

## BIĄŁKA ZNAMION *Festuca pratensis* HUDS.<sup>1</sup>

Andrzej Kalinowski, Marek Radłowski, Elżbieta Borzyszkowska

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

### Wstęp

Znamię słupka działa jak ekran akceptujący lub odrzucający pyłek i bierze w tej interakcji aktywny udział. Pierwszy kontakt w przypadku znamienia wilgotnego zachodzi pomiędzy wydzieliną znamienia, a substancjami płaszczu pyłkowego (ang. pollen coat, pollen kit or tryphine). Pod pojęciem płaszczu pyłkowego rozumie się związki zdeponowane na powierzchni i w zagłębieniach egzyny. W przypadku znamion typu suchego, spotykanego m.in. u traw, bezpośredni kontakt musi być poprzedzony działaniem kutynaz i esteraz pyłkowych, hydrolizujących obecną na powierzchni znamienia warstwę kutikuli [SHIVANA i in. 1978]. Zarówno w znamionach typu wilgotnego jak i suchego zaobserwowano wysoki polimorfizm białkowy [MIKI-HIROSHIGE i in. 1987; KALINOWSKI i in. 1996]. Dużą część wysokocząsteczkowych białek znamion zidentyfikowano jako glikoproteiny odpowiedzialne za zjawisko samonieżgodności [BREDEMEIJER, BLASS 1981; FERRARI i in. 1981; TAN, JACKSON 1988; NASRALLAH, NASRALLAH 1994; HEARN i in. 1996].

Cytoplazmatyczne białka pyłku i te zdeponowane w intynie są wynikiem ekspresji genomu haploidalnego, natomiast białka obecne w płaszczu pyłkowym są syntetyzowane jeszcze w tapetum, transportowane do egzyny oraz przestrzeni między egzyną a intyną, w ostatnich stadiach formowania się dojrzałego pyłku [HESLOP-HARRISON i in. 1973; VITHANAGE, KNOX 1979]. W płaszczu i ścianach pyłku znajdują się liczne enzymy hydrolityczne takie jak esterazy, kutynazy, proteazy, amylazy, pektynazy i pektynoesterazy, których izozymy różnią się ruchliwością elektroforetyczną i punktami izoelektrycznymi [LAVITHIS, BHALLA 1995; RADŁOWSKI i in. 1996; RADŁOWSKI 1998]. Głównym zadaniem tych enzymów jest dostarczanie energii i prekursorów budulcowych dla rosnącej łagiewki pyłkowej oraz ułatwienie jej wrastania w tkankę słupka.

W pierwszym etapie interakcji pyłek-znamię biorą udział zarówno specyficzne białka płaszczu pyłkowego jak i białka znamion. Sugeruje się, że niektóre z enzymów pyłkowych są uaktywniane przez związki pochodzące ze znamienia [HESLOP-HARRISON, HESLOP-HARRISON 1975]. Asocjacje tego typu między białkami (peptydami) znamion i pyłku wydają się być powszechne i często uważane za jeden z elementów mechanizmu nieżgodności [ROBERTS i in. 1980; DUMAS, GAUDE

<sup>1</sup> Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN P 06A 004 14.

1981; RADŁOWSKI i in. 1996].

W zjawisku samoniezdgodności, w zależności od obiektu badań stwierdzono udział kinaz serynowo-treoninowych (gen *SRK*), glikoprotein (gen *SLG*), rybonukleaz (S-RNazy) i sygnału wapniowego [HARING i in. 1990; NEWBIGIN i in. 1993; NASRALLAH i in. 1994a; 1994b; RUDD i in. 1996; NASRALLAH 2000]. Za samoniezdgodność w przypadku roślin dwuliściennych odpowiedzialny jest jeden poligen S, natomiast u traw wydaje się ona być pod kontrolą dwóch poligenów – S i Z [BAUMAN i in. 2000].

Płaszcz pyłkowy wraz z zawartymi w nim białkami można usunąć przez płukanie pyłku w izotonicznym roztworze mannitolu nie uszkadzając protoplastu [HOWLETT i in. 1975]. Nasze doświadczenia nad odmywaniem frakcji białkowej ścian pyłkowych różnych gatunków roślin wykazały, że równie skuteczne jest użycie izotonicznego roztworu sacharozy (KALINOWSKI dane niepublikowane).

Celami pracy było zbadanie polimorfizmu białkowego w pojedynczych znamionach *F. pratensis* HUDS., określenie wpływu eluatu ścian pyłku z tej samej rośliny na peptydy znamienia i ich udział w samoniezdgodności oraz zbadanie oddziaływań proteaza/niskocząsteczkowy związek ze znamienia i pyłku w mechanizmie niezgodności.

## Materiał i metody

Do analiz białek pojedynczych znamion zastosowano metodę mikro-izoelektroogniskowania (M-IEF). Z dziesięciu odmian *F. pratensis* wyselekcjonowano osobniki samoniezdgodne, które poddano powtórnemu testowi w warunkach samozapylenia i z nich do dalszych badań wybrano trzy osobniki. W początkowym okresie kwitnienia z każdego osobnika pobierano trzysta słupków i przetrzymywano je przez 48 godzin w wyrównanych warunkach kultury *semi vivo*. Z tych samych osobników zbierano też dojrzały pyłek. Białka ścian i płaszcz pyłkowego odmywano poprzez delikatne wytrząsanie mikrogametofitów w 15% sacharozie przez 30 min. Uzyskane eluaty z pyłku wyselekcjonowanych roślin zawierały średnio 560  $\mu\text{g}$  białka na ml oznaczanego metodą BRADFORDA [1976]. Na znaniona nanoszono po 1  $\mu\text{l}$  odpowiedniego eluatu (0,5  $\mu\text{g}$  białka), pozwalając na dwugodzinne wzajemne oddziaływanie w temp. pokojowej. Traktowane i nietraktowane znamiona jak i pozostałą część eluatu ścian pyłku przechowywano w  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Pojedyncze znamiona homogenizowano w wodnym roztworze dithiotreitolu (1%) z detergentem Nonidet NP-40 (0,002%). Surowym ekstraktem nasączano skrawki z bibuły filtracyjnej (2  $\times$  2 mm) i nakładano na 5% żel poliakrylamidowy (0,4  $\times$  26  $\times$  70 mm), zawierający Servalyt o zakresie pH 3–10 [MULCAHY i in. 1981; KALINOWSKI i in. 1998]. Rozdzielone na drodze 26 mm metodą mikro-izoelektroogniskowania białka wybarwiano azotanem srebra [HEUKESHOVEN, DERNICK 1985], a otrzymane prążki odczytywano za pomocą densytometru laserowego Ultrosan XL. Na podstawie sporządzonych w ten sposób elektroforegramów białek z pojedynczych znamion i eluatów pyłkowych każdego osobnika, rysowano elektroforegramy syntetyczne, uwzględniające wszystkie wykryte prążki tak dla znamion jak i dla eluatów ścian pyłku.

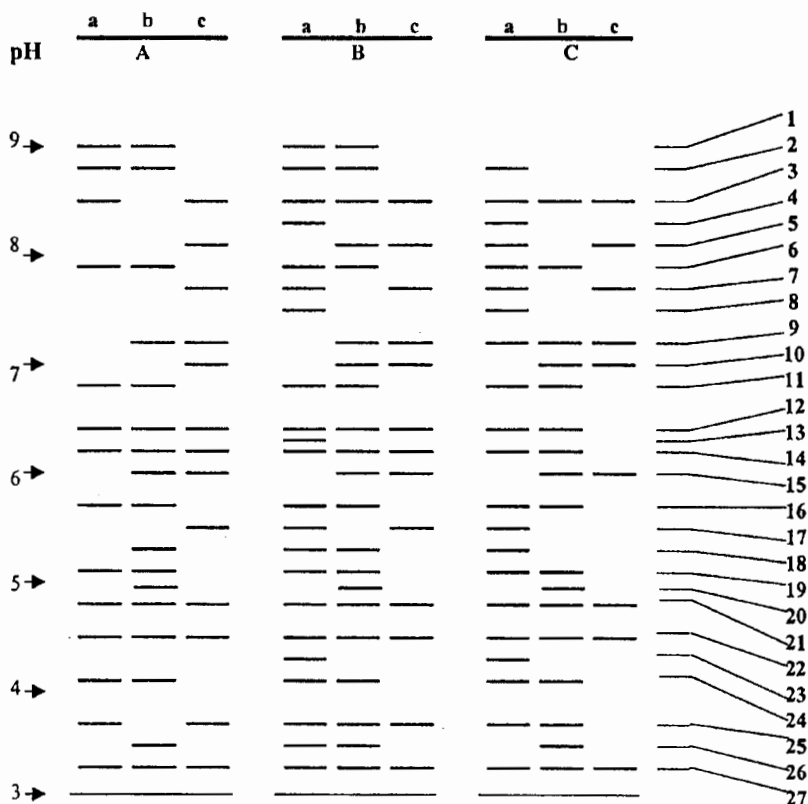
Metodą zminiaturyzowanej 2-D elektroforezy (M-2-D) rozdzielano ekstrakty białkowe otrzymane metodą HURKMAN i TANAKA [1986]. Każdorazowej ekstrakcji poddawano dwadzieścia traktowanych i nietraktowanych eluatem znamion,

pochodzących z jednego, wyselekcjonowanego osobnika. W przypadku mikroga-metofitu analizowano eluat otrzymany z przemycia 4 mg pyłku. W pierwszym kierunku rozdział prowadzono w kolumnkach (0,55 × 60 mm) żelu poliakrylo-amidowego (PAGE) z Servalitem o zakresie pH 3–10, a w drugim kierunku (siarczan dodecylosodowy – PAGE) w 13% płytach poliakryloamidowych o wymiarach 0,5 × 60 × 60 mm [HOCHSTRASSER i in. 1988; KALINOWSKI i in. 1999]. Po rozdziałach, podobnie jak w przypadku M-IEF, białka wybarwiano azotanem srebra, a do analizy obrazów użyto programu Image Master 2-D Elite (Amers-ham Pharmacia Biotech.).

W doświadczeniach nad proteazami użyto znamion *Festuca pratensis* i *Zea mays* L. oraz ich pyłek, a także pyłek innych roślin z rodziny *Poaceae* (*Lolium multiflorum* LAM., *Festulolium*, *Dactylis glomerata* L., *Secale cereale* L., *Triticale*), *Solanaceae* (*Nicotiana glauca* LINK & OTTO), *Compositae* (*Helianthus annuus* L.) i *Liliaceae* (*Hemerocallis fulva* L.). Ekstrakcję frakcji białkowej (źródło enzymów proteolitycznych) i frakcji związków o niskiej masie cząsteczkowej, w której spodziewano się obecności efektorów aktywności proteaz, prowadzono podczas jed-nej procedury. Otrzymane ekstrakty nakładano na kolumnę Sephadex G-25 (1 × 12 cm) oddzielając obie frakcje od siebie. W reakcji proteolitycznej jako substrat stosowano kazeinę znakowaną izotiocyanianem fluoresceiny (FITC-kazeina). Hydrolizę prowadzono 3 godz. w temp. 37°C. W eksperymentach użyto ponadto następujących proteaz i ich inhibitorów: proteinaza K, pepsyna, trypsyna, chymo-trypsyna, pronaza R, pronaza CB, leupeptyna, pepstatyna, kwas jodoctowy i 1,10 fenantrolina. Do frakcjonowania metodą wysokociśnieniowej chromatografii cie-czowej (HPLC) użyto kolumny Econosil (C<sub>18</sub>), wymywając z niej naniesioną próbkę gradientem acetonitrylu 0,1–30% przy szybkości przepływu 1ml na min.

## Wyniki

Metodą mikro-izoelektroogniskowania z pojedynczych traktowanych i nie-traktowanych eluatem ścian pyłkowych znamion oraz z frakcji otrzymanej w wyni-ku przemywania ścian pyłku rozdzielono dwadzieścia siedem białek, których punkty izoelektryczne (pI) odpowiadały pH od 3,2 do 9,0 (rys. 1). W obrębie „populacji” znamion każdego z samonieźgodnych osobników obserwowano poli-morfizm białkowy. Po potraktowaniu znamion eluatem ścian pyłku z tego samego osobnika zaobserwowano zmiany jakościowe, polegające na zaniku niektórych i wystąpieniu nowych białek. W traktowanych znamionach osobnika A w porów-naniu ze znamionami nietraktowanymi zanikły te białka, które posiadały punkty izoelektryczne w pH 3,6 i 8,5 natomiast pojawiły się trzy o pI w pH 3,4; 5,2 i 7,2. W traktowanych eluatem znamionach osobnika B nie wykryto trzech peptydów, których pI odpowiadało wartościom pH 4,3; 6,2 i 6,9, natomiast pojawiły się trzy nowe o pI w pH 3,9; 7,0 i 7,2. Te dwa samonieźgodne osobniki (nie uzyskano ani jednego ziarna po samozapyleniu) zostały wyselekcjonowane z odmiany Skra. Ze znamion samonieźgodnego osobnika C (odmiana Limosa) zanikło po potraktowa-niu eluatem ścian własnego pyłku aż osiem białek o punktach izoelektrycznych w pH 3,6; 4,2; 5,2; 5,4; 7,5; 7,7; 8,1; 8,3 i 8,8, natomiast pojawiły się dwa nowe białka o punktach izoelektrycznych pH 3,4 i 6,9. Tylko w traktowanych eluatem pyłkowym znamionach wszystkich trzech samonieźgodnych osobników wykryto peptyd o punkcie izoelektrycznym w pH 5,0.



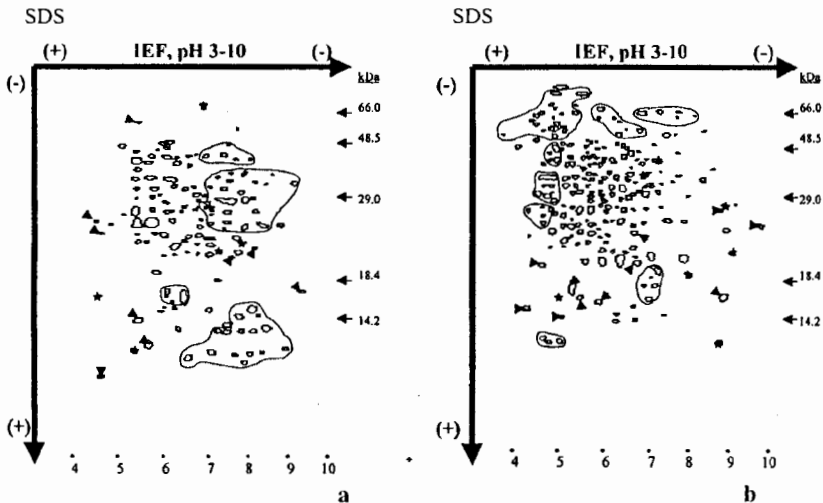
Rys. 1. Syntetyczne elektroforegramy białek dla pojedynczych znamion trzech osobników *F. pratensis* po rozdzielach metodą mikroelektroogniskowania (a – znamiona, b – znamiona po potraktowaniu eluatem ścian i płaszczka pyłkowej, c – płaszcz pyłkowy)

Fig. 1. General electrophoregrams of proteins from single stigmas of three *F. pratensis* individuals after separations by micro isoelectric focusing (a – stigma, b – stigma after treatment with pollen coat and walls exudate, c – pollen coat)

Metodą zminiaturyzowanej 2-D elektroforezy stwierdzono, że w przypadku każdego z wyselekcjonowanych osobników obrazy białek 2-D z nietraktowanych i traktowanych znamion różniły się liczbą wybarwionych peptydów. Obserwowano również wyraźne różnice jakościowe (rys. 2).

U osobnika A z dziewięćdziesięciu czterech peptydów obecnych w nietraktowanych znamionach dwadzieścia jeden nie wykryto w znamionach traktowanych eluatem ścian pyłkowych tego samego osobnika, np. białka o MW 42, 47 i 59 kD i odpowiednio o punktach izoelektrycznych w pH 7,8; 6,0 i 6,0, niskocząsteczkowe o MW poniżej 14,2 kD i pI w pH 6,3, 6,4; 7,6; 7,8 i 8,3, a także jedenaście peptydów o MW od 15 do 27 kD (szeroki zakres pH). Po naniesieniu eluatu ścian własnego pyłku wykryta liczba peptydów w znamionach wzrastała do sto osiemdziesiąt jeden, z czego czterdzieści pięć było nowymi białkami, począwszy

od niskocząsteczkowych, np. trzynastu o MW poniżej 13 kD rozdzielonych niemal w całym zakresie pH, trzech wysokocząsteczkowych o MW 52, 58 i 72 kD (pI odpowiednio w pH 4,8; 4,9 i 5,9) i innych o średnich masach cząsteczkowych i punktach izoelektrycznych w pH od 3,3 do 9,2. Pozostałe czterdzieści dwie plamki zostały również wykryte we frakcji ścian pyłkowych. Tylko dziewięć peptydów wystąpiło zarówno w traktowanych i nietraktowanych znamionach (brak ich we frakcji ścian pyłkowych).



Rys. 2. Białka znamion (a) i znamion po uprzednim traktowaniu eluatem płaszcza ścian własnego pyłku (b) *F. pratensis* – osobnik C. Zaznaczone plamki odpowiadają peptydom charakterystycznym

Fig. 2. Proteins of stigmas (a) and stigmas after treatment with eluate of own pollen walls (b) *F. pratensis*, individual C. Characteristic peptides were marked

Spośród sześćdziesięciu dwóch peptydów znamion osobnika B dwadzieścia siedem nie obserwowano w traktowanych eluatem ścian pyłku znamionach m.in. dwanaście o MW od 46 do 70 kD (pI w pH 4,8–6,6), cztery o MW od 24 do 26 kD (pI w pH 6,1–6,5) oraz niskocząsteczkowce o MW poniżej 13 kD (pI w pH 4,8; 5,6 i 6,9). W potraktowanych eluatem ścian z pyłku tej samej rośliny znamionach okazało się, że z pięćdziesięciu dziewięciu peptydów, dwadzieścia jeden było charakterystyczne (pozostałe wykryto także we frakcji ścian pyłku) m.in. pięć o masach cząsteczkowych od 44 do 47 kD (pI w pH 4,9–5,2), siedem o MW od 33 do 38 kD (pI w pH 4,8–5,5) czy pięć niskocząsteczkowych o MW poniżej 13 kD i punktach izoelektrycznych w pH 4,3; 4,7; 4,8; 5,1 i 8,9.

Ze stu trzydziestu dziewięciu peptydów znamion osobnika C sześćdziesiąt sześć nie wykryto w znamionach traktowanych eluatem ze ścian pyłkowych, takich jak np. dwadzieścia dziewięć o MW od 25 do 37 kD (pI w pH 7,0–9,2), cztery o MW 41–48 kD (pI w pH 7,0–8,1), piętnaście wysokocząsteczkowych o MW 56 kD (pI w pH 7,8), 58 kD (pI w pH 5,4) i 70 kD (pI w pH 6,9). Tylko w potraktowanych eluatem pyłkowym znamionach wykryto takie białka jak: np. dwadzieścia jeden o MW 42–47 kD (pI w pH 3,7–5,4), siedem o MW od 52–67 kD (pI w

pH 5,8–6,8), pięć o MW 62–66 kD (pI w pH 6,9–8,1), dziewięć o masach cząsteczkowych poniżej 18 kD, rozdzielonych w pH 4,2–8,7.

We wszystkich trzech przypadkach tylko w traktowanych eluatom pyłkowym znamionach wykryto pięć peptydów o następujących parametrach: 13 kD (pI w pH 8,9), 17kD (pI w pH 9,0), 13 kD (pI w pH 4,9), 12,5 kD (pI w pH 5,1) i peptyd o masie 16,5 kD (pI w pH 7,1).

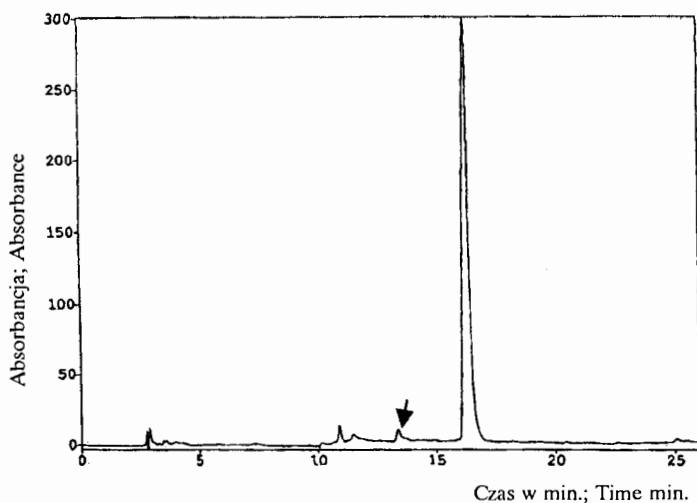
Rozdzielone frakcje, białkowa (o aktywności proteolitycznej) i frakcja związków o niskiej masie cząsteczkowej (źródło ewentualnych efektorów) ze znamion i pyłku *F. pratensis* testowano w reakcji proteolizy w układzie homo- i heterologicznym (frakcja białkowa ze znamion, frakcja niskocząsteczkowa z pyłku i odwrotnie) nie stwierdzając istotnych różnic w aktywności enzymatycznej. Kiedy jednak do frakcji enzymatycznej ze znamienia *F. pratensis* dodawano frakcje niskocząsteczkowe z pyłków roślin rodziny *Poaceae* (siedem gatunków) obserwowano bardzo znaczący wzrost aktywności proteazy znamienia (320–680%), który nie zależał od czasu preinkubacji. Podobne frakcje z pyłków roślin należących do innych rodzin (*Nicotiana alata* – *Solanaceae*, *Helianthus annuus* – *Compositae*, *Hemerocallis fulva* – *Liliaceae*) nie miały podobnych własności (tab. 1). Enzym ze znamienia kukurydzy (roślina kontrolna) w obecności frakcji niskocząsteczkowej z pyłku *F. pratensis* również zwiększał szybkość hydrolizy substratu (około 400%). Stosując specyficzne inhibitory enzymów proteolitycznych ustalono, że oba enzymy ze znamienia należą do grupy metaloproteinaz, uważanej za najstarszą grupę proteaz. Frakcje niskocząsteczkowe, które tak wydawnie wzmagają działanie proteaz ze znamion *F. pratensis* i kukurydzy, nie miały żadnego wpływu na aktywność enzymów, w tym również metaloproteinaz. Próby stwierdzenia czy efektor (-y) z pyłku rodziny *Poaceae* jest peptydem, nie pozwalają w chwili obecnej na jednoznaczne potwierdzenie. Trawienie enzymami z innych organizmów, a następnie rozdzielanie metodami chromatograficznymi i testowanie otrzymanej frakcji niskocząsteczkowej w reakcji proteolizy przyniosło bardzo rozbieżne wyniki. Dzięki zastosowaniu metody wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) udało się wyodrębnić z ekstraktu pyłkowego kukurydzy związek (lub niewielką grupę związków), który po zagęszczeniu powodował 10-krotny wzrost aktywności proteazy ze znamienia *Festuca pratensis* (rys. 3).

Tabela 1; Table 1

Wpływ obecności frakcji związków o niskiej masie cząsteczkowej z pyłków różnych roślin na aktywność enzymów proteolitycznych ze znamion *Festuca pratensis*

Influence of low molecular weight compounds fraction from pollen grains of different species on activity of proteolytic enzymes from *Festuca pratensis* stigmas

Gatunek; Species	Stymulacja w %; Stimulation %
<i>Festuca pratensis</i> HUDS.	0
<i>Lolium multiflorum</i> LAM.	375
<i>Festulolium</i>	322
<i>Dactylis glomerata</i> L.	547
<i>Secale cereale</i> L.	434
<i>Triticale</i>	466
<i>Zea mays</i> L.	680
<i>Nicotiana alata</i> LINT & OTTO	0
<i>Helianthus annuus</i> L.	0
<i>Hemerocallis fulva</i> L.	0



Rys. 3. Profil elucji związków o niskiej masie cząsteczkowej z pyłku kukurydzy w kolumnie Econosil (HPLC). Strzałka wskazuje frakcję stymulującą aktywność enzymów proteolitycznych ze znamion *Festuca pratensis*

Fig. 3. Elution profile of low molecular weight compounds from pollen grains of maize in Econosil column (HPLC). Arrow shows the fraction stimulating activity of proteolytic enzymes from *Festuca pratensis* stigmas

## Dyskusja

Przeprowadzone analizy elektroforetyczne potwierdzają istnienie polimorfizmu białek ze znamion jednego osobnika *F. pratensis*. Wcześniej polimorfizm białek ze znamion stwierdzono u *Lolium multiflorum* [MIKI-HIRISHIGE 1987], w znamionach i ich wydzielinach u *Nicotiana glauca* [KALINOWSKI i in. 1999] i różnych gatunków o suchych i wilgotnych znamionach [KALINOWSKI i in. 1996]. Istnienie polimorfizmu białkowego wynika z heterozygotyczności utrzymywanej u samonieżądnych roślin.

W traktowanych eluatom ścian własnego pyłku znamionach, po rozdzielaniu metodą M-IEF obserwowano nowe białka, nieobecne w nietraktowanych znamionach i w eluacie ścian pyłku. Ponadto w traktowanych znamionach nowe białka miały często te same punkty izoelektryczne co białka ścian pyłkowych, ale jak stwierdzono w analizach porównawczych nie były one peptydami frakcji ścian pyłkowych. Nie mogły być one wykryte ze względu na zbyt małą ilość (0,5 µg) nanoszonych na znamiona białek ścian.

W traktowanych eluatom ścian pyłkowych znamionach zaobserwowano zmiany jakościowe w porównaniu z znamionami nietraktowanymi. Zanik grup peptydów w traktowanych znamionach niewątpliwie związany jest z działaniem pyłkowych enzymów hydrolitycznych. Po zetknięciu mikrogametofitu ze znamieniem ten pierwszy uwalnia z płaszczu i ścian enzymy hydrolityczne, wśród nich proteazy [RADŁOWSKI 1998]. Zanik wielu peptydów znamion po potraktowaniu ich eluatom ścian pyłku jednoznacznie wskazuje na intensywne działanie enzymów proteolitycznych. Jeden z nich, obecny w pyłku *Zea mays* L., trawi białka znamie-

nia w sposób wysoce wybiórczy [RADŁOWSKI i in. 1996], można więc przypuszczać że pojawianie się nowych peptydów w traktowanych znamionach (np. o niskich masach cząsteczkowych) jest efektem specyficznej hydrolizy wysokocząsteczkowych białek przez proteazy z eluatu pyłkowego *F. pratensis*.

Obecne tylko w traktowanych eluatom ścian pyłkowych znamionach białka (jedno po rozdzielach M-IEF, pięć po M 2-D elektroforezie) wiązać należy ze zjawiskiem samoniezgodności. Na tle danych literaturowych najprawdopodobniej są to glikoproteiny o zbliżonych masach cząsteczkowych [ROBERTS i in. 1980; DUMAS, GAUDE 1981; SCHOPFER i in. 1999; NASRALLAH 2000].

Powodem badań relacji enzym proteolityczny-niskocząsteczkowy efektor podczas interakcji pyłek-znamię u *Festuca pratensis* było: 1) regulacyjna rola tego typu oddziaływań w wielu procesach fizjologicznych u roślin; 2) konserwatywność procesów proteolitycznych w komórkach różnych organizmów; 3) brak uniwersalnego modelu samo- i niezgodności na poziomie molekularnym; 4) wykrycie i oczyszczenie proteaz z pyłku kilku gatunków roślin; 5) różnice w specyficzności działania enzymów proteolitycznych z pyłku w porównaniu z enzymami z tkanki diploidalnej. Przypuszczano więc, że oddziaływania proteaza-efektor ze znamienia i pyłku może odgrywać istotną rolę w mechanizmach rozpoznawania lub odrzucania mikrogametofitu przez tkankę diploidalną.

W przeprowadzonych doświadczeniach nad proteazami znamion i pyłku w żadnym przypadku nie zaobserwowano inhibującego wpływu frakcji związków o niskiej masie cząsteczkowej ekstrahowanych z tych źródeł, co jest najczęściej spotykanym efektem tego rodzaju oddziaływań. Otrzymane wyniki potwierdzają udział enzymów proteolitycznych w interakcji pyłek-znamię w rodzinie *Poaceae*. Wzmaganie aktywności proteaz znamienia *F. pratensis* w obecności niskocząsteczkowej frakcji z pyłków innych roślin tylko z rodziny traw może stanowić jeden z elementów mechanizmu niezgodności. Odpowiedź na pytanie czy podobnego typu relacje występują także w obrębie roślin innych rodzin wymaga dalszych badań.

## Wnioski

1. Metody elektroforetyczne w połączeniu z zamianą białek płaszczą i ścian pyłku pozwalają na identyfikację peptydów znamienia zaangażowanych w procesie samoniezgodności u *Festuca pratensis*.
2. Zanikanie peptydów znamienia jak i pojawianie się „nowych” białek w następstwie interakcji z eluatem własnego pyłku można wiązać z intensyfikacją działania proteaz pyłkowych.
3. Interakcja proteaz znamienia *Festuca pratensis* z niskocząsteczkową frakcją z pyłków roślin z rodziny *Poaceae* może być istotnym elementem mechanizmu niezgodności.

## Literatura

- BAUMAN U., JUTTNER J., BIAN X., LANGRIDGE P. 2000. Self-incompatible in the grasses. *Ann. Bot.* 85(A): 203–209.
- BRADFORD M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram



quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.

BREDEMEIJER G.M.M., BLAAS J. 1981. *S*-specific proteins styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theor. Appl. Genet.* 59: 185–190.

DUMAS C., GAUDE T. 1981. *Stigma-pollen recognition: a new look*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 50: 235–247.

FERRARI T.E., BRUNS D., WALLACE D.H. 1981. *Isolation of plant glycoprotein involved with control of intercellular recognition*. *Plant Physiol.* 67: 270–277.

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.

HEARN M.J., FRANKLIN F.C.H., RIDE J.P. 1996. *Identification of a membrane glycoprotein in pollen of Papaver rhoeas which binds stigmatic self-incompatibility (S-) proteins*. *Plant J.* 9: 467–475.

HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y. 1975. *Enzymic removal of the proteinaceous pellicle of the stigma papilla prevents pollen tube entry in the Caryophyllaceae*. *Ann. Bot.* 39: 163–165.

HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y., KNOX R.B., HOWLETT B. 1973. *Pollen-wall proteins: gametophytic and sporophytic fractions in the pollen walls of the Malvaceae*. *Ann. Bot.* 37: 403–412.

HEUKESHOVEN J., DERNICK R. 1985. *Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining*. *Electrophoresis* 6: 103–112.

HOCHSTRASSER D.F., HARRINGTON M.G., HOCHSTRASSER A.-C., MILLER M.J., MERRILL C.R. 1988. *Methods for increasing the resolution of two-dimensional proteins electrophoresis*. *Anal. Biochem.* 173: 424–435.

HOWLETT B.J., KNOX R.B., PAKSTONS J.B., HESLOP-HARRISON J. 1975. *Pollen-wall proteins: physicochemical characterization and role in self-incompatibility in Cosmos bipinnatus*. *Proc. R. Soc. London B.* 188: 167–182.

HURKMAN W.J., TANAKA C.H. 1986. *Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis*. *Plant Physiol.* 81: 802–806.

KALINOWSKI A., DOLEŻAL K., RADŁOWSKI M., KLIMKO M., BARTKOWIAK S. 1998. *Variability of proteins from single microgametophyte in two lines of maize and their hybrids*. *Biol. Bull. Poznań, Genetics* 35: 75–83.

KALINOWSKI A., RADŁOWSKI M., BARTKOWIAK S. 1996. *Proteins from stigma exudate*. *Genet. Pol.* 37A: 163–165.

KALINOWSKI A., RADŁOWSKI M., WINIARCZYK K., BORZYSZKOWSKA E. 1999. *Białka pojedynczych znamion i ich wydzielin u Nicotiana glauca Link et Otto*. *Bibliotheca Fragm. Agronom.* 6: 23–29.

LAVITHIS M., BHALLA P.L. 1995. *Esterases in pollen and stigma of Brassica*. *Sex. Plant Reprod.* 8: 289–298.

MIKI-HIROSHIGE H., HOEK I.H.S., NAKAMURA S. 1987. *Secretions from the pistil Lolium longiflorum*. *Am. J. Bot.* 74: 1709–1715.

MULCAHY D.L., ROBINSON R.W., IHARA M., KESSELI R. 1981. *Gametophytic transcription for acid phosphatases in pollen of Cucurbita species hybrids*. *J. Hered.* 72: 353–354.

- NASRALLAH J.B. 2000. *Cell-cell signaling in the self-incompatibility response*. *Curr. Op. Plant Biol.* 3: 368–373.
- NASRALLAH J.B., NASRALLAH M.E. 1994. *Electrophoretic heterogeneity exhibited by the S-allele specific glycoproteins of Brassica*. *Experientia* 40: 279–281.
- NASRALLAH J.B., RUNDLE S.J., NASRALLAH M.E. 1994a. *Genetic evidence for the requirement of the Brassica S-locus receptor kinase gene in the self-incompatibility response*. *Plant J.* 5: 373–384.
- NASRALLAH J.B., STEIN J.C., KANDASAMY M.K., NASRALLAH M.E. 1994b. *Signaling the arrest of pollen tube development in self-incompatible plants*. *Science* 226: 1505–1508.
- NEWBIGIN E., ANDERSON M.A., CLARKE A.E. 1993. *Gametophytic self-incompatibility system*. *Plant Cell* 5: 1315–1324.
- RADŁOWSKI M. 1998. *Enzymy hydrolityczne pyłku i łagiewki pyłkowej ze szczególnym uwzględnieniem proteaz*. Wydawn. Nauk. UAM, Poznań: 63 ss.
- RADŁOWSKI M., KALINOWSKI A., ADAMCZYK J., KRÓLIKOWSKI Z., BARTKOWIAK S. 1996. *Proteolytic activity maize pollen wall*. *Physiol. Plantarum* 98: 172–178.
- ROBERTS I.N., STEAD A.D., OCKENDON D.J., DICKINSON H.G. 1980. *Pollen stigma interactions in Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 58: 241–246.
- RUDD J.J., FRANKLIN F.CH., LORD J.M., FRANKLING-TONG V.E. 1996. *Increased phosphorylation of a 26 kD pollen proteins is induced by the self-incompatibility response in Papaver rhoeas*. *Plant Cell* 8: 713–724.
- SHIVANA K.R., HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y. 1978. *The pollen-stigma interaction: bud pollination in the Cruciferae*. *Acta Bot. Neerl.* 27: 225–228.
- SCHOPFER C.R., NASRALLAH M.E., NASRALLAH J.B. 1999. *The male determinant of self-incompatibility in Brassica*. *Science* 286: 1697–1700.
- TAN L.W., JACKSON J.F. 1988. *Sigma proteins of the two loci self-incompatible grass Phalaris coerulescens*. *Sex. Plant Reprod.* 1: 25–27.
- VITHANAGE H.I.M.V., KNOX R.B. 1979. *Pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in sunflower, Helianthus annuus L.* *Ann. Bot.* 44: 95–106.

**Słowa kluczowe:** *Festuca pratensis*, białka, mikroisoelektrofocusing, 2-D elektroforeza, enzymy proteolityczne

### Streszczenie

Metodami elektroforetycznymi badano polimorfizm peptydów znamienia oraz wpływ eluatu ścian pyłku na ich udział w samoniezgodności na przykładzie trzech, wyselekcjonowanych osobników *Festuca pratensis*. Jednocześnie określano zaangażowanie oddziaływań proteaza/niskocząsteczkowe związki ze znamienia i pyłku w mechanizmach niezgodności.

Metodą M-IEF w pojedynczych znamionach *F. pratensis*, znamionach traktowanych eluatem ścian pyłku i w eluacie pyłkowym wykryto 27 peptydów. Jeden z nich o punkcie izoelektrycznym (pI) w pH 5,0 wykryto w znamionach traktowanych eluatem pyłkowym. Metodą dwukierunkowej elektroforezy w traktowa-

nych eluatom znamionach stwierdzono obecność pięciu peptydów o MW 13 kD (pI w pH 8,9), 17 kD (pI w pH 9,0), 13 kD (pI w pH 4,9), 12,5 kD (pI w pH 5,1) i peptyd o MW 16,5 kD (pI w pH 7,1). Wyżej wymienione białka należy wiązać ze zjawiskiem samoniezgodności. Obiema metodami wykazano, że w traktowanych znamionach zachodziły istotne zmiany jakościowe polegające na zaniku pewnych grup i pojawianiu się tzw. „nowych” peptydów.

Stwierdzono, że aktywność enzymów proteolitycznych znamienia *F. pratensis* wzrasta bardzo znacznie (320–680%) w obecności frakcji niskocząsteczkowej z pyłków innych roślin rodziny *Poaceae*. Frakcja niskocząsteczkowa z pyłku *F. pratensis*, a także z pyłków roślin należących do innych rodzin nie posiadała takich własności. Zaobserwowana zależność może odgrywać rolę w procesie niezgodności.

### STIGMA PROTEINS OF *Festuca pratensis* HUDS.

Andrzej Kalinowski, Marek Radłowski, Elżbieta Borzyszkowska  
Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań

Key words: *Festuca pratensis* HUDS., proteins, micro-isoelectricfocusing, 2-D electrophoresis, proteolytic enzymes

#### Summary

The influence of pollen coat and walls fraction on stigma proteins of the three self-incompatible individuals of *Festuca pratensis* was investigated by microslab isoelectric focusing and miniaturised two-dimensional gel electrophoresis methods. The contribution of proteolytic enzyme – low molecular weight effector interaction from pollen and stigma to incompatibility was investigated.

Twenty seven peptides were detected in single stigmas before, after treatment with pollen wall fraction and in pollen eluate by microslab isoelectric focusing. One of them with isoelectric point (pI) at pH 5.0 was found only in treated stigmas. Five peptides: MW 13 kD (pI at pH 8.9), 17 kD (pI at pH 8.9), 17 kD (pI at pH 9.0), 13 kD (pI at pH 4.9), 12.5 kD (pI at pH 5.1) and 16.5 kD (pI at pH 7.1) were detected only in treated stigmas after two-dimensional gel electrophoresis. Both electrophoretic method showed qualitative changes in protein spectras of stigmas after treatment with pollen eluate.

It was found that the activity of proteolytic enzymes from stigmas of *Festuca pratensis* increased by (320–680%) at presence of low molecular weight compound fraction from pollen of the other species of *Poaceae* family. The same fractions from pollen of *Festuca pratensis* and pollen of different families did not influence on hydrolytic properties of these proteases. The effect observed may be an element of incompatible response.

Dr Andrzej Kalinowski  
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk  
ul. Strzeszyńska 34  
60-479 POZNAŃ  
e-mail: akal@igr.poznan.pl