

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Bojana G. Banović

Molekularna osnova auto-inkompatibilnog sistema heljde

(*Fagopyrum esculentum* Moench)

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Bojana G. Banović

Molecular basis of self-incompatibility system in buckwheat

(*Fagopyrum esculentum* Moench)

PhD Thesis

Belgrade, 2013

Mentori:

viši naučni saradnik dr Jovanka Miljuš-Đukić
Univerzitet u Beogradu
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

redovni profesor dr Svetlana Radović
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Član komisije:

redovni profesor, naučni savetnik dr Gordana Matić
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Datum odbrane: 30.09.2013.

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo i u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerziteta u Beogradu

dr Jovanki Miljuš-Đukić se zahvaljujem na stručnim savetima i pomoći u izradi ove disertacije, a pre svega na neposustajanju pred preprekama i na njenom vedrom duhu

dr Svetlani Radović se zahvaljujem na tome što se uz brojne druge obaveze prihvatila i obaveze komentorstva u izradi ove disertacije i na svesrdnoj pomoći u uobličavanju ove teze

dr Vesni Maksimović se zahvaljujem na tome što me je srdačno primila u Lab 08 još kao diplomca, a zatim mi omogućila i izradu ove disertacije i njeno dovršavanje, uprkos promeni orijentacije Laboratorije u odabiru dalje istraživačke problematike

dr Miroslavu Konstantinoviću hvala na pomoći i strpljenju za sva poravnanja sekvenci i dizajniranje prajmera koja je radio za mene u mojim početničkim danima u Labu 08

dr Jeleni Samardžić hvala što je sa puno razumevanja i predusretljivosti omogućila dovršavanje ove teze

dr Gordani Matić hvala na tome što mi je omogućila korišćenje opreme za proteomiku u IBISSu, kao i na tome što se prihvatila obaveze članstva u komisiji za odbranu teze

dr Goranu Poznanoviću hvala na pruženom znanju iz proteomike, kao i na tome što mi je omogućio da deo svoje teze uradim u Laboratoriji za molekularnu biologiju IBISSa

dr Svetlani Dinić veliko hvala na pruženom znanju, savetima i pomoći u savladavanju osnova proteomike, kako u teoriji, tako i u praksi

svim kolegama u Labu 08 hvala na korisnim savetima i pomoći u eksperimentalnom radu Džu, Žiks i Joko, vama posebno hvala na tome što radne dane uvek bojimo smehom

mojoj porodici, prijateljima i S., jednostavno - Hvala vam...

Molekularna osnova auto-inkompatibilnog sistema heljde

(*Fagopyrum esculentum* Moench)

REZIME

Heljda (fam. Polygonaceae) je heteromorfna biljna vrsta koja sadrži cvetove dve morfologije: "pin" (dugačak stubić tučka, kratke antere, manja polenova zrna) i "tram" (kratak stubić tučka, dugačke antere, veća polenova zrna). Oplodjenje je dozvoljeno samo između cvetova različite morfologije, dok je sprečeno između cvetova iste morfologije delovanjem sistema auto-inkompatibilnosti (AI), koji ne dozvoljava ukrštanje u srodstvu. Heljda se zbog svojih dobrih nutritivnih osobina gaji širom sveta, a osnovni problem u njenom uzgajanju predstavljaju nizak i nepouzdan prinos i visoka otpornost na introgresiju novih osobina iz srodnih vrsta, što su direktne posledice njene AI. Ovakvo delovanje AI sistema može predstavljati prepreku u uzgajanju i oplemenjivanju poljoprivredno značajnih vrsta (npr. badem, heljda, itd.), odatle i veliki interes za proučavanje ovih sistema. Kroz njihovo upoznavanje može se omogućiti proizvodnja samooplodnih i hibridnih linija željenih svojstava, kao i razvijanje novih markera, pomoću kojih se ubrzava proces selekcije, što bi dovelo do povećanja prinosa uz snižavanje troškova gajenja. Ono što je poznato o heljdinom AI odgovoru jeste da predstavlja genetički determinisanu kaskadu biohemijskih reakcija, koja dovodi do zaustavljanja rasta polenove cevi ako je polen prepoznat kao sopstveni. Rast sopstvene polenove cevi se zaustavlja na spoju žiga i stubića "tram" tučka, odnosno na $2/3$ dužine stubića "pin" tučka. Ova reakcija je pod kontrolom *S*-supergena, koji pored AI gena sadrži i gene koji određuju dužinu stubića tučka, visinu antera i veličinu polenovog zrna, koji se zajedno vezano nasleđuju. Između alela AI gena postoji dominantno-recesivan odnos, u kom su "pin" biljke recesivni homozigoti za AI gen, *ss*, dok su "tram" biljke dominantni heterozigoti, *Ss*. Pošto se pri oplodjenju "tram" polen ponaša u skladu sa diploidnim genotipom roditeljske biljke, a ne sopstvenim haploidnim genotipom, zaključeno je da kod heljde postoji sporofitna determinacija AI. Poslednjih godina razvijeni su molekularni markeri za fino mapiranje *S*-lokusa heljde, a sekvenciran je i transkriptom cveta heljde, što omogućuje detekciju novih *S*-sekvenci. Identifikovan je i prvi kandidat gena *S*-lokusa heljde, gen *S-ELF3*, koji najverovatnije određuje "tram"

fenotip tučka. Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje molekularne osnove AI odgovora heljde na dva nezavisna načina: metodom polimeraznog lančanog umnožavanja uz upotrebu prajmera karakterističnih za sekvencu blisku *S*-lokusu, odnosno prajmera specifičnih za AI gene *Prunus* i *Brassica* (čija fiziologija AI odgovora podseća na AI odgovor dva morfa heljde) i metodom 2D-PAGE za razdvajanja ukupnih proteina polena, neoprašenih i inkompatibilno/kompatibilno oprušenih tučkova oba morfa. Na ovaj način dobijeno je 14 novih genomskih sekvenci bliskih *S*-lokusu heljde, a analiza njihovih otvorenih okvira čitanja ukazala je na postojanje homologije sa proteinima uključenim u signalnu transdukciju i regulaciju transkripcije. Pokazano je da u genomu heljde nema gena homolognih *S*-RNazim i *SFB* genima (AI geni roda *Prunus*), kao ni *SRK*, *SLG* i *SP11* genima (AI geni roda *Brassica*), ali da postoji homolog *MLPKf2* genu *Brassica*. Ovaj gen kodira *M*-lokus vezanu protein kinazu izoforme 2, koja je pozitivni medijator signala u AI odgovoru kupusa. Izvedena aminokiselinska sekvenca *MLPKf2* heljde pokazala je 80% homologije sa *MLPKf2* *Brassica*. Grupa miristolovanih protein kinaza C (npr. za membranu vezne Ca^{2+} /kalmodulin-zavisne protein kinaze) nema ulogu u AI odgovoru heljde, što je utvrđeno primenom inhibitora ovih kinaza. 2D-PAGE analizom detektovano je preko 200 reproducibilnih proteina po uzorku i uočena je visoka sličnost sastava proteoma među uzorcima, što ukazuje da najveći relativni udeo u proteomima svih uzoraka imaju proteini opšte uloge u polen-tučak interakciji. Detektovano je preko 100 proteina različitih među uzorcima, od kojih je 21 morf-specifično ili specifično za AI odgovor. Istraživanje bi trebalo nastaviti kroz identifikaciju/sekvenciranje detektovanih specifičnih proteina i kroz dalje sekvenciranje regiona bliskog *S*-lokusu, pomoću prajmera dizajniranih iz novih 14 *S*-sekvenci, kao i prajmera dizajniranih na osnovu dobijenih proteinskih sekvenci.

Ključne reči: heljda, auto-inkompatibilnost, *S*-lokus, *S*-gen, *S*-alel, oplemenjivanje, pin, tram.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija biljaka

UDK broj: [577.21:581.162]:633.12 (043.3)

Molecular basis of self-incompatibility system in buckwheat

(*Fagopyrum esculentum* Moench)

ABSTRACT

Buckwheat (fam. Polygonaceae) is heteromorphic species with two flower morphs: "pin" (long style, short anthers, and smaller pollen grains) and "thrum" (short style, long anthers, and larger pollen grains). Fertilization is allowed only between flowers of different morphology, while it is prevented between flowers of the same morphology, through self-incompatibility (SI) system, which prevents inbreeding. Buckwheat is grown worldwide due to its good nutritive characteristics, but the main issue in its breeding is low and uncertain yield and high resistance of buckwheat to introgression of new characteristics from related wild species, all of which are direct consequences of buckwheat's SI. These effects of SI systems may present obstacles in breeding of agriculturally important species (i.e. almond, buckwheat, etc.), hence the interest in SI system studies. The aim of SI systems studies is to provide self-fertile and hybrid lines of desired characteristics, as well as to provide new markers for marker-assisted selections, all of which would improve the yield, while lowering the costs of breeding. Current understanding of buckwheat SI system considers SI response as genetically determined cascade of biochemical reactions that lead to pollen tube arrest when pollen has been recognized as self. The site of self-pollen tube arrest is different in two morphs: in "thrum" morph it occurs at the stigma-style junction, while in "pin" it takes place at 2/3 of style's length. This reaction is under the control of the *S*-supergene which comprises SI genes and closely linked genes that determine style's length, anthers' height and pollen grain size, inherited as a single unit. Between SI alleles there is a dominant-recessive relationship, in which "pin" plants act as recessive homozygotes, *ss*, while "thrum" plants act as dominant heterozygotes, *Ss*. Since "thrum" pollen behaves in accordance with a diploid genotype of its parental plant and not its own haploid genotype, it was concluded that SI in buckwheat is sporophytically determined. Recently, molecular markers for fine mapping of *S*-locus were developed, and flower transcriptome was sequenced, which enables detection of new *S*-sequences. First buckwheat *S*-gene was identified as *S-ELF3* gene, which is the most probable candidate for

the "thrum" pistil phenotype determinant. The aim of this research was to analyze molecular basis of buckwheat's SI response in two independent ways: through PCR by using primers specific for *S*-linked region and primers specific for SI genes of *Prunus* and *Brassica* (species in which SI response resembles SI response observed in two buckwheat morphs) as well as through 2D-PAGE separation of total protein extracts isolated from pollen, unpollinated, self- and cross-pollinated pistils of both morphs. In this way 14 new genomic sequences, closely linked to *S*-locus, were obtained and open reading frame analysis suggested their homology to proteins involved in signal transduction and transcription regulation. No genes homologous to *S*-RNase and SFB genes (SI genes in *Prunus*) or to SRK, SLG and SP11 genes (SI genes in *Brassica*) were found in buckwheat genome, but a gene homologous to *Brassica's MLPKf2* was found. It codes for *M*-locus protein kinase isoform 2 involved in *Brassica's* SI response as a positive mediator of SI signal. MLPKf2 showed 80% homology with *Brassica's* MLPKf2 at deduced amino acid sequence level. Test involving inhibitor of myristoylated protein kinases C showed these kinases (i.e. Ca²⁺/calmoduline-dependant protein kinase) have no role in buckwheat's SI response. 2D-PAGE proteome analysis revealed over 200 reproducible proteins in each sample and high overall similarity of proteome composition between samples, suggesting most proteins are shared in all samples and have general roles in pollen-pistil interactions. Over 100 proteins were found to be different between samples. Among them 21 were found to be specific to the particular morph or its SI response. This research should be continued through identification/sequencing of these specific proteins and also through further sequencing of *S*-locus linked region by using primers designed from 14 new *S*-sequences as well as primers designed according to obtained specific protein sequences.

Key words: buckwheat, self-incompatibility, *S*-locus, *S*-gene, *S*-allele, breeding, pin, thrum.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant molecular biology

UDC number: [577.21:581.162]:633.12 (043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Auto-inkompatibilnost cvetnica.....	4
1.2. Pojave koje podsećaju na auto-inkompatibilnost cvetnica.....	6
1.3. Evolucija auto-inkompatibilnih sistema cvetnica.....	9
1.4. Auto-inkompatibilni sistemi homomorfni cvetnica.....	11
1.4.1. Homomorfna sporofitna auto-inkompatibilnost <i>Brassicaceae</i>	12
1.4.2. Homomorfna gametofitna na <i>S-RN</i> azama zasnovana auto-inkompatibilnost <i>Rosaceae</i>	14
1.4.3. Homomorfna gametofitna auto-inkompatibilnost <i>Poaceae</i>	17
1.5. Auto-inkompatibilni sistemi heteromorfni cvetnica.....	18
Heteromorfna sporofitna auto-inkompatibilnost <i>Primula</i>	20
1.6. Heljda (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench).....	21
Heteromorfna sporofitna auto-inkompatibilnost heljde.....	23
1.7. Značaj proučavanja auto-inkompatibilnih sistema u poljoprivredi.....	27
2. CILJEVI.....	28
3. MATERIJAL I METODE.....	30
3.1. Biljni materijal.....	30
3.2. Bakterijske procedure.....	30
3.2.1. Medijumi za uzgajanje bakterija.....	30
3.2.2. Bakterije i plazmidi.....	31
3.2.3. Uzgajanje i održavanje bakterija.....	31

3.2.4. Transformacija <i>E.coli</i> toplotnim šokom.....	31
3.3. Osnovne procedure rada sa DNK.....	32
3.3.1. Izolovanje biljne genomske DNK.....	32
3.3.2. Izolovanje plazmida iz bakterija.....	32
3.3.3. Prečišćavanje umnoženih fragmenata DNK nakon reakcije umnožavanja.....	33
3.3.4. Elektroforeza na gelu od agaroze.....	34
3.3.5. Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze.....	34
3.3.6. Digestija DNK restrikcijom enzimima.....	35
3.3.7. Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima.....	35
3.3.8. Sekvenciranje DNK.....	35
3.3.9. Kompjuterska analiza sekvenci.....	36
3.4. Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK.....	36
3.4.1. Umnožavanje homologa AI gena homomorfnih AI sistema <i>Brassicaceae</i>	36
3.4.2. Umnožavanje homologa AI gena homomorfnih gametofitnih AI sistema <i>Prunus</i> (Rosaceae).....	37
3.4.3. Umnožavanje segmenata genomske DNK heljde blisko vezanih sa <i>S</i> -lokusom.....	38
3.5. Osnovne procedure rada na fluorescentnom mikroskopu.....	40
3.5.1. Tretman tučkova inhibitorom protein kinaza C.....	40
3.5.2. Priprema preparata za fluorescentno mikroskopiranje.....	40
3.6. Osnovne procedure rada sa proteinima.....	41
3.6.1. Priprema proteinskih izolata.....	41
3.6.2. Precipitacija proteina TCA/acetonom.....	41
3.6.3. Jednodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	42
3.6.4. Dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (2D-PAGE).....	42
3.6.5. Kompjuterska analiza 2D-PAGE proteinskih profila.....	44
4. REZULTATI.....	45
4.1. Ispitivanje prisustva gena homolognih AI genima drugih biljnih vrsta u	

genomu heljde.....	45
4.2. Ispitivanje učestvovanja protein kinaza C u AI odgovoru heljde.....	46
4.3. Umnožavanje i sekvenciranje segmenta genomske DNK u neposrednoj blizini <i>S</i> -lokusa heljde i analiza sekvenci.....	48
4.4. 2D-PAGE razdvajanje ukupnih proteina polena i tučkova heljde.....	52
5. DISKUSIJA.....	57
5.1. Ispitivanje prisustva gena homolognih AI genima drugih biljnih vrsta u genomu heljde.....	57
5.2. Tretman inhibitorom protein kinaza C.....	59
5.3. Sekvence segmenata genomske DNK blisko vezane <i>S</i> -lokusu heljde.....	60
5.4. 2D-PAGE razdvajanje ukupnih proteina polena i tučkova heljde.....	62
5.5. Perspektiva istraživanja molekularne osnove AI odgovora heljde.....	65
6. ZAKLJUČCI.....	67
7. LITERATURA.....	72
8. DODATNI MATERIJAL.....	99
7.1. PRILOG A.....	99
7.2. PRILOG B.....	102
Biografija.....	109
Prilog 1. Izjava o autorstvu	
Prilog 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
Prilog 3. Izjava o korišćenju	

SKRAĆENICE

AI, auto-inkompatibilnost

SAI, sporofitna auto-inkompatibilnost

GAI, gametofitna auto-inkompatibilnost

UI, unilateralna inkompatibilnost

SRK, *S*-lokus receptor kinaza

SLG, *S*-lokus glikoprotein

SP11, *S*-lokus protein 11

MLPK, *M*-lokus protein kinaza

S-RNaza, *S*-protein sa ribonukleaznom funkcijom

SLF/SFB, *S*-lokus F boks protein

DNK, dezoksiribonukleinska kiselina

AFLP marker, marker polimorfizama dužina umnoženih fragmenata DNK

SCAR marker, marker sekvencom okarakterisanog umnoženog regiona DNK

PKC, protein kinaza C

TCA, trihlorsirćetna kiselina

pI, izoelektrična tačka

SDS-PAGE, sodijum dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza

IEF, izoelektrično fokusiranje

2D-PAGE, dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza

CRP, cisteinom bogat protein

1. UVOD

Biljno carstvo čini vegetacioni pokrivač planete Zemlje, koji prema podacima iz 2010 god. sadrži između 310,000 i 315,000 vrsta (*Chapman, 2009*), a obuhvata veoma raznovrsne predstavnike, od algi do viših biljaka. Idući kroz vreme, od postanka prvih biljaka do sastava i izgleda flore danas, možemo primetiti na osnovu fosilnih ostataka da se kompleksnost novonastalih biljnih vrsta postepeno povećavala, kao i da su nove, složenije, vrste postajale vremenom uspešnije od svojih prethodnika, a samim tim i brojnije. Tako su se kroz određena razdoblja istorije Zemlje među dominantnim biljnim vrstama smenjivale briofite (ordovik), likopode (silur, devon, karbon, perm, trijas), paprati (devon, karbon, perm, trijas), sve do složenijih golosemenica (kraj perma, trijas, jura, kreda) i skrivenosemenica (od kraja krede do danas) (*Behrensmeyer i sar., 1992*). Navedene promene u sastavu i izgledu flore dešavale su se (i dalje se dešavaju) pod uticajem ekoloških promena na Zemlji (klimatske, geološke, geografske), ali takođe i pod uticajem hromozomskih rearanžmana, kao i promena u načinu razmnožavanja biljaka, koje utiču ne samo na reproduktivni uspeh i opstanak vrste, nego i na genetičku varijaciju, specijaciju i evolucionu diverzifikaciju vrsta (*Barrett, 1998; Rieseberg, 2001; Widmer i sar., 2009*).

Smatra se da su se prvi predstavnici biljaka, alge, pojavile pre 1,200 miliona godina, a prve kopnene biljke pre oko 450 miliona godina, u ordoviku (*Rensing i sar., 2008; Kato, 2010*), a da se njihova diverzifikacija odigrala pre oko 418-407 miliona godina, u kasnom siluru-ranom devonu (*Kenrick i Crane, 1997; Gensel, 2008*). Za cvetnice, najbrojnije biljne vrste savremene flore, smatra se da su nastale pre oko 180-132 miliona godina (*Soltis i Soltis, 2004; Bell i sar., 2005*) i da je njihova brojnost porasla zbog niza karakteristika koje su im pružile evolutivnu prednost. U te karakteristike ubrajamo prisustvo perfektnih cvetova (koji svojom građom osiguravaju razmnožavanje tako što pored atraktivnosti za oprašivače sadrže i "nagradu" za njih, a time obezbeđuju i manju količinu polena potrebnu za oprašivanje kroz smanjenje njegovog nasumičnog rasipanja), proizvodnju zaštićenog

semena (kao glavnog sredstva razmnožavanja i rasejavanja), kao i prisustvo razvijenijeg vaskularnog sistema (*Crepet i Niklas, 2009*). Uprkos njihovoj sadašnjoj premoći, cvetnice se takođe suočavaju sa raznim izazovima u opstanku i produženju vrste. Pre svega, pošto su sve biljke sesilni organizmi njima su potrebni nosioci polena tj. oprašivači (insekti, vetar, voda), koji će preneti polen do odgovarajućeg partnera, što nekada može biti otežano, ili čak i sprečeno, postojanjem fizičkih barijera (npr. planinski venci, okean i dr.) ili nedostatkom oprašivača (*Klein i sar., 2007*). Pored toga, pri pronalaženju partnera poželjno je izbeći ukrštanje u srodstvu, a kod cvetnica koje poseduju hermafroditne cvetove, tj. i muške i ženske polne organe u istom cvetu, kakvo je oko 70% cvetnica danas (*Ming i sar., 2007*) i samooplođenje.

Iako se ukrštanje u srodstvu i samooplođenje (inbriding) javljaju i održavaju u nekim uslovima u prirodi, poželjno je izbeći ih kad je to moguće, zbog toga što imaju negativan efekat na fitnes populacije/vrste, tj. njenu sposobnost da preživi i reprodukuje se. Naime, potomstvo nastalo kroz niz generacija inbridinga najčešće će ispoljiti negativne promene kao što su: manji rast u zrelom dobu, smanjenje broja cvetova po biljci, smanjenje vijabilnosti polena, smanjen broj ovula po cvetu, smanjeno plodonošenje i/ili smanjen broj semena, što se naziva inbriding depresijom (*Darwin, 1876; Charlesworth i Charlesworth, 1987; Keller i Waller, 2002*). Inbriding depresija se može ispoljiti u ranim i/ili kasnim fazama životnog ciklusa biljaka, ali vrlo često se značajno ispoljava u reproduktivnom stadijumu (*Husband i Schemske, 1996; Goodwillie, 2000*). Smatra se generalno da do ovih posledica dolazi usled smanjenja heterozigotnosti potomstva u populacijama (*Falconer i MacKay, 1996*), ali postoje podeljena mišljenja o tome šta izaziva negativni fitnes. Prema nekim autorima negativni fitnes se javlja zbog toga što za posmatrani genski lokus heterozigoti imaju veći fitnes od homozigota, dok drugi autori smatraju da se sa povećanjem homozigotnosti povećava i verovatnoća fiksiranja i ispoljavanja recesivnih i delecionih mutacija prisutnih u roditeljskim individuama, što dovodi do negativnog fitnesa i može u nekom trenutku opteretiti vrstu i ugroziti njen opstanak (*Charlesworth i Charlesworth, 1987; Lynch, 1991; Kärkkäinen i sar. 1999; Keller i Waller, 2002; Reed i Frankham, 2003*).

Upravo zbog selektivnog pritiska da se održi visoka genetička varijabilnost vrsta, zato što ona povećava fitness, mnoge biljne vrste razvile su različite načine kojima se sprečava ukrštanje u srodstvu i samooplođenje. U nekim biljnim vrstama tako mogu postojati samo muški ili samo ženski cvetovi unutar vrste, koji mogu biti na različitim biljkama (npr. topola - *Populus trichocarpa*) ili na različitim delovima iste biljke (npr. kukuruz - *Zea mays*) ili imati različito vreme sazrevanja u istom cvetu (npr. štitasti vodoljub - *Butomus umbellatus*) (Bawa i Beach, 1981; Charlesworth i Charlesworth, 1987; Bhardwaj i Eckert, 2001; Zluvova i sar., 2006; Jansson i Douglas, 2007), a mnoge cvetnice čiji su cvetovi hermafroditni imaju sposobnost auto-inkompatibilnosti (AI), kojom se sprečava oplodjenje sopstvenim i/ili srodnim (tj. inkompatibilnim) polenom (Silva i Goring, 2001; Takayama i Isogai, 2005).

Ipak, neosporno je da ima slučajeva ukrštanja u srodstvu i samooplođenja među različitim biljnim vrstama, zato što samooplodnost osigurava reproduktivni uspeh (primeri samooplodnih vrsta: suncokret, pšenica, paradajz, kikiriki, soja, orhideje, itd.). Tako u slučajevima vrsta čije populacije kratko žive (kakve su npr. mnoge jednogodišnje biljke) ili su izložene periodičnim izumiranjima ili nepovoljnim ekološkim faktorima (npr. suša, velika vlaga, nedostatak oprašivača, mala veličina populacije, izolovanost populacije, itd.), kao i pri osnivanju novih populacija od strane jedne ili malog broja jedinki, strategija samooplođenja obezbeđuje sigurnu reprodukciju, čak i po cenu smanjenja fitnessa, jer je na kraju to manja cena koja se plaća, u poređenju sa potpunim izostankom reprodukcije (Stebbins, 1957; Jain, 1976; Lande i Schemske, 1985; Barrett, 1998). Samooplodnost i stranooplodnost zapravo predstavljaju dva alternativna stabilna stanja sistema za razmnožavanje (od kojih je stranooplodnost potrebna da održava genetsku varijabilnost i obezbedi dugoročno održavanje evolutivnog potencijala vrste, dok je samooplodnost potrebna da osigurava reprodukciju u uslovima u kojima je stranooplodnost smanjena ili sprečena), a koje od dva stanja će prevagnuti zavisi od neposrednih ekoloških faktora i održavanja balansa između cene reproduktivnog uspeha i cene održavanja genetske raznovrsnosti (Jain, 1976; Solbrig, 1976; Lande i Schemske, 1985; Frankham, 2003).

1.1. Auto-inkompatibilnost cvetnica

Auto-inkompatibilnost (AI) cvetnica predstavlja genetički determinisan kompleksni kaskadni sistem biohemijskih reakcija, kojim se sprečava oplodjenje u slučaju da polen ima isti inkompatibilni fenotip kao i tučak koji oprašuje (Barrett, 1992; Schopfer i Nasrallah, 2000; Kao i Tsukamoto, 2004; Takayama i Isogai, 2005; Wheeler i sar., 2009; Klaas i sar., 2011). AI odgovor kod svih auto-inkompatibilnih cvetnica uključuje prepoznavanje inkompatibilnog polena, koje pokreće prenos signala i sprečava oplodjenje inkompatibilnim polenom (Matton i sar., 1994; Cock i sar., 2000; Hiscock, 2002; Takayama i Isogai, 2005). Iako je ovakav tok AI odgovora univerzalan, svaka od tri navedene faze može biti ostvarena na različite načine i u skladu sa tim mnogi autori (Barrett, 1988; Cornish i sar., 1988; Clarke i Newbiggin, 1993; Dixit i Nasrallah, 2001; Allen i Hiscock, 2008) klasifikuju AI sisteme na četiri načina:

1) *U zavisnosti od načina na koji je određen inkompatibilni fenotip polena*, AI sistemi se mogu klasifikovati na *sporofitne* i *gametofitne* sisteme. Kod sporofitnih AI sistema (SAI) inkompatibilni fenotip polena određen je diploidnim genotipom majke biljke (npr. *Brassica*, *Parthenium argentium*, *Crepis foetida*, *Ipomoea trifida*, *Senecio squalidus*, itd.), dok je kod gametofitnih AI sistema (GAI) određen haploidnim genotipom samog polena (npr. *Prunus*, *Petunia*, *Nicotiana*, *Papaver*, *Solanum*, itd.). Zbog takve determinacije AI fenotipa kod sporofitnih vrsta polen će se ponašati kao diploidan, pri čemu će ispoljavanje inkompatibilnog fenotipa zavisiti od odnosa među alelima diploidnog genotipa majke biljke (razmotreno pod tačkom 4), dok će se kod gametofitnih vrsta ponašati u skladu sa sopstvenim haploidnim genotipom tj. jednom jedinom alelskom varijantom koju je dobio rekombinacijom alela prisutnih kod roditelja (Heslop-Harrison, 1975; Gaude i Dumas, 1987).

2) *U zavisnosti od prisustva cvetova iste ili različite morfologije unutar jedne vrste*, AI sistemi se mogu klasifikovati na *homomorfne* ili *heteromorfne*. AI sistemi cvetnica koje unutar vrste imaju samo cvetove iste morfologije nazivaju se homomorfni (npr. *Brassica*,

Nicotiana, *Prunus*, itd.), dok se oni prisutni u cvetnica koje unutar vrste imaju morfološki različite cvetove nazivaju heteromorfni (npr. *Fagopyrum esculentum* Moench, *Primula* spp., *Linum* spp., itd.). Heteromorfne vrste cvetnica se odlikuju heterostilijom tj. tučkovi i antere unutar cvetova te vrste su različite dužine/visine. Heterostilija se može javiti u obliku distilije (dva morfa cveta, tj. dve dužine tučka i dve visine antera u cvetovima date vrste, npr. *Hedyotis acutangula*, *Primula vulgaris*, *Fagopyrum esculentum* Moench) ili tristilije (tri morfa cveta, tj. tri dužine tučka i dve visine antera u cvetovima date vrste, npr. *Lythrum salicaria*) (Wu i sar., 2010; Bawa i Beach, 1981; Charlesworth i Charlesworth, 1987; Matsui i sar., 2004) Do sada su kod homomorfnih AI sistema zabeleženi i sporofitni (npr. *Brassica*, *Senecio squalidus*) i gametofitni tip (npr. *Prunus*, *Nicotiana*) determinacije AI fenotipa polena, dok je kod heteromorfnih AI sistema zabeležen samo sporofitni tip (npr. *Fagopyrum esculentum* Moench, *Primula* spp., *Linum* spp.) (Silva i Goring, 2001; Takayama i Isogai, 2005; Brennan i sar., 2011).

3) U zavisnosti od mesta na kom se zaustavlja rast inkompatibilne polenove cevi, AI sistemi se klasifikuju na sisteme u kojima do zaustavljanja dolazi na žigu tučka (npr. kod homomorfne SAI *Brassica*, GAI trava i kod nekih heteromorfnih SAI), u stubiću tučka (npr. kod GAI zasnovanoj na S-RNazama u rodovima *Prunus*, *Nicotiana*, *Solanum* i kod nekih heteromorfnih SAI) ili u ovarijumu tučka (npr. kod kasne AI *Narcissus*, *Lilium*, *Borago officinalis*, *Gasteria verucosa*). Takođe, kod heteromorfnih sporofitnih AI sistema mesto zaustavljanja rasta inkompatibilne polenove cevi može biti isto ili različito u cvetovima različite morfologije (npr. kod heteromorfnih vrsta *Fagopyrum esculentum* Moench i *Primula* spp. mesto zaustavljanja rasta polenove cevi razlikuje se između cvetova različite morfologije, dok je kod heteromorfne vrste *Linum* spp. mesto zaustavljanja rasta polenove cevi isto kod cvetova različite morfologije) (Franklin-Tong i sar., 1990; Haring i sar., 1990; Barrett i Cruzan, 1994; Geitmann i sar., 2001; Miljuš-Đukić i sar., 2003; McCubbin, 2008; Klein i sar., 2009).

4) U zavisnosti od broja genskih lokusa, koji određuju fazu prepoznavanja u auto-inkompatibilnom odgovoru, AI sistemi se klasifikuju na one u kojima je prepoznavanje

inkompatibilnog polena pod kontrolom jednog lokusa (npr. *S*-lokus kod homomorfne SAI *Brassica* i GAI *Prunus*) ili dva (npr. *S*-lokus i *Z*-lokus kod GAI trava) i više nezavisnih lokusa (kod homomorfne i heteromorfne SAI). Takođe, geni sadržani u ovim lokusima mogu biti višealelski (npr. slučaj kod homomorfnih SAI i GAI, ali i kod nekih heteromorfnih SAI) ili bialelski (dominantan i recesivan alel) (uglavnom se javljaju kod heteromorfnih SAI). Pored učestvovanja više od jednog genskog lokusa, arhitektura AI se dodatno usložnjava time što odnosi među alelima istog lokusa mogu biti *kodominantni* (GSI, homomorfna SSI, i to najčešće među *S*-alelima tučka) ili *dominantno-recesivni* (homomorfna SSI, i to najčešće među *S*-alelima polena, dok se u heteromorfnoj SSI ovakav odnos očekuje među *S*-alelima i tučka i polena; pri tome odnos dominantnosti među alelima može biti linearan i nelinearan), a ponekad njihov odnos može biti i *kompetitivna interakcija* (npr. kod tetraploidnih heterozigota GSI vrsta u heteroalelskom polenu) (Thompson, 1972; Hatakeyama i sar., 1998; Golz i sar., 1999, 2001; Brennan i sar., 2011). Nasuprot tome, među alelima nezavisnih lokusa postoji *komplementarna interakcija* (npr. *Guadinia fragilis*, *Beta vulgaris* L.) (Lundqvist, 1964; Larsen, 1977; Baumann i sar., 2000).

1.2. Pojave koje podsećaju na auto-inkompatibilnost cvetnica

Klasifikacija AI sistema, navedena u poglavlju 1.1., predstavlja najčešći način predstavljanja ovih sistema i iako je zasnovana na njihovim najšire rasprostranjenim odlikama, ona i dalje nije sveobuhvatna. Naime, postoji još nekoliko pojava koje nisu svrstane ni u jednu od postojećih klasifikacija, a koje po nekim svojim osobinama podsećaju na AI sisteme i to su:

1) ***Kasna auto-inkompatibilnost***, koja se manifestuje u ovarijumu tučka neposredno pre ili posle oplodjenja, dovodeći ili do sprečavanja nastajanja embriona (usled ovularne inhibicije koja se može odigrati pre ili posle pristizanja sopstvene/srodne polenove cevi do ovule) ili do odbacivanja embriona odmah posle njegovog nastajanja. Do sada je zabeležena kod vrsta: *Asclepias syriaca*, *Beta vulgaris*, *Cyrtanthus breviflorus*, *Dalbergia retusa*, *Dipteryx*

panamensis, *Gasteria verrucosa*, *Jacaranda racemosa*, *Lilium candidum*, *Liquidambar styraciflua*, *Myrospermum frutescens*, *Physalis ixocarpa*, *Pseudowintera axillaris*, *Theobroma cacao* i drugim vrstama (Pandey, 1960; Seavey i Bawa, 1986; Sage i Sampson, 2003; Bittencourt i Semir, 2006; Vaughton i sar., 2010). Međutim, istraživanje ovog fenomena znatno je otežano time što je eksperimentalno često teško razlikovati kasnu AI od posledica inbriding depresije ispoljenih u ranoj fazi razvića, tako da su uočeni mehanizmi kasne auto-inkompatibilnosti do danas ostali nerasvetljeni.

2) Unilateralna inkompatibilnost (UI) sprečava hibridizaciju srodnih vrsta u jednom smeru tj. polinacija između dve srodne vrste kompatibilna je u jednom smeru, dok je inkompatibilna u obrnutom smeru (npr. kad su u pitanju vrste *Erythronium americanum* i *Erythronium albidum* (Liliaceae), polenove cevi auto-inkompatibilne vrste *E. americanum* rastu nesmetano na tučkovima samooplodne vrste *E. albidum*, dok polinacija u obrnutom smeru dovodi do inkompatibilne reakcije; Harder i sar., 1993). UI najčešće dozvoljava oplodjenje samooplodne vrste polenom srodne auto-inkompatibilne vrste, dok polinacija u obrnutom smeru dovodi do inkompatibilne reakcije (mada ima i izuzetaka od pravila gde polen samooplodne vrste može da oplodi srodnu auto-inkompatibilnu vrstu; Lewis i Crowe, 1958). Takođe, UI se može javiti i između dve auto-inkompatibilne ili između dve auto-kompatibilne vrste (Brandvain i Haig, 2005). UI je zabeležena kod rodova: *Brassica*, *Capsicum*, *Eucalyptus*, *Leavenworthia*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum* i drugih (Martin, 1964; Lloyd, 1968; Gore i sar., 1990; Hancock i sar., 2003; Onus i Pickersgill, 2004; Covey i sar., 2010). Kod nekih vrsta komponente AI sistema su uključene i u UI odgovor (npr. kod *Nicotiana* u UI odgovor uključene su S-RNaze, a razlika između AI i UI sistema leži u ne-S-RNaznim faktorima koji su uključeni u proces, Hancock i sar., 2003; dok kod *Solanum* u UI odgovor nisu uključene S-RNaze, ali jesu neke druge ne-S-RNazne komponente poput HT-A gena, Covey i sar., 2010; takođe je i kod *Brassica* uočeno da u UI nisu uključeni produkti S-lokusa već M-lokusa, konkretno MLPK gen, Takada i sar., 2013).

Neki autori smatraju da se UI javlja kao slučajna posledica postojanja AI sistema (Martin, 1964), drugi smatraju da ima za cilj da zaštiti AI vrste od hibridizacije sa srodnim

samooplodnim vrstama, kao vid prevencije samooplođenja/ukrštanja u srodstvu (*Grun i Radlow*, 1961), a postoji i mišljenje da je UI sporedna pojava divergencije vrsta unutar istog roda (*Onus i Pickersgill*, 2004). Potrebno je ipak sakupiti još podataka o molekularnoj osnovi UI, kao i o evoluciji, promenama i održavanju AI sistema, da bi bilo moguće izvesti pouzdanije zaključke.

3) Prikrivena auto-inkompatibilnost podrazumeva pojavu da je u vrsti prisutno uspešno i stranooplođenje i samooplođenje, ali kada se u isto vreme na istom žigu tučka nađu srodni i nesrodni polen, onda će pri oplođenju nesrodni polen imati kompetitivnu prednost nad srodnim polenom (usled brže germinacije polena i/ili bržeg rasta polenovih cevi) (*Jesson i sar.*, 2006). Zabeležena je u vrstama: *Amsinckia grandiflora*, *Cheiranthus cheiri* L., *Clarkia unguiculata*, *Decodon verticillatus*, *Echium vulgare*, *Eichhornia paniculata*, *Hedyotis acutangula*, *Silene vulgaris* i drugim (*Bateman*, 1956; *Weller i Ornduff*, 1977; *Bowman*, 1987; *Cruzan i Barrett*, 1993; *Eckert i Allen*, 1997; *Korbecka i sar.*, 2003; *Wu i sar.*, 2010; *Smith-Huerta i Vasek Madroño*, 2011). Neki autori smatraju da predstavlja strategiju kojom se osigurava reproduktivni uspeh vrste, tako što se u slučaju prisustva nesrodnog polena povećava udeo plodova nastalih stranooplođenjem, dok se u vremenima kada nema nesrodnog polena (npr. zbog odsustva polinatora) favorizuje plodonošenje samooplođenjem (*Kalisz i sar.*, 2004; *Jesson i sar.*, 2006). Drugi autori smatraju da predstavlja tranzijentnu fazu AI vrste ka samooplodnosti (*Mable i sar.*, 2005; *Liu i sar.*, 2007).

4) Mentor efekat, koji podrazumeva indukovanje samooplođenja u inače auto-inkompatibilnim individuama pod uticajem polena iz drugih vrsta i javlja se najčešće u zonama hibridizacije dve vrste (npr. u *Hieracium* s.str., *Lotus corniculatus*, *Paspalum notatum*, *Ranunculus auricomus* i dr.) (*Mráz*, 2003; *Hörandl i Temsch*, 2009). Kad se na tučku nadje mešavina sopstvenog i stranog polena druge vrste, mentor efekat sprečava stranooplođnju favorizujući samooplođenje, čak i po cenu rizikovanja inbriding depresije, a sve u cilju sprečavanja nastajanja sterilnog potomstva, koje bi se aseksualno reprodukovalo. Iako mentor efekat dovodi do sloma auto-inkompatibilnosti, smatra se da ima važnu ulogu

u reproduktivnoj izolaciji i specijaciji hibrida, uglavnom u zonama hibridizacije dve vrste, gde se mešavine polena najčešće pojavljuju i da otežava/sprečava nastajanje primarnih hibrida. Mehanizam mentor efekta do danas nije rasvetljen.

U naučnoj javnosti se mnogo diskutuje o tome gde nabrojane četiri pojave treba svrstati, tj. da li su sve ili barem neke od njih AI sistemi *sensu stricto* ili su sporedne/dodatne manifestacije AI sistema ili su možda tranzijentne forme reproduktivnih sistema, ali svi se slažu u jednom, a to je da se javljaju kao deo strategije cvetnica za osiguravanjem reprodukcije u stalno promenljivoj životnoj sredini.

1.3. Evolucija auto-inkompatibilnih sistema cvetnica

Na osnovu opštih podataka kojima se za sada raspolaže o AI sistemima *sensu stricto* (kojima se smatraju samo AI sistemi koji predstavljaju postpolinacione, prezigotske barijere) smatra se da ovi sistemi imaju *polifiletsko poreklo*, tj. da su evoluirali više puta nezavisno unutar klase cvetnica (Ilgic i sar., 2008). Prema sadašnjim filogenetskim i molekularnim podacima o AI sistemima, ispostavilo se da su gametofitni AI sistemi zasnovani na *S-RN*azama filogenetski najrasprostranjeniji od svih AI sistema *sensu stricto*, zbog čega neki autori smatraju da su upravo oni predačko stanje prvih cvetnica (Ilgic i Kohn, 2001). Smatra se da su gametofitni AI sistemi postojali u centru porekla vrsta, dok se u perifernim zonama centra porekla pojavljivala samooplodnost, kao izvedeno stanje (Stebbins, 1957; Kusaba i sar., 2001). Takođe, pretpostavlja se da su se sporofitni AI sistemi tek kasnije razvili, nastajući iz auto-kompatibilnih linija poteklih od predaka koji su imali gametofitni AI sistem (Allen i Hiscock, 2008). Predloženo je i da sporofitni AI sistemi mogu evoluirati i održavati se i u prisustvu sistema prikrivene gametofitne auto-inkompatibilnosti, pošto su zabeleženi podaci o postojanju zajedničke gametofitne/sporofitne AI kontrole kod vrsta *Theobroma cacao* (Sterculiaceae), *Cerastium arvense* (Caryophyllaceae) i *Stellaria holostea* (Caryophyllaceae), za koje se smatra da predstavljaju primere tranzicije AI gena između gametofitne i sporofitne kontrole (Allen i

Hiscock, 2008). Za sada najviše podataka ide u prilog tome da je GSI nastala više puta nezavisno u najranijim linijama cvetnica pre njihove dalje diverzifikacije, ali da je ipak kasna AI najverovatnije bila osnovno stanje prvih cvetnica, pa da je posle nastala GAI, pa da su onda nastali heteromorfni AI sistemi, dok su homomorfni sporofitni AI sistemi najmlađi. Nasuprot ovom mišljenju ima i autora koji smatraju da je najverovatnije ancestralno stanje bila auto-kompatibilnost iz koje su kasnije evoluirali prvo sporofitni AI sistemi, a onda iz njih i gametofitni, kroz odlaganje vremena ekspresije *S* alela. Kada je reč o poreklu heteromorfnih AI sistema, smatra se da su evoluirali više puta nezavisno tokom diverzifikacije cvetnica, i da iako su sporofitnog karaktera, poput homomorfni sporofitnih AI sistema, da su ova dva sistema suštinski različita i stoga nezavisnog porekla, što podržavaju i skorije molekularne i filogenetske analize (*Allen i Hiscock*, 2008).

Sakupljanjem više podataka o postojećim tri forme AI sistema *sensu stricto* (prikazanih ponaosob u poglavljima 1.4. i 1.5.), uočeno je da sva tri tipa AI sistema imaju određene zajedničke odlike. Pre svega, svaki od tri tipa AI sistema je prilično **plastičan**, zato što:

1) Pokazuje dinamiku zavisnu od razvojnog stadijuma cveta, u kojoj AI sistem tokom sazrevanja cveta postepeno postaje aktivan i postiže punu aktivnost dan-dva pre otvaranja cveta (*Kusaba i sar.*, 2001; *Chalivendra i sar.*, 2013);

2) Postoji određena propustljivost reproduktivnih barijera tj. kvantitativne razlike u snazi odgovora AI sistema između vrsta, kao i između genotipova jedne vrste, za koje se smatra da predstavljaju deo reproduktivnih strategija u suočavanju AI vrsta sa variranjem u dostupnosti nesrodnog polena (*Vallejo-Marin i Uyenoyama*, 2004; *Porcher i Lande*, 2005).

Takođe, primećeno je da se kod sva tri tipa AI vrsta cvetnica dešavaju i **česti prelazi na samooplodnost**, što nije samo posledica smanjenja broja *S* alela u populaciji (do kog može doći usled genetičkog drifta, efekta osnivača, efekta uskog grla, itd.), već da zavisi i

od drugih genetičkih (npr. mutacije u AI genima ili genima modifikatorima AI odgovora i dr.) i negenetičkih faktora (npr. nedostatak polinatora, izolovanost populacije, itd.) (Busch, 2005; Mable i sar., 2005; Mable, 2008; Navascués i sar., 2010) i da su takvi prelazi nepovratni (Igic i sar., 2004, 2006).

Dakle, na osnovu svih dosadašnjih saznanja o AI sistemima *sensu stricto* možemo zaključiti da se u stalno promenljivom okruženju unutar različitih taksonomskih kategorija (npr. vrste, roda) dešavaju tranzicije sa stranooplodnih (auto-inkompatibilnih) na samooplodne (auto-kompatibilne) načine reprodukcije, a u isto vreme se dešava i *de novo* pojava AI sistema i njihova dalja evolucija. Ovakav dinamičan skup reproduktivnih strategija održava balans između cene reproduktivnog uspeha i cene genetičke varijabilnosti vrsta, između kojih je vrsta primorana da stalno odlučuje u zavisnosti od spoljašnjih uslova. Takođe, kao što je objašnjeno, AI sistemi u sadejstvu sa ekološkim faktorima utiču i na specijaciju i diverzifikaciju vrsta, a time posredno i na smene dominantnih biljnih vrsta u Zemljinoj vegetaciji od postanka tih vrsta do danas. Zato je upoznavanje AI sistema od velike važnosti za razumevanje evolucije reproduktivnih sistema biljaka, zatim i evolucije, specijacije i diverzifikacije cvetnica, ali takođe i za upoznavanje i razumevanje nekih univerzalnih pojava u molekularnoj genetici svih eukariotskih vrsta, kao što su sticanje i održavanje visoke varijabilnosti alela u određenom genskom lokusu, smanjivanje rekombinacija u određenim regionima genoma, ciljana inaktivacija alela, različite interakcije među alelima, kao i koevolucija interaktivnih faktora.

1.4. Auto-inkompatibilni sistemi homomorfni cvetnica

Vrste koje poseduju hermafroditne cvetove identične morfologije su najbrojniji predstavnici cvetnica. Kod takvih homomorfni vrsta karakteristike cvetova (poput dužine tučkova, visine antera i veličina polenovih zrna) identični su među svim cvetovima te vrste. Auto-inkompatibilnost je prisutna u više od 94 familije homomorfni cvetnica

(Gibbs, 1990; Weller i sar., 1995; Steinbachs i Holsinger, 2002) i javlja se ili kao sporofitna AI ili kao gametofitna AI. Za razliku od heteromorfnih AI sistema, homomorfni AI sistemi su znatno bolje proučeni, a njihova molekularna osnova je do sada najbolje razjašnjena kod familija Brassicaceae (kupusnjača), Solanaceae, Rosaceae i Scrophulariaceae (krompira, ruža i zevalica) i Poaceae (trava).

1.4.1. Homomorfna sporofitna auto-inkompatibilnost Brassicaceae

Familija Brassicaceae (kupusnjača) sadrži preko 330 rodova sa ukupno oko 3,700 vrsta (prema Royal Botanic Gardens, Kew) i smatra se da je u ovoj familiji AI nezavisno nastala 9 do 10 puta (Igic i sar., 2008). Do sada sve ispitane AI vrste kupusnjača pokazale su sporofitnu AI, u kojoj se rast sopstvene polenove cevi zaustavlja na žigu tučka, a detaljnija istraživanja su pokazala da je AI kupusnjača pod kontrolom dva genska lokusa, *S* i *M*. Dok je *S*-lokus višealetski i odgovoran za sintezu SRK, SLG, SP11 proteina, koji obezbeđuju specifično razlikovanje sopstvenog polena od stranog, *M*-lokus je odgovoran za sintezu *M*-lokus protein kinaze (MLPK), koja ima ulogu pozitivnog medijatora signala u kaskadi događaja koji vode zaustavljanju rasta cevi polena prepoznatog kao sopstvenog.

Proteini koji direktno određuju specifičnost AI prepoznavanja kod kupusnjača su *S*-lokus receptor kinaza (SRK), transmembranska serin/treonin kinaza prisutna u epidermalnim ćelijama žiga tučka (Stein i sar., 1991,1996; Takasaki i sar., 2000) i *S*-lokus protein 11 (SP11), cisteinom bogat mali protein prisutan u omotaču polena (Schopfer i sar., 1999; Shiba i sar., 2001). Mehanizam interakcije funkcioniše poput receptor-ligand kompleksa, u kom se SP11 kao ligand vezuje za vanćelijski domen SRK i ukoliko dođe do njihovog prepoznavanja aktivira se receptorski kompleks (koji pored SRK čini i SLG, *S*-lokus glikoprotein, koji stabilizuje SRK na haplotip-specifičan način, mada ima i haplotipova kojima uopšte ne treba SLG), kroz autofosforilaciju SRK, čime se pokreće signalna kaskada koja će dovesti do zaustavljanja rasta inkompatibilne polenove cevi

(*Takasaki* i sar., 2000; *Takayama* i *Isogai*, 2003; *Chookajorn* i sar., 2004; *Kemp* i *Doughty*, 2003; 2007; *Shimosato* i sar., 2007).

Neki od molekula signalne kaskade AI odgovora kupusnjača su identifikovani i uključuju, redom kojim se pojavljuju kao akteri u prenošenju signala:

1) dva tioredoksin h proteina, nazvanih THL1 i THL2, koji negativno regulišu SRK, a i sam AI odgovor, tako što održavaju SRK u neaktivnom stanju (u neoprašenim tučkovima) (*Bower* i sar., 1996; *Cabrillac* i sar., 2001; *Haffani* i sar., 2004);

2) MLPK, za membranu vezanu *M*-lokus serin/treonin protein kinazu, koja je neophodna za AI odgovor i direktno interaguje sa SRK, iako se još uvek ne zna njihova tačna fiziološka veza (*Murase* i sar., 2004; *Kakita* i sar., 2007a; 2007b);

3) ARC1 (ARM-Repeat Containing-1), E3 ubikvitin ligaza, koja je lokalizovana u proteazomima i signalozomima na SRK zavisani način (*Stone* i sar., 2003);

4) Exo70A1, protein koji ulazi u sastav oktamerskog proteinskog kompleksa, koji učestvuje u transportu vezikula i drugom polarizovanom unutarćelijskom transportu (*Samuel* i sar., 2009).

Na osnovu do danas sakupljenih podataka najverovatniji model AI odgovora *Brassica* podrazumeva da nakon vezivanja SP11 za SRK prestaje inhibicija SRK (koja je bila ostvarena tioredoksinima), čime se dozvoljava autofosforilacija SRK, što aktivira ovu kinazu omogućujući joj da dalje aktivira MLPK (koja se nalazi neposredno pored SRK u membrani). Na taj način se pokreće složena nizvodna kaskada događaja, u kojoj se fosforiliše ARC1, koji interaguje sa Exo70A1 i pokreće njegovu degradaciju, sprečavajući na taj način stvaranje kompatibilnih faktora, koji su neophodni za rast polenove cevi, što na kraju dovodi do zaustavljanja rasta tube polena prepoznatog kao sopstvenog (*Haasen* i *Goring*, 2010; *Kitashiba* i sar., 2011).

Pored velikog broja molekula potrebnih za realizaciju AI odgovora, složenost AI sistema još više je uvećana kompleksnim interakcijama između *S* alela *Brassica*. *Thompson i Taylor* (1966) su primetili da postoji dominantno-recesivna interakcija među *S*-haplotipovima kupusnjača. Utvrđeno je da je AI fenotip polena određen odnosom *S*-haplotipova nasleđenih od roditelja, koji može biti kodominantan ili dominantno-recesivan. Pri tom se odnosi dominantnosti u tučku razlikuju od onih u polenu, a svi odnosi dominantnosti su nelinearni (*Hatakeyama i sar.*, 1998). Takođe, nedavno je ustanovljeno da kod kupusnjača postoji epigenetska regulacije monoalelske ekspresije u polenu kroz monoalelsku metilaciju. U ovom procesu se posredstvom malih RNK, kodiranih u oivičavajućim regionima dominantnog SP11 alela (klasa I *S*-haplotipova), ostvaruje *in trans* transkripciono utišavanje recesivnog SP11 alela (klasa II *S*-haplotipova) putem metilacije njegovog promotora (*Tarutani i sar.*, 2010; *Shiba i Takayama*, 2012). Pri tome SP11 aleli klase I ispoljavaju međusobnu kodominantnost, dok među SP11 alelima klase II postoji linearna dominantnost i aleli klase I su uvek dominantni nad alelima klase II. Nasuprot tome, ispostavilo se da je dominantnost haplotipova u tučkovima svojstvo same SRK i da nije povezano sa promenom nivoa transkripcije SRK (*Hatakeyama i sar.*, 2001). Za sada se ne zna tačan mehanizam regulacije dominantnosti među SRK alelima, ali uopšteno gledano on može uključivati interakciju između dve SRK, kompeticiju za nizvodne signalne komponente ili post-transkripcionu regulaciju dominantnosti (*Kemp i Doughty*, 2003).

1.4.2. Homomorfna gametofitna na *S*-RNazama zasnovana auto-inkompatibilnost *Rosaceae*

Sledeća po redu, kad je reč o stepenu poznavanja molekularne osnove AI odgovora, jeste na *S*-RNazama zasnovana gametofitna AI, koja je prisutna u familijama Solanaceae, Rosaceae i Scrophulariaceae (krompira, ruža i zevalica), koje zajedno obuhvataju više od 300 rodova i više od 8,500 vrsta (*Olmstead i Bohs*, 2007; <http://www.theplantlist.org>,

2010). Kod svih ispitivanih AI vrsta ovih familija pokazano je da se rast sopstvene polenove cevi zaustavlja na 2/3 dužine stubića tučka i da je pod kontrolom jednog višelelskog *S*-lokusa. *S*-lokus kod ovih vrsta odgovoran je za sintezu proteina S-RNaza i SLF/SFB, koji predstavljaju žensku i mušku komponentu specifičnosti prepoznavanja sopstvenog i nesopstvenog polena. S-RNaza je *S*-protein sa ribonukleaznom funkcijom i prisutna je samo u vanćelijskom matriksu sprovodnog tkiva tučka gde degraduje RNK sopstvenog polena, dok je SLF/SFB, *S*-lokus F boks protein (F boks je strukturni motiv proteina karakterističan za proteine koji odvođe druge proteine u degradaciju u proteazomima), prisutan isključivo u polenu (Kao i Tsukamoto, 2004; McClure, 2004). Kada se *S*-haplotip polena podudara sa bilo kojim od dva *S*-haplotipa tučka, ispoljiće se citotoksična aktivnost S-RNaze, kojom će se zaustaviti dalji rast polenove cevi.

Iako su sam korak prepoznavanja i degradacije sopstvenog polena ostvareni zahvaljujući delovanju *S*-proteina, za potpuno ispoljavanje AI odgovora zasnovanog na S-RNazama potrebno je i delovanje drugih, nezavisnih genskih lokusa, nazvanih modifikujućim lokusima, za koje je pokazano da mogu da utiču na nivo ekspresije *S*-gena. Istraživanja *in vitro* omogućila su identifikaciju nekoliko ne-*S* komponenti tučka za koje se smatra da su potrebni za AI odgovor, kao što su: 120K (vanćelijski arabinogalaktan, koji može da se veže za S-RNazu), NaStEP (kiseli protein iz grupe Kunitz-tipa proteinaznih inhibitora, prisutan na površini žiga tučka i u manjoj količini u stubiću tučka), NaTrh (protein tioredoksin h podgrupe II, prisutan u vanćelijskom matriksu provodnog tkiva tučka) i HT-B (mali vanćelijski protein bogat asparaginom/aspartatom) (Puerta i sar., 2009; McClure i sar., 2011). Takođe su identifikovane i ne-*S* komponente polena poput: *Sli* faktora (*S*-lokus inhibitor, koji deluje kao dominantni faktor koji uzrokuje sporofitnu inhibiciju AI odgovora, tako što potiskuje polenovu funkciju na za sad nepoznat način; zahvaljujući njemu polen može savladati citotoksičnost S-RNaze nezavisno od svog *S*-genotipa), SBP1 (protein sa RING domenom, koji nije specifičan samo za polen, nego se javlja i u drugim tkivima, a za koji je pokazano da se *in vitro* vezuje za S-RNazu, 120K, SLF i neke transkripcione faktore), brojni SLF-vezujući proteini kao što je protein nalik

SCF (Skp1-Cullin-F-box) E3 kompleks (koji vezuje SLF i vodi nesopstvenu *S*-RNazu do ubikvitinacije), SSK1 (Skp1-nalik protein, koji vezuje SLF i protein nalik kulin-1 proteinu (Cullin1), stvarajući na taj način tročlani kompleks proteina za koji se smatra da učestvuje u AI odgovoru) (McClure i sar., 2011). Tačna uloga nabrojanih ne *S*-faktora AI odgovora zasnovanog na *S*-RNazama za sada je nerazjašnjena, ali su ispitivanja njihovih uloga u toku, pa možemo očekivati prve odgovore uskoro.

Što se tiče *biohemijuskog modela AI odgovora zasnovanog na S-RNazama*, predložena su dva: *S-RNaza degradujući model* i *kompartmentalizacioni model*. Ono što je za ova dva modela zajedničko jeste da oba podrazumevaju da interakcija *S*-RNaze sa SLF određuje da li je polinacija inkompatibilna ili kompatibilna, kao i da nakon prepoznavanja polena kao sopstvenog dolazi do degradacije polenove RNK, što izaziva opštu inhibiciju sinteze proteina neophodnih za kontinuiran rast polenove cevi. Ono u čemu se ova dva modela razlikuju jeste način na koji polen izbegava citotoksičan efekat *S*-RNaza, ali modeli nisu uzajamno isključivi.

U S-RNaza degradujućem modelu predloženo je da različiti SLF proteini (najmanje tri klase SLF proteina, prema Kubo i sar., 2010) saraduju na tome da ostvare rezistenciju na *S*-RNaze, tako što u kompatibilnoj polinaciji vezuju nesopstvenu *S*-RNazu i vode je u ubikvitinaciju i proteozomalnu degradaciju, sprečavajući tako degradaciju RNK polena, dok u inkompatibilnoj polinaciji ne mogu da se vežu za sopstvenu *S*-RNazu, tako da ona ispoljava svoje citotoksično dejstvo, degraduje polenovu RNK i zaustavlja rast polenove cevi.

U kompartmentalizacionom modelu predloženo je da se rezistencija na *S*-RNaze ostvaruje tako što se nesopstvene *S*-RNaze transportuju u vakuole kompatibilne polenove cevi, čime je sprečeno njihovo citotoksično delovanje, dok u inkompatibilnoj polinaciji

nema kompartmentalizacije sopstvene *S*-RNaze, tako da ona ostvaruje svoje citotoksično dejstvo i dovodi do zaustavljanja rasta tube polena prepoznatog kao sopstvenog (*McClure* i sar., 2011).

Iako se već dosta zna o ovim sistemima, potrebno je još dosta istraživanja da bi se razjasnili genetički i biohemijski putevi gametofitne AI zasnovane na *S*-RNazama (npr. koji sve geni učestvuju u AI i koje uloge imaju, kako se transportuje *S*-RNaza iz vanćelijskog matriksa tučka u vakuole polenove cevi, koji su tačno ciljni proteini SLF kompleks, itd.).

1.4.3. Homomorfna gametofitna auto-inkompatibilnost *Poaceae*

Na trećem mestu, kad je reč o stepenu poznavanja molekularne osnove AI odgovora, jeste familija *Poaceae* (trava), koja sadrži otprilike 700 rodova sa ukupno oko 10,000 vrsta (*Watson* i *Dallwitz*, 1992), a barem 16 rodova sadrži AI vrste (*Connor*, 1979). Iako sve do sad ispitane AI vrste trava imaju gametofitnu AI, kod većine vrsta do zaustavljanja rasta inkompatibilne polenove cevi dolazi na žigu tučka (npr. *Guardinia fragilis*) (što više podseća na ponašanje vrsta sa sporofitnom AI), mada ima i nekih kod kojih se rast zaustavlja u stubiću tučka (npr. *Cynodon dactylon*), što može biti posledica variranja intenziteta AI odgovora između različitih vrsta, kao i različitih genotipova jedne vrste (*Thomas* i *Murray*, 1975; *Shivanna* i sar., 1982).

Poznato je da je gametofitna AI kontrola trava ostvarena pomoću dva nezavisna, višealetska lokusa *S* i *Z*. Komplementarnom interakcijom alela ova dva genska lokusa ostvaruje se AI reakcija, ali samo u slučaju kada se aleli oba genska lokusa u inkompatibilnim fenotipovima polena i tučka podudaraju (*Hayman*, 1992). Pored *S* - i *Z*-lokusa izgleda da je i treći, *T*-lokus, uključen u AI odgovor trava, ali je ili u aktivnom ili u neaktivnom stanju i ne pokazuje alelsku varijabilnost kao *S* - i *Z*-lokusi, pa je moguće da je

nekad bio varijabilan, a onda postao fiksiran za jedan alel ili da uopšte ne učestvuje u specifičnom prepoznavanju, nego u prenosu signala u AI odgovoru (Hayman, 1992).

Mehanizam AI trava je najbolje proučen kod *Papaver rhoeas* gde je pokazano da PrpS, mali transmembranski protein polena (oko 20 kDa) i PrsS, mali cisteinom bogati protein tučka interaguju i pokreću Ca^{2+} zavisani signalni put, koji dovodi do zaustavljanja rasta polenove cevi, izmena u citoskeletu i programirane ćelijske smrti inkompatibilnog polena (Franklin-Tong i sar., 1993; 2002; Wheeler i sar., 2009; Klaas i sar., 2011; Wu i sar., 2011; de Graaf i sar., 2012).

1.5. Auto-inkompatibilni sistemi heteromorfnih cvetnica

Heteromorfnost je znatno ređa osobina od homomorfnosti, javlja se u otprilike 28 biljnih familija sa nekoliko rodova (Ganders, 1979; Gibbs, 1990; Barrett i sar., 2000; Steinbachs i Holsinger, 2002). Kod svih do danas zabeleženih heteromorfni AI vrsta sprečavanje ukrštanja u srodstvu/samooplođenja ostvareno je kombinacijom genetski determinisanog polimorfizma cvetova i dialelskog sporofitnog AI odgovora. Za razliku od homomorfni AI vrsta kod kojih postoji i gametofitna i sporofitna determinacija AI (pogledati pod 1.1.1.), među heteromorfni AI vrstama do danas su identifikovane jedino sporofitne AI vrste. Kao jedini u literaturi predloženi kandidati za S-faktore heteromorfniog sporofitnog AI odgovora za sad su spomenuti fitohemaglutinini i peroksidaza apoplasta tučka (Golynskaya i sar., 1976; Carraro i sar., 1996). Međutim, ne postoje još nikakvi eksperimentalni dokazi o njihovoj uključenosti u AI odgovor, a takođe ih treba uzeti sa rezervom budući da su, u to isto vreme početaka istraživanja AI sistema, za kandidate sporofitnih i gametofitnih homomorfni AI sistema predložene peroksidaze i lektini, što su rezultati skorijih istraživanja opovrgli. Iako je do danas prikupljeno dosta podataka o genima i proteinima uključenim u homomorfne sporofitne i gametofitne AI sisteme

cvetnica, proučavanje heteromorfni sporofitnih AI sistema tek je otpočelo i za sada nema konkretnijih podataka o njihovoj molekularnoj osnovi.

Istraživanja molekularne osnove heteromorfne AI započela su u rodovima *Turnera* (*Athanasiou i Shore, 1997; Shore i sar., 2006; Safavian i Shore, 2010*), *Primula* (*Manfield i sar., 2005; Li i sar., 2007; McCubbin, 2006; 2008*) i *Fagopyrum* (*Miljuš-Đukić i sar., 1998, 2003; Jotaro i sar., 1999; Matsui i sar., 2004, 2007*), ali za sada je sakupljeno vrlo malo podataka o njima. Za početak je poznato da svi predstavnici ispoljavaju sporofitnu determinaciju AI i da se mesto zaustavljanja rasta sopstvene polenove cevi razlikuje između dva morfa kod proučavanih *Turnera joelii*, *T. scabra*, *Primula vulgaris* i *Fagopyrum essulentum* Moench. Kod svih "tram" cvetova do zaustavljanja rasta inkompatibilne polenove cevi dolazi na žigu tučka ili spoju žiga i stubića tučka, dok kod "pin" cvetova do zaustavljanja dolazi kasnije, na otprilike 2/3 dužine stubića tučka. Pošto je kod heteromorfni sporofitnih AI sistema genetska determinacija morfa cveta kombinovana sa AI odgovorom, pretpostavljeno je da kod takvih AI vrsta postoji *S*-super-gen, lociran blizu centromere hromozoma kao regiona u kom su suprimirane rekombinacije, koji sadrži veći broj alela koji se vezano nasleđuju, a koji određuju više osobina cveta, kao što su dužina stubića tučka, visina antera, veličina polenovih zrna i auto-inkompatibilnost. Za razliku od homomorfne sporofitne AI, koja ima više različitih *S*-alela uključenih u AI odgovor, *S*-gen zadužen za heteromorfni AI odgovor postoji samo u vidu dva alela, od kojih *S* pokazuje potpunu dominantnost nad *s* (*Matsui i sar., 2004*). I kod *Primula* i kod *Fagopyrum* dominantni alel je prisutan u "tram" morfu, koji genotipski predstavlja dominantni heterozigot (*Ss*), dok je "pin" recesivni homozigot (*ss*) (*Kurian i Richards, 1997; McCubbin, 2008; Matsui i sar., 2004; 2007*). Za dominantnost *S* nad *s* je pokazano da je potpuna i u tučku i u polenu, kao i da opstaje čak i kod tetraploidnog genotipa *Ssss* (*Dowrick, 1956*). Iako se ne zna kako je dominantnost postignuta u heteromorfnoj AI, smatra se da se ona najverovatnije ostvaruje putem utišavanja recesivnog alela, kao i da je to utišavanje reverzibilno (npr. reverzibilna DNK metilacija), budući da su aleli funkcionalni u "pin" potomstvu "tram" biljaka.

Heteromorfna sporofitna auto-inkompatibilnost Primula

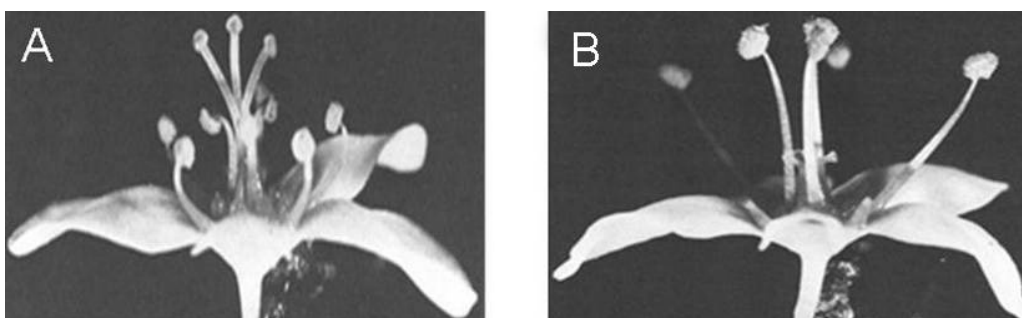
Prvi molekularni podaci o auto-inkompatibilnosti *Primula* (Primulaceae) tj. jagorčevina uključuju sekvencu 8,8 kb dugog fragmenta genomske DNK, koji se nalazi u blizini *S*-lokusa i za koji je ustanovljeno da je repetitivne strukture i da sadrži dosta sekvenci nalik retrotranspozonu. Time podseća na strukturu sekvenci blisko vezanih *S*-lokusu homomorfni AI vrsta, a uočena akumulacija navedenih strukturnih elemenata je saglasna sa izveštajima o smanjenoj rekombinaciji unutar *S*-lokusa ili njemu bliskog regiona (*Manfield* i sar., 2005).

Najnoviji podaci o AI *Primula* uključuju identifikaciju dva fragmenta komplementarne DNK, koji su povezani sa *S*-lokusom. Geni koji određuju ove komplementarne DNK nazvani su *PvSLL1* i *PvSLL2*. Analiza sekvenci otkrila je da *PvSLL2* pokazuje homologiju sa *Arabidopsis* "Constans-like" genskom familijom, dok je *PvSLL1* potencijalno potreban za sintezu malog transmembranskog molekula sličnog At1g72020 proteinu *Arabidopsis* za sada neutvrđene funkcije (*Li* i sar., 2007). Pored toga, identifikovana su tri *PvSLL1* alela (dva recesivna i jedan dominantan), što je interesantno jer tradicionalni model dialelskog lokusa heteromorfni AI sistema predviđa samo dva. Ovo može ukazivati na akumuliranje polimorfizama u alelima koji imaju istu funkciju, ali budući da je analiza sekvenci pokazala različita vremena divergencije recesivnih i dominantnog alela, to dovodi u sumnju uključenost ovih gena u heteromorfnu AI jagorčevine. Iako do sada sakupljeni podaci nisu pružili odgovore na ključna pitanja o heteromorfnoj sporofitnoj AI (npr. koji geni su nosioci *S*-specifičnosti razlikovanja sopstvenog i nesopstvenog polena, koji proteini učestvuju u odbacivanju polena prepoznatog kao sopstvenog i na koji način), istraživanja su nastavljena, tako da možemo očekivati nove podatke uskoro, a moguće i neke odgovore o molekularnoj osnovi ovih sistema.

1.6. Heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench)

Heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench) pripada familiji *Polygonaceae* i prema jedinim podacima dostupnim u literaturi vodi poreklo od divljeg srodnika *Fagopyrum esculentum* iz provincije Junan u južnoj Kini (Ohnishi, 1991). Rod *Fagopyrum* pored heljde uključuje još oko 14 vrsta, većinom diploidne vrste poput *F. tataricum*, *F. urophyllum*, *F. gracilipes*, *F. leptopodum*, ali i *F. cymosum* i *F. esculentum*, koje su autotetraploidi (Woo i sar., 2008).

Kao dimorfna biljna vrsta, heljda ima dva morfološki različita tipa cveta nazvanih "pin" (dugačak stubić tučka, kratke antere, sitnije polenovo zrno) i "tram" (kratak stubić tučka, dugačke antere, krupnije polenovo zrno) (Slika 1).

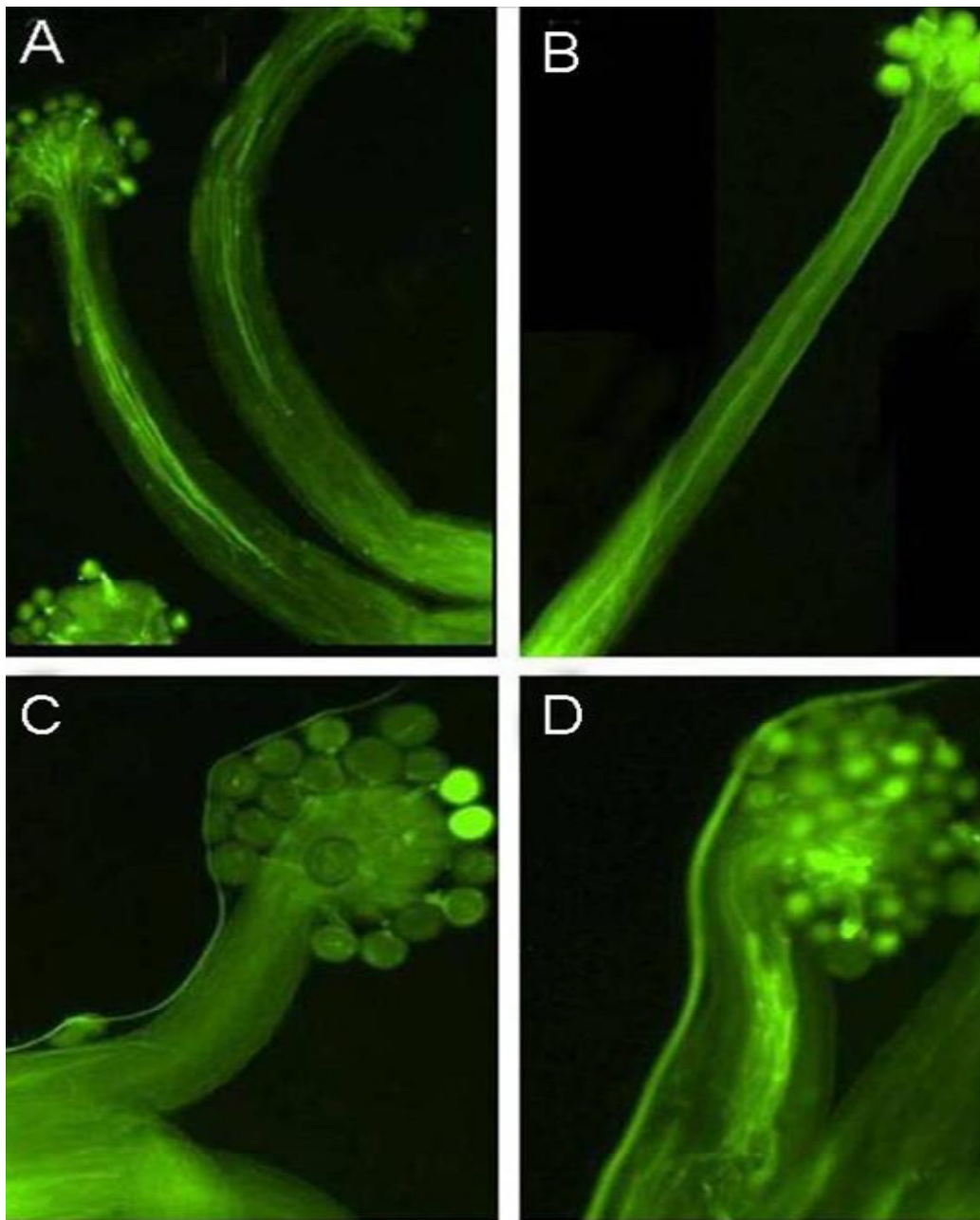


A, "Pin" cvet heljde

B, "Tram" cvet heljde

Slika 1. Morfološki izgled dva tipa cveta heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench): A, "pin" cvet; B, "tram" cvet (slika je preuzeta iz Marshall, 1980).

Usled delovanja heteromorfne sporofitne AI kod heljde do oplodjenja može doći samo između "pin" i "tram" cvetova (kompatibilno oprašivanje), dok je između cvetova iste morfologije sprečeno oplodjenje (inkompatibilno oprašivanje) (Miljuš-Đukić i sar., 1998; 2003; Jotaro i sar., 1999).



Slika 2. Rast polenovih cevi nakon inkompatibilne i kompatibilne polinacije dva morfa tučkova heljde (*Fagopyrum esculentum* Moench) posmatran pod fluorescentnim mikroskopom: **A**, auto-inkompatibilna polinacija "pin" tučka; **B**, kompatibilna polinacija "pin" tučka; **C**, auto-inkompatibilna polinacija "tram" tučka; **D**, kompatibilna polinacija "tram" tučka.

Fluorescentnim mikroskopiranjem vizuelizovan je rast polenovih cevi nakon inkompatibilnih i kompatibilnih oprašivanja tučkova oba morfa heljde. Ustanovljeno je da se nakon inkompatibilne polinacije rast polenove cevi zaustavlja na 2/3 dužine stubića tučka kod "pin" cveta (**Slika 2A**), dok se kod "tram" cveta zaustavlja na samom žigu tučka (**Slika 2C**). U slučaju kompatibilnih oprašivanja i kod "pin" i kod "tram" cvetova heljde polenove cevi rastu čitavom dužinom stubića tučka do plodnika gde će doći do oplodjenja (**Slika 2B, 2D**).

Heteromorfna sporofitna auto-inkompatibilnost heljde

Analizom rezultata ukrštanja AI heljde sa samooplodnim linijama heljde (dobijenim spontanim prirodnim mutacijama ili mutacijama izazvanim zračenjem), kao i ukrštanja heljde sa njenim samooplodnim divljim srodnikom *F. homotropicum*, uz spašavanje embriona, zaključeno da je heljdin AI sistem pod kontrolom *S*-supergena. Ovaj supergen sadrži više blisko vezanih gena koji se zajedno nasleđuju, a to su geni koji određuju morfološke karakteristike cveta (dužinu tučka, visinu antera, veličinu polenovog zrna) i bialelski *S*-gen odgovoran za AI fenotip polena i tučka (*Matsui i sar.*, 2003). Među alelima gena koji određuju AI fenotip polena i tučka, postoji dominantno-recesivan odnos u kom je alel *S* dominantan nad *s* (tako su "tram" biljke dominantni heterozigoti za *S*-alel tj. *Ss*, dok su "pin" biljke recesivni homozigoti, *ss*).

Takođe, rezultati ukrštanja su ukazali na to da je alel S^h (poreklom iz *F. homotropicum*), odgovoran za auto-kompatibilnost heljde, isti kao i gen koji je odgovoran za inkompatibilnost, samo da je nastao rekombinacijom unutar *S*-supergena, pri čemu inkompatibilni *S*-aleli stoje u sledećem odnosu prema njemu: $S > S^h > s$ (**Tabela 1**) (*Woo i sar.*, 1999; *Matsui i sar.*, 2003). A pošto se "tram" polen, nezavisno od svog haploidnog genotipa, u svim ukrštanjima uvek ponašao kao da ima dominantni *S*-fenotip, zaključeno je da je AI fenotip polena heljde sporofitno determinisan.

Pored toga, predloženo je da heljda, kao i *Primula*, najverovatnije sadrži poligene izvan *S*-lokusa, koji kontrolišu intenzitet AI odgovora (*Mather i de Winton*, 1941). Smatra se da ovi geni, nazvani modifikatori, imaju zajedničke tri glavne karakteristike: **1)** polen je kompatibilan sa tučkovima svih tipova cvetova, a njegova kompatibilnost je pod uticajem genetske osnove biljaka na koje dospeva; **2)** morfologija cvetova F1 generacije pod kontrolom je genotipa *S*-lokusa; **3)** F1 biljke imaju visoku auto-kompatibilnost, mada je nivo kompatibilnosti pod uticajem njihovog genetskog porekla (*Matsui i sar.*, 2007).

Tabela 1. Prikaz očekivanih odnosa dominantnosti između alela *S*, *s*, *S^h* (*S^h* označava *S*-alel srednje dužine tučka, tj. duži od "tram", ali kraći od pin "tučka"). Prikazani odnosi *S*-alela zasnovani su na odnosima dominantnosti između alela koji određuju dužinu tučka (*g*) i visinu antera (*a*) (preuzeto iz *Matsui i sar.*, 2003).

<i>S</i>-genotip	<i>s/s</i>	<i>S^h/S^h</i>	<i>S/s</i>	<i>S^h/s</i>	<i>S/S^h</i>
Genotip dužine stubića tučka (<i>g</i>) i visine antera (<i>a</i>)	<i>ggaa</i>	<i>ggAA</i>	<i>GgAa</i>	<i>ggAa</i>	<i>GgAA</i>
Fenotip dužine stubića tučka (<i>g</i>) i visine antera (<i>a</i>)	<i>ga</i>	<i>gA</i>	<i>GA</i>	<i>gA</i>	<i>GA</i>
Morf cveta	pin	Tučak srednje dužine	tram	Tučak srednje dužine	tram
Odnos <i>S</i> -alela	/	/	<i>S</i> > <i>s</i>	<i>S^h</i> > <i>s</i>	<i>S</i> > <i>S^h</i>

Do nedavno jedini dostupni podaci o *S*-lokusu heljde uključivali su potvrdu da se nalazi blizu centromere hromozoma, na šta su ukazivali markeri *S*-regiona koji su sadržali repetitivne sekvence, od kojih su neke pokazivale homologiju sa centromernim regionom *Arabidopsis* i pirinča (*Aii i sar.*, 2004). Zatim je objavljena mapa genoma heljde kroz osam grupa vezanosti markera različitih gena, u kojima je pokazano da je marker za distilnu auto-

inkompatibilnost blisko vezan markeru za rasejavanje semena i da su oba smeštena blizu centra grupe vezanosti 1 (Yasui i sar., 2004). Ubrzo su konstruisane i biblioteke *F. homotropicum* (Nagano i sar., 2005) i *F. esculentum* Moench u veštačkim bakterijskim hromozomima (Yasui i sar., 2008), koje su bile namenjene razvijanju markera za poziciono kloniranje *S*-lokusa heljde sa ciljem analize *S*-supergena, a onda je u poslednjih pet godina i razvijen niz molekularnih markera koji segregiraju sa određenim osobinama heljde, uključujući tu i auto-inkompatibilnost. U međuvremenu je sekvenciran i transkriptom cveta dve vrste heljde, *Fagopyrum esculentum* i *F. tataricum*, što je pružilo značajan set novih sekvenci koje omogućavaju detekciju novih gena heljde (Logacheva i sar., 2011). Autori su objavili da su detektovali gene koji su različito ekspimirani između ove dve vrste među kojima se nalaze geni retrotranspozona i geni uključeni u biosintezu i metabolizam šećera, kao i rezultate filogenetske analize zasnovane na genima koji su bili prisutni u jednoj kopiji po genomu, ali za sada ništa o genima potencijalnog *S*-supergena heljde. Nezavisno od istraživanja transkriptoma cveta heljde, druga grupa autora je ispitivala razlike u ekspresiji gena u tučkovima dva morfa heljde i tako identifikovala gen ekspimiran samo u "tram" tučkovima, koji je bio u potpunosti vezan za *S*-lokus, a pokazivao je homologiju sa grupom gena odgovornih za rano cvetanje ("*EARLY FLOWERING 3*"), zbog čega je nazvan *S-ELF3*. Rezultati ispitivanja idu u prilog tome da je ovaj gen najverovatniji kandidat za gen koji kontroliše fenotip kratkog stubića tučka kod heljde (Yasui i sar., 2012).

Kada je reč o ostalim molekulima nizvodne kaskade AI odgovora heljde, za sada jedini podaci dostupni u literaturi su rezultati proistekli iz tretmana "pin" i "tram" tučkova heljde fosfatanim inhibitorima i antagonistima kalcijuma, koji su doveli do sprečavanja inhibicije rasta polenovih cevi, ukazujući na to da su protein fosfataze i kalcijumom posredovani signalni putevi neophodna komponenta AI odgovora heljde (Miljuš-Đukić i sar., 2003). Nakon toga detektovano je i specifično prisustvo proteina od 50 kDa u proteinskim izolatima auto-inkompatibilno oprušenih "tram" tučkova, međutim identitet ovog proteina ostao je nepoznat (Miljuš-Đukić i sar., 2004). Podaci o proteinima heljde koji postoje u literaturi do danas uključuju samo proteine semena (Radović i sar., 1996; Watanabe i sar., 1998; Momma, 2009; Katsube-Tanaka i sar., 2011) i proteine lista heljde (Shin i sar., 2010),

među kojima ne očekujemo prisustvo proteina koji učestvuju u AI odgovoru, jer traženi S-proteini imaju tkivno-specifičnu ekspresiju ograničenu samo na tučkove odnosno polen heljde.

Heljda je izabrana kao model organizam za istraživanje AI sistema zbog toga što predstavlja poljoprivredno značajnu biljnu vrstu, vrlo dobrih nutritivnih karakteristika, koja se koristi za ishranu ljudi i životinja, kao i za pravljenje farmaceutskih proizvoda. Njena vrednost u ishrani je visoka, jer pored toga što ima dobro izbalansirani sadržaj esencijalnih aminokiselina i što sadrži antioksidant rutin, ona sadrži i druge biološki aktivne proteine, koji npr. snižavaju holesterol i hipertenziju (Woo i sar., 2008). Gaji se širom sveta (Kina, Japan, Brazil, SAD, Rusija, Poljska, Francuska, Slovenija, itd.), ali njen nizak i nestabilan prinos, niska proizvodnja semena, kao i otpornosti na introgresiju drugih gena iz srodnih vrsta, što je sve uglavnom posledica delovanja AI sistema, doveli su do potrebe razvijanja različitih strateških programa za oplemenjivanje heljde (Woo i sar., 1999a).

Svi programi za oplemenjivanje heljde imaju za cilj uvođenje kompatibilnosti ili nekih drugih poljoprivredno poželjnih osobina (iz heljdinih divljih srodnika) u postojeće AI linije heljde i stvaranje fertilnog hibridnog potomstva poboljšanih osobina. Neki ovakvi pokušaji ukrštanja su bili uspešni, ali mnogi su uspešno ostvareni samo uz spašavanje embriona (Samimy i sar., 1996; Campbell, 1997; Chen, 1999; Woo i sar., 1999b; 2008; Aii i sar., 2001; 2004; Ölschläger i sar., 2004; Konishi i Ohnishi, 2006; Pan i Chen, 2010). Upravo zbog toga je i upoznavanje molekularne osnove auto-inkompatibilnog sistema heljde od interesa, jer bi moglo da doprinese postojećim programima oplemenjivanja tako što bi olakšalo proces dobijanja samooplodnih i drugih hibridnih linija, kao i kroz dizajn novih markera za efikasniju markerima posredovanu selekciju hibrida željenih osobina. Pored značaja za poljoprivredu, prikupljeni podaci doprineli bi i boljem razumevanju heteromorfni sporofitni auto-inkompatibilni sistema, koji su za sada najslabije proučeni AI sistemi cvetnica.

1.8. Značaj proučavanja auto-inkompatibilnih sistema u poljoprivredi

Iako su mnoge poljoprivredno značajne biljne vrste samooplodne (npr. suncokret, pšenica), ima i onih koje su auto-inkompatibilne (npr. badem, kajsija, kruška, heljda, itd.). Da bi ove vrste, koje imaju aktivne AI sisteme, plodonosile, one moraju biti zasejane sa kompatibilnim partnerima, a takođe su im neophodni i oprašivači, pri čemu ni plodonošenje ni prinos nisu zagarantovani. Budući da samooplodnost osigurava plodonošenje, uklanjajući potrebu za identifikacijom i testiranjem kompatibilnih partnera, kao i potrebu za oprašivačima, što sve snižava cenu uzgajanja, ona se pojavljuje kao vrlo poželjna osobina u poljoprivredi (*Dicenta i Gracia*, 1993; *Nomura i sar.*, 2002; *Niroula i sar.*, 2006; *Hafizi i sar.*, 2013). Zato je i proučavanje AI sistema od velikog interesa za poljoprivredu, jer se upoznavanjem ovih sistema može omogućiti i kreiranje samooplodnih linija, bilo kroz selekciju spontano nastalih samooplodnih jedinki (nastalih spontanom mutacijama *S*-gena/modifikujućih gena), bilo kroz ciljano ukidanje AI odgovora metodama genetičkog inženjerstva. Iako je samooplodnost cenjena osobina u poljoprivredi, zbog problema inbriding depresije koji se može javiti posle nekoliko generacija samooplodnje, potrebno je proizvoditi i nove samooplodne linije, u cilju izbegavanja negativnih efekata inbridinga (npr. smanjenje prinosa i kvaliteta ploda).

U prirodi se spontano dešavaju mutacije koje dovode do samooplodnosti tj. slamanja auto-inkompatibilnosti, npr. kroz poliploidiju, kroz mutacije u genima koji determinišu AI fenotipove polena ili tučka, itd. Oplemenjivači izdvajaju te jedinke i koriste ih u različito dizajniranim ukrštanjima, a sve sa ciljem da obezbede fertilno potomstvo koje će naslediti kombinaciju željenih osobina roditelja. Ovo je dugotrajan proces, koji bi se mogao značajno ubrzati razvojem markera koji segregiraju sa poželjnim osobinama, pomoću kojih bi proces identifikacije jedinki koje nose željene osobine i potomstva koje je nasledilo te osobine bio ubrzan. Proučavanje AI sistema upravo omogućuje razvijanje takvih markera, što je još jedan od poloprivredno značajnih doprinosa istraživanja ovog tipa.

2. CILJEVI RADA

Cilj istraživanja bio je da se ispita molekularna osnova heteromorfno sporofitnog auto-inkompatibilnog sistema heljde kroz:

- Ø Ispitivanje prisustva gena homolognih genima za koje je poznato da su uključeni u auto-inkompatibilni odgovor drugih biljnih vrsta upotrebom prajmera specifičnih za AI gene drugih biljnih vrsta na genomskoj DNK heljde u polimeraznoj lančanoj reakciji umnožavanja i sekvenciranje produkata umnožavanja;
- Ø Umnožavanje regiona genomske DNK heljde u neposrednoj blizini *S*-lokusa upotrebom prajmera specifičnih i poluspecifičnih za sekvencu blisko vezanu heljdinom *S*-lokusu u asimetričnoj polimeraznoj lančanoj reakciji umnožavanja i sekvenciranje produkata umnožavanja;
- Ø Analizu sekvenci genomske DNK heljde u programima koji omogućavaju predviđanje otvorenih okvira čitanja, egzon-intron struktura i iz njih izvedenih aminokiselinskih sekvenci, kao i poređenje sa DNK i aminokiselinskim sekvencama prisutnim u bazama podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije;
- Ø Ispitivanje potencijalne uloge za membranu vezanih Ca^{2+} zavisnih protein kinaza C (PKC) u auto-inkompatibilnom odgovoru heljde, kroz praćenje efekta tretmana tučkova oba morfa PKC-inhibitorom na rast polenovih cevi nakon inkompatibilnih i kompatibilnih polinacija tretiranih i netretiranih tučkova;
- Ø Izolaciju ukupnih proteina polena, neoprašenih, kompatibilno i auto-inkompatibilno oprušenih tučkova "pin" i "tram" cvetova heljde i njihovo 2D-PAGE razdvajanje;

Ø Detekciju proteina koji su specifično prisutni u 2D proteinskim profilima "pin" ili "tram" tučkova i polena, odnosno u profilima njihovih auto-inkompatibilnih odgovora.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench) je gajena u stakleniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u optimalnim uslovima. Neposredno po dostizanju reproduktivne zrelosti biljaka i započinjanju perioda cvetanja, u periodu od 14 dana, sakupljani su listovi i cvetovi sa "pin" i "tram" biljaka. Listovi su upotrebljavani sveži za izolaciju genomske DNK, dok su iz cvetova izolovani tučkovi i polen. Postupak sakupljanja biljnog materijala ponovljen je pet puta.

Izolovanim neoprašenim tučkovima plodnici su uklonjeni odmah po izolaciji (sterilnim skalpelom), dok su tučkovima koji su ručno inkompatibilno i kompatibilno oprašivani (pod binokularnim mikroskopom-lupom PXS-V1) plodnici uklonjeni tek 1,5 h nakon polinacije, a u međuvremenu su držani na podlogama za germinaciju polena (1% agar, 15% saharoza, 100 mg/l H_3BO_3 , 300 mg/l $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 200 mg/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg/l KNO_3) (Brewbaker i Kwack, 1963). Sakupljeno je ukupno osam klasa uzoraka: "pin" i "tram" polen, neoprašeni "pin" i "tram" tučkovi, inkompatibilno oprašeni "pin" i "tram" tučkovi (1.5 h nakon polinacije), kompatibilno oprašeni "pin" i "tram" tučkovi (1.5 h nakon polinacije). Uzorci su uskladišteni na $-80^\circ C$ do upotrebe.

3.2. Bakterijske procedure

3.2.1. Medijumi za uzgajanje bakterija

LB: 1% (w/v) Tripton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) ekstrakt kvasca, pH podešen na 7,5 pomoću 10N NaOH (Sambrook i sar., 1989).

LA: Čvrsti LB medijum, napravljen dodavanjem 1,5% (w/v) agara i 100 µg/ml ampicilina u tečni LB medijum (*Sambrook i sar.*, 1989).

3.2.2. Bakterije i plazmidi

Korišćen je soj bakterija *E.coli* DH5α K12, genotipa *F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) UI69 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 -thi-1 gyrA96 relA1*.

Plazmid korišćen za kloniranje produkata lančanog umnožavanja DNK bio je pJET vektor (CloneJet PCR Cloning kit, Fermentas). Ovaj vektor kao selektivni marker poseduje gen za rezistenciju na ampicilin.

3.2.3. Uzgajanje i održavanje bakterija

Transformisane bakterije uzgajane su preko noći na 37°C na čvrstom ili tečnom LB medijumu uz dodatak ampicilina. Za dugoročnu upotrebu, kulture transformisanih bakterija zamrzavane su na -80°C u 15% (v/v) glicerolu.

3.2.4. Transformacija *E.coli* toplotnim šokom

Transformacija kompetentnih ćelija *E.coli* DH5α K12 toplotnim šokom podrazumevala je da se bakterije i ligaciona smeša inkubiraju zajedno 10 min na ledu, a zatim prebace 45 sekundi u vodeno kupatilo na 42°C i vrate na led 2 min. U 100 µl transformisanih *E.coli* DH5α K12 ćelija dodavano je po 900 µl LB medijuma i bakterije su inkubirane 1h na 37°C uz intenzivno mešanje, nakon čega su razmazivane na LA podloge sa ampicilinom. Posle prekonocnog rasta na 37°C pojedinačne kolonije su prebacivane u tečni LB medijum, u kom su ostavljene preko noći na 37°C uz intenzivno mešanje. Dobijene prekonocne kulture, poreklom od pojedinačnih bakterijskih klonova, korišćene su za dalje analize prisustva inserta očekivane dužine.

3.3. Osnovne procedure rada sa DNK

3.3.1. Izolovanje biljne genomske DNK

Listovi "pin" i "tram" biljaka heljde su neposredno nakon uzimanja sa biljaka preneti u avane i uz dodatak tečnog azota mehaničkim usitnjavanjem samleveni u fini prah. Izolacija genomske DNK iz sprášenih listova rađena je po protokolu *Doyle i Doyle* (1987).

Po 100 mg uzorka prebačeno je u plastične tube u koje je dodavano 750 µl CTAB (cetil-trimetil-amonijum bromid) pufera (2% CTAB; 1.4M natrijum hlorid; 20 mM EDTA; 100 mM Tris pH 8, 2% PVP 40, 1% β-merkaptioetanol) zagrejanog na 65°C. Uzorak je inkubiran 3 min na 65°C u vodenom kupatilu uz povremeno mešanje uzorka obrtanjem tube. Zatim je u uzorak dodavano po 750 µl SEVAG rastvora (hloroform i izoamil alkohol u zapreminskom odnosu 24:1), uzorci su mešani 3 min obrtanjem tube i centrifugirani 10 min na 13,000 obrt/min (Minispin, Eppendorf). Gornja faza uzorka preneti je u novu plastičnu tubu. Ponovljen je korak ispiranja SEVAG rastvorom. Nakon dodavanja hladnog izopropanola (na -20°C) supernatantu, u zapremini jednakoj 2/3 zapremine uzorka, uzorak je promešan obrtanjem tube i centrifugiran 5 min na 13,000 obrt/min. Nakon toga, gornja faza je odbačena, a talog ispran sa 500 µl hladnog 70% etanola (na -20°C) obrtanjem tube i centrifugiranjem 5 min na 13,000 obrt/min. Posle centrifugiranja, etanol je odbačen, a talog osušen 10 min u rotavaporu (Concentrator 5301, Eppendorf). Suv talog rastvoren je u 50 µl vode i posle dodavanja RNaze A (10 µg/ml) inkubiran 30 min na 30°C da se ukloni RNK iz izolata. Koncentracija i čistoća izolovane genomske DNK proverene su na aparatu "Nanovue" (GE Healthcare). Izolati genomske DNK, koji nisu odmah korišćeni, skladišteni su na -20°C.

3.3.2. Izolovanje plazmida iz bakterija

Plazmidi su iz prekonocnih bakterijskih kultura izolovani na dva načina, u zavisnosti od namene izolovanih plazmida.

Prvi način predstavlja izolaciju plazmida u cilju analize dobijenih klonova (koji se ne mogu koristiti za sekvenciranje) i izvodi se po brzom proceduri na sledeći način: 1,5 mL prekonocne bakterijske kulture je centrifugirano 2 min na 13,000 obrt/min i talog je resuspendovan u 300 µl TENS pufera (1M Tris-HCl, pH 8,0; 0,5M EDTA, pH 8,0; 10M NaOH; 20 % SDS). Smeši je dodavano 150 µl 3M Na-acetata pH 5,2 nakon čega je tuba snažno promešana i centrifugirana 2 min na 13,000 obrt/min. Supernatant je prebačen u nove tube u koje je dodavano po 1 ml hladnog 96% etanola (-20°C). Nakon centrifugiranja 10 min na 13,000 obrt/min talog je ispran 70% etanolom, osušen u rotavaporu i rastvoren u 20 µl bidestilovane vode.

Drugi način predstavlja izolacija plazmida za preparativne svrhe (npr. za sekvenciranje plazmida), koja je urađena pomoću kita za izolaciju plazmida iz bakterija (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific) prema uputstvu proizvođača. Prema proceduri 1,5 mL prekonocne bakterijske kulture centrifugirano je 2 min na 13,000 obrt/min, a talog je resuspendovan u 250 µl rastvora za resuspenziju, 250 µl rastvora za liziranje ćelija i 350 µl rastvora za neutralizaciju, uz snažno mešanje uzorka nakon dodavanja svakog narednog rastvora. Nakon centrifugiranja 5 min na 13,000 obrt/min, supernatant je prebačen u GeneJET kolonice, centrifugiran 1 min, ispran sa po 500 µl rastvora za ispiranje dva puta (Centrifugiranje 1 min, eluat odbačen). Dodatnim centrifugiranjem kolonice pod istim uslovima eliminisani su tragovi etanola koji bi mogli da inhibiraju enzimske reakcije na prečišćenim plazmidima. DNK je zatim eluirana sa kolonice u 50 µl elucionog pufera. Ovako prečišćeni plazmidi korišćeni su za sekvenciranje ukloniranih fragmenata DNK.

3.3.3. Prečišćavanje umnoženih fragmenata DNK nakon reakcije umnožavanja

Produkti umnožavanja su nakon reakcije lančanog umnožavanja prečišćavani od zaostalih prajmera, kratkih oligonuklotida i soli upotrebom kita za prečišćavanje produkata lančane reakcije umnožavanja (PCR Purification Kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača.

Prema protokolu u produkte umnožavanja dodavan je PB1 pufer (u odnosu 5 puta većem od zapremine uzorka), uzorak je snažno promešan i prebačen u QIAquick kolonice, centrifugiran 1 min na 13,000 obrt/min. Eluat je odbačen, a kolonica isprana sa 750 µl PE pufera, centrifugirana 1 min uz odbacivanje eluata. Dodatnim centrifugiranjem kolonice pod istim uslovima eliminisani su tragovi etanola koji bi mogli da inhibiraju enzimske reakcije na prečišćenim DNK fragmentima. DNK je zatim eluirana sa kolonice u 50 µl bidestilovane vode.

3.3.4. Elektroforeza na gelu od agaroze

Produkti umnožavanja polimerazne lančane reakcije elektroforetski su razdvojeni na 1,5% (w/v) agaroznom gelu (od SeaKem GTG agaroze, FMC BioProducts, koja ne inhibira enzimske reakcije). U gel je dodato 0,5 µg/ml etidijum bromida. Za elektroforezu je korišćen TAE pufer (40mM Tris, 20mM sirćetna kiselina, 1mM EDTA) i raspon napona 5-10 V/cm gela (*Sambrook i sar.*, 1989). Nakon elektroforeze DNK je vizualizovana na UV transiluminatoru na talasnoj dužini od 266 nm. Kao standard za određivanje dužina umnoženih fragmenata DNK korišćen je 1kb Gene ruler (Thermo Scientific).

3.3.5. Prečišćavanje fragmenata DNK sa gela od agaroze

Nakon elektroforeze fragmenti DNK isečeni su sa gela i prečišćeni upotrebom kita za ekstrakciju DNK iz gela (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific) prema uputstvu proizvođača. U tube sa isečcima gela dodavan je pufer za vezivanje za kolonicu (w:v=1:1) i tube su inkubirane 10 min na 60°C uz povremeno mešanje. Uzorak je zatim prebačen u GeneJET kolonice za prečišćavanje i centrifugiran 1min. Eluat je odbačen, a kolonice isprane sa 700 µl pufera za ispiranje, centrifugirane 1 min, uz odbacivanje eluata. Dodatnim centrifugiranjem kolonice pod istim uslovima eliminisani su tragovi etanola koji bi mogli da inhibiraju enzimske reakcije na fragmentima DNK ekstrahovanim sa gela. DNK je zatim eluirana sa kolonice u 50 µl elucionog pufera.

3.3.6. Digestija DNK restrikcionim enzimima

Provera plazmida za inserte očekivanih dužina podrazumevala je parcijalne endonukleazne restrikcione digestije (za pJET plazmidni vektor dvostruku digestiju upotrebom restrikcionih enzima *HindIII* i *XhoI*). Digestije su postavljene prema uputstvu proizvođača 3h na 37°C i zaustavljene inkubacijom na 65°C.

Restrikcionih fragmenti su razdvojeni elektroforezom na 1% agaroznom gelu sa etidijum bromidom u TAE puferu i vizualizovani pod UV svetlom. Plazmidi za koje je potvrđeno da sadrže insert DNK očekivane veličine korišćeni su za sekvenciranje.

3.3.7. Ligacija DNK sa plazmidnim vektorima

Prečišćeni DNK fragmenti su pripremljeni za ligaciju tako što su prvo tretirani enzimom za poravnanje krajeva fragmenta. Smeša je sadržala: 1 X pufera, 1 µl DNK enzima za poravnanje krajeva inserta, 1µl eluata i sterilne vode do 17 µl. Sastojci su kratko promešani, preneti na 70°C u trajanju od 5 min i zatim prebačeni na led. U smešu za ligaciju dodati su 1µl vektora i 1µl T4 DNK ligaze i smeša je inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi. Sve komponente smeše za ligaciju sadržane su u kitu za kloniranje (CloneJet PCR Cloning kit, Fermentas).

3.3.8. Sekvenciranje DNK

Kapilarno sekvenciranje transformisanih plazmida urađeno je pomoću para pJET 1.2 prajmera za pJET plazmidni vektor na ABI3730XL DNK analizatoru (Applied Biosystems) od strane kompanije "Macrogen" (<http://www.macrogen.com>).

3.3.9. Kompjuterska analiza sekvenci

Nukleotidne sekvence umnoženih segmenata heljdine DNK prečišćene su od kontaminacije vektorskom sekvencom upotrebom programa "Vecscreen", koji identifikuje nizove nukleotida visoko sličnih sekvenci plazmidnog vektora koji je upotrebljen za kloniranje segmenta DNK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>).

Pomoću programa "ORF Finder" i "GENESCAN" sekvence su analizirane za prisustvo otvorenih okvira čitanja i egzon-intron struktura, respektivno. Sekvence su ispitivane i za prisustvo repetitivnih elemenata ("REPFIND") i različitih DNK motiva ("MelinaII"), a određen je i procentualni udeo dezoksiguanozina i dezoksicitozina (GC% sadržaj) sekvenci upotrebom programa za GC% izračunavanje dostupnog na Internetu (<http://www.molbiol-tools.ca/>). Predviđena je i aminokiselinska sekvenca koju parcijalne nukleotidne sekvence kodiraju (automatska funkcija programa "ORF Finder" i "GENESCAN" ili "ExPASy").

Upotrebom "BLASTN" i "BLASTP" programa pretraživane su nukleotidne i aminokiselinske sekvence prijavljene u bazama podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.4. Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK

3.4.1. Umnožavanje homologa AI gena homomorfnih AI sistema *Brassicaceae*

Izrođeni prajmeri dizajnirani su na osnovu evolutivno očuvanih regiona *SRK*, *SLG*, *SP11* i *MLPK* sekvenci *Brassica rapa*, dostupnih u DNK bazama podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvence prajmera i njihove optimalne temperature sparivanja date su u **Tabeli 2**.

Smeša za reakciju lančanog umnožavanja sadržala je: 1X pufer; 2 µl rastvora Q; 1mM MgCl₂; 0.2 mM smeše dezoksiribonukleotida; 0.25 µM svakog prajmera; 0.5 jedinica Taq polimeraze; 100 ng genomske DNK heljde (kit Taq DNK polimeraza, Qiagen).

Uslovi lančanog umnožavanja za AI gene *Brassica* bili su sledeći:

1. Inicijalna denaturacija DNK na 94°C u trajanju od 2 min;
2. 34 ponavljanja ciklusa: denaturacija DNK na 94°C u trajanju od 1 min; T sparivanja u trajanju od 1 min, polimerizacija na 72°C u trajanju od 1 min;
3. Finalna elongacija produkta umnožavanja na 72°C u trajanju od 10 min.

3.4.2. Umnožavanje homologa AI gena homomorfnih gametofitnih AI sistema *Prunus* (Rosaceae)

Ispitivanje prisustva homologa *S-RNaza* i *SFB* gena roda *Prunus* sprovedeno je upotrebom specifičnih prajmera za ove gene (Sonneveld i sar., 2003; Ortega i sar., 2005; Vaughan i sar., 2006). Sekvence prajmera, kao i temperature sparivanja date su u **Tabeli 2**. Smeša za reakciju lančanog umnožavanja bila je ista kao za umnožavanje homologa AI gena *Brassica*.

Uslovi lančanog umnožavanja za *S-RNazi* gen bili su sledeći:

1. Inicijalna denaturacija DNK na 94°C u trajanju od 2 min;
2. 34 ponavljanja ciklusa: denaturacija DNK na 94°C u trajanju od 1 min; T sparivanja u trajanju od 2 min, polimerizacija na 68°C u trajanju od 4 min;
3. Finalna elongacija produkta umnožavanja na 68°C u trajanju od 10 min.

Uslovi lančanog umnožavanja za *SFB* gen bili su sledeći:

1. Inicijalna denaturacija DNK na 94°C u trajanju od 2 min;
2. 29 ponavljanja ciklusa: denaturacija DNK na 94°C u trajanju od 45 sec; T sparivanja u trajanju od 1 min, polimerizacija na 68°C u trajanju od 3 min;
3. Finalna elongacija produkta umnožavanja na 68°C u trajanju od 10 min.

Produkti umnožavanja su razdvojeni elektroforezom na 2% agaroznom gelu u TAE puferu (0,04M Tris-acetat, 1 mM EDTA), obojeni etidijum bromidom i vizualizovani pod UV svetlom (Biodoc Analyze, Biometra).

Tabela 2. Nukleotidne sekvence prajmera specifičnih za AI gene rodova *Brassica* (Brassicaceae) i *Prunus* (Rosaceae) i njihove optimalne temperature sparivanja, koji su korišćeni za ispitivanje prisustva homologa ovih gena u genomu heljde reakcijom polimeraznog lančanog umnožavanja.

Prajmer	Sekvenca prajmera	T (°C)
SRK_f	5'-TCITT(C/T)GA(C/T)TA(C/T)CCICANGA(C/T)-3'	62
SRK_r	5'-CATICC(A/G)AA(A/G)TCIG(A/T)DAT(C/T)TTN-3'	62
SLG_f	5'-GG(A/T)GATGT(C/T)TT(C/T)GA(A/G)(C/T)TNGG-3'	63
SLG_r	5'-(A/G)AAICC(C/T)TG(A/G/T)AT(A/G)CA(A/G)TT(A/G)CA-3'	63
SP11_f	5'-TAACTAA(A/G)AT(A/C/T)CA(C/T)TA(C/T)(C/T)TNTG-3'	62
SP11_r	5'-TAIGA(C/T)TTIAC(C/T)TT(A/G)CA(A/G)CA(A/G)TA(A/G)C-3'	62
MLPK_f	5'-T(A/T)(C/T)AA(A/G)GG(A/G/T)TGGAT(C/G/T)GATG-3'	52.6
MLPK_r	5'-GT(A/G)GA(A/C/T)AC(A/G)TG(A/G)CT(A/C/T)TT(A/C/G)TC(A/G)CC-3'	52.6
S-RNaza_f	5'-(C/A)CTTGTTCTTG(C/G)TTT(T/C)GCTTTCTTC-3'	50
S-RNaza_r	5'-CAAAATACCACTTCATGTAACA(A/G)C-3'	50
SFB_f	5'-(C/T)GACATCCTAG(C/T)AAGACT(A/G/T)(A/C)C(A/T)G-3'	51
SFB_r	5'-AC(C/T)TG(C/T)TT(A/G)GATTC(A/G)TAAT(C/T)(A/C)C(A/C)CAA-3'	51

3.4.3. Umnožavanje segmenata genomske DNK heljde blisko vezanih sa S-lokusom

Smeša za reakciju lančanog umnožavanja sadržala je: 1X pufer; 1 mM MgCl₂; 0.2 mM svakog dezoksiribonukleotida; 0.25 µM svakog prajmera; 0.5 jedinica Taq polimeraze; 100 ng genomske DNK heljde (Taq DNK polimeraza, Fermentas).

Prajmeri koji su upotrebljeni za umnožavanje kraćih fragmenata genomske DNK u neposrednoj blizini *S*-lokusa heljde razvijeni su iz N_7 AFLP markera, blisko vezanog S^h alelu heljde (Nagano *i sar.*, 2001). Nukleotidne sekvence prajmera navedene su u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Nukleotidne sekvence specifičnih (N_7F_1 , N_7F_2 , N_7F_3 , N_7R_1 , N_7R_2 , N_7R_3 i N_7 - $Eco+710$) i arbitrarnih prajmera (AD_1 , AD_2 i AD_3) za fino mapiranje *S*-lokusa razvijene iz N_7 -AFLP markera, koji je blisko vezan S^h alelu *S*-lokusa heljde (Nagano *i sar.*, 2001).

Prajmer	Sekvenca
N_7F_1	5'-G A A A T C A C C C A T G G A G T A A G T G -3'
N_7F_2	5'-(G/C) A C C C A T G G A G T A A G T G T T T C C -3'
N_7F_3	5'-G G A G A C C A T G C G C T C T A C A A -3'
N_7R_1	5'-G C C A A A C A T C T C G C G T A C C A G -3'
N_7R_2	5'-T C G C G T A C C A G A G G G T G T G C -3'
N_7R_3	5'-C C T T T G T G A A T G A G G T A C C C A C -3'
AD_1	5'-N G T C G A (G/C) (A/T) G A N A (A/T) G A A -3'
AD_2	5'-G T N C G A (G/C) (A/T) C A N A (A/T) G T T -3'
AD_3	5'-(A/T) G T G N A G (A/T) A N C A N A G A -3'
N_7 - $Eco+710$	5'-C A C G C A A C C A G G T G A A C C T A C C -3'

Za umnožavanje nepoznatih sekvenci bliskih *S*-lokusu korišćena je reakcija termalnog asimetričnog lančanog umnožavanja, zasnovana na principu upotrebe jednog specifičnog i jednog kraćeg izrođenog arbitrarnog prajmera, u kojoj je relativna efikasnost umnožavanja specifičnih i nespecifičnih produkata temperaturno kontrolisana naizmeničnim smenjivanjem strožijih i manje strogih ciklusa umnožavanja. Uslovi reakcije, adaptirani iz Liu *i Whittier* (1995), navedeni su u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Uslovi reakcije termalnog asimetričnog polimeraznog lančanog umnožavanja i sekvenciranje produkata umnožavanja su adaptirani iz *Liu i Whittier (1995)*.

Redni broj ciklusa	Broj ponavljanja	Uslovi reakcije asimetričnog lančanog umnožavanja
1	1	92°C (2 min), 95°C (1 min)
2	5	94°C (15 sek), 63 °C (1 min), 72°C (2 min)
3	1	94°C (15 sek), 30 °C (3 min), 72°C (2 min)
4	10	94°C (5 sek), 44 °C (1 min), 72°C (2 min)
5	12	94°C (5 sek), 63 °C (1 min), 72°C (2 min) 94°C (5 sek), 63 °C (1 min), 72°C (2 min) 94°C (5 sek), 44 °C (1 min), 72°C (2 min)
6	1	72°C (5 min)

3.5. Osnovne procedure rada na fluorescentnom mikroskopu

3.5.1. *Tretman tučkova inhibitorom protein kinaza C*

Izolovani tučkovi iz oba morfa cvetova heljde ostavljeni su 24h na podlogama za germinaciju polena (*Brewbacker i Kwack, 1963*), u koje je dodato 100 μ M i 200 μ M inhibitora protein kinaza C (PKC) ili su bile bez inhibitora (kontrolne polinacije). Nakon isteka 24h tučkovi su uzeti sa podloga, inkompatibilno i kompatibilno oprašivani i ostavljeni još 24h na podlogama istog sastava bez inhibitora. Nakon toga tučkovi su uklonjeni sa podloge i pripremljeni za mikroskopiranje.

3.5.2. *Priprema preparata za fluorescentno mikroskopiranje*

Priprema preparata za mikroskopiranje podrazumevala je fiksiranje tučkova u 25% sirćetnoj kiselini u etanolu u periodu od 48h, nakon čega su ispirani vodom i ostavljeni u

7N NaOH naredna 24h. Sutradan su prvo ispirani u vodi i 50 mM kalijum fosfatnom puferu, a zatim preneti u rastvor anilin plave boje u kom su ostavljeni narednih 48h. Nakon toga, tučkovi su preneti na mikroskopske pločice, uz kap anilin plave boje, prekriveni pokrovnim staklom i ostavljeni 24h pre mikroskopiranja na 4°C. Za posmatranje pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, CytoVision 3.1) korišćen je filter za anilin plavo.

3.6. Osnovne procedure rada sa proteinima

3.6.1. Priprema proteinskih izolata

Postupak izolacije proteina podrazumevao je prvo mehaničko usitnjavanje tkiva polena/tučkova u plastičnim tubama uz dodavanje tečnog azota. U tube je dodat Lemlijev pufer (285 mM Tris, 20% glicerol, 1% Triton X-100) i mala količina polivinilpolipirrolidona (PVPP) i nastavljeno je sa mehaničkim usitnjavanjem sve dok uzorci nisu bili homogenizovani. Nakon toga uzorci su centrifugirani 45 min u hladnoj centrifugi na 4°C 13,000 obrt/min (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Posle centrifugiranja tečna faza koja je sadržala ukupne proteine polena/tučkova prebačena je u nove tube, a talog je odbačen.

3.6.2. Precipitacija proteina TCA/acetonom

U proteinske izolate dodavano je 10% trihlorsirćetne kiseline u acetonu i tube su ostavljene na -20°C preko noći. Sutradan nakon centrifugiranja 1h u hladnoj centrifugi na 4°C 13,000 obrtaja tečna faza je odbačena, a talog ispiran acetonom dva puta (1h na -20°C i centrifugiranje 1h u hladnoj centrifugi na 4°C 13,000 obrtaja). Posle ispiranja acetonom talog je osušen 10 min u rotavaporu (Concentrator 5301, Eppendorf), a zatim rastvoren u puferu za izoelektrično fokusiranje (IEF pufer) (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 40 mM DTT) i ostavljen 2h na sobnoj temperaturi da se potpuno resolubilizuje, uz kratko

povremeno mešanje. Koncentracija proteina u svakoj od klasa uzoraka određena je kolorimetrijskom metodom prema *Bradford* (1976).

3.6.3. Jednodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Proteinski izolati vizuelizovani su SDS-PAGE metodom u diskontinuiranom sistemu gelova (modifikacija metode *Laemmli*, 1970). Proteinski uzorci su pripremljeni za elektroforezu tako što su rastvoreni u puferu za uzorak (125mM Tris, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,025% bromfenol plavo; 4% β -merkaptotanol) i kuvani 3 min na 100°C.

Gel za koncentrovanje sadržavao je 125mM Tris, pH 6,8; 0,1% SDS; 12% akrilamid (akrilamid:bisakrilamid=29:1). Gel za razdvajanje sadržavao je 375mM Tris, pH 8,8; 0,1% SDS; 5% akrilamid. Kao inicijator polimerizacije dodavan je 10% amonijum persulfat. Dimenzije gela bile su 8x5cm, a debljina 1 mm.

Elektroforeza je vršena u TGB puferu (25mM Tris, 250mM glicin, 0.1% SDS) pri konstantnoj struji od 25 mA u sistemu za vertikalnu elektroforezu Biometra tip G42.

Po završenoj elektroforezi gelovi su bojani srebrom upotrebom kita Plus One Silver Staining (GE Healthcare) prema uputstvu proizvođača.

3.6.4. Dvodimenzionalna poliakrilamidna gel elektroforeza (2D-PAGE)

Protokol za 2D-PAGE bio je sledeći:

Rehidracija gel-stripa pasivnom difuzijom uzorka u gel je urađena tako što je gel-strip inkubiran sa uzorkom na sobnoj temperaturi preko noći. Uzorak za rehidraciju sadržao je 20 μ g proteina u ukupnoj zapremini od 200 μ l IEF pufera, a uzorku su

neposredno pre rehidratacije dodati amfoliti (0.25%) i 1 μ l 0.1% brom fenol plavo. U posudu za rehidrataciju prvo je nanet uzorak, onda je preko njega spušten gel-strip tako da bude celom površinom u kontaktu sa uzorkom i na kraju je gel-strip prekriven tankim slojem mineralnog ulja.

Razdvajanje proteina po izoelektričnim tačkama izvedeno je u aparatu IPGphor 3 (GE Healthcare) na gel-stripovima dužine 11 cm (pH 3-10) (GE Healthcare) u programu za izoelektrično fokusiranje (IEF) proteina: 500 V u trajanju od 500 Vh; 1,000 V u trajanju od 800 Vh (gradijent napona); 6000 V u trajanju od 7,000 Vh (gradijent napona) i finalno fokusiranje proteina na 6000 V u trajanju od 2,200 Vh.

Nakon izoelektričnog fokusiranja, gel-stripovi su prebacivani prvo u pufer za redukciju uzorka (6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 0.05 M Tris pH 8.8, 15 mM DTT), a zatim u pufer za alkilaciju uzorka (6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 0.05 M Tris pH 8.8, 250 mg IAA) i ispirani u svakom od pufera po 15 min, uz neprekidnu rotaciju uzoraka na vertikalnom rotatoru.

Nakon ekvibracije gel-stripova u puferima za redukciju i alkilaciju uzorka, gel-stripovi su postavljeni na 12% SDS poliakrilamidne gelove tako da čitavom svojom dužom ivicom budu u kontaktu sa gelom. Da bi se osiguralo da se gel-stripovi ne pomeraju tokom elektroforeze, zatopljeni su u 1% agaroznom puferu (50 mM Tris, pH 6,8; 0.1% SDS; 0.01% brom-fenol plavo). Razdvajanje proteina prema molekularnoj masi (SDS-PAGE) radeno je u TGB puferu na 150 V, 25 mA u sistemu za vertikalnu elektroforezu SE 600 (Amersham Biosciences).

Nakon završetka elektroforeze gelovi su bojani srebrom pomoću odgovarajućeg kita (Plus One Silver Staining kit, GE Healthcare) i posle bojenja su skenirani.

3.6.5. Kompjuterska analiza 2D-PAGE proteinskih profila

Fotografije srebrom obojenih skeniranih 2D-gelova (tiff format, rezolucija 300 dpi) analizirane su u programu Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). Prvo su identifikovani individualni proteini na svim gelovima, prema sledećim zadatim parametrima: 2 za parametar glatkosti, 2 za parametar ispupčenja i 5 za parametar minimalne površine. Zatim su triplicati gelova unutar svake klase uzorka međusobno upoređivani (uz obeležavanje po dva do tri zajednička proteina, kao tačaka oslonca za poređenje gelova), nakon čega je izabran najreprezentativniji tj. najinformativniji gel (koji je sadržavao sve odlike date grupe uzorka) koji je predstavljao datu klasu uzorka u međusobnom poređenju između klasa.

Poređenje klasa uzoraka takođe je uključivalo obeležavanje dva do tri zajednička proteina u klasama koje su upoređivane, koji su predstavljali tačke oslonca na osnovu kojih program može da sprovede automatsko poređenje gelova. Iz izveštaja koji su automatski kreirani za svaki gel ponaosob, kao i za svako poređenje unutar i između klasa, može se steći uvid u stepen sličnosti, odnosno različitosti 2D-profila uzoraka dve klase. Na ovaj način moguće je detektovati proteine specifične za određenu klasu uzorka, čak i kad su prisutni u relativno maloj količini.

Određivanje pI vrednosti u odsustvu pI markera rađeno je pomoću lenjira, tako što je izmerena udaljenost položaja detektovanog proteina od ivica gela i onda preračunata njegova pI na osnovu grafikona linearnog gradijenta pH vrednost u gel-stripovima od 11 cm.

Određivanje molekulskih masa urađeno je direktnim upoređivanjem položaja detektovanog proteina na 2D-gelu u odnosu na položaje proteina poznatih masa, sadržanih u proteinskom markeru Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje prisustva gena homolognih AI genima drugih biljnih vrsta u genomu heljde

U genomskoj DNK heljde je metodom lančanog umnožavanja upotrebom genspecifičnih prajmera za *SRK*, *SLG*, *SP11* i *MLPK* gene roda *Brassica*, kao i prajmera specifičnih za *S-RNaze* i *SFB* gene roda *Prunus*, ispitivano prisustvo njihovih homologa.

Rezultati lančanog umnožavanja DNK upotrebom izrođenih prajmera specifičnih za AI gene roda *Prunus* pokazali su da heljda ne sadrži homologe *S-RNaznih* i *SFB* gena.

Rezultati lančanog umnožavanja DNK upotrebom izrođenih prajmera specifičnih za AI gene roda *Brassica* pokazali su da heljda ne sadrži homologe *SRK*, *SLG* i *SP11* gena, ali da sadrži homolog *MLPKf2* gena kupusa, koji je nazvan *MLPKFe*. Umnoženi fragment imao je 728 nukleotida (prijavljen u DNK bazu podataka pod identifikacionim brojem FJ858190) i sadržao je 4 egzona, koji su odgovarali kinaznom regionu *MLPK* gena.

Izvedena *MLPKFe* aminokiselinska sekvenca pokazala je visoku homologiju sa protein kinazama drugih biljnih vrsta, krećući se od 81% u *Trifolium pratense* do 89% u *Populus trichocarpa*. Takođe, sekvenca je pokazala 80% sličnosti sa *MLPKf2* sekvencom *Brassica rapa* (AB121973) i *APK1A Arabidopsis thaliana* (AT1G07570) (**Slika 3**).

```

*      20      *      40      *      60      *      80
MLPKFe : ----- : -
APK1A  : -----MGICLSAQVKAESSGASTKYDAKDIGSLGSKASSVSVRPSRTEGEILQSPNLKSFSAELKSATRN : 67
MLPKBr : MGFVKKVQSKVFLYVNYLPGVCIGASPKYMSS-----EANDTQSMGSKCSSVSVRTPRTEGEILQSPNLKCFSAELKAATRN : 79

*      100     *      120     *      140     *      160     *
MLPKFe : -----FKGWMDEKSLAPTRPCTGMVIAVKRLNQEGLQGHKEWLAETNYLQQLHHPNLVVKLIGYCLEDEHRLLYVE : 70
APK1A  : FRPDSVLGEGGFGCVFKGWIIDKSLTASRPCTGLVIAVKRLNQDGGQGHQEWLAETNYLQQLHHPNLVVKLIGYCLEDEHRLLYVE : 152
MLPKBr : FRPDSVLGEGGFGCVFKGWIIDKSLTASRPCTGMVIAVKRLNTEGQGHQEWLAETNYLQQLHHPNLVVKLIGYCLEDEHRLLYVE : 164
      FKGW DE SL      PCTG VIAVK LN  G  QGH EWLAE NYLG  H  LVKLIQYCLEDEH LLYVE

      180     *      200     *      220     *      240     *
MLPKFe : FMPRGSMNDNHLFRSSSHFQPLSWAVRMKVALGSAAGLAF LHSDEARVVIYRDFKTSNILLDINYNAKLSDFGLARDGPTGDNSSHVS : 155
APK1A  : FMPRGSLNHLFRRLGLYFQPLSWKLRLLKVALGAAKGLAF LHSSETRVVIYRDFKTSNILLDSEYNAKLSDFGLAKDGIIDKSHVS : 237
MLPKBr : FMECGSLNHLFRRLGSYFQPLSNIRLRLKVALGCAKGLAF LHSSETQVIYRDFKTSNILLDSNYNAKLSDFGLAKDGTGDNSSHVS : 249
      FMP GS  NHLFRR  F  PLSW  R  K  ALG  A  GLAF LHS  E  VIYRDFKTSNILLD  YNAKLSDFGLA  DGP  GD  SHVS

      260     *      280     *      300     *      320     *      340
MLPKFe : T----- : 156
APK1A  : TRVMGTHGYAAPEYLATGHLTTKSDVYSPGVVLELLSGRRRAVDKNRPSGERNLVEWAKPYLVNKRKIFRVIDNRIRQDQYSMEEA : 322
MLPKBr : TRVIGTYGYVDPGYLLNGHLTTKSDVYSGVVLEMLSGRKVVDNRRPPREQKLVDWAKPLLANKKKVSRVIDNRIRDQISVKEA : 334
      T

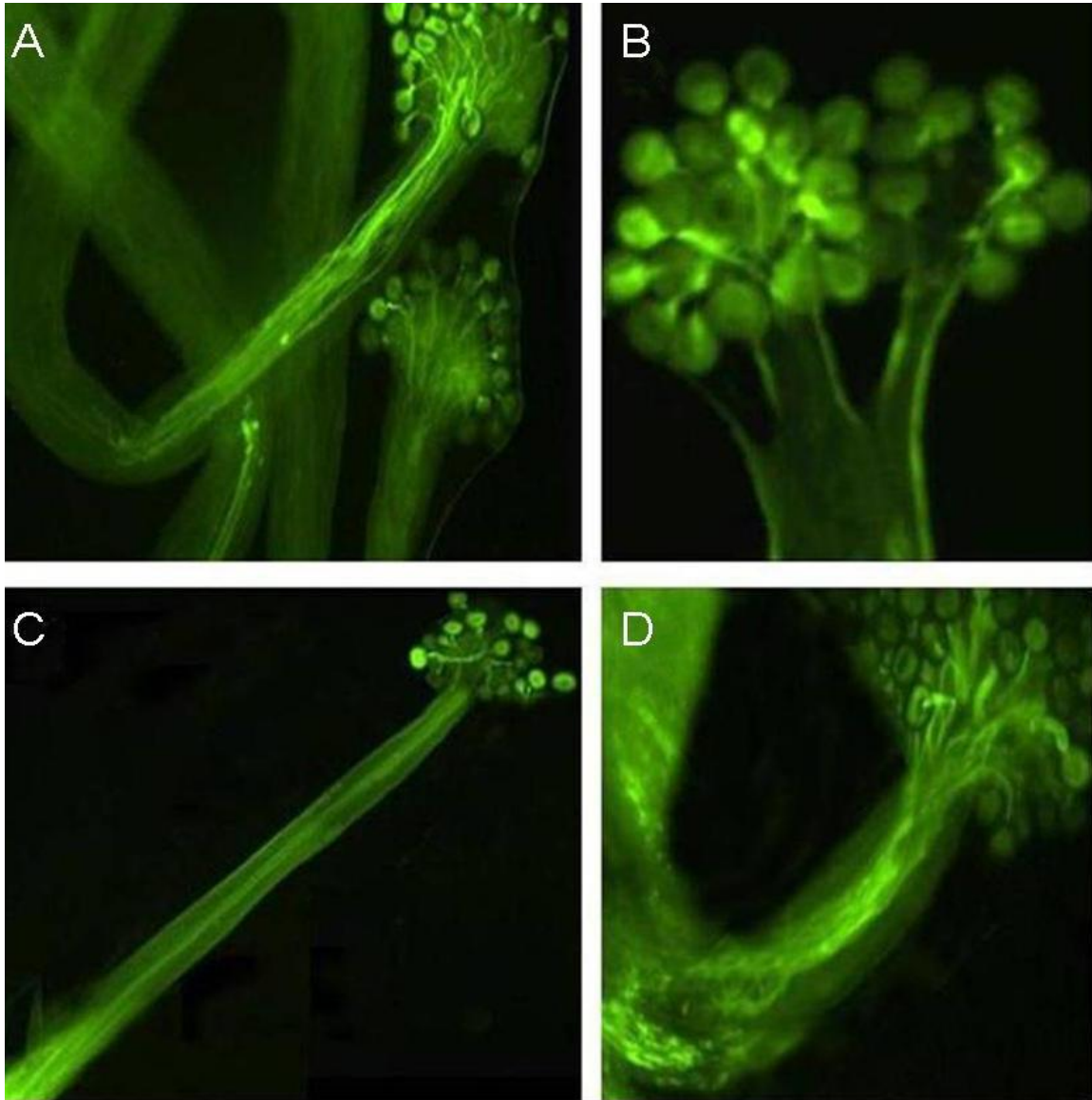
*      360     *      380     *      400     *      420
MLPKFe : ----- : -
APK1A  : CKVATLSLRCLTTEIKLRPNMSEVVSHLEHIQSLNAAIGGNMDKTRRRRRRSDSVVSKKVNAGFARQTAVGSTVAVYPRPSASP : 407
MLPKBr : HKVATQVFRCLDVKRQRPNMNEIVFHLENIQA-SREEGGN--KTEKRRRRRSDS-----FAQQTGVGGIATAYPRPSASP : 407

```

Slika 3. Poravnanje aminokiselinskih sekvenci koje su izvedene iz nukleotidnih sekvenci *MLPK* homologa kod heljde (*MLPKFe*), arabidopsisa (*APK1A*) i kupusa (*MLPKBr*). Zatamnjeni regioni predstavljaju segmente aminokiselinskih *MLPK* sekvenci koji su potpuno identični između tri vrste.

4.2. Ispitivanje učestvovanja protein kinaza C u AI odgovoru heljde

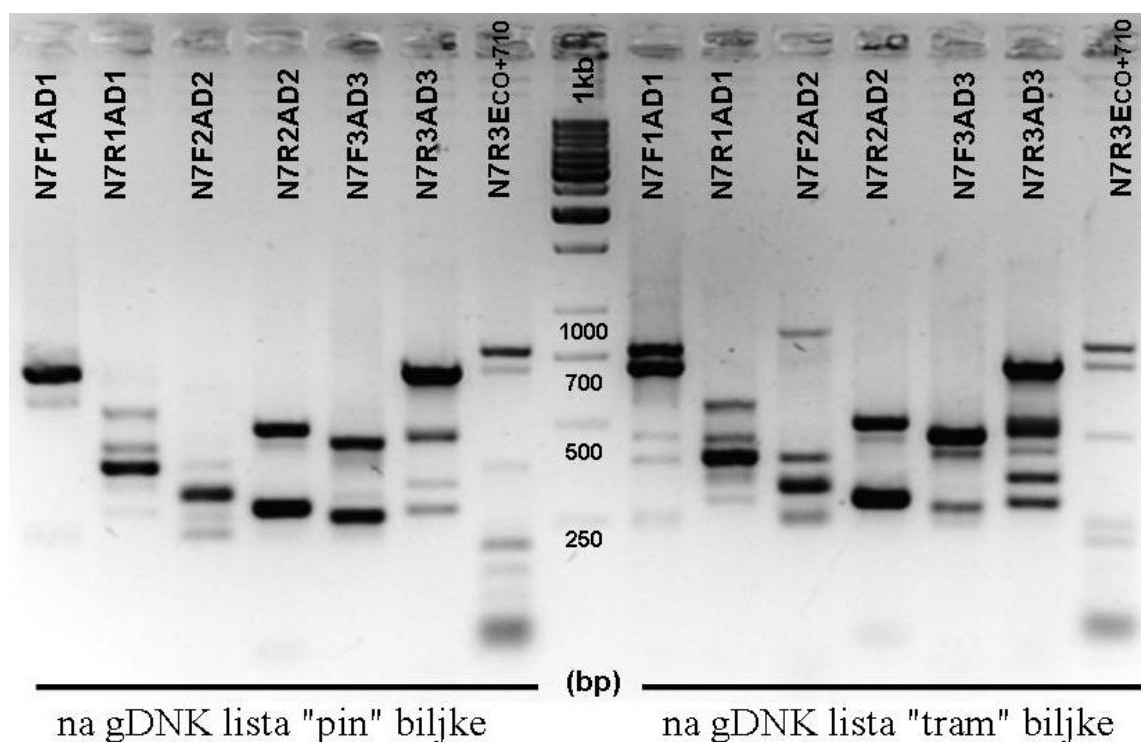
Vizuelizacijom rasta polenovih cevi pod fluorescentnim mikroskopom, nakon kompatibilnih i auto-inkompatibilnih polinacija netretiranih i inhibitorom miristilovanih protein kinaza C tretiranih "pin" i "tram" tučkova, ustanovljeno je da tretman PKC inhibitorom nije ni u jednoj od primenjenih koncentracija na bilo kakav vidljiv način uticao na rast polenovih tuba u inkompatibilnim ili kompatibilnim polinacijama (**Slika 4**).



Slika 4. Rast polenovih cevi posmatran pod fluorescentnim mikroskopom 24 h nakon polinacija tučkova koji su pre polinacija tretirani inhibitorom miristolovanih protein kinaza C: **A**, auto-inkompatibilno oprašen "pin" tučak; **B**, auto-inkompatibilno oprašen "tram" tučak; **C**, kompatibilno oprašen "pin" tučak; **D**, kompatibilno oprašen "tram" tučak.

4.3. Umnožavanje i sekvenciranje segmenta genomske DNK u neposrednoj blizini *S*-lokusa heljde i analiza sekvenci

U asimetričnoj lančanoj reakciji umnožavanja upotrebom prajmera koji su specifični i poluspecifični za DNK sekvencu u neposrednoj blizini heljdinog *S*-lokusa, na genomskoj DNK heljde iz listova "pin" i "tram" biljaka kao matrici, umnoženo je jedan ili više produkata po paru prajmera, od kojih je 14 sekvencirano (**Slika 5**). Dobijene sekvence su navedene u **Prilogu A**.



Slika 5. Produkti umnožavanja segmenta genomske DNK "pin" i "tram" biljaka heljde u neposrednoj blizini *S*-lokusa razdvojeni na 1.5% agaroznom gelu (prajmeri dati u **Tabeli 3**).

Dužina sekvenciranih produkata kretala se u opsegu od 255 do 875 baznih parova DNK, a njihov GC sadržaj kretao se između 35% i 44.7% (u proseku je iznosio 40.24%). Osim toga, sekvence su pokazivale prisustvo repetitivnih elemenata. Upoređivanje dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u nukleotidnim bazama podataka upotrebom "BLASTN" programa za pretragu nije otkrilo sličnost ni sa jednom od sekvenci prijavljenim u NCBI bazi podataka do danas.

Međusobno poređenje sekvenci "pin" i "tram" klasa, otkrilo je da se najveći broj sekvenci unutar jedne klase, kao i između dve klase, ne preklapaju međusobno. Jedino se sekvenca dobijena pomoću N₇R₁ i AD₁ seta prajmera pokazala kao identična između dva morfa (99% sličnosti sekvence P₂₁₂ i T₂₂; sekvence su date u **Prilogu A**). U pitanju je kratka sekvenca od 255 baznih parova, čija egzon-intron struktura ukazuje na mogućnost kodiranja proteina sličnog LRR receptoru-nalik serin/treonin protein kinazi GSO2 ili histon-acetil transferazi HAC2 *Arabidopsis thaliana*.

Analiza preostalih 13 sekvenci u programima koji identifikuju otvorene okvire čitanja i prisustvo egzon-intron struktura pokazala je sledeće rezultate: za tri sekvence (P₁₃₄, P₃₃₃ i P₅₃₃) nisu pronađene egzon-intron strukture ni otvoreni okvir čitanja, dok je za 9 sekvenci uočen određen stepen homologije sa sekvencama proteina koji imaju prepoznatljive strukture i uloge poput regulacije transkripcije, fosforilacije proteina, modifikacije hromatina, remodelovanja citoskeleta, itd. Rezultati kompjuterske analize sekvenci sumirani su u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Prikaz rezultata analize genomskih sekvenci "pin" i "tram" biljaka heljde, dobijenih pomoću prajmera izvedenih iz AFLP N₇ markera blisko vezanog S^h alelu S-lokus heljde, u programima "ORF Finder", "GENESCAN" i "BLASTP" (nazivi potencijalnih homologa i biljne vrsta kojoj pripadaju, oznaka homologne sekvence u proteinskoj bazi podataka i % homologije izražen prema ukupnom % preklapanja dve sekvence).

Heljda	Homologna sekvenca i biljna vrsta kojoj pripada	ID sekvence u NCBI bazi podataka	% homologije od % preklapanja sekvenci
P ₁₁	acil-koenzim A sintetaza 5 iz <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176482.1	48% od 81%
P ₁₂₅	protein sa PWWP domenom iz <i>A.lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002873347.1	31% od 89%
P ₂₁₂	LRR receptor-nalik serin/treonin kinaza GSO2 iz <i>A.thaliana</i>	NP_199283.1	34% od 68%
P ₄₃	hipotetički protein ARALYDRAFT_480018 iz <i>A.lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002883574.1	48% od 61%
P ₂₁	Superfamilija proteina nalik homeodomenu iz <i>A.thaliana</i>	NP_175020.1	30% od 66%
	Predviđeni protein <i>A.lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002875362.1	38% od 91%
	TIR-NBS-LRR klasa proteina za rezistenciju na bolesti iz <i>A.thaliana</i>	NP_176571.1	33% od 87%
	ATCHX1 iz <i>Arabidopsis lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002892905.1	40% od 61%
	fitohrom C iz <i>A.thaliana</i>	NP_198433.1	25% od 93%
T ₁₁	hipotetički protein ARALYDRAFT_897410 iz <i>A.lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002871878.1	26% od 82%
	Protein 2 koji se vezuje za oštećenu DNK iz <i>A.thaliana</i>	NP_200684.2	37% od 52%
T ₂₂	histon acetil transferaza HAS2 iz <i>A.thaliana</i>	NP_564891.4	34% od 78%
T ₃₁	WRKY DNK-vezujući protein 40 iz <i>A.lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002889272.1	40% od 81%

Tabela 5. Prikaz rezultata analize genomskih sekvenci "pin" i "tram" biljaka heljde, dobijenih pomoću prajmera izvedenih iz AFLP N₇ markera blisko vezanog S^h alelu S-lokus heljde, u programima "ORF Finder", "GENESCAN" i "BLASTP" (nazivi potencijalnih homologa i biljne vrsta kojoj pripadaju, oznaka homologne sekvence u proteinskoj bazi podataka i % homologije izražen prema ukupnom % preklapanja dve sekvence).

Heljda	Homologna sekvenca i biljna vrsta kojoj pripada	ID sekvence u NCBI bazi podataka	% homologije od % preklapanja sekvenci
T ₃₁	Protein iz familije kinaza iz <i>A. lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002889521.1	29% od 95%
	Tirozin kinaza sa PB1 domenom iz <i>A. thaliana</i>	NP_171964.1	29% od 95%
	Protein trasducinske familije sa WD40 iz <i>A. lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i> i <i>A. thaliana</i> ssp. <i>thaliana</i>	XP_002869159.1= NP_195154.2	36% od 85%
T ₄₄	protein 713 asociran sa membranom vezikula iz <i>A.thaliana</i>	NP_196676.1	30% od 97%
	UDP-glukoziltransferaza 91B1 iz <i>A.thaliana</i>	NP_201358.1	37% od 86%
	kinazna familija iz <i>A.lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002876502.1	32% od 73%
T ₃₁₃	NRT1.1 iz <i>Arabidopsis lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002889915.1	27% od 72%
	Protein iz familije transducina iz <i>A. lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i> = Protein koji sadrži WD40 domen iz <i>A.thaliana</i>	XP_002869159.1= NP_195154.2	36% od 85%
T ₅₅	Vakuolarni sortirajući protein 39 iz <i>A. haliana</i>	NP_173699.5	39% od 76%
	Nitratni transporter iz <i>A.lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002885459.1	38% od 91%
	CESA10 iz <i>A.lyrata</i> ssp. <i>lyrata</i>	XP_002880684.1	47% od 61%

4.4. 2D-PAGE razdvajanje ukupnih proteina polena i tučkova heljde

Ukupni proteinski izolati "pin" i "tram" polena, kao i neoprašenih, kompatibilno i inkompatibilno oprušenih "pin" i "tram" tučkova heljde, razdvojeni su prema izoelektričnim tačkama i molekulskim masama upotrebom 2D-PAGE. Proteinski 2D-profilu otkrili su prisustvo više od 200 visoko reproducibilnih proteina u svakom od izolata. Regioni gelova, u kojima je rezolucija razdvajanja bila manjeg kvaliteta i onemogućavala pouzdanu detekciju individualnih proteina (pH 3-5.5; 55-110 kDa), bili su izuzeti iz analize u svim uzorcima.

U proteomima svih uzoraka preovlađivali su kiseli i neutralni proteini (pH 3.5-7), praćeni manjim brojem baznih proteina (pH 7.5-9). Proteini su bili raspoređeni u širokom opsegu molekulskih masa (10-130 kDa) (**Slika 6**). Sastav proteina u neoprašenim tučkovima/polenu oba morfa, kao i u inkompatibilno i kompatibilno oprušenim tučkovima oba morfa, bio je u visokom stepenu sličan, ali u svakom uzorku detektovani su i proteini specifični za dati uzorak (između tri i 15 proteina po gelu, obeleženi crvenim kvadratima, **Slika 6**). Opšte karakteristike oko 100 proteina (pI, molekulska masa i udeo u ukupnoj zapremini proteina detektovanih na gelu), koji su detektovani kao specifični za određeni uzorak ili grupu uzoraka, navedene su u **Prilogu B**. Oni su detektovani kao različiti među ukupno najmanje 2000 proteina, koliko je detektovano u svim uzorcima zajedno, što govori u prilog tome da proteini specifični za uzorak/grupu uzoraka predstavljaju najmanje 5% ukupno detektovanih proteina.

Upoređivanjem 2D-profila "pin" i "tram" uzoraka uočeno je da su se izolati neoprašenih "pin" i "tram" tučkova razlikovali u minimum 19 proteina, od kojih je 7 proteina bilo specifično prisutno u "pin" (identifikacioni brojevi ovih proteina u **Prilogu B** su: 462, 1414, 1415, 1417, 1421, 1423, 1428), dok je 12 proteina bilo specifično prisutno u "tram" morfu tučka (njihovi identifikacioni brojevi u **Prilogu B** su: 216, 244, 263, 269, 285, 332, 355, 357, 367, 370, 376, 386). Proteinski 2D-profilu "pin" i "tram" polenovih zrna

razlikovali su se u minimum 15 proteina, od kojih je 8 proteina bilo specifično prisutno u "pin" polenovim zrnima (identifikacioni brojevi ovih proteina u **Prilogu B** su: 233,235,273, 501,514,540,564,569), dok je 7 proteina bilo specifično prisutno u "tram" polenovim zrnima (njihovi identifikacioni brojevi u **Prilogu B** su: 142, 155, 159, 177, 435, 455, 457). Pored toga, uočena je i grupa od 12 proteina, koja je bila prisutna samo u neoprašenim "pin" tučkovima, a odsutna u neoprašenim "tram", kao i inkompatibilno i kompatibilno oprашenim "pin" tučkovima (u **Prilogu B** pod identifikacionim brojevima: 277, 322, 326, 1417, 1419, 1421, 1423, 1427, 1428, 1429, 1434, 1435). U neoprašenim "tram" tučkovima nije uočena slična grupa proteina ili neka druga grupa proteina slične specifičnosti ekspresije.

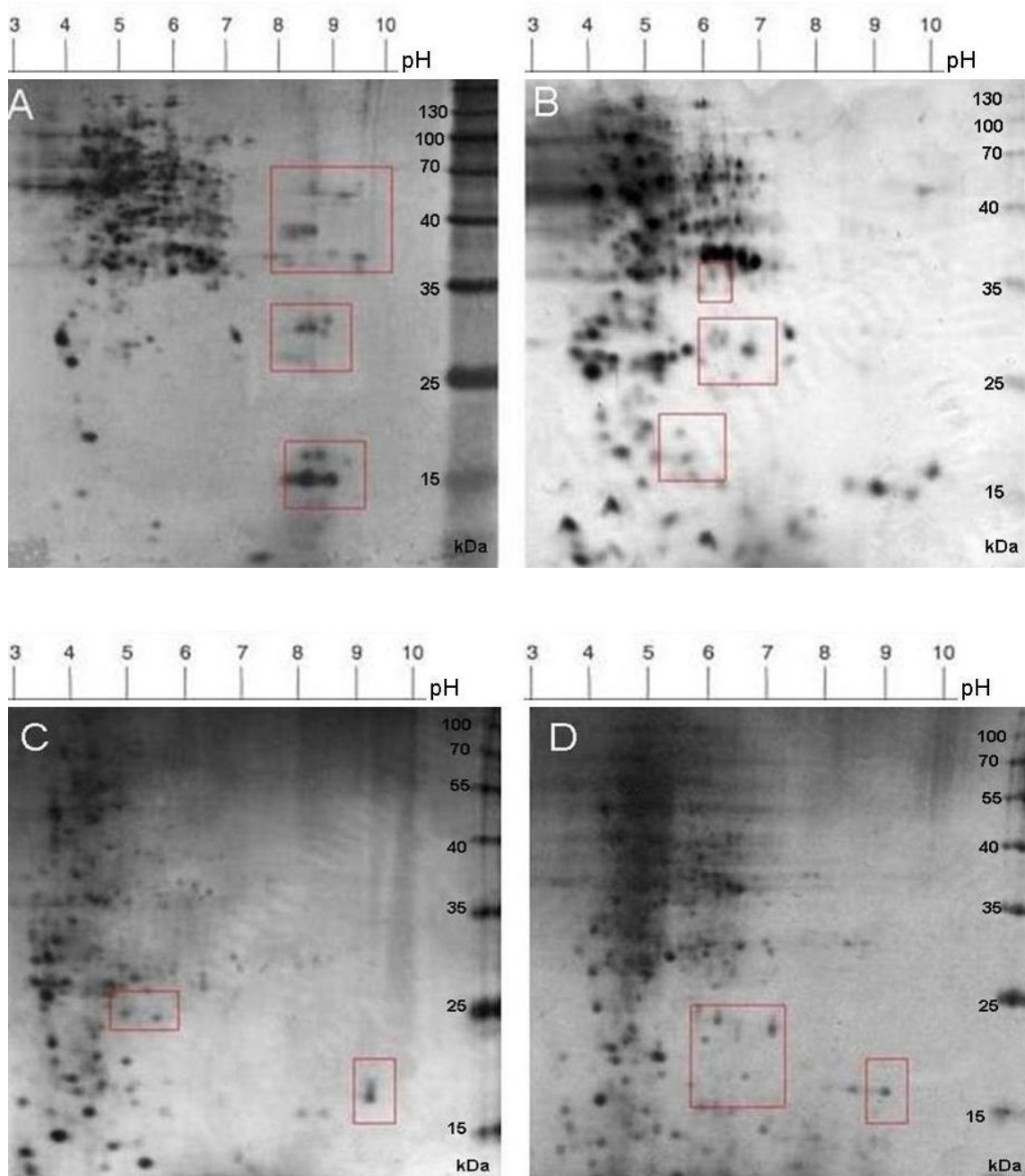
Što se tiče sastava proteoma nakon polinacija, primećeno je da se nakon inkompatibilnih polinacija u obe morfološke klase tučkova pojavljuju *de novo* kiseli i neutralni proteini manje molekulske mase (pI 4-7.5; 13-28 kDa).

Nakon kompatibilnih polinacija u "tram" tučkovima pojavljuje se *de novo* grupa baznih proteina (pI 8-9.9; 35-43 kDa) i dva neutralna proteina (~32 kDa), dok u kompatibilno oprашenim "pin" tučkovima nije uočena pojava njima slične grupe proteina, ali je primećeno da se *de novo* pojavljuje grupa manjih, kiselih proteina (pI 4-5; 9-12 kDa).

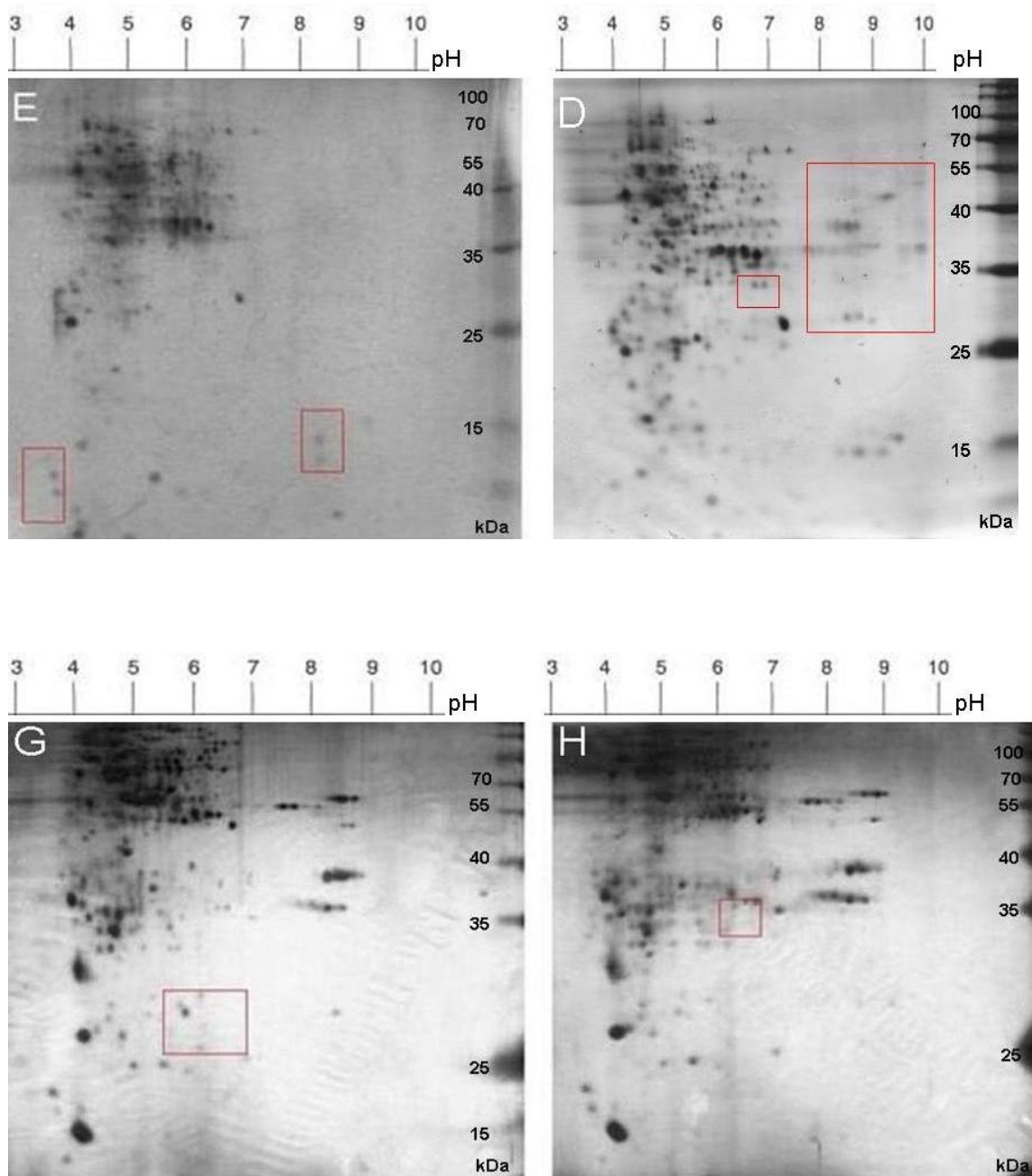
Na ovaj način analize se među 100 proteina detektovanih kao različitih između uzoraka, izdvojilo njih 21, koji su bili prisutni isključivo u jednoj klasi uzorka (**Tabela 6**). Kao što se može primetiti iz **Tabele 6**, u pitanju su proteini manje molekulske mase (11-35kDa), koji pokazuju širok opseg pI (4.3-9).

Tabela 6. Prikaz proteina čije je prisustvo detektovano isključivo u jednoj klasi uzoraka. Za svaki protein navedene su njegove osnovne karakteristike dostupne iz 2D-profila: izoelektrična tačka, molekulska masa, identifikacioni broj i relativna zapreminska zastupljenost na gelu (udeo zapremine individualnog proteina u ukupnoj zapremini svih proteina na gelu), kao i vrsta uzorka u kojoj je detektovan.

Redni broj	Id. br. proteina	Molekulska masa (kDa)	Izoel. tačka	Relativna zastupljenost proteina (% ukupne zapremine)	Uzorak/gel
1	1421	17	8.7	0.79	Neoprašeni "pin" tučak
2	1423	17	8.5	0.76	Neoprašeni "pin" tučak
3	1434	11	7.7	0.12	Neoprašeni "pin" tučak
4	94	22	6.5	0.24	Neoprašeni "tram" tučak
5	514	28	5.7	1.01	"Pin" polen
6	569	26	7	0.04	"Pin" polen
7	435	35	4.3	0.04	"Tram" polen
8	140	14	5.9	3.45	AI oprашen "pin" tučak
9	127	17	4.75	1.04	AI oprашen "pin" tučak
10	221	16	5.1	0.24	AI oprашen "pin" tučak
11	155	13	5.8	2.78	AI oprашen "pin" tučak
12	220	13	7.5	0.15	AI oprашen "pin" tučak
13	257	14	6.2	0.38	AI oprашen "pin" tučak
14	111	20	6	2.02	AI oprашen "pin" tučak
15	231	14	4.3	0.72	AI oprашen "tram" tučak
16	194	19	6.8	0.71	AI oprашen "tram" tučak
17	182	15	5.55	1.84	AI oprашen "tram" tučak
18	281	15	9	0.61	AI oprашen "tram" tučak
19	181	13	5.65	3.00	AI oprашen "tram" tučak
20	183	22	7.3	2.34	AI oprашen "tram" tučak
21	64	30	6.6	0.77	AI oprашen "tram" tučak



Slika 6. 2D-PAGE profili totalnih proteinskih izolata iz: **A**, neoprašenih "pin" tučkova; **B**, neoprašenih "tram" tučkova; **C**, inkompatibilno oprašenih "pin" tučkova; **D**, inkompatibilno oprašenih "tram" tučkova. Crvenim kvadratima su uokvireni regioni gela u kojima se nalaze proteini specifični za datu klasu uzorka.



Slika 6. 2D-PAGE profili totalnih proteinskih izolata iz: **E**, kompatibilno oprašenih "pin" tučkova; **F**, kompatibilno oprašenih "tram" tučkova; **G**, "pin" polena; **H**, "tram" polena. Crvenim kvadratima su uokvireni regioni gela u kojima se nalaze proteini specifični za datu klasu uzorka.

5. DISKUSIJA

5.1. Ispitivanje prisustva gena homolognih AI genima drugih biljnih vrsta u genomu heljde

Iako još uvek ne postoji kompletna filogenetska i filogeografska analiza auto-inkompatibilnih sistema, najveći broj savremenih autora smatra da su AI sistemi evoluirali više puta nezavisno u različitim linijama cvetnica, kao i da su geni koji su uključeni u AI odgovore različitih vrsta nesrodni (detaljnije objašnjeno u Uvodu, poglavlje 1.3). U prilog nezavisnog porekla AI sistema, pored postojanja suštinskih razlika u do sada zabeleženim tipovima AI sistema (čak i sistema koji su pod istom vrstom genetičke kontrole, bilo sporofitne, bilo gametofitne), govore i savremeni molekularni i filogenetski podaci sakupljeni o AI sistemima cvetnica. Takođe, opšte zapažanje molekularne biologije i teorije evolucije, koje ukazuje da slični fiziološki procesi ne moraju nužno imati zajedničko poreklo, već mogu biti različitog porekla i pod kontrolom različitih genetičkih faktora (konvergentna evolucija), čini to stanovište održivim.

Nasuprot iznad iznetom stanovištu, zabeleženi su i nalazi koji potvrđuju da je među AI sistemima prisutna takozvana "trans-specijska evolucija" (*Sutherland i sar.*, 2008), termin skovan da ukaže na to da evolutivno udaljene AI vrste mogu posedovati iste ili slične predačke AI gene (npr. vrlo izraženo u homomorfnoj gametofitnoj AI zasnovanoj na *S-RN* roda *Prunus*). Pored toga, nedavno je objavljen i primer sekundarne evolucije AI lokusa kod *Leavenworthia*, za koji se smatra da pripada liniji koja se odvojila od linije predačkih gena *S*-lokusa Brassicaceae pre diverzifikacije *S*-alela, jer pokazuje domensku strukturu, sekvence i filogenetsku istoriju sličnu genima *S*-lokusa, ali ne učestvuje u razlikovanju sopstvenog od stranog polena. Pretpostavlja se da je u liniji *Leavenworthia* došlo do sticanja nove funkcije ovih *S*-lokus nalik genima, što je dovelo do evolucije odvojenog ligand-receptor sistema AI (*Chantha i sar.*, 2013).

Osim toga, postoji opšta fiziološka sličnost AI odgovora "tram" i "pin" morfa heljde sporofitnom AI odgovoru *Brassica* (Brassicaceae) i gametofitnom AI odgovoru *Prunus* (Rosaceae), respektivno, što može podsećati na situaciju u kojoj u jednoj vrsti deluju sporofitna i gametofitna kontrola (detaljnije objašnjeno u Uvodu, poglavlje 1.3). Takvi slučajevi zabeleženi su u literaturi kod vrsta *Theobroma cacao* (Sterculiaceae), *Cerastium arvense* (Caryophyllaceae) i *Stellaria holostea* (Caryophyllaceae), za koje se smatra da predstavljaju primere tranzicije gena između gametofitne i sporofitne kontrole (Allen i Hiscock, 2008).

Zbog svega navedenog, zaključili smo da postoji opravdana osnova za ispitivanje prisustva gena homolognih AI genima rodova *Brassica* i *Prunus* u genomu heljde metodom polimeraznog lančanog umnožavanja upotrebom gen-specifičnih prajmera (dizajniranih ili preuzetih iz literature). Odabran je pristup koji koristi izrođene prajmere za umnožavanje genske sekvence, jer su ovi prajmeri dovoljno specifični za datu sekvencu, ali i dovoljno nespecifični tako da mogu da detektuje grupu srodnih sekvenci, pa je na ovaj način moguće otkriti prisustvo homologa, čak i ukoliko su vremenom akumulirali razlike u odnosu na AI gene *Brassica* i *Prunus* sa kojima bi mogli da dele zajedničko poreklo.

Ispitivanje prisustva gena homolognih *SRK*, *SLG*, *SP11* i *MLPK* genima *Brassica*, kao i *SRNaznim* i *SFB* genima *Prunus*, pokazalo je da u genomu heljde nema homologa *SRK*, *SLG*, *SP11* genima, kao ni *SRNaznim* i *SFB* genima, ali da postoji homolog *MLPKf2* genu *Brassica*.

Značajna homologija *MLPKFe* sa *MLPKf2 Brassica* (80%), za koju je poznato da ima ulogu pozitivnog medijatora signala u AI odgovoru kupusnjača, može, ali ne mora značiti da *MLPKFe* ima ulogu u AI heljde. Pošto proteinska *MLPK* familija obuhvata brojne proteine koji su prenosioci signala u različitim fiziološkim procesima, moguće je da *MLPKFe* učestvuje u nekom sasvim drugom fiziološkom procesu heljde. Do zaključka da li *MLPKFe* učestvuje u AI odgovoru heljde mogli bismo doći posredno, tako što bismo pratili gensku ekspresiju *MLPKFe* u tkivima lista, cveta, polena/antera, tučka, kao i u različitim

razvojnim stadijumima tučka. Ukoliko MLPKFe učestvuje u AI odgovoru heljde, očekivali bismo da se primeti razlika u njenoj ekspresiji u različitim tkivima, tako što bi najviši nivo ekspresije imala u tučkovima, značajno niži nivo ekspresije u listovima, dok ne bi bila eksprimirana uopšte u polenu/anterama, slično shemi ekspresije njenog homologa *MLPKf2* kod *Brassica* (Kakita i sar., 2007a). Takođe, očekivali bismo da se u toku sazrevanja tučka, njen nivo ekspresije postepeno povećava i da je najviši pred samo otvaranje cveta.

5.2. Tretman inhibitorom protein kinaza C

Kako je ranije uočeno, kalcijum ima važnu ulogu u AI odgovoru heljde (Miljuš-Đukić i sar., 2003), što je potvrđeno i za neke druge AI sisteme poput gametofitne AI Poaceae (videti pod 1.4.3.), međutim nije poznata njegova konkretna uloga u AI heljde. Imajući u vidu različite izveštaje koji govore u prilog tome da protein kinaze mogu učestvovati u AI odgovoru (npr. *MLPKf2 Brassica* je receptoru nalik kinaza), kao i da protein kinaze C aktivirane Ca^{2+} jonima (npr. Ca^{2+} /kalmodulin-zavisna kinaza) imaju važnu ulogu u procesima signalne transdukcije eukariota (i da u tom signalnom putu mogu biti kuplovane sa receptoru nalik kinazama), odlučili smo da testiramo kakav efekat na AI odgovor heljde ima tretman inhibitorom miristilovanih protein kinaza C (za membranu vezanih kalcijum- i fosfolipid-zavisnih protein kinaza).

Na ovaj način želeli smo da testiramo potencijalnu ulogu kalcijum-zavisnih protein kinaza vezanih za membranu, poput Ca^{2+} /kalmodulin zavisne kinaze, u AI odgovoru heljde i time posredno ispitamo jedan od mogućih načina angažovanja kalcijuma u heljdinom AI sistemu. Ukoliko bi Ca^{2+} zavisne PKC bile zaista deo AI odgovora heljde, očekivali bismo da tretman ovim inhibitorom dovede do narušavanja signalnog puta u inkompatibilnoj reakciji, što bi dovelo do narušavanja kaskade neophodne za realizaciju AI odgovora i rast sopstvene polenove cevi ne bi bio zaustavljen na 2/3 dužine stubića "pin" tučka ili na spoju žiga i stubića tučka "tram" morfa.

Rezultati tretiranja tučkova PKC inhibitorom pre polinacije, pokazali su da inhibitor nije na vidljiv način uticao na rast polenovih tuba u inkompatibilnim polinacijama ni kod "pin" ni kod "tram" morfa. Dakle, za membranu vezane kalcijum- i fosfolipid-zavisne protein kinaze C nemaju ulogu u AI odgovoru heljde, tako da kalcijum svoju ulogu u AI sistemu heljde ostvaruje na neki drugi način.

5.3. Sekvence segmenata genomske DNK blisko vezane S-lokusu heljde

Do sada ne postoji ni jedan podatak o genima uključenim u sporofitni heteromorfni AI odgovor heljde. Ipak, razvijeni su markeri iz kojih su izvedeni prajmeri za umnožavanje sekvenci u blizini *S*-lokusa ili u samom *S*-lokusu, što čini mogućim njegovo fino mapiranje (*Nagano i sar.*, 2001).

Upotrebom prajmera izvedenih iz AFLP N_7 markera u reakciji termalnog asimetričnog lančanog umnožavanja, dobijeno je u nekim reakcijama i više od dva produkta umnožavanja. To nije neočekivano budući da se ova reakcija umnožavanja upravo koristi kombinacijom specifičnih i poluspecifičnih prajmera uz variranje temperature da poveća prinos specifičnog umnoška u odnosu na nespecifične (koji su neminovno prisutni usled samog dizajna ovakve reakcije umnožavanja) i na taj način dok se oslanja na jednu poznatu sekvencu omogućuje umnožavanje do tad nepoznatog susednog regiona genoma. Takođe, može se primetiti da je u svim reakcijama po prinosu dominirao najmanje jedan, a najviše dva produkta, što može odgovarati situacijama homozigot/heterozigot za analizirani region.

Sekvence koje su proizašle kao rezultat ovog istraživanja, pružile su uvid u nukleotidni sastav regiona bliskog *S*-lokusu i ono što je prvo vidljivo jeste njihova repetitivna struktura, što je upravo i odlika *S*-lokusa i njemu bliskog regiona DNK. Dalje, međusobnim upoređivanjem dobijenih sekvenci ustanovljeno je da se najveći broj sekvenci unutar jedne klase ("pin"/"tram" klase) međusobno ne preklapa, što ukazuje da su

sekvencirani fragmenti poreklom sa različitih mesta bliskih *S*-lokusu, ali ne znamo koliko su ta mesta međusobno udaljena. Da bi se ostvarilo preklapanje tj. povezivanje u niz sekvenciranih fragmenata može se probati lančano umnožavanje sa prajmerima dizajniranim iz dobijenih sekvenci ili prajmerima dostupnim iz literature, npr. onim koji su izvedeni iz drugih markera bliskih *S*-lokusu kao što je npr. *sht1* marker za rasejavanje semena (*Matsui i sar.*, 2004).

Međusobno upoređivanje sekvenci između "pin" i "tram" biljaka pokazalo je da među sekvencama nema preklapanja, izuzev jedne sekvence, koja je umnožena pomoću N_7R_1 i AD_1 seta prajmera, i koja je pokazala identičnost analiziranog fragmenta genomske DNK u "pin" i "tram" biljkama (sekvence P_{212} i T_{22} , **Prilog A**). U pitanju je kratka sekvenca od 255 baznih parova, čija egzon-intron struktura ukazuje na mogućnost kodiranja aminokiselinske sekvence, koja pokazuje homologiju sa LRR receptor-nalik serin/treonin protein kinazom GSO2 ili kodiranja aminokiselinske sekvence koja pokazuje homologiju sa histon-acetil transferazom HAC2. Ukoliko razmotrimo uloge ova dva proteina, oba imaju ulogu koja je dovoljno opšta i neophodna za reprodukciju da se opravdano bilo koji od njih može naći lociran u regionu bliskom *S*-lokusu oba morfa. Što se tiče LRR receptoru-nalik serin/treonin protein kinaze GSO2, poznato je da je locirana u membrani i da zajedno sa GSO1 omogućuje razvoj epidermalne površine embriona i kotiledona, a uključena je i u fazu jedarne deobe u procesu megagametogeneze. Uglavnom je eksprimirana u silikama, semenima, kotiledonima, embrionima, cvetnom pupoljku, ali nije primećena njena ekspresija u listu, korenu i stem tkivima (*Pagnussat i sar.*, 2005; *Tsuwamoto i sar.*, 2008). Takođe, histon-acetil transferaza HAC2 je protein koji acetiluje histone, obeležavajući ih za transkripcionu aktivaciju. Prisutan je u jedrima ćelija rozeta listova, stem tkiva i cvetova. Sadrži repetitivni motiv cinkanih prstiju i učestvuje u procesima modifikacije hromatina, DNK-zavisne transkripcije i njene regulacije (*Pandey i sar.*, 2002).

Pored sekvence P_{212} tj. T_{22} , analiza otvorenih okvira čitanja i egzon-intron struktura je dovela do zanimljivih predloga mogućih uloga i za većinu ostalih sekvenci (**Tabela 5**),

od kojih ću prodiskutovati samo nekoliko mogućnosti za sekvence **P₁₂₅**, **T₃₁**, **T₃₁₃**. Izvedena aminokiselinska sekvenca za **P₁₂₅** segment DNK može pripadati grupi proteina koji sadrže PWWP domen; izvedena aminokiselinska sekvenca za **T₃₁** pokazuje sličnost sa WRKY DNK-vezujućim proteinom 40 ili tirozin kinazom sa PB1 domenom, dok izvedena aminokiselinska sekvenca za **T₃₁₃** podseća na familiju transducina, proteina koji sadrže WD40 domen. Proteini sa PWWP domenom pripadaju nuklearnim proteinima, koji imaju ulogu u rastu i diferencijaciji ćelija. Predloženo je da je PWWP domen omogućuje protein-protein interakcije između nuklearnih proteina uključenih u diferencijaciju (*Stec i sar.*, 2000). Što se tiče WRKY DNK-vezujućeg proteina 40, on pripada velikoj familiji transkripcionih faktora, koji učestvuju u prenošenju signala u toku razvoja, dormantnosti i germinaciji semena, razvojnim procesima, starenju, biotičkom/abiotičkom stresu, a može delovati i kao aktivator i kao represor transkripcije (*Rushton i sar.*, 2010). Zanimljivo je da i svi ostali predloženi proteini imaju uloge u prenošenju signala: npr. tirozin kinaza sa PB1 domenom (karakteristika mnogih signalnih citoplazmatskih proteina eukariota) učestvuje u složenoj transdukciji signala, ili familije transducina/WD40 domen proteina (karakteristični za proteine eukariota, familija ima širok spektar uloga, od signalne transdukcije, preko procesovanja prekursora iRNK, do sastavljanja citoskeleta) (*Xu i Min*, 2011).

Za tri sekvence, **P₁₃₄**, **P₃₃₃** i **P₅₃₃**, za koje nisu pronađene egzon-intron strukture ni otvoreni okviri čitanja, njihovo odsustvo može ukazivati ili da su tako pozicionirane da iako su kodirajuće strukture njihov umnoženi segment ne omogućuje detekciju egzon-intron struktura ili na to da su navedene tri sekvence deo nekodirajućeg regiona DNK, što se može ustanoviti umnožavanjem pomoću prajmera dizajniranih specifično za ove sekvence.

5.4. 2D-PAGE razdvajanje ukupnih proteina polena i tučkova heljde

Nakon izolacije i polinacije tučkova, a pre ekstrakcije proteina, uklonjeni su plodnici tučkova zbog toga što su bogati rezervnim proteinima, koji bi mogli da otežaju detekciju proteina žiga i stubića tučkova, među kojima očekujemo da se nađu proteini koji učestvuju

u AI odgovoru heljde. Pored toga, još jedan kritičan momenat bio je odabir vremena izolacije proteina u odnosu na trenutak inkompatibilne polinacije. Poznato je da je AI odgovor cvetnica generalno brz odgovor i da pokazuje izraženu vremensku dinamiku, kao i da kod heljde "tram" morf ima značajno bržu AI reakciju nego "pin" morf (na šta ukazuje mesto zaustavljanja rasta sopstvene polenove cevi). Zato je odabrano vreme AI reakcije (od trenutka polinacije do trenutka izolacije proteina) iznosilo 1,5h, jer je protumačeno da pruža dovoljno vremena da se uključi niz nizvodnih učesnika AI odgovora, bez da su neki od njih već intenzivno degradovani u proteazomima.

Da bismo stekli uvid u sastav proteoma tučkova i polena dva cvetna morfa heljde, a bez dostupnih podataka o njihovom sastavu iz literature, odlučili smo se za razdvajanje proteina prema izoelektričnoj tački na najširem opsegu pH, 3-10. Odabrani opseg rezultovao je 2D-PAGE proteinskim profilima solidne rezolucije, omogućavajući detektovanje preko 200 individualnih proteina po uzorku/gelu, kao i uočavanje proteina specifično prisutnih u "pin" i "tram" profilima, kao i u profilima inkompatibilnih i kompatibilnih polinacija.

Ipak, ostvarena rezolucija bi mogla biti još poboljšana u kiselim regionima gela (pH 3-5) u zoni proteina molekulskih masa od 55 do 130 kDa. Za sada su ovi regioni gelova u svim uzorcima isključeni iz analize, iz razloga što su u svim uzorcima najviše zastupljeni proteini navedenih karakteristika, što otežava pouzdanu identifikaciju pojedinačnih proteina u tom regionu. Za potrebe inicijalnog istraživanja sastava proteoma i sticanja prvih opštih informacija o sličnostima i razlikama proteoma analiziranih uzoraka, izuzimanje ovog regiona iz analize uzoraka ne predstavlja poseban problem. Međutim, kada dođe na red faza sakupljanja ukupnih podataka koje pružaju 2D-PAGE proteinski profili uzoraka biće potrebno da se upotrebe sve informacije koje 2D gel pruža, što se može postići upotrebom stripova užeg opsega pH, npr. 3-7, koji bi značajno poboljšati rezoluciju 2D profila proteina u naznačenom regionu.

Analiza 2D proteinskih profila osam klasa uzoraka (totalnih proteinskih izolata "pin" i "tram" polena, neoprašenih, inkompatibilno i kompatibilno oprušenih "pin" i "tram"

tučkova), pokazala je da postoji visok stepen sličnosti između proteina prisutnih u "pin" i u "tram" klasi, kao i između klasa inkompatibilnih i kompatibilnih polinacija. Ovaj nalaz potvrđuje da proteomi analiziranih reproduktivnih tkiva u svom sastavu sadrže veliki broj zajedničkih proteina, što je i bilo očekivano, jer ipak najveći relativni udeo u proteomu reproduktivnih tkiva svih vrsta cvetnica, bile one AI ili ne, imaju proteini koji imaju opšte uloge u cvetu (npr. za opšte polen-tučak interakcije). U prilog tome govore i rezultati istraživanja u divljem paradajzu (*Solanum pennellii*), koji su pokazali da u proteomu nezrelih tučkova (5 dana pre otvaranja cveta) najveću relativnu zastupljenost imaju histoni i ribozomalni proteini, što je u skladu sa fazom povišene stope ćelijskih deoba i ubrzanim metabolizmom, ali kasnije, sa sazrevanjem tučkova i sticanjem pune AI odnosi relativne zastupljenosti se menjaju u korist proteina povezanih sa metabolizmom i transportom lipida (*Chalivendra i sar.*, 2013). Zanimljivo je to da se većina ovih proteina može klasifikovati u CRP grupu proteina (proteini bogati cisteinom). Upravo za tu grupu proteina su *Marshal i sar.* (2011) pokazali da je uključena u opšte polen-tučak interakcije, kao što su: formiranje eksudata na žigu tučka, adhezija i rast polenove cevi, odbrani tučka od patogena ili u interakcije polena i tučka (remodelovanje ćelijskog zida, pektinaze, poligalakturonaze, ekspanzini), itd.

I pored visokog stepena sličnosti sastava proteoma analiziranih klasa uzoraka, zahvaljujući visokoj osetljivosti 2D-PAGE metode omogućena je i detekcija vrlo male količine specifično eksprimiranih proteina, koji su vezani za određeni tip morfa cveta ili njegov AI sistem. Na taj način u osam analiziranih uzoraka detektovali smo 21 protein jedinstveno prisutan samo u jednoj klasi uzorka. Za sada znamo samo njihove opšte karakteristike, poput izoelektrične tačke, molekulske mase i njegove relativne zapreminske zastupljenosti u uzorku. U nastavljanju istraživanja specifični proteini bi trebalo da budu identifikovani/sekvencirani, čime će se steći i uvid u njihovu potencijalnu ulogu.

Grupa proteina identifikovana kao specifična za 2D-profile "pin" neoprašenih tučkova (njihovi identifikacioni brojevi u **Prilogu B** su: 187, 230, 277, 322, 326, 344, 1417, 1418, 1419, 1421, 1423, 1427, 1428, 1429, 1435) (tj. odsutna u 2D-profilima "tram"

neoprašenih tučkova, inkompatibilno i kompatibilno oprašenih "pin" tučkova), najverovatnije ukazuje na proteine koji su zaduženi za opšti odgovor "pin" tučka pri oprašivanju, nezavisno od toga da li je polen sopstveni/srodan ili ne, ali nije specifična za AI odgovor "pin" tučkova.

Proteini koji se pojavljuju *de novo* u 2D-profilima auto-inkompatibilnih i kompatibilnih polinacija mogu se javiti ili kao rezultat *de novo* sinteze proteina u signalnoj kaskadi događaja izazvanoj polinacijom sopstvenim/nesrodnim polenom ili nastati degradacijom proteina prisutnih u 2D-profilima neoprašenih tučkova. Iako uzrok može varirati od slučaja do slučaja, da bismo mogli da zaključimo koji od ova dva događaja je uzrok pojave određenog *de novo* proteina, potrebno je da uradimo identifikaciju/sekvenciranje barem proteina navedenih u **Tabeli 6**, ako ne i svih proteina navedenih u **Prilogu B**.

5.5. Perspektiva istraživanja molekularne osnove AI odgovora heljde

Na osnovu iznetih rezultata istraživanja možemo zaključiti da je specifičnost prepoznavanja sopstvenog polena kod heljde pod kontrolom gena koji se razlikuju od gena uključenih u sporofitni auto-inkompatibilni odgovor *Brassica* i gametofitni auto-inkompatibilni odgovor *Prunus*. Dobijene nove genomske sekvence bliske *S*-lokusu nisu pokazale homologiju sa bilo kojom od nukleotidnih sekvenci u bazama podataka, ali nakon analize u programima za identifikaciju otvorenih okvira čitanja i egzon-intron struktura pronađene su potencijalne homologne aminokiselinske sekvence u proteinskim bazama podataka, čije su predložene uloge uglavnom obuhvatale prenošenje signala i regulaciju transkripcije.

Da bismo razjasnili koje od mnogobrojnih predloženih uloga mogu zaista da se odnose na analizirane sekvence, potrebno je analizirati duže fragmente DNK bliske *S*-lokusu. Te duže fragmente možemo dobiti npr. lančanim umnožavanjem sa prajmerima dizajniranim iz novih sekvenci ili pak prajmerima dostupnim iz literature, ali izvedenim iz

drugih markera bliskih S-lokusu, kao što su npr. SCAR markeri (*Jotaro i sar.*, 1999) ili markeri novijeg datuma poput *sht1* markera kojim se prati rasejavanje semena, a koji je blisko vezan S-lokusu (*Matsui i sar.*, 2004). Takođe, još jedna mogućnost je da se (ne)radioaktivno obeleži jedan od produkata umnožavanja N₇ prajmerima i upotrebi kao S-lokus specifična proba u blotovanju po Southern-u, a zatim da se restrikcioni fragment genomske DNK sa kojim proba bude hibridizovala uklonira i sekvencira.

Uporedo sa daljim sekvenciranjem segmenata genomske DNK bliskih S-lokusu, do proteina kandidata za učesnike u AI odgovoru heljde možemo doći i direktnim pristupom, kroz analiziranje proteoma inkompatibilnog i kompatibilnog odgovora oba morfa. Trenutno najbolji kandidati za proteine učesnike AI sistema su upravo proteini detektovani kao specifično prisutni u auto-inkompatibilno oprašenim "pin"/"tram" tučkovima. Iako spomenuti proteini mogu imati i neku drugu ulogu, kao npr. u determinaciji morfologije cveta ili sl., njihova identifikacija ili sekvenciranje ne samo da bi pružili uvid u njihovu potencijalnu ulogu, već bi pružili i uvid u nukleotidnu sekvencu na kojoj počiva njihova sinteza, na osnovu koje bismo se mogli još više približiti genima S-lokusa, među kojima su zasigurno i AI geni.

Rezultati dosadašnjeg istraživanja ukazuju da bi dalje nastavljanje sa istraživanjem zaista moglo dovesti do značajnog pomaka u rasvetljavanju molekularne osnove heteromorfog sporofitnog AI sistema heljde. Upoznavanje genetičke i biohemijske osnove AI sistema imale bi veliki praktični značaj u programima oplemenjivanja heljde, kao i u produbljanju znanja o slabo proučenim sporofitnim heteromorfim AI sistemima cvetnica.

6. ZAKLJUČCI

- ▼ Nije pronađen dokaz prisustva homologa *S-RNaza* i *SFB*, gena za koje je poznato da kontrolišu homomorfni gametofitni AI odgovor roda *Prunus* (Rosaceae), u genomu heljde.

- ▼ Nije pronađen dokaz prisustva homologa *SRK*, *SLG*, *SP11*, gena za koje je poznato da kontrolišu homomorfni sporofitni AI odgovor roda *Brassica* (Brassicaceae), u genomu heljde.

- ▼ Specifično prepoznavanje sopstvenog od stranog polena kod heljde je pod kontrolom gena koji se razlikuju od gena odgovornih za specifično prepoznavanje sopstvenog od stranog polena u sporofitnom auto-inkompatibilnom sistemu *Brassica* (Brassicaceae) i gametofitnom auto-inkompatibilnom sistemu *Prunus* (Rosaceae).

- ▼ Identifikovano je prisustvo homologa *M*-lokus protein kinaze izoforme 2 (*MLPKf2*) *Brassica* (koja ima ulogu pozitivnog medijatora signala u AI odgovoru *Brassica*) u genomu heljde i heljdin homolog nazvan je *MLPKFe*.

- ▼ Parcijalna nukleotidna sekvenca *MLPKFe* dugačka je 728 nukleotida i sadrži 4 egzona, koji odgovaraju kinaznom regionu gena.

- ▼ Izvedena aminokiselinska sekvenca MLPKFe pokazala je visok stepen homologije sa protein kinazama drugih biljnih vrsta, krećući se od 81% u *Trifolium pratense* do 89% u *Populus trichocarpa*. Takođe, sekvenca je pokazala 80% homologije sa MLPKf2 sekvencom *Brassica rapa* i APK1A *Arabidopsis thaliana*.

- ▼ Tretman tučkova oba morfa heljde inhibitorom miristolovanih protein kinaza C pre polinacija tučkova nije uticao na bilo kakav vidljiv način na rast inkompatibilnih polenovih cevi ni kod "pin" ni kod "tram" morfa, što ukazuje da za membranu vezane kalcijum- i fosfolipid-zavisne protein kinaza C ne učestvuju u AI odgovoru heljde.

- ▼ Umnožavanje DNK segmenata vezanih za S-lokus heljde upotrebom prajmera dizajniranih iz N₇ AFLP markera (blisko vezanog S^h alelu S-lokusa heljde), omogućilo je dobijanje 14 novih sekvenci genomske DNK heljde.

- ▼ Dužina 14 novih nukleotidnih sekvenci heljde kretala se u opsegu od 255 do 875 baznih parova DNK, a njihov GC sadržaj između 35% i 44.7% (u proseku 40.24%).

- ▼ Sekvence su pokazivale repetitivnu strukturu (karakteristika S-lokusa mnogih AI cvetnica), što ide u prilog fizičkoj bliskosti ovih sekvenci i S-lokusa.

- ▼ Sekvence P₂₁₂ i T₂₂, umnožene pomoću N₇R₁ i AD₁ seta prajmera, bile su identične: dužine 255 baznih parova sa egzon-intron strukturom koja ukazuje na sličnost sa LRR receptor-nalik serin/treonin protein kinazom GSO2 ili sa histon-acetil transferazom HAC2;

- ▼ Analiza otvorenih okvira čitanja i egzon-intron struktura za 9 sekvenci ukazala je na sličnost sa različitim grupama proteina koji uglavnom imaju uloge u transdukciji signala i regulaciji transkripcije.

- ▼ Za tri sekvence (P₁₃₄, P₃₃₃ i P₅₃₃) nisu pronađene egzon-intron strukture ni otvoreni okvir čitanja.

- ▼ 2D-PAGE profili totalnih proteinskih izolata "pin" i "tram" polena, neoprašenih, kompatibilno i inkompatibilno oprušenih "pin" i "tram" tučkova heljde, otkrili su preko 200 visoko reproducibilnih proteina u svakom od izolata.

- ▼ Proteini su bili raspoređeni u širokom opsegu molekulskih masa (10-130 kDa), uz preovlađivanje kiselih i neutralnih proteina (pH 3.5-7), praćenih dosta manjim brojem baznih proteina (pH 7.5 - 9) u svakom od izolata.

- ▼ Uočen je visok stepen sličnosti proteoma "pin" i "tram" polena odnosno neoprašenih "pin" i "tram" tučkova, kao i proteoma inkompatibilne/kompatibilne polinacije "pin" i "tram" tučkova, što ukazuje da najveći relativni udeo u svim uzorcima imaju proteini sa opštim ulogama u cvetu.

- ▼ Detektovali smo oko 100 proteina različitih među klasama, što čini ~5% ukupno detektovanih proteina. Među 100 različitih proteina, detektovali smo 21 protein prisutan isključivo samo u jednom uzorku, tj. vezan specifično za određeni morf cveta ili njegov inkompatibilni odgovor.

- ▼ 2D-profilu "pin" i "tram" neoprašenih tučkova razlikuju se u najmanje 19 proteina, od kojih je 7 proteina specifično prisutno u "pin", a 12 proteina u "tram" morfu tučka.

- ▼ 2D-profilu "pin" i "tram" polena razlikuju se u najmanje 15 proteina, od kojih je 8 proteina specifično prisutno u "pin", a 7 proteina u "tram" polenu.

- ▼ Identifikovana je grupa baznih proteina srednje molekulske mase (pI 8-9.25; 39-55 kDa) i dva mala bazna proteina (pI 8,5-8,8; 17 kDa) koji su specifični za "pin" neoprašene tučkove, a koji nestaju iz 2D-profila nakon polinacije, nezavisno od toga da li je polinacija bila inkompatibilna ili kompatibilna. U "tram" neoprašenim tučkovima nije detektovana slična grupa proteina.

- ▼ Detektovana grupa baznih proteina neoprašenih "pin" tučkova je specifična za "pin" morf cveta i sadrži proteine uključene u opšti odgovor "pin" morfa na oprašivanje.

- ▼ U 2D-profilima inkompatibilnih polinacija "pin" i "tram" tučkova uočeno je *de novo* pojavljivanje kiselih i neutralnih proteina manje molekulske mase (pI 4-7.5; 13-28 kDa).

- ▼ Nakon kompatibilnih polinacija u "tram" tučkovima pojavljuje se *de novo* grupa baznih proteina srednje molekulske mase (pI 8-9.9; 35-43 kDa) i dva neutralna proteina (~32 kDa). U kompatibilno oprašenim "pin" tučkovima nije uočena pojava njima slične grupe proteina, ali je primećeno *de novo* pojavljivanje grupe manjih kiselih proteina (pI 4-5; 9-12 kDa).

- ▼ Rezultati istraživanja otvaraju niz novih mogućnosti i ukazuju da bi nastavljanje istraživanja moglo dovesti do značajnog pomaka u rasvetljavanju molekularne osnove heteromorfnog sporofitnog AI sistema heljde.

7. LITERATURA

Aii, J., Nagano, M., Kuroda, M., Campbell, C., Adachi, T. (2001) Characterization of AFLP markers linked to the *Sh* allele in buckwheat. The proceeding of the 8th ISB, National Institute of Agrobiological Sciences, str. 470-474.

Aii, J., Nagano, M., Kawasaki S., Adachi T. (2004) Centromeric location of the *S*-locus in buckwheat. *Fagopyrum* **21**:21-25.

Allen, A.M., Hiscock, S.J. (2008) Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. U: Franklin-Tong, V.E. (ed.) Self-incompatibility in flowering plants - Evolution, diversity and mechanisms. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str.73-101.

Athanasiou, A., Shore J.S. (1997) Morph-specific proteins in pollen and styles of distylous *Turnera* (Turneraceae). *Genetics* **146**:669-679.

Bateman, A.J. (1956) Cryptic self-incompatibility in the wallflower: *Cheiranthus cheiri* L. *Heredity* **10**: 257–261.

Barrett, S.C.H. (1988) The evolution, maintenance, and loss of self-incompatibility systems. U: Doust, J.L., Doust L.L. (eds.) Plant reproductive ecology: patterns and strategies. Oxford University Press, New York, str. 98-124.

Barrett, S.C.H. (1992) Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. U: Barrett, S.C.H. (ed.) Evolution and function of heterostyly. Monographs on theoretical and applied genetics. Springer, Berlin, str. 1-29.

Barrett, S.C.H., Cruzan M.B. (1994) Incompatibility in heterostylous plants. U: Williams, E.G., Clarke, A.E., Konx, R.B. (eds.) Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,Boston, London, str. 189-219.

Barrett, S.C.H. (1998) The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* **3**: 335-341.

Barrett, S.C.H., Jesson, L.K., Baker, A.M. (2000) The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany* **85**:253-265.

Baumann, U., Juttner, J., Bian, X., Langridge, P. (2000) Self-incompatibility in the grasses. *Annals of Botany* **85**: 203-209.

Bawa, K.S., Beach, J.H. (1981) Evolution of Sexual Systems in Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 254-274.

Behrensmeyer, A.K., Damuth, J.D., DiMichele, W.A., Potts, R., Sues, H.D., Wing, S.L. (eds.) (1992) Terrestrial Ecosystems through Time: the Evolutionary Paleoecology of Terrestrial Plants and Animals. Chicago, London: University of Chicago Press.

Bell, C.D., Soltis, D.E., Soltis P.S. (2005) The age of the Angiosperms: a molecular timescale without a clock. *Evolution*, **59**: 1245-1258.

Bhardwaj M., Eckert C.G. (2001) Functional analysis of synchronous dichogamy in flowering rush, *Butomus umbellatu* (Butomaceae). *American Journal of Botany* **88**: 2204–2213.

Bittencourt, N. S., Semir J. (2006) Floral biology and late-acting self-incompatibility in *Jacaranda racemosa* (Bignoniaceae). *Australian Journal of Botany* **54**: 315-324.

Bower, M.S., Matias, D.D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S.J., Goring, D.R. (1996) Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* S locus receptor kinase. *Plant Cell* **8**: 1641-1650.

Bowman R.N. (1987) Cryptic self-incompatibility and the breeding system of *Clarkia unguiculata* (Onagraceae). *American Journal of Botany* **74**: 471-476.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.

Brandvain, Y., Haig, D. (2005) Divergent mating systems and parental conflict as a barrier to hybridization in flowering plants. *American Naturalist* **166**: 330–338.

Brennan, A.C., Tabah, D.A., Harris, S.A., Hiscock, S.J. (2011) Sporophytic self-incompatibility in *Senecio squalidus* (Asteraceae): S allele dominance interactions and modifiers of cross-compatibility and selfing rates. *Heredity* **106**: 113–123.

Brewbaker, J.L., Kwack, B.H. (1963) The essential role of calcium ions in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* **50**: 859-865.

Busch, J.W. (2005) The evolution of self-compatibility in geographically peripheral populations of *Leavenworthia alabamica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **92**: 1503–1512.

Cabrillac, D., Cock, J. M., Dumas, C., Gaude, T. (2001) The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**: 220-223.

Campbell, C.G. (1997) (ed.) Buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops **19**, International Plant Genetic Resources Institute.

Carraro, L., Lombardo, G., Gerola, P. (1996) Style peroxidase and heteromorphic incompatibility reactions in *Primula acaulis* Hil ("thrum morph"). *Caryologica* **49**:101-112.

Chalivendra, S.C., Lopez-Casado, G., Kumar, A., Kassenbrock, A.R., Royer, S., Tovar-Mèndez, A., Covey, P.A., Dempsey, L.A., Randle, A.M., Stack, S.M., Rose, J.K.C., McClure, B., Bedinger, P.A. (2013) Developmental onset of reproductive barriers and associated proteome changes in stigma/styles of *Solanum pennellii*. *Journal of Experimental Botany* **64**: 265–279.

Chantha, S.-C., Herman, A.C., Platts, A.E., Vekemans, X., Schoen D.J. (2013) Secondary evolution of a self-incompatibility locus in the Brassicaceae genus *Leavenworthia*. *PLoS Biology* **11**: e1001560.

Chapman, A.D. (2009) Numbers of Living Species in Australia and the World, 2nd edition. Australian Biological Resources Study, Canberra.

Charlesworth, D., Charlesworth B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 237-268.

Chen, Q.F. (1999) Hybridization between *Fagopyrum* (Polygonaceae) species native to China. *Botanical Journal of the Linnean Society* **131**:177–185.

Chookajorn, T., Kachroo, A., Ripoll, D.R., Clark, A.G., Nasrallah, J.B. (2004) Specificity determinants and diversification of the *Brassica* self-incompatibility pollen ligand. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**: 911-917.

Clarke, A.E., Newbigin E. (1993) Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. *Annual Review of Genetics* **27**:257-279.

Cock, J. M., Cabrillac, D., Giranton, J.-L., Pastuglia, M., Ruffio-Chable, V., Miede, C., Dumas, C., Gaude, T. (2000) Investigating the molecular mechanism of the self-incompatibility response in *Brassica*. *Annals of Botany* **85**: 147-153.

Connor, H.E. (1979) Breeding systems in the grasses: a survey. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 547-574.

Cornish, E.C., Pettitt, J.M., Clarke, A.E. (1988). Self-incompatibility genes in flowering plants. U: Verma D.P.S., Goldberg R.B. (eds.) Temporal and spatial regulation of plant genes. New York, Springer-Verlag, str. 117-130.

Covey, P.A., Kondo, K., Welch, L., Frank, E., Sianta, S., Kumar, A., Nuñez R., Lopez-Casado, G., van der Knaap, E., Rose, J.K.C., McClure B.A., Bedinger P.A. (2010) Multiple features that distinguish unilateral incongruity and self-incompatibility in the tomato clade. *The Plant Journal* **64**: 367–378.

Crepet, W.L., Niklas K.J. (2009) Darwin's second "Abominable mystery": Why are there so many angiosperm species? *American Journal of Botany* **96**: 366–381.

Cruzan, M.B., Barrett, S.C.H. (1993) Contribution of cryptic incompatibility to the mating system of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution*, **47**: 925-934.

Darwin, C.R. (1876) The Effects of Cross and Self-fertilization in the Vegetable Kingdom. London. John Murray.

Dicenta, F., Gracia, J.E. (1993) Inheritance of self-incompatibility in almond. Heredity 70:313–317.

Dixit, R., Nasrallah J. B. (2001) Recognizing self in the self-incompatibility response. Plant Physiology, 125:105–108.

*Dowrick, V.P.J. (1956) Heterostyly and homostyly in *Primula obconica*. Heredity 10:219-236.*

*Eckert C., Allen M. (1997) Cryptic self-incompatibility in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae). American Journal of Botany 84:1391-1397.*

Falconer, D. S., Mackay, T. F. C. (1996). Introduction to quantitative genetics. Longman, Essex, UK, 4th ed. edition.

Frankham R. (2003) Genetics and conservation biology. Comptes Rendus Biologies 326 :S22–S29.

*Franklin-Tong, V.E., Lawrence. M. J., Franklin. F.C.H. (1990) Self-incompatibility in *Papaver rhoeas* L.: inhibition of incompatible pollen tube growth is dependent on pollen gene expression. New Phytologist 116: 319–324.*

*Franklin-Tong, V.E., Ride, J.P., Read, N.D., Trewavas, A.J., Franklin, F.C.H. (1993) The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic-free calcium. The Plant Journal 4:163–177.*

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*. *The Plant Journal* **29**: 333–345.

Ganders, F.R. (1979) The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 607–635.

Gaude, T., Dumas, C. (1987) Molecular and cellular events of self-incompatibility. *International Review of Cytology* **107**:333-366.

Geitmann, A., Emons, A.M.C., Franklin-Tong, V.E. (2001). Early cellular events in pollen tubes during the self-incompatibility reaction. U: Geitmann, A., Cresti, M., Heath, I.B. (eds.) *Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth*, IOS Press, str. 203-219.

Gensel, P.G. (2008) The earliest land plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **39**:459-477.

Gibbs, P.E. (1990) Self-incompatibility in flowering plants: a Neotropical perspective. *Revista Brasileira de Botanica* **13**: 125–136.

Goodwillie, C. (2000) Inbreeding depression and mating systems in two species of *Linanthus* (Polemoniaceae). *Heredity* **84**: 283-293.

Golynskaya, E.L., Bashrikova, N.V., Tonchuk, N.N. (1976) Phytohaemagglutinins of the pistil of *Primula* as possible protiens of generative incompatibility. *Soviet Plant Physiology* **23**:169-176.

Golz, J.F., Su, V., Clarke, A.E., Newbigin, E. (1999) A molecular description of mutations affecting the pollen component of the *Nicotiana alata* S locus. *Genetics* **152**: 1123-1135.

Golz, J.F., Oh, H.Y., Su, V., Kusaba, M., Newbiggin, E. (2001) Genetic analysis of *Nicotiana* pollen-part mutants is consistent with the presence of an S-ribonuclease inhibitor at the S locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 15372-15376.

Gore, P.L., Potts, B.M., Volker, P.W., Megalos, J. (1990) Unilateral cross-incompatibility in *Eucalyptus*: the case of hybridisation between *E. globulus* and *E. nitens*. *Australian Journal of Botany* **38**: 383 - 394.

de Graaf, B.H.J., Vatovec, S., Juárez-Díaz, J.A., Chai, L., Kooblall, K., Wilkins, K.A., Zou, H., Forbes, T., Franklin, F.C.H., Franklin-Tong V.E. (2012) The *Papaver* self-incompatibility pollen S-determinant, PrpS, functions in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **22**: 154–159.

Grun, P., Radlow A. (1961) Evolution of barriers to crossing of self-incompatible with self-compatible species of *Solanum*. *Heredity* **16**: 137-144.

Haasen, K.E., Goring D.R. (2010) The recognition and rejection of self-incompatible pollen in the Brassicaceae. *Botanical Studies* **51**: 1-6.

Haffani, Y., Gaude, T., Cock, J., Goring, D. (2004) Antisense suppression of thioredoxin h mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. *Plant Molecular Biology* **55**: 619-630.

Hafzi, A., Shiran, B., Maleki, B., Imani, A., Banovic, B. (2013) Identification of new S-RNase self-incompatibility alleles and characterization of natural mutations in Iranian almond cultivars. *Trees Structure and Function* **27**:497–510.

Hancock, N. C., Kondo, K., Beecher, B., McClure B. (2003) The S-locus and unilateral incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Biological Sciences* **358**: 1133–1140.

Haring, V., Gray, J.E., McClure, B. A., Anderson, M. A., Clarke, A.E. (1990) Self-Incompatibility: A Self-Recognition System in Plants. *Science* **250**:937-941.

Hatakeyama, K., Watanabe, M., Takasaki, T., Ojima, K., Hinata, K. (1998) Dominance relationships between S-alleles in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Heredity* **80**:241–247.

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*. *The Plant Journal* **26**:69-76.

Harder, L.D., Cruzan, M.B., Thomson, J.D. (1993) Unilateral incompatibility and the effects of interspecific pollination for *Erythronium americanum* and *Erythronium albidum* (Liliaceae). *Canadian Journal of Botany* **71**: 353-358.

Hayman, D.L. (1992) The S-Z incompatibility system. In: Chapman, G.P. (ed.) Grass evolution and domestication. Cambridge University Press, Cambridge, str. 117-137.

Heslop-Harrison, J. (1975) Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Annual Review Plant Physiology* **26**:403-425.

Hiscock, S.J. (2002) Pollen recognition during the self-incompatibility response in plants. *Genome Biology* **3**:1004.1–1004.6.

Hörandl, E., Temsch, E.M. (2009) Introgression of apomixis into sexual species is inhibited by mentor effect and ploidy barriers in the *Ranunculus auricomus* complex. *Annals of Botany* **104**: 81-89.

<http://www.theplantlist.org> (2010) Royal Botanic Gardens, Kew, Missouri Botanical Garden.

Hua, Z.-H., Fields, A., Kao, T.-H. (2008) Biochemical models for S-RNase-based Self-incompatibility. *Molecular Plant* **1**: 575–585.

Husband, B.C., Schemske D. W. (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* **50**: 54-70.

Igic, B., Kohn, J.R. (2001) Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**:13167–13171.

Igic, B., Bohs, L., Kohn, J.R. (2004) Historical inferences from the self-incompatibility locus. *New Phytologist* **161**: 97–105.

Igic, B., Bohs, L., Kohn, J.R. (2006) Ancient polymorphism reveals unidirectional breeding system shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**: 1359–1363.

Igic, B., Lande, R., Kohn, J.R. (2008) Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *International Journal of Plant Sciences* **169**: 93-104.

Jain, S.K. (1976) The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **7**: 469-495.

Jansson, S., Douglas, C.J. (2007) *Populus*: A model system for plant biology. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 435-458.

Jesson, L.K., Milicich, L.D., Newman, S.C. (2006) Competition-dependent incompatibility in *Phormium tenax*: does self-fertilisation provide reproductive assurance? *New Zealand Journal of Botany* **44**: 249–259.

Joshi, B.K., Okuno, K., Ohsawa, R., Hara, T. (2006) Common buckwheat-based EST primers in the genome of other species of *Fagopyrum*. *Nepal Agricultural Research Journal* **7**: 27-36.

Jotaro, A., Nagano, M., Woo, S.H., Campbell, C. (1999) Development of SCAR markers linked to the *Sh* gene in buckwheat. *Fagopyrum* **16**:19-22.

Kao, T.-H., Tsukamoto, T. (2004) The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell* **16**: S72–S83.

Kakita, M., Murase, K., Iwano, M., Matsumoto, T., Watanabe, M., Shiba, H., Isogai, A., Takayama, S. (2007a). 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*. *The Plant Cell* **19**: 3961-3973.

Kakita, M., Shimosato, H., Murase, K., Isogai, A., Takayama, S. (2007b) Direct interaction between the S-locus receptor kinase and M-locus protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Plant Biotechnology* **24**:185-190.

Kalisz, S., Vogler, D.W., Hanley, K.M. (2004) Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* **430**: 884–887.

Kärkkäinen, K., Kuittinen, H., van Treuren, R., Vogl, C., Oikarinen, S., Savolainen, O. (1999) The genetic basis of inbreeding depression in *Arabis petraea*. *Evolution* **53**: 1354-1365.

Kato, M. (2010) Evolution of Primitive Land Plants: A Review. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B*, **36**:1–11.

Katsube-Tanaka, T., Khan, N., Takahashi, Y., Nakagawaa, M. (2011) Analysis of the major seed storage protein, 13S globulin, in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Proceedings of The 7th ACSA Conference*, str. 349-353.

Keller, L.F., Waller, D.M. (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* **17**: 230-241.

Kemp, B.P., Doughty, J. (2003) Just how complex is the *Brassica* S-receptor complex? *Journal of Experimental Botany (Plant Reproductive Biology Special Issue)*, **54**:157-168.

Kemp, B.P., Doughty, J. (2007) S cysteine-rich (SCR) binding domain analysis of the *Brassica* self-incompatibility S-locus receptore-kinase. *New Phytologist* **175**:619-629.

Kenrick, P., Crane, P.R. (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature* **389**: 33-39.

Kitashiba, H., Liu, P., Nishio, T., Nasrallah, J.B., Nasrallah, M.E. (2011) Functional test of *Brassica* self-incompatibility modifiers in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**:18173–18178.

Klaas, M., Yang, B., Bosch, M., Thorogood, D., Manzanares, C., Armstead I.P., Franklin, F.C.H., Barth, S. (2011) Progress towards elucidating the mechanisms of self-

incompatibility in the grasses: further insights from studies in *Lolium*. *Annals of Botany* **108**: 677–685.

Klein, A.-M., Vaissière, B. E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharnkte, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **274**: 303–313.

Klein, D. E., Freitas, L., Da Cunha, M. (2009) Self-incompatibility in a distylous species of Rubiaceae: is there a single incompatibility response of the morphs? *Sexual Plant Reproduction* **22**:121-131.

Konishi, T., Ohnishi, O. (2006) A linkage map for common buckwheat based on microsatellite and AFLP markers. *Fagopyrum* **23**: 1-6.

Korbecka, G., Vrieling, K., Squirrell, J., Hale, M. L., Wolff, K. (2003) Characterization of six microsatellite loci in *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Molecular Ecology Notes* **3**:274–276.

Kubo, K.-I., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A.M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S.-I., Ando, T., Isogai, A., Kao, T.-H., Takayama, S. (2010) Collaborative non-self recognition system in *S*-RNase-based self-incompatibility. *Science* **330**:796-799.

Kurian, V., Richards, A. J. (1997) A new recombinant in the heteromorphy 'S' supergene in *Primula*. *Heredity* **78**: 383–390.

Kusaba, M., Dwyer, K., Hendershot, J., Vrebalov, J., Nasrallah, J.B., 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*. *The Plant Cell* **13**: 627–643.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lande, R., Schemske, D.W. (1985) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* **39**: 24-40.

Larsen K. (1977) Self-incompatibility in *Beta vulgaris* L. I. Four gametophytic, complementary S-loci in sugar beet. *Hereditas* **85**: 227-248.

Lewis, D., Crowe, L.K. (1958) Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity* **12**: 233–256.

Li, J., Webster, M., Furuya, M., Gilmartin, P.M. (2007) Identification and characterization of pin and thrum alleles of two genes that co-segregate with the *Primula* S locus. *The Plant Journal* **51**:18-31.

Liu, Y.G., Whittier, R.F. (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**:674-681.

Liu, P., Sherman-Broyles, S., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B. (2007) A cryptic modifier causing transient selfincompatibility in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **17**: 734–740.

Lloyd, D.G. (1968) Partial unilateral incompatibility in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Evolution* **22**: 382-393.

Logacheva, M.D., Kasianov, A.S., Vinogradov, D.V., Samigullin, T.H., Gelfand, M.S., Makeev, V.J., Penin, A.A. (2011) De novo sequencing and characterization of floral transcriptome in two species of buckwheat (*Fagopyrum*). *BMC Genomics* **12**:30.

Lundqvist, A. (1964) The nature of the two-loci incompatibility system in grasses III. Frequency of specific incompatibility alleles in a population of *Festuca pratensis* huds. *Hereditas* **52**: 189–196.

Lynch, M. (1991) The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution* **45**: 622-629.

Mable, B.K., Robertson, A.V., Dart, S., Di Berardo, C., Witham, L. (2005) Breakdown of self-incompatibility in the perennial *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae) and its genetic consequences. *Evolution* **59**: 1437–1448.

Mable, B.K. (2008) Genetic causes and consequences of the breakdown of self-incompatibility : case studies in the Brassicaceae. *Genetics Research* (Camb) **90**: 47–60.

Manfield, I.W., Pavlov, V.K., Li, J., Cook, H.E., Hummel, F., Gilmartin, P.M. (2005) Molecular characterization of DNA sequences from the *Primula vulgaris* S-locus. *Journal of Experimental Botany* **56**:1177-1188.

Marshall, H.G. (1980) Buckwheat. U: Fehr W.R., Hadley H.H. (ed.) Hybridization of crop plants. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, str. 215-224.

Marshall, E., Costa, L.M., Gutierrez-Marcos, J. (2011) Cysteine-rich peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell–cell communication in plant reproduction and development. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1677–1686.

Martin, F.W. (1964) The inheritance of unilateral incompatibility in *Lycopersicon Hirsutum*. *Genetics* **50**: 459-469.

Mather, K., de Winton, D. (1941) Adaptation and counter-adaptation of breeding system in *Primula*. *Annals of Botany* **5**: 297-311.

Matton, D.P, Nass, N., Clarke, A.E., Newbigin, E. (1994) Self-incompatibility - how plants avoid illegitimate offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**:1992-1997.

Matsui, K., Tetsuka, T., Nishio, T., Hara, T. (2003) Heteromorphic incompatibility retained in self-compatible plants produced by a cross between common and wild buckwheat. *New Phytologist* **159**:701-708.

Matsui, K., Nishio, T., Tetsuka, T. (2004) Genes outside the *S* supergene suppress *S* functions in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Annals of Botany*. **94**:805-809.

Matsui, K., Nishio, T., Tetsuka, T. (2007) Use of self-compatibility and modifier genes for breeding and genetic analysis in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Japan Agricultural Research Quarterly* **41**:1-5.

McClure, B.A. (2004) *S*-RNase and SLF determine *S*-haplotype-specific pollen recognition and rejection. *The Plant Cell* **16**: 2840-2847.

McClure, B., Cruz-García, F., Romero, C. (2011) Compatibility and incompatibility in *S*-RNase-based systems. *Annals of Botany* (Review: part of a special issue on sexual plant reproduction): 1-12.

McCubbin, A. G., Lee, C., Hetrick, A. (2006) Identification of genes showing differential expression between morphs in developing flowers of *Primula vulgaris*. *Sexual Plant Reproduction***19**:63-72.

McCubbin, A. (2008) Heteromorphic self-incompatibility in *Primula*: twenty-first century tools promise to unravel a classic nineteenth century model system. U: Franklin-Tong, V.E. (ed.) Self-incompatibility in flowering plants - Evolution, diversity and mechanisms. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str. 289-308.

Miljuš-Đukić, J., Ninković, S., Maksimović, V., Radović, S., Brkljačić, J., Nešković, M. (1998) Effects of protein metabolism inhibitors on SI reaction in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). U: Campbell, C., and Przybylski, R. (ed.). Proceedings of the VII International Symposium on Buckwheat V, International Buckwheat Research Association, Winnipeg, str. 9-18.

Miljuš-Đukić, J., Ninković, S., Nešković, M. (2003) Effects of protein phosphatase inhibitors and calcium antagonists on self-incompatible reaction in buckwheat. *Biologia Plantarum* **46**: 475–478.

Miljuš-Đukić, J., Ninković, S., Radović, S., Maksimović, V., Brkljačić, J., Nešković, M. (2004) Detection of proteins possibly involved in self-incompatibility response in distylous buckwheat. *Biologia Plantarum* **48**:293-296.

Momma, M. (2009) Detection of dehydrin-like proteins in buckwheat by immunoblotting with an antibody against the lysine-rich sequence. *Reports of the National Food Research Institute* **7**: 1-6.

Ming, R., Wang, J., Moore, P. H., Paterson A. H. (2007) Sex chromosomes in flowering plants. *American Journal of Botany* **94**: 141–150.

Mráz, P. (2003) Mentor effects in the genus *Hieracium* s.str. (Compositae, Lactuceae). *Folia Geobotanica* **38**: 345-350.

Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F. S., Watanabe, M., Isogai A., Takayama, S. (2004) A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science* **303**: 1516-1519.

Nagano, M., Aii, J., Kuroda, M., Campbell, C., Adachi, T. (2001) Conversion of AFLP markers linked to the S^h allele at the *S* locus in buckwheat to a simple PCR based marker form. *Plant Biotechnology* **18**:191-196.

Nagano, M., Aii, J., Campbell, C., Adachi, T., Kawasaki, S. (2005) Construction of BAC library for the investigation of the *S* locus in buckwheat. *Fagopyrum* **22**:13-19.

Navascués, M., Stoeckel, S., Mariette, S. (2010) Genetic diversity and fitness in small populations of partially asexual, self-incompatible plants. *Heredity* (Edinb) **104**: 482–492.

Niroula, R.K., Bimb, H.P., Sah, B.P. (2006) Interspecific hybrids of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) regenerated through embryo rescue. *Scientific World* **4**:74-77.

Nomura, Y., Hatashita, M., Inoue, M. (2002) Production of self-compatible common buckwheat by ion exposure. *Fagopyrum* **19**: 43-48.

Ohnishi, O. (1991) Discovery of the wild ancestor of common buckwheat. *Fagopyrum* **II**: 5-10.

Olmstead, R.G., Bohs, L. (2007) A Summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. *Acta Horticulturae* (ISHS) **745**:255-268.

Ölschläger, C., Treutter, D., Zeller, F.J. (2004) Breeding Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) for flavonoids. *Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat*, Prague.

Onus, N.A., Pickersgill, B. (2004) Unilateral Incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): Occurrence and Taxonomic Distribution. *Annals of Botany* **94**: 289–295.

Ortega, E., Sutherland, B.G., Dicenta, F., Bošković, R., Tobutt, K.R. (2005) Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new *S*-alleles and correction of reported *S*-genotypes *Plant Breeding* **124**:188–196.

Pagnussat, G.C., Yu, H.-J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.-F., Ye, D., Sundaresan, V. (2005) Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* **132**:603-614.

Pan, S.-J., Chen, Q.-F. (2010) Genetic mapping of common buckwheat using DNA, protein and morphological markers. *Hereditas* **147**: 27–33.

Pandey, K.K. (1960) Evolution of gametophytic and sporophytic systems of self-incompatibility in angiosperms. *Evolution* **14**: 98-115.

Pandey, R., Mueller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W., Jorgensen, R.A. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **30**:5036-5055.

Porcher, E., Lande, R. (2005) Loss of gametophytic self-incompatibility with evolution of inbreeding depression. *Evolution* **59**: 46–60.

Puerta, A.R., Ushijima, K., Koba, T., Sassa, H. (2009) Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *Journal of Experimental Botany* **60**:1309–1318.

Radović S.R., Maksimović V.R., Varkonji-Gašić E.I. (1996) Characterization of buckwheat seed storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 972–974.

Reed D.H., Frankham R. (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* **17**:230–237.

Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S.-I., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, B.W., Barker, E., Bennetzen, J. L., Blankenship, R., Cho, S. H., Dutcher, S. K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D. R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P. J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.-H., Stueber, K., Theodoulou, F. L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A. C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B. D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano R. S., Boore J. L. (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**: 64–69.

Rieseberg, L.H. (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 351-358.

Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., Shen, Q.J. (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Sciences* **15**:247-258.

Safavian, D., Shore, J.S. (2010) Structure of styles and pollen tubes of distylous *Turnera joelii* and *T. scabra* (Turneraceae): are there different mechanisms of incompatibility between the morphs? *Sexual Plant Reproduction* **23**:225–237.

Sage, T.L., Sampson B.F. (2003) Evidence for ovarian self-incompatibility as a cause of self-sterility in the relictual woody angiosperm, *Pseudowintera axillaris* (Winteraceae). *Annals of Botany* **91**: 807-816.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual (2nd edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Samimy, C., Bjorkman, T., Siritunga, D., Blanchard, L. (1996) Overcoming the barrier to interspecific hybridization of *Fagopyrum esculentum* with *Fagopyrum tataricum* *Euphytica* **91**: 323-330.

Samuel, M.A., Chong, Y.T., Haasen, K.E., Aldea-Brydges, M.G., Stone, S.L., 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. *The Plant Cell* **21**:2655–2671.

Schopfer, C. R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J. B. (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**:1697-1700.

Schopfer, C.R., Nasrallah, J.B. (2000) Self-Incompatibility. Prospects for a Novel Putative Peptide-Signaling Molecule. *Plant Physiology* **124**:935-940.

Seavey, S.R., Bawa, K.S. (1986) Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *The Botanical Review* **52**: 195-219.

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 Physiology* **125**: 2095–2103.

Shiba, H., Takayama, S. (2012) Epigenetic regulation of monoallelic gene expression. *Development, Growth and Differentiation* **54**:120–128.

Shimosato, H., Yokota, N., Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Che, F., Watanabe, M., Isogai, A., Takayama, S. (2007) Characterization of the SP11/SCR high affinity binding site involved in self/nonself recognition in *Brassica* self-incompatibility. *The Plant Cell* **19**:109-117.

Shin, D.H., Kamal, A.H.M., Suzuki, T., Yun, U.H., Lee, M.S., Chuang, K.Y., Jeong, H.S., Park, C.H., Choi, J.S., Woo, S.H. (2010) Reference proteome map of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* and *Fagopyrum tataricum*) leaf and stem cultured under light or dark. *Australian Journal of Crop Sciences* **4**:633-641.

Shivanna, K.R., Heslop-Harrison, Y., Heslop-Harrison, J. (1982) The pollen-stigma interaction in the grasses. III. Features of the self-incompatibility response. *Acta Botanica Neerlandica* **31**: 307-319.

Shore, J.S., Arbo, M.M., Fernández A. (2006) Breeding system variation, genetics and evolution in the Turneraceae. *New Phytologist* **171**:539–551.

Silva, N.F., Goring, D.R. (2001) Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**:1988-2007.

Smith-Huerta, N.L., Vasek Madroño, F.C. (2011) Pollen siring success in the California wildflower *Clarkia unguiculata* (Onagraceae). *Madroño* **58**: 78-85.

Solbrig, O.T. (1976) On the relative advantages of cross and self-fertilization. Annals of the Missouri Botanical Garden 63: 262-276.

Soltis, P.S., Soltis D.E. (2004) The origin and diversification of angiosperms. American Journal of Botany 91: 1614–1626.

Sonneveld, T., Tobutt, K.R., Robbins, T.P. (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. Theoretical and Applied Genetics 107: 1059–1070.

Stebbins, G.L. (1957) Self fertilization and population variability in the higher plants. The American Naturalist 86: 337-354.

Stec, I., Nagl, S.B., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T. (2000) The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? FEBS Letters 473:1-5.

*Stein, J.C., Howlett, B., Boyes, D.C., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B. (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. The Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88: 8816–8820.*

*Stein, J.C., Dixit, R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B. (1996). SRK, the stigma-specific S locus receptor kinase of *Brassica*, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco. The Plant Cell 8:429–445.*

Steinbachs, J.E., Holsinger, K.E. (2002) S-RNase-mediated gametophytic self-incompatibility is ancestral in eudicots. Molecular Biology and Evolution 19: 825–829.

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. *The Plant Cell* **15**:885–898.

Sutherland, B.G., Tobutt, K. R., Robbins, T. P. (2008) Trans-specific S-RNase and SFB alleles in *Prunus* self-incompatibility haplotypes. *Molecular Genetics and Genomics* **279**: 95-106.

Takada, Y., Sato, T., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S. Watanabe, M. (2013) Involvement of MLPK pathway in intraspecies unilateral incompatibility regulated by a single locus with stigma and pollen factors. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **3**: 719-726.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K. (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigmas. *Nature* **403**: 913-916.

Takayama, S., Isogai, A. (2003) Molecular mechanism of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Journal of Experimental Botany (Plant Reproductive Biology Special Issue)* **54**: 149-156.

Takayama, S., Isogai, A. (2005) Self-incompatibility in plants. *Annual Review of Plant Biology* **56**:467-89.

Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Takayama, S. (2010) Trans-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature* **466**:983–986.

Thomas, S.M., Murray, B.G. (1975) A new site for the self-incompatibility reaction in the Gramineae. *Incompatibility Newsletter* **6**: 22-23.

Thompson, K.F., Taylor, J.P. (1966) Non-linear relationships between *S* alleles. *Heredity* **21**:345–362.

Thompson, K.F. (1972) Competitive interaction between two *S* alleles in a sporophytically-controlled incompatibility system. *Heredity* **28**:1-7.

Tsuwamoto, R., Fukuoka, H., Takahata, Y. (2008) GASSHO1 and GASSHO2 encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos. *The Plant Journal* **54**:30-42.

Vaughan, S.P., Russell, K., Sargent, D.J., Tobutt, K.R. (2006) Isolation of *S*-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype. *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 856–866.

Vaughton, G., Ramsey, M., Johnson S.D. (2010) Pollination and late-acting self-incompatibility in *Cyrtanthus breviflorus* (Amaryllidaceae): implications for seed production. *Annals of Botany* **106**: 547 –555.

Vallejo-Marin, M., Uyenoyama, M.K. (2004) On the evolutionary costs of self-incompatibility: incomplete reproductive compensation due to pollen limitation. *Evolution* **58**:1924–1935.

Watson, L., Dallwitz, M. J. (1992) The grass genera of the world. CAB International, Wallingford.

Watanabe, K., Shimizu, M., Adachi, T., Yoshida, T., Mitsunaga, T. (1998) Characterization of thiamin-binding protein from buckwheat seeds. *Journal of the Nutritional Science and Vitaminology* (Tokyo) **44**:323-328.

Weller, S.G., Ornduff, R. (1977) Cryptic self-incompatibility in *Amscinkia grandiflora*. *Evolution* **31**: 47-51.

Weller, S.G., Donoghue, M.J., Charlesworth, D. (1995) The evolution of self-incompatibility in flowering plants: a phylogenetic approach. U: Hoch, P.C., Stephenson, A.G. (eds.) Experimental and molecular approaches to plant biosystematics, **53**. Missouri Botanical Garden, St. Louis, str. 355–382.

Wheeler, M.J., de Graaf, B.H.J., Hadjiosif, N., Perry, R.M., Poulter, N.S., Osman, K., Vatovec, S., Harper, A., Franklin, F.C.H., Franklin-Tong, V.E. (2009) Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature* **459**: 992–995.

Widmer, A., Lexer, C., Cozzolino, S. (2009) Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* **102**: 31-38.

Woo, S.-H., Adachi, T., Jong, S.K., Campbell, C.G. (1999a) Inheritance of self-compatibility and flower morphology in an inter-specific buckwheat hybrid. *Canadian Journal of Plant Sciences* **79**:483-490.

Woo, S.H., Wang, Y.J., Campbell, C.G. (1999b) Interspecific hybrids with *Fagopyrum cymosum* in the genus *Fagopyrum*. *Fagopyrum* **16**: 13-18.

Woo, S.-H., Kim, S.-H., Tsai, K.S., Chung, K.-Y., Jong, S.-K., Adachi, T., Choi, J.-S. (2008) Pollen tube behavior and embryo development in interspecific crosses among genus *Fagopyrum*. *Journal of Plant Biology* **51**:302-310.

Wu, X., Li, A., Zhang, D. (2010) Cryptic self-incompatibility and distyly in *Hedyotis acutangula* Champ. (Rubiaceae). *Plant Biology* **12**:484-494.

Wu, J., Wang, S., Gu, Y., Zhang, S., Publicover, S.J., Franklin-Tong, V.E. (2011) Self-incompatibility in *Papaver rhoeas* activates nonspecific cation conductance permeable to Ca²⁺ and K^{+[W]}. *Plant Physiology* **155**: 963–973.

Xu, C., Min, J. (2011) Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* **2**: 202-214.

Yasui, Y., Wang, Y., Ohnishi, O., Campbell, C.G. (2004) Amplified fragment length polymorphism linkage analysis of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and its wild self-pollinated relative *Fagopyrum homotropicum*. *Genome* **47**:345-351.

Yasui, Y., Mori, M., Matsumoto, D., Ohnishi, O., Campbell, C.G., Ota, T. (2008) Construction of a BAC library for buckwheat genome research - an application to positional cloning of agriculturally valuable traits. *Genes and Genetics Systematics* **83**:393-401.

Yasui, Y., Mori, M., Aii, J., Abe, T., Matsumoto, D., Sato, S., Hayashi, Y., Ohnishi, O., Ota, T. (2012) *S*-locus early flowering 3 is exclusively present in the genomes of short-styled buckwheat plants that exhibit heteromorphic self-incompatibility. *PlosOne* **7**: 1-8.

Zluvova. J., Nicolas, M., Berger, A., Negrutiu, I., Monéger F. (2006) Premature arrest of the male flower meristem precedes sexual dimorphism in the dioecious plant *Silene latifolia*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**: 18854–18859.

8. DODATNI MATERIJAL

PRILOG A. Genomske sekvence heljde bliske *S*-lokusu dobijene umnožavanjem pomoću prajmera izvedenih iz AFLP N₇ markera (pogledati u **Tabeli 2**), koji je blisko vezan *S*^h alelu *S*-lokusa heljde (**P**, sekvence genomske DNK "pin" biljke; **T**, sekvence genomske DNK "tram" biljke).

P11> 704bp

```
GAAATCACCCATGGAGTAAGTGTGCTAGGATAGTTGCTTAGAACTTCCCTTTCCGAGACTTACCCGGTAAGGA
TAGGTTAGACCTCTAGGCAACAAATCCGGTTTGTGTAGAATTCCAATCCTTAGGTTCTTAGAGACTTACCCGG
TAACGAGACCTTAAGAATGGATTAGCGGACCATGAGACTTACCAGGTGATTGATCCCCTTCATAAACACTTA
CTCCCGACATATCATAGATCACCCAAGGAATGATTAGATAGCTTGAGTCCTATGCCATAATCGGAATTTCCAA
CCCCTAGAATCCGTTTCTCTCTTTTGTATTCATATCTCGTGTGTTAGCTTGTCTTTGTTTTGATTCATTAGCT
TAGTTGATTGCTTACTTTTACATGAATGTGATCCTTGATTGATCACTTAAAACCAACCAAAAACAATTGAGA
TTTTCATTTCTTTATTTCTTTCTCATTTCTTAACTTAGATCTTCACTAGACTTAATCATAAACCGAATCAATC
TCACCTTAGTCTTTGTGTTTCGACCTCGGAATACTATCCACACTACGAACGTCCCGTACACTGCGGGTGCGCTA
GGAGTTAGGAGAAATATAACGAGTATAAATTTAAGACTTATTGTGCACACATCCTGAGCGTAACAAGACCTAC
CCGGTGATTAATCCAATCTAGAAACACTTACTCCATGGGTGATTTTC
```

P125> 397bp

```
CACCCATGGAGTAAGTGTTCCTCAAAGGACGTTTATAATCATACTTGTAATGATTGAATTTGCACATGACACAA
ACTTAATAATTTAGAAAGCTCATGTGACATTTTATTCTAAAATCAGTCAATAATGTGTTTGTATTCCGTTTTTA
GTTGTGGATTTCGAGGTAATATTTATTTTCGCCTCATTTTTATAATAACTTTTGTACGTGGAGTGATTTTTTTAGT
GGACTTGAAGTGGCGGAACGAGATGATTTTTTCAGCATGCGTCTTTTGTGCGGGATTGACATCGGCACATGCTT
GCTACGGCTAATGAGTATTGTTAAGCTTGAATAAGAAGCATCTTATGAGAATTCACGACGTCCGATTACTT
TGATGGCTTGGGAAACACTTACTCCATGGGTG
```

P134> 255bp

```
GAAATCACCCATGGAGTAAGTGTGCTAGGATAGTTGCTTAGAACTTCCCTTTCCGGGACTTACCCGGTAAGGA
TAGGTTAGACCTCTAGGCAACAAATCCGGTTTGTGTAGAATTCCATTCCTTAGGTTCTTAGAGACTTACCCGG
TAACGAGACCTTAAGAATGGATTAGCGGACCATGAGACTTACCAGGTGATTGATCCCAATCTAGAAACACTCA
CTCCAACATATTGCACTTACTCCATGGGTGATTTTC
```

P21> 875bp

```
CACCCATGGAGTAAGTGTTCCTCAAACAAACAAAGTTATATCCTCGTCAAAAATTTAAAATCATCTTCTACAATA
GTTATACAACCAGAATCCTGCGATTTTCATCTTTTTTAGGACATTCGTTATTTCAATGCCTTTTTTCTTTACAAT
AGTTACAAACATCATTCAGCTTATGACCTTTTGAAGAAGACAATTTATTGTCCTTCTTCTTCTTGGATTTTTTC
TTGTTCCCTTGCCCTTCACTTGTAAACATTCATATGCTTGATTGTCCTTTACCTATACCACCTTTCATTCACCCCT
GTGGCATAGTTCCCTTGTATGAAGGGCAAACCTTGATGTCTACTAGAATAATAGTATCTTTTCCAACAATATAT
```

TATTGAACGAAGTTTTTATATGATGACGGTAGAGATACCAACATATTAATCAACGAAACATCCTTGTCTCAA
CCTTAACCTTAATATTCAAATCTAGAAGAATTGTGTTCAAGTGATCTAAGTGTTACGAAATTGCGTACCTTC
TTCCATTCGAAGGTTGAACATAAGCTACTTTAGAAGTTAATATGAGACTTCATCGTGTAGAGGCTCTCCAAC
TCAACCATAGTTTGGTTACGATGTTGATCTGAAACCTCACATAAGACATCATTTGTGAGAAACATCATGAT
GGTTGAATGTACCTTGTCTCCTTAGTGACCATCTCAACAACATCGTCCTTTTCCCTTATCGGATTCCTTTTTG
ACAATAAACCCGTAAGCATTGTTGTTTCTACAAAGCTAACATCTTGATTTACCATATACTGAAACTGTCTCT
TTGTGAACCTCTCGATCTCATGTTGAAAGAAGACATATTTCTCTAGATTACAGAATACAAAAAAAAAAGAC

P212> 375bp

CACCCATGGAGTAAGTGTTCATTAAGCATCTTAACTGTAGGGCATAACCACGTCTTATTACAAATCGATCTT
ATCTTCTTTGCTCTCCCGTCAATCCAACATGTTGGGGGAGTCTTTGTATTCCACCTAAGCTTGCATCATT
CTTCGAGTACGTGTAGAACTACTTCATTTCTTATGTAACATCAATCCGACCGTAGAGGTTCTAGCCTCAAT
TTTTATATGCTTCTTGTACATCTCATATCGACATCATACTTCAAGACTTCAGTCTTCTCTTACTCTGGTTGGT
CGCCATATACATCTCTCGGTATCCCATAAACACTCCATAACCGTACCAGTATGCCCTGTGGGAAACACTTAC
TCCATGGGTG

P333> 255bp

GAAATCACCCATGGAGTAAGTGTGCTAGGATAGTTGCATAGAACTTCCCTTTCCGAGACTTACCCGGTAAGGA
TAGGTTAGACCTCTAGGCAACAAATCCGGTTTGTGTAGAATTCCAATCCTTAGGTTCTCAGAGACTTACCCGG
TGATAAGATCTTAGGAACGGATTAGTGGATCATGAGACCTACCCGGTGATTGATCCCAATCTAGAAACACTCA
CTCCAACATATTGCACTTACTCCATGGGTGATTTT

P43> 292bp

GCCAAACATCTCGCGTACCAGAAAACCTAGAAGATGATAACTTTAGTAGATGAATCAAAGCTGTACCATTTTG
TATGCATGATTTATTGGATCAACTTAGGGTGAAACCATGATTTTACTGCAAATTAGTACTATTTATCATGAA
AGGAAATAAAATCTGAAATACATGAATTGTGATTAGCATTGTTGACATTAGACGCAACAAATCTAGCCAAAA
ACTTGATATGTTCTTTCTGTTTTCTCATGGCTTCTCCTTCTTTCTTCTCGCCTGGTACGCGAGATGTTTGGC

P53> 274bp

TCGCGTACCAGAGGGTGTGCAAACCATAAAAAAGGAGCAATTTGGCTGCCATGCATGAATTTCAAACATAAGCA
CAAATGATTTGATCCTACCAAAACCAAATCAAAGTGTTCACAAAACACTCTTCTTTAGTTTTAGTGATTTCTT
GATATTAATTTAGGTAATGCCACAAGAAATCAAGTAAATGGAATTAATTCATAGGTAATAGATACATGCGTCA
GCTTGTGCTTATTAGACTCCTTTTTATCCCCTTAGGCACACCCTCTGGTACGCGA

T11> 782bp

GAAATCACCCATGGAGTAAGTGGAGCAAATTTGGATAGTTAGTTAGGAAGAAGATCCTAGAAGGAGGTGATTCA
GAAACTCGACGTAGAGCTACCTCGAGTGGGTTGTCTTCTTGGTTGAGTGAGCTTCTCGTGAGCCTCGAGTTG
TTCCACCGATTATCTTGTACTCTTTGCTCGAGTGTCTTGTCTTCTTCTCTCGAGTTTTTGTGTCTTGTTTGC
TCAAGTAATGATGTAAACTCGAGAGATGTGGATAAATATGGACTTTGGGCTTCTTTGCTCGAGTGGATGTGTA
CTCTTTGCTCGAGTAAAAGTCACTTGGGGTACCACCTCAAGCAACGCTGAATTTTCTACAGCTCATGTCTTAT
TTGGTAGAGTGAAGTGTCTTCGTTGCTCGAGTGATGATGTAAACTCGAGCTTAGTTCGAGAAATTCCTCTCCGA
TGCTTCTTTTCTCGAGTCAAACCTTCTCTTTGCTCGAGTTTGGCTTCACTTAATGCTCCAACCTTCGGGTTT
CCTTAGCTCCATCGTCTCAAGTGATGATGTAAACTCAAGCTTAGTTGAAAAATATTTTCTTCCCACAAAGACT
GTTAAAAATATGGAGAAGATTTCTCACTTCGACATGGAGGATGGTGAGAATATCTACTCAGAATGGGAGATAT

TAATGACCTATTGCATTCTTGTCCTCACCGTGGATTTGAAATGGGAGCAATTCTTGAATATATTTATAGTGGT
TTGAATGACACTACAAGAAATCGTTTTTATACCACTTACTCCATGGGTGATT

T22> 375bp

CACCCATGGAGTAAGTGTTCATTAAGCATCTTAACTGTAGGGCATAACCACGTCTTATTACAAATCGATCTT
ATCTTCTTTTGCTCTCCCGTCAATCCCAACATGTTGGGGGAGTCTTTGTATTCCACCTAAGCTTGCATCATT
CTTCGAGTACGTGTAGAACTACTTCATTTCTTATGTAACATCAATCCGACCGTAGAGGTTCTAGCCTCAAT
TTTTATATGCTTCTTGACATCTCATATCGACATCATACTTCAAGACTTCAGTCTTCTTACTCTGGTTGGT
CACCATATACATCTCTCGGTATCCCATAAAACACTCCATAACCGTACCAGTATGCCCTGTGGGAAACACTTAC
TCCATGGGTG

T31> 876bp

GGAGACCATGCGCTCTACAACCAAGGACTTTATCCACCTGTGTTGCATATGGACAAAAACAATTTCAATTAGA
ACAACCTCGAAGCATTTTCGTTGCCAAAAACAGAACACAAAGGTGTATAAAGATAGAATTATGTACTTGGAAAG
CTAAAACAGATAACACAGGAAATGGTATTAGATTCTAAAAGTGTGAATGATTAATCTGCACAAATATGTATAG
AAGAATTTCTTTGTGCCTGTGTTAGGCCTCACAGAAGAACTTTAGCTTCTTAGTGGCGAAAGGAAAGAGCGTA
CAAAGATAGACTGCTTTGTTTTTAAAAATTTGGCATCACAAATGAGTAGGTTGGTGAATCTACCTGCAGAGAA
TCTTCAAGAGAAATCACTTCAGACAAAGACTGTTTTTCAGCTCTAACTCTTCGGACCAATCCATGTGACGGAT
TCTCTTCTTGAATAACCTTCAATGCGAAAAAGAAACAGTTGTCCATGTGACCATATTAATCAAACAGGAGAAAA
CCAATTTGTGAATAAAAAACGATTTCACTTTTTGAAGAGCTAGCTAATGACAGATAGGCAGAGAACAGAAATGAT
GACATGTAAACCTCTCTTCGGACTACCAAATTCACACATTTGGAGCCTTATGCTTTTTTCATCTATCTTCCCTCG
TCCTTACTACTCCTAAAATAGAGAAGACTGAACATCCACATCCTCATTTTCCAGATTGGAAAAGAACAAAATG
GAAAACCATGAACAAGTGAACACGTGGCACTCTATGTTTGATGCAGCACTATCAAATTAACATGCAAAGGC
ATTGAAACAATAAGCCTCTTATAAATAGTGGTCAAAATCATTTTGTAGAGCGCATGGTCTCCAATCACTAGTGT

T313> 328bp

GGAGACCATGCGCTCTACAAGAGATTGGGAGGTGCTCTTTCGACCCAGACCCACTAGTAACGGATAGATGCATA
TGATCTATTTCATGTCGTTAAAGGGGACAAGGGCGAGTTTCGGAATATTCCCCTGTGAGAAAATAAGTTGAATT
AGTAATCTGGATAACCTAATGAAAGATAAATAACCGGATGTTGTGTGAGCATGCTAGGTGTTTTATGTTAGCTT
ATGTGTGTATGTTTATTGTTGTTATTCTGATATATGGAACGTTAGCTAACGGTTTTATCCGCCGTTGTAGATG
TCTTGCAGGTTAAGAGTTGTAGAGCGCATGGTCTCC

T44> 340bp

TGTCGACTGAGATGAACAGAAATGGTAGAACATTGAGATTGAGATCACAAAACAAGCAATCACGCGAAATAAA
CCAATCAAAATCCAACCTCTCTCAATTTCTCTCTCCATTCTTCGAAAAACCGAAAACACCTTTGCCATCAA
CCCTAAGCAAAGATCTCTTCTTAACTACTCAAACCTCATCTTATTGATTTTCACTCTCTTCTCCTACCCACC
GACGATCTGGATCTGCACTGGTGGTACACTTTCTTCCCCTACTCAACTCGTTTTACTTTTTTTTTCTTCTAGT
TCTTACGATTTGGATTGGATCTGGTTTTCTGGTACCGGAGATGTTTGGC

T55> 448bp

CCAGAGGGTGTGCTAGTTTGGAGTTATAGTTCTAAAGCATGATTCCCTTGAGACTTACCCGGTAATAGGAGTTA
CGGTTTAGGATTAGTGTGTAGTGAGACTTACCCGGTGATCTACTCCACTTTAGTAACACCTTCCCCACGCAA
AATCTCAGCTTTGTCCGCTTATCTATAGATCTTGAGTTGGAACCACAACCTAGATGCTTTAATCCCTAGAATTG
CATGTTTGCCTTATTGACTTCTTATTCATCTTTGATTGTGTTAATCGCTCTTGTGGTTAGAATTAACGTAGCA
TACCGTATTGACTCTGTTTACCCGAGTCCCTGTGATCGACCCCTGGAATTTTCTTGCTTTTACTACGATTGAC
CCGTACACTGCGGGTTCGCATCCTTGTTTTTAAGCTTAAGTCTAGGGTTATAAATTTAAAGCTTGCACACCCTC
TGGTACGCGA

PRILOG B. Pregled proteina koji su u 2D-profilima detektovani kao specifični za "pin"/"tram" polen, "pin"/"tram" neoprašene tučkove, odnosno specifični za inkompatibilno/kompatibilno oprašene "pin"/"tram" tučkove. Za svaki protein navedene su njegove osnovne karakteristike dostupne iz 2D-profila: izoelektrična tačka, molekulska masa, identifikacioni broj i relativna zapreminska zastupljenost u uzorku, kao i vrsta uzorka u kojoj je detektovan.

Redni broj	Identif. br. proteina	Molekulska masa (kDa)	Izol. tačka	Relativna zastupljenost proteina (% ukupne zapremine)	Uzorak/gel
1	1423	~17	~8.40	0.76	Neoprašeni "pin" tučak
2	1421	~17	~8.70	0.79	Neoprašeni "pin" tučak
3	1434	~11	~7.70	0,20	Neoprašeni "pin" tučak
4	1417	~41	~9.25	0,79	Neoprašeni "pin" tučak
5	1428	~39	~9.28	0,54	Neoprašeni "pin" tučak
6	1419	~45	~8.27	0.03	Neoprašeni "pin" tučak
7	1435	~45	~8.40	0.10	Neoprašeni "pin" tučak
8	326	~41	~8.00	0.36	Neoprašeni "pin" tučak
9	322	~41	~8.10	0.16	Neoprašeni "pin" tučak
10	1429	~39	~8.20	0.30	Neoprašeni "pin" tučak
11	277	~45	~8.60	0.36	Neoprašeni "pin" tučak
12	1427	~41	~8.90	0.41	Neoprašeni "pin" tučak

Redni broj	Šifra proteina	Molekulska masa (kDa)	Izol. tačka	Relativna zastupljenost proteina (% ukupne zapremine)	Uzorak/gel
13	344	~39	~8.50	0.10	Neoprašeni "pin" tučak
14	1418	~55	~8.60	0.06	Neoprašeni "pin" tučak
15	462	~31	~8.80	0.10	Neoprašeni "pin" tučak
16	1414	~29	~8.40	0.95	Neoprašeni "pin" tučak
17	1415	~29	~8.75	0.79	Neoprašeni "pin" tučak
18	569	~26	~7.00	0.04	"Pin" polen
19	564	~26	~5.40	0.12	"Pin" polen
20	540	~27	~5.50	0.08	"Pin" polen
21	501	~30	~6.00	0.40	"Pin" polen
22	235	~44	~8.20	0.31	"Pin" polen
23	233	~44	~8.45	0.22	"Pin" polen
24	273	~43	~8.30	0.17	"Pin" polen
25	514	~28	~5.70	1.01	"Pin" polen
26	355	~16	~7.41	0.08	Neoprašeni "tram" tučak
27	357	~16	~7.20	0.09	Neoprašeni "tram" tučak
28	367	~25	~5.30	0.14	Neoprašeni "tram" tučak

Redni broj	Identif. br. proteina	Molekulska masa (kDa)	Izol. tačka	Relativna zastupljenost proteina (% ukupne zapremine)	Uzorak/gel
29	285	~20	~5.90	0.35	Neoprašeni "tram" tučak
30	370	~16	~5.70	0.29	Neoprašeni "tram" tučak
31	263	~22	~5.40	2.10	Neoprašeni "tram" tučak
32	269	~22	~5.80	0.42	Neoprašeni "tram" tučak
33	244	~26	~6.50	0.04	Neoprašeni "tram" tučak
34	216	~28	~6.65	1.31	Neoprašeni "tram" tučak
35	386	~24	~5.50	0.03	Neoprašeni "tram" tučak
36	252	~24	~5.30	0.01	Neoprašeni "tram" tučak
37	249	~24	~6.40	0.007	Neoprašeni "tram" tučak
38	245	~25	~6.50	0.04	Neoprašeni "tram" tučak
39	376	~35	~6.40	0.04	Neoprašeni "tram" tučak
40	455	~23	~7.30	0.02	"Tram" polen
41	435	~29	~6.75	0.04	"Tram" polen
42	177	~31	~8.30	0.19	"Tram" polen
43	159	~32	~7.50	0.40	"Tram" polen
44	155	~32	~7.65	0.20	"Tram" polen
45	142	~32	~7.70	0.16	"Tram" polen

Redni broj	Identif. br. proteina	Molekulska masa (kDa)	Izoel. tačka	Relativna zastupljenost proteina (% ukupne zapremine)	Uzorak/gel
46	457	~22	~7.70	0.04	"Tram" polen
47	170	~12	~4.90	1.23	"Pin" AI
48	160	~12	~4.70	1.08	"Pin" AI
49	126	~17	~9.20	12.14	"Pin" AI
50	257	~14	~6.20	0.24	"Pin" AI
51	220	~13	~7.50	0.15	"Pin" AI
52	155	~13	~5.80	2.78	"Pin" AI
53	111	~20	~6.00	2.02	"Pin" AI
54	191	~18	~5.75	0.92	"Pin" AI
55	238	~26	~7.00	0.65	"Pin" AI
56	204	~23	~5.80	0.11	"Pin" AI
57	189	~21	~5.70	1.02	"Pin" AI
58	186	~28	~7.00	0.31	"Pin" AI
59	221	~16	~5.10	0.24	"Pin" AI
60	127	~17	~4.75	1.04	"Pin" AI
61	140	~14	~5.90	3.45	"Pin" AI

Redni broj	Identif. br. proteina	Molekulska masa (kDa)	Izol. tačka	Relativna zastupljenost proteina (% ukupne zapremine)	Uzorak/gel
62	231	~14	~4.30	0.72	"Tram" AI
63	183	~22	~7.30	2.30	"Tram" AI
64	192	~23	~6.30	0.70	"Tram" AI
65	193	~22	~6.13	0.76	"Tram" AI
66	284	~19	~7.80	0.22	"Tram" AI
67	286	~22	~6.65	0.23	"Tram" AI
68	281	~15	~9.00	0.32	"Tram" AI
69	282	~16	~9.00	0.17	"Tram" AI
70	294	~14	~8.90	0.30	"Tram" AI
71	258	~15	~8.00	0.37	"Tram" AI
72	181	~13	~5.65	3.00	"Tram" AI
73	293	~13	~4.10	0.29	"Tram" AI
74	182	~15	~5.60	1.84	"Tram" AI
75	194	~19	~6.80	0.71	"Tram" AI
76	190	~22	~4.80	1.02	"Tram" AI
77	269	~22	~4.70	0.46	"Tram" AI

Redni broj	Identif. br. proteina	Molekulska masa (kDa)	Izol. tačka	Relativna zastupljenost proteina (% ukupne zapremine)	Uzorak/gel
79	202	~20	~4.50	0.75	"Tram" AI
80	180	~17	~4.25	5.10	"Tram" AI
81	179	~20	~5.25	5.37	"Tram" AI
82	223	~21	~5.30	0.38	"Tram" AI
83	206	~15	~5.30	1.03	"Tram" AI
84	247	~15	~4.90	0.36	"Tram" AI
85	2701	~11	~3.80	0.07	Kompatibilno oprušen "pin"
86	3324	~10	~4.15	0.20	Kompatibilno oprušen "pin"
87	3328	~10	~4.20	0.91	Kompatibilno oprušen "pin"
88	3327	~10	~4.58	2.50	Kompatibilno oprušen "pin"
89	3326	~9	~5.00	0.98	Kompatibilno oprušen "pin"
90	747	~43	~9.25	0.28	Kompatibilno oprušen "pin"
91	745	~43	~9.35	0.23	Kompatibilno oprušen "pin"
92	744	~37	~9.90	0.11	Kompatibilno oprušen "pin"
93	3305	~10	~8.50	0.80	Kompatibilno oprušen "pin"
94	784	~39	~8.30	0.18	Kompatibilno oprušen "pin"

Redni broj	Identif. br. proteina	Molekulska masa (kDa)	Izol. tačka	Relativna zastupljenost proteina (% ukupne zapremine)	Uzorak/gel
95	815	~37	~9.10	0.11	Kompatibilno oprušen "tram"
96	800	~37	~8.80	0.11	Kompatibilno oprušen "tram"
97	828	~36	~8.40	0.11	Kompatibilno oprušen "tram"
98	801	~36	~8.00	0.06	Kompatibilno oprušen "tram"
99	748	~36	~7.80	0.10	Kompatibilno oprušen "tram"
100	760	~34	~5.75	0.17	Kompatibilno oprušen "tram"
101	333	~30	~5.90	1.66	Kompatibilno oprušen "tram"
102	335	~32	~6.80	0.72	Kompatibilno oprušen "tram"
103	336	~32	~7.00	1.11	Kompatibilno oprušen "tram"

Biografija

Bojana G. Banović, rođena je 1979. god. u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je 2005. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, odsek Genetičko inženjerstvo i biotehnologija, sa temom: "Kloniranje i sekvenciranje gena *S-RNaze Prunus webbii*". Za diplomski rad dobila je 2005 god. i nagradu "Fondacije Goran Ljubijankić" za najbolji diplomski rad. Eksperimentalni deo diplomskog rada uradila je u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, u kojoj je i je zaposlena od 2006 god. kao istraživač-pripravnik. Iste godine upisala je postdiplomske studije iz Molekularne biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Zvanje istraživač-saradnik stiče 2009 god. Do sada je objavila osam radova, od toga tri u vrhunskim međunarodnim časopisima, dva u tematskim zbornicima od međunarodnog značaja i tri u međunarodnim časopisima. Pored toga angažovana je i na planu popularizacije nauke, kroz saradnju sa Regionalnim centrom za Talente Beograd II i manifestaciju Noć istraživača.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Бановић Г. Бојана _____

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларна основа ауто-инкомпатибилног система хељде (*Fagopyrum esculentum*

Moench)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Бојана Г. Бановић _____

Број индекса _____ IO 060036 _____

Студијски програм _____ Молекуларна биологија _____

Наслов рада _____ Молекуларна основа ауто-инкомпатибилног система хељде
(*Fagopyrum esculentum* Moench) _____

Ментори др Јованка Миљуш-Ђукић виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство и др Светлана Радовић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

Потписани/а _____ Бојана Г. Бановић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекуларна основа ауто-инкомпатибилног система хељде (*Fagopyrum esculentum* Moench)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.