002) Generation of self-incompatible *Arabidopsis thaliana* by transfer of two S locus genes from *A. lyrata*. *Science (80-)*, **297**, 247–249.
- Nasrallah, M.E., Liu, P., Sherman-Broyles, S., Boggs, N.A. a Nasrallah, J.B.** (2004) Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: Implications for the evolution of selfing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 16070–16074.
- Nettancourt, D. de** (1977) The distribution of self-incompatibility systems in the angiosperms. In *Incompatibility in Angiosperms. Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, s. 15–19.
- Nowak, M.D., Russo, G., Schlapbach, R., Huu, C.N., Lenhard, M. a Conti, E.** (2015) The draft genome of *Primula veris* yields insights into the molecular basis of heterostyly. *Genome Biol.*, **16**.
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G. a Davis, R.W.** (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.*, **7**, 974–985.
- Riley, H.P.** (1932) Self-sterility in shepherds' purse. *Genetics*, **17**, 231–295.
- Robinson, R., Sollapura, V., Couroux, P., Sprott, D., Ravensdale, M., Routly, E., Xing, T. a Robert, L.S.** (2021) The *Brassica* mature pollen and stigma proteomes: preparing to meet. *Plant J.*, 0–3.
- Rozier, F., Riglet, L., Kodera, C., Bayle, V., Durand, E., Schnabel, J., Gaude, T. a Fobis-Loisy, I.** (2020) Live-cell imaging of early events following pollen perception in self-incompatible *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **71**, 2513–2526.
- Safavian, D. a Goring, D.R.** (2013) Secretory activity is rapidly induced in stigmatic papillae by compatible pollen, but inhibited for self-incompatible pollen in the brassicaceae. *PLoS One*, **8**.
- Safavian, D., Zayed, Y., Indriolo, E., Chapman, L., Ahmed, A. a Goring, D.R.** (2015) RNA silencing of exocyst genes in the stigma impairs the acceptance of compatible pollen in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **169**, 2526–2538.

- Sampson, D.R.** (1957) The genetics of self- and cross-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Genetics*, **42**, 253–263.
- Samuel, M.A., Chong, Y.T., Haasen, K.E., Aldea-Brydges, M.G., Stone, S.L. a Goring, D.R.** (2009) Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in brassica and arabidopsis stigmas intersect at *exo70a1*, a putative component of the exocyst complex. *Plant Cell*, **21**, 2655–2671.
- Samuel, M.A., Tang, W., Jamshed, M., et al.** (2011) Proteomic analysis of Brassica stigmatic proteins following the self-incompatibility reaction reveals a role for microtubule dynamics during pollen responses. *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M111.011338.
- Sankaranarayanan, S., Jamshed, M. a Samuel, M.A.** (2015) Degradation of glyoxalase i in Brassica napus stigma leads to self-incompatibility response. *Nat. Plants*, **1**.
- Sato, K., Nishio, T., Kimura, R., Kusaba, M., Suzuki, T., Hatakeyama, K., Ockendon, D.J. a Satta, Y.** (2002) Coevolution of the S-locus genes SRK, SLG and SP11/SCR in Brassica oleracea and B. rapa. *Genetics*, **162**, 931–940.
- Schiøtt, M., Romanowsky, S.M., Bækgaard, L., Jakobsen, M.K., Palmgren, M.G. a Harper, J.F.** (2004) A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 9502–9507.
- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B., Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E. a Nasrallah, J.B.** (1999) The Male Determinant of Self-Incompatibility in Brassica. *Science (80-)*, **286**, 1697–1700.
- Shiba, H., Takayama, S., Iwano, M., et al.** (2001) A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of Brassica species. *Plant Physiol.*, **125**, 2095–2103.
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A.L., Wang, Y., Dowd, P.E., McCubbin, A.G., Huang, S. a Kao, T.H.** (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, **429**, 302–305.
- Stead, A.D., Roberts, I.N. a Dickinson, H.G.** (1980) Pollen-stigma interaction in Brassica oleracea: the role of stigmatic proteins in pollen grain adhesion. *J. Cell Sci.*, **42**, 417–423.
- Stein, J.C., Howlett, B., Boyes, D.C., Nasrallah, M.E. a Nasrallah, J.B.** (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of Brassica oleracea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 8816–8820.
- Stone, S.L., Anderson, E.M., Mullen, R.T. a 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.

- Stone, S.L., Arnoldo, M.A. a Goring, D.R.** (1999) A breakdown of Brassica self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* (80-.), **286**, 1729–1731.
- Stout, A.B.** (1931) Pollen-tube behavior in Brassica pekinensis with reference to self-incompatibility in fertilization. *Am. J. Bot.*, **18**, 686–695.
- Su, S., Dai, H., Wang, X., Wang, C., Zeng, W., Huang, J. a Duan, Q.** (2020) Ethylene negatively mediates self-incompatibility response in Brassica rapa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **525**, 600–606.
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., et al.** (2000) The pollen determinant of self-incompatibility in Brassica campestris. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 1920–1925.
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Asano, K., Hara, M., Che, F.S., Watanabe, M., Hinata, K. a Isogai, A.** (2000) Isolation and characterization of pollen coat proteins of Brassica campestris that interact with S locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 3765–3770.
- Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M., Che, F.S., Watanabe, M., Iwano, M. a Isogai, A.** (2001) Direct ligand ± receptor complex interaction controls Brassica self-incompatibility. *Nature*, **413**, 534–538.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, **408**, 796–815.
- Thomas, S.G. a Franklin-Tong, V.E.** (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen. *Nature*, **429**, 305–309.
- Thomson, K.F. a Taylor, J..** (1966) Non-linear dominance relationships between S alleles. , **21**, 345–362.
- Toriyama, K., Thorsness, M.K., Nasrallah, J.B. a Nasrallah, M.E.** (1991) A Brassica S locus gene promoter directs sporophytic expression in the anther tapetum of transgenic Arabidopsis. *Dev. Biol.*, **143**, 427–431.
- Verger, S., Chabout, S., Gineau, E. a Mouille, G.** (2016) Cell adhesion in plants is under the control of putative O-fucosyltransferases. *Dev.*, **143**, 2536–2540.
- Wang, H.Y. a Xue, Y.B.** (2005) Subcellular localization of the S locus F-box protein AhSLF-S2 in pollen and pollen tubes of self-incompatible Antirrhinum. *J. Integr. Plant Biol.*, **47**, 76–83.
- Wang, L., Clarke, L.A., Eason, R.J., Parker, C.C., Qi, B., Scott, R.J. a Doughty, J.** (2017) PCP-B class pollen coat proteins are key regulators of the hydration checkpoint in Arabidopsis thaliana pollen–stigma interactions. *New Phytol.*, **213**, 764–777.

- Weller, S.G.** (1976) The genetic control of tristily in oxalis section ionoxalis. *Heredity (Edinb.)*, **37**, 387–393.
- Windari, E.A., Ando, M., Mizoguchi, Y., et al.** (2021) Two aquaporins, sip1;1 and pip1;2, mediate water transport for pollen hydration in the arabidopsis pistil. *Plant Biotechnol.*, **38**, 77–87.
- Yamamoto, M., Nishimura, K., Kitashiba, H., Sakamoto, W., Nishio, T. a Wilson, Z.** (2019) High temperature causes breakdown of S haplotype-dependent stigmatic self-incompatibility in self-incompatible *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **70**, 5745–5751.
- Yamamoto, M., Nishio, T. a Nasrallah, J.B.** (2018) Activation of self-incompatibility signaling in transgenic *Arabidopsis thaliana* is independent of AP2-based clathrin-mediated endocytosis. *G3 Genes, Genomes, Genet.*, **8**, 2231–2239.
- Yang, Y.W., Lai, K.N., Tai, P.Y. a Li, W.H.** (1999) Rates of nucleotide substitution in angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between Brassica and other angiosperm lineages. *J. Mol. Evol.*, **48**, 597–604.
- Yu, K., Schafer, U., Glavin, T.L., Goring, D.R. a Rothstein, S.J.** (1996) Molecular characterization of the S locus in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell*, **8**, 2369–2380.
- Zhang, T., Zhou, G., Goring, D.R., et al.** (2019) Generation of transgenic self-incompatible *Arabidopsis thaliana* shows a genus-specific preference for self-incompatibility genes. *Plants*, **8**, 1–16.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G. a Preuss, D.** (1999) Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: A species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development*, **126**, 5431–5440.