

배추과 작물의 자가불화합성 유전자의 발현 및 조절

박종인 · 이인호 · Masao Watanabe · 노일섭

Expression and regulation of self-incompatible genes in *Brassica*

Jong-In Park · In-Ho Lee · Masao Watanabe · Ill-Sup Nou

Received: 31 March 2010 / Accepted: 10 April 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In most self-incompatible plant species, recognition of self-pollen is controlled by a single locus, termed the *S*-locus. The self-incompatibility (SI) system in *Brassica* is controlled sporophytically by multiple alleles at a single locus, designated as *S*, and involves cell-cell communication between male and female. Two highly polymorphic *S* locus genes, *SLG* (*S* locus glycoprotein) and *SRK* (*S* receptor kinase), have been identified, both of which are expressed predominantly in the stigmatic papillar cell. Gain-of-function experiments have demonstrated that *SRK* solely determines *S* haplotype-specificity of the stigma, while *SLG* enhances the recognition reaction of SI. The sequence analysis of the *S* locus genomic region of *B. campestris* (syn. *rapa*) has led to the identification of an anther-specific gene, designated as *SP11/SCR*, which is the male *S* determinant. Molecular analysis has demonstrated that the dominance relationships between *S* alleles in the stigma were determined by *SRK* itself, but not by the relative expression level. In contrast, the expression of *SP11/SCR* from the recessive *S* allele was specifically suppressed in the *S* heterozygote, suggesting that the dominance relationships in pollen were determined by the expression level of *SP11/SCR*. Furthermore, recent studies on recessive allele-specific DNA methylation of *Brassica* self-incompatibility alleles demonstrate that DNA

methylation patterns in plants can vary temporally and spatially in each generation. In this review, we firstly present overview of self incompatibility system in *Brassica* and then describe dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility regulated by allele-specific DNA methylation.

Keywords *S* haplotype, *SRK*, *SP11/SCR*, Dominance relationships, DNA methylation

서론

생식은 생물에 있어서 종의 보존을 위한 필수적 기능이다. 생식기능이 진화하여 상호간에 교배가 불가능하게 변이하였을 때 종이 분화되고 이러한 과정에서 양성화와 단성화의 기능적 역할담당이 구분되었을 것이다. 양성화는 꽃의 구조상 자식 (selfing)할 가능성이 높다. 자식을 피하기 위하여 피자식물은 자가불화합성과 같은 기능을 발달시키고 있다. 자가불화합성을 가진 식물은 정상으로 기능하는 자성·웅성기관을 가지고 있음에도 불구하고 자가화분은 수정을 못 이룬다. 자가불화합성 현상의 상세한 관찰이 Darwin에 의해 행하여졌다 (Darwin 1876, 1877). 이 현상의 주목할 점은 고등식물에 있어서 자기와 비자기의 인식반응이 포함되어 있는 점이다.

배추과 작물의 자가불화합성은 포자체적으로 기능하는 단일 유전자좌 *S* 복대립 유전자계에 의해 지배되고, 화분과 주두의 *S* 유전자의 표현형이 일치하였을 때 불화합이 된다. 지금까지의 유전학적인 연구에 의해 *Brassica campestris* (syn. *rapa*)에서는 30개 이상 (Nou et al. 1993b) (Fig. 1), *Brassica oleracea*에서는 50개 이상의 *S* 대립유전자 호모계통이 확립되어 있다 (Brace et al. 1994; Park et al. 2001, 2002). 배추과 자가불화합성의 특징은 화분과 주두

J.-I. Park · I.-H. Lee · I.-S. Nou (✉)
순천대학교 생명산업과학대학 원예학과
(Department of Horticulture, Suncheon National University,
Suncheon 540-742, Korea)
e-mail: nis@suncheon.ac.kr

Masao Watanabe
일본 동북대학 생명과학연구소
(Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1,
Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan)

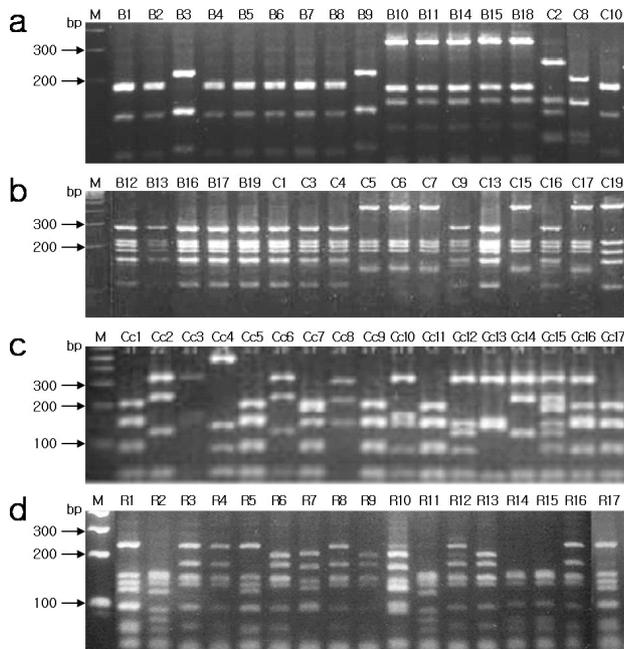


Fig. 1 Polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence (PCR-CAPS) analysis of *SRK* DNA fragments using *SRK* specific primers (Park et al. 2002). Electrophoresis profile of PCR products after cleavage with *EcoRII+HinfI* (a), *AluI* (b), *RsaI+HinfI* (c), and *EcoRI+HinfI* (d); B, broccoli; C, cabbage; Cc, chinese cabbage; R, radish

의 표층에서 자타식별의 인식반응이 일어남으로써 주두는 주두에 부착된 화분을 자기화분으로 인식할 경우 화분의 흡수, 화분관의 발아·신장을 억제하는 기구를 발현시킨다. 이 현상을 *S* 유전자좌와의 관계로 보면, *S* 유전자좌에는 주두와 화분 각각의 *S* 표현형을 결정하는 인자가 존재하고 있고, 이들 인자들간의 상호작용에 의해 인식반응이 일어난다고 생각되어진다. 그래서, 자가불화합성의 현상을 분자수준에서 이해하기 위해서는 *S* 유전자좌의 실제, 즉, *S* 유전자좌에 코드되어진 주두측 인자와 화분측 인자를 명확하게 밝히는 것이 요구되며, 이들의 정보전달 시스템의 해석이 중요한 연구과제가 된다. 또한, 포자체형 자가불화합성에서는 화분과 주두의 *S* 유전자 표현형은 *S* 대립유전자 간의 우열성에 의해 결정되어진다. 배추과 작물의 *S* 대립유전자간에서는 공우성이 일반적이지만 화분에서는 주두측과는 달리 우열성이 보이는 경우가 많다. 그리고, 우열성관계는 주두측과 화분측에서 꼭 일치하지 않는 비선형 (non-linear)이 있다는 것이 알려져 있다 (Hatakeyama et al. 1998b, c; Thompson and Taylor 1996). 이러한 표현형의 우열성 존재도 배추과 작물의 자가불화합성 특징중의 하나이다.

주두측 *S* 유전자의 발견, 구조 및 기능해석

S 유전자좌의 실체를 명확하게 밝힌 연구는 주두측 인

자 해석으로부터 시작되었다. 1977년에 *S* 유전자좌와 연쇄하고 있는 주두특이 단백질인 *S* 당단백질 (*S* locus glycoprotein; *SLG*)이 등전점 전기영동법에 의해 발견되어 (Nishio and Hinata 1997), 이것이 배추과 작물에 있어서 자가불화합성의 분자수준에서의 해석 계기가 되었다. 1985년에는 *SLG*의 cDNA 클론이 *B. oleracea*로부터 단리되었고 (Nasrallah et al. 1985), 또한, *B. campestris*에 있어서 *SLG*가 주두로부터 정제되어, *SLG* 분자의 전체상이 명확하게 되었다 (Takayama et al. 1987). 지금까지 30개 이상의 *SLG* 유전자가 단리되었고 (Watanabe and Hinata 1999; Nasrallah et al. 1987; Yamakawa et al. 1994; Watanabe et al. 1994; Matsushita et al. 1996; Kusaba et al. 1997; Hatakeyama et al. 1998a, b), 단리된 *SLG*의 해석으로부터 *SLG*는 분비형 당단백질이며, 분자내에 가변영역이 존재하고, 분자의 C말단 측의 12개의 cysteine 잔기가 공통으로 보존되어 있으며, 분자중의 당쇄 자체에는 *SLG*간에 차이가 없다는 것이 밝혀졌다 (Nasrallah et al. 1987; Isogai et al. 1987; Takayama et al. 1989). 또한 지금까지 클로닝된 *SLG*들의 상동성에 기초하여 정리하면, class I과 class II라고하는 2개의 그룹으로 분류되었고, 동일 class내에서의 상동성은 약 80~90%로 높지만 class간 상동성은 약 60%로 낮다는 것이었다. *SLG*가 주두의 세포벽에 국재하고 있는 것으로부터 (Kishi-Nishizawa et al. 1990), 당시의 최대의 의문점은 이 물질이 화분과의 인식에 관여하는 물질일 경우 그 정보는 어떻게 주두표층에서 세포내부로 전해지는 것인가라는 것이었다.

이 문제점은 1990년에 옥수수에서 *SLG*와 상동성을 가진 receptor kinase 유전자 (*ZmPK1*)가 단리되면서 (Walker and Zhang 1990) 해명되기 시작되었고, 이 *ZmPK1* 유전자를 기초로 하여 *B. oleracea*에 있어서도 *ZmPK1*과 유사한 유전자가 단리되었다. 단리된 유전자는 주두에서 발현하고 있으며, *S* 유전자좌에 연쇄하고 있다는 것이 밝혀졌다 (Stein et al. 1991). 이 유전자는 *SLG*와 높은 상동성이 있는 영역 (*S* domain)이 있으며, 막관통 영역과 serine/threonine 형의 단백질 인산화효소 (protein kinase)영역을 가진 단백질을 코드하고 있기 때문에 *SRK* (*S* receptor kinase)라고 명명되었다. 이 *SRK*의 발견으로 인하여, 외부의 시그널을 세포내부에 전달하는 기본분자가 receptor kinase이고 화분 인자와의 결합은 *S*-domain이 수행하며, 세포내부에서의 시그널 전달은 serine/threonine kinase 영역에서 수행할 것이라고 예상되었다.

SLG 및 *SRK*에 관한 자가불화합성 변이체의 해석으로부터 *SLG*와 *SRK* 모두 자가불화합성에 관여하고 있을 가능성이 시사되었지만 (Nasrallah et al. 1992, 1994; Goring et al. 1993; Watanabe et al. 1997; Shiba et al. 1995, 2000), 어느 자가불화합성 계통에서는 *SLG* 유전자의 중복이 보여 자가불화합성에는 *SLG*가 필요하지 않을 가능성도 시사되

었다 (Cabrillac et al. 1999). 일본 동북대학 Watanabe 그룹은 이것을 명확하게 하기 위하여 class I로부터 단리된 각각의 *SLG*와 *SRK*를 class II의 *S* 유전자계통에 형질전환하여 각각 도입한 *SLG*와 *SRK* 유전자를 정상으로 발현시키는 형질전환체를 얻었다 (Takasaki et al. 2000). 얻어진 형질전환체 해석으로부터, *SRK*를 발현하고 있는 개체에서만 주두측에 도입한 유전자 유래의 *S* 유전자 표현형이 새롭게 부여되었던 것을 관찰하였다. 이 결과는, 주두측의 *S* 표현형의 결정에서는 *SRK*만으로도 충분하다는 것을 증명한 것이다 (Takasaki et al. 2000). 또 *SLG*를 도입한 형질전환체는 자가불화합성의 인식특이성을 변환시키지는 못하였지만, *SRK*와 같이 존재하면 *SRK*의 자가불화합성 반응이 강하게 되는 것을 확인하였다. 이 결과로부터 *SLG*는 자가불화합성의 인식반응에는 직접적으로 관여하지 않지만 그 표현형을 안정시키기 위하여 주두에 존재하고 있다고 생각되었다 (Takasaki et al. 2000). 이러한 일련의 실험 결과들로부터 주두측의 *S* 유전자 산물의 본체가 *SRK* 유전자라는 것이 증명된 셈이다.

화분측 *S* 유전자의 동정, 구조 및 기능해석

화분 *S* 인자 또는 이것을 코드하는 화분측 *S* 유전자가기 위해서는 (1) *S* 유전자좌상에 위치 즉, *SLG*나 *SRK*의 근방에 위치하고 있을 것, (2) *SLG* 및 *SRK*와 같이 대립유전자간에 다형성이 있을 것, (3) 포자체적으로 기능하는 자가불화합성이기 때문에 2n인 감수분열 이전의 화분모세포 또는 약의 용단세포에서 발현하고 화분표층 단백질 일 것, (4) receptor인 *SRK*의 S-domain이나 *SLG*와 상호작용할 것 등이 예상되었다. 화분측 *S* 인자를 동정하기 위하여 우선 등전점 전기영동을 이용하여 *SLG* 밴드의 이동을 지표로 화분표층 단백질의 정제가 수행되어, *SLG*와 결합능이 있는 저분자의 약 7 kDa의 염기성 peptide가 단리되었다. 이 염기성 peptide는 화분표층 단백질 (Pollen Coat Protein)로부터 정제되었기 때문에 처음에는 PCP7로 명명

되었지만 후에 PCP-A1으로 다시 명명되었다 (Doughty et al. 1933, 1998). 이 PCP-A1은 어느 *S* 계통의 *SLG*와도 상호작용하는 성질을 나타내어 *S* 유전자형 특이성이 없었다. 또한, 이 유전자의 발현은 배우체적 (화분 특이적)이었고, *S* 유전자좌에 위치하고 있지 않았기 때문에 자가불화합성의 화분측 *S* 유전자가 아니라는 것이 명확하게 되었다 (Doughty et al. 1998). 그 후, Watanabe 그룹은 단백질 상호작용을 해석하는 기구를 이용하여 화분으로부터 추출한 단백질에 관한 해석을 수행하여 *SLG*와 상호작용하는 단백질이 다수 존재하는 것을 확인하였다 (Takayama et al. 2000a). 이 단백질들을 코드하는 유전자들을 해석한 결과, 이 유전자들은 계놈내에 다중유전자좌를 형성하고 있고 8개의 cysteine 잔기를 가진 PCP-A1이나 defencing family 단백질과 닮은 유전자들이었다 (Doughty et al. 1998; Stanchev et al. 1996). 이들 유전자들은 모두 *S* 대립유전자간에 다형성이 없었으며 화분인자는 아니었다 (Takayama et al. 2000a). 그래서 이들 그룹은 화분측 *S* 유전자를 단리하기 위하여 *B. campestris* *S*⁹ 계통을 이용하여 *S* 유전자좌 해석을 수행하였다. *B. campestris* *S*⁹ 계통은 *SLG*와 *SRK* 유전자를 포함한 영역이 짧은 계놈 단편으로 검출되는 것을 확인한 후 (Suzuki et al. 1997, 2000), 제한효소 *Mlu* I에 의해 완전소화로 *SLG*와 *SRK*를 포함한 약 80 kb의 계놈단편을 P1 유래 인공염색체 (PAC)에 클로닝하였다 (Suzuki et al. 1997). 이 계놈 cloning의 전 염기배열을 결정하고 이 계놈 단편을 probe로 하여 약 (anther) cDNA library를 screening 하여 약에서 발현하고 있는 12개의 유전자를 동정할 수 있었다 (Watanabe et al. 1999; Suzuki et al. 1999). 이들 각각의 유전자 발현부위 해석결과, *SP11/SCR* 유전자와 *SAE1* 유전자가 약 특이적으로 발현하였다 (Watanabe et al. 1999; Suzuki et al. 1999). 이들 중 *SP11/SCR*은 8개의 cysteine 잔기를 가진 저분자의 염기성 peptide를 코드하였다. *SP11/SCR*의 cysteine 잔기 배열은 화분표층 peptide PCP-A1과 비슷하였다. 또한 *SP11/SCR*이 PCP 다중유전자좌의 하나이고 *SLG*와 상호작용할 가능성이 있다는 것이 시사되었다

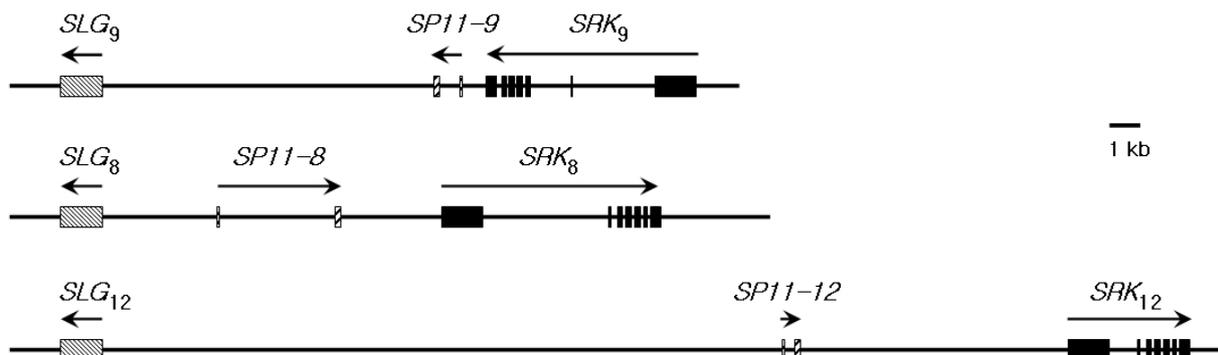


Fig. 2 Genomic organization of the *SLG/SRK* region of the *S* locus of *B. campestris*. The arrows indicate the direction of transcription of each gene. Exons are indicated by solid boxes and introns are indicated by dips (Takayama et al. 2000b)

(Suzuki et al. 1999).

이상과 같이 얻어진 *SP11/SCR*과 *S* 유전자좌에서의 *SLG*, *SRK*와의 물리적 위치관계를 해석한 결과, S^8 , S^9 , S^{12} 의 경우, *SP11/SCR* 유전자는 *SLG*와 *SRK* 유전자의 사이에 위치하고 있다는 것이 판명되었다 (Fig. 2). 또, S^{32} 의 경우는 *SRK* 하류 근방에 위치하고 있는 것을 확인하였다 (Takayama et al. 2000b). 또한, 이들 4개의 유전자는 상호간에 대립유전자 관계에 있다고 결론지었다. 흥미로운 것은 복대립유전자 관계이면서도 *SLG*, *SRK*, *SP11/SCR* 유전자의 전사 방향은 *S* 대립유전자간에 각각 달랐다. 일반적으로 자가불화합성을 나타내는 작물에서는 *S* 유전자좌에 있어서, *S* 대립유전자간에서의 조환빈도가 매우 적다는 것이 알려져 있다. 배우체형 자가불화합성을 나타내는 페츄니아에 있어서는 *S* 유전자좌는 동원체에 매우 가깝게 위치하고 있고 그것이 조환을 억제하는 요인의 하나라고 생각되어지고 있다 (Entani et al. 1999). 배추과 작물의 경우에는 *S* 유전자좌는 염색체의 말단부 가까운 곳에 위치하고 있기 때문에 (Iwano et al. 1998; Kamisugi et al. 1998), 자가불화합성에 관련하고 있는 3개의 유전자 위치관계가 조환 억제에 중요하다는 것을 생각할 수 있다 (Takayama et al. 2000b).

Northern blot 분석, *in situ* hybridization에 의한 해석으로부터 *SP11/SCR* 유전자 발현양식은 1핵기부터 발현이 시작되어, 2핵기에 발현양이 최대이고, 3핵기에서도 발현하고 있었다 (Suzuki et al. 1999; Takayama et al. 2000b). 지금까지 보고되어진 *PCP-AI* 등의 *PCP* 다중유전자들은 전부 배우체인 화분에서만 발현하였지만 (Takasaki et al. 1999), *SP11/SCR*은 화분뿐만 아니라 약의 용단조직에서도 발현하였다 (Takayama et al. 2000b). 이 결과는 배추과 작물의 자가불화합성 *S* 유전자의 발현이 포자체적으로 결정되어진다는 점을 설명할 수 있기 때문에 *SP11/SCR*이 화분측 *S* 유전자 산물이라는 것이 강하게 주장되었다.

최종적으로 *SP11/SCR* 유전자가 자가불화합성 인식반응에 관여하는 화분측 *S* 유전자라는 것을 확인하기 위하여 S^8 및 S^9 계통 유래의 *SP11/SCR* 유전자를 S^{32S60} 계통 (품종명: "Osome")에 도입한 형질전환체를 만들어 화분의 *S* 표현형의 변화를 조사하였다. 이 실험에는 S^8 유래의 *SP11/SCR* cDNA와 S^9 계통 유래의 *SP11/SCR* 계놈 클론을 이용하였고, 이 둘의 경우 모두 도입한 형질전환체의 화분에서는 도입된 *S* 유전자형의 형질이 부여되어 같은 *S* 계통의 주두에 수분시킬 경우에 *S* 특이적으로 불화합성을 나타내었다. 이 형질전환 실험 결과는 *SP11/SCR* 유전자가 화분측 *S* 유전자이라는 것을 명확하게 증명하였다 (Shiba et al. 2001).

이들 일련의 실험에 의해 *SP11/SCR*이 화분 *S* 인자로써 명확한 기능을 한다는 것이 밝혀졌다. 즉, 배추과 작물 자가불화합성의 화분과 주두의 자타인식을 제어하고 있

는 유전자는 근접하여 존재하고 있는 *SP11/SCR*과 *SRK* 유전자라는 것, 즉 인식반응에 관여하는 *S* 유전자의 본체가 이 2개의 유전자라는 것이 확인되었다.

자가불화합성 관련 유전자의 분자 진화

배추과 작물에 있어서 자가불화합성의 *S* 대립유전자는 100개 이상이라고 추정하고 있다 (Nou et al. 1993a, b; Brace et al. 1994). 그래서 다수의 자가불화합성 관련 유전자를 단리하고 이들의 대립유전자간 염기 비교에 의해 각각의 유전자가 어떤 진화 과정을 거쳤는지 예상하는 연구가 시도되었다.

지금까지 cloning된 *SLG*와 *SRK*의 *S* domain 및 kinase domain에 관해서 대립유전자간의 동의적, 비동의적 염기 치환을 계산하였다. *SLG*와 *SRK*의 *S* domain 각각의 치환량은 같은 정도이었으며, 비동의 치환이 동의치환의 50% 정도이었다. 더욱이, *SRK*에서는 kinase domain과 *S* domain의 동의 치환량은 거의 같았지만, kinase domain의 비동의적 치환량은 *S* domain의 거의 절반이었다. 이것은 kinase domain에서는 kinase 활성을 유지하기 위하여 비동의적 치환양이 억제되었다는 것을 시사하고 있다. 그것에 반하여 *S* domain은 비동의적 치환에 의해 domain의 구조를 변화시켜 결과적으로 집단내에 새로운 *S* 대립유전자를 만들어 낸다는 것이 예상되었다. 새로운 대립유전자는 집단의 유전적 다양성을 증가시키므로 그 집단에 있어서 유리하게 움직여 결국 그 유전자는 고정된다고 생각되었다 (Hinata et al. 1995). 이들 자가불화합성 관련 유전자의 염기치환 속도가 엽록체 유전자와 거의 같은 정도라고 가정한다면 배추과 작물이 자가불화합성을 획득한 것은 약 5천만년 전이라고 추정된다 (Hinata et al. 1995).

*B. campestris*와 *B. oleracea*로부터 단리된 *SLG*, *SRK* 유전자에 관하여 각각 분자 계통수를 작성하면 2개의 종이 혼재된 형태를 나타낸다 (Kusaba et al. 1997; Kusaba and Nisho 1999). 이것은 *SLG*, *SRK* 유전자가 종 분화 이전에 분화되었다고 가정할 수 있다. 더욱이, 30개 이상의 *SLG*, *SRK* 유전자를 비교한 분자 계통수를 작성한 결과, 이들 유전자의 다양성에는 점 돌연변이뿐만 아니라, 유전자 내 혹은 유전자 상호간에 교차 (cross over)나 유전자 변환 (gene conversion)이 크게 관여하고 있다는 것을 나타내었다 (Kusaba et al. 1997; Kusaba and Nisho 1999). 특히 *SLG*와 *SRK*의 *S* domain의 상동성이 높은 것은 이들이 유전자 변환에 의해 한쪽의 유전자로부터 다른 한쪽이 생겼다고 보고되었다 (Watanabe et al. 1994; Hatakeyama et al. 1998b, c; Suzuki et al. 1997).

화분측 *S* 유전자 *SP11/SCR*에 관해서도 똑같이 분자 계통수를 작성했을 경우, *SLG* 등과 동일한 경향을 나타내어 *SP11/SCR*의 분화 역시 종분화 이전이라는 것을 시사하였

다 (Watanabe et al. 2000). 더욱이, SP11/SCR의 분자 계통주와 SLG나 SRK의 분자 계통주를 비교해 보면 Fig. 3에 나타난 것과 같이 거의 동일하였다. 이 결과로부터 이 3개의 유전자는 공진화하였다고 예측되었다 (Watanabe et al. 2000).

화분측 S 표현형에서 보이는 우열성 현상

SP11/SCR 발현양식의 해석이 진전됨에 따라 배추과 작물의 포자체형 자가불화합성 기구의 설명이 가능해졌다. 그러나 S haplotype의 조합에 따라서는 화분의 S 표현형에 우열의 관계가 생기는 경우가 있다. 이 경우 화분은 한쪽의 성질을 전혀 나타내지 않고, 다른 한쪽의 S 유전자만을 갖고 있는 것 같이 행동하는 것이 알려져 있다. 예를 들어 S^1S^2 헤테로 개체의 화분은 통상 (S^1 과 S^2 가 공우성의 경우) S^1S^1 및 S^2S^2 의 자성에 대하여 불화합이 되지만, S^1 이 S^2 에 대하여 우성인 경우에는 S^1S^1 의 자성에는 불화합으로 되지만 S^2S^2 의 자성에 대해서는 화합이 된다. 또한 S^1S^2 헤테로 개체를 자가수정하여 얻은 후대의 S^2S^2 호모 개체의 화분은 (본래는 자가불화합이기 때문에 자가수분에 의해 후대의 종자를 얻을 수 없지만, 불화합의 기구가 출현하기 전에 수분을 행하는 뇌수분이나 탄산가스처리에 의한 일시적인 자가불화합성 타파에 의해 후대

를 얻을 수가 있다.) S^2S^2 의 자성에 대해서 불화합으로 되는 등, 열성 화분의 S 표현형 소실은 S 대립유전자간에 우열관계가 있을 때에만 나타나고, 그 현상은 가역적이었다. 그러나 열성 S haplotype간에 있어서는 상호적으로 직선적인 우열관계를 나타낸다고 보고되었지만 (Kakizaki et al. 2003), 어떻게 이와 같은 우열관계가 발생하는 것인가에 대한 분자기구의 해석은 긴 세월 동안 밝혀지지 않았다.

화분의 우열성 기구를 해석하기 위하여 우성 및 열성 SP11/SCR 유전자의 동정 및 발현양식의 관찰은 화분측에서 일어나는 우열관계 해석의 열쇠가 된다고 생각된다. 앞에서 언급한 SP11/SCR 유전자는 우성을 나타내는 S haplotype에서 동정되었다. 이 우성 SP11/SCR 유전자들의 염기 배열을 기초로 하여 열성을 나타내는 S haplotype에서 열성 SP11/SCR 유전자를 동정하기 위한 실험이 수행되었지만 열성 SP11/SCR 염기배열이 우성의 것과 매우 차이가 있어 Southern blotting 및 PCR 실험에서 결과를 얻을 수 없었다. 그리하여 Shiba 등 (2002)은 화분 열성을 나타내는 S^{60} 호모계통의 계놈 DNA library를 이용하여 S 유전자좌 영역을 단리·해석하였다. 그 결과 SRK⁶⁰ 유전자상류 6.5 kb의 위치에 SP11/SCR의 특징인 8개의 cysteine 잔기를 코드하고 있는 유전자배열을 동정하였다. 이 유전자는 *in situ* hybridization에 의해 약의 융단조직에서 특이적으로 발현하고 있었고, 이 열성 유전자 배열을 이용한 primer 조합에 의해 다른 S 열성계통의 약 mRNA로부터도 열성 SP11/SCR 유전자를 동정하였다 (Shiba et al. 2002). 동정된 열성 SP11/SCR간에 추정 아미노산 배열의 상동성 비교로부터 열성 계통간에는 상동성이 비교적 높았으나 (순무 계통간에 63-73%), 우성 SP11/SCR과의 상동성은 거의 없었다. 또한 S 유전자좌의 해석으로부터 열성 SP11/SCR 유전자는 우성계통과 같이 SRK 유전자 근방에 위치하고 있었으며 S 유전자좌와 연쇄하고 있었다.

화분의 우열성 출현과 열성 SP11/SCR 유전자의 발현양식 관계를 해석하기 위하여 열성 SP11/SCR 유전자의 발현양식을 검토하였다. 우성/열성 헤테로개체 및 열성 호모 개체의 약 절편을 이용한 *in situ* hybridization 해석으로부터 열성 SP11/SCR 유전자는 열성 호모개체의 융단조직에서 발현하였지만 우성/열성 헤테로 개체의 융단조직에서는 발현하지 않았다. 그러나, 우성 SP11/SCR 유전자는 헤테로 개체에서도 융단조직에서 강하게 발현하였다. 또한, Kakizaki 등 (2003)은 직선적인 우열성관계를 나타내는 열성 S haplotype의 조합에 있어서는 항상 상대적으로 열성을 나타내는 계통의 SP11/SCR 유전자는 발현이 억제되고 있다는 것을 확인하였다. 예를 들면 S^{60} 계통은 S^{44} 계통에 대하여는 열성이지만 S^{40} 혹은 S^{29} 계통에 대해서는 우성의 관계이었다. 이 때 $S^{44}S^{60}$ 헤테로 개체에서는 S^{60} 유래의 SP11/SCR의 발현이 억제되지만 $S^{40}S^{60}$, $S^{29}S^{60}$ 헤테로 개

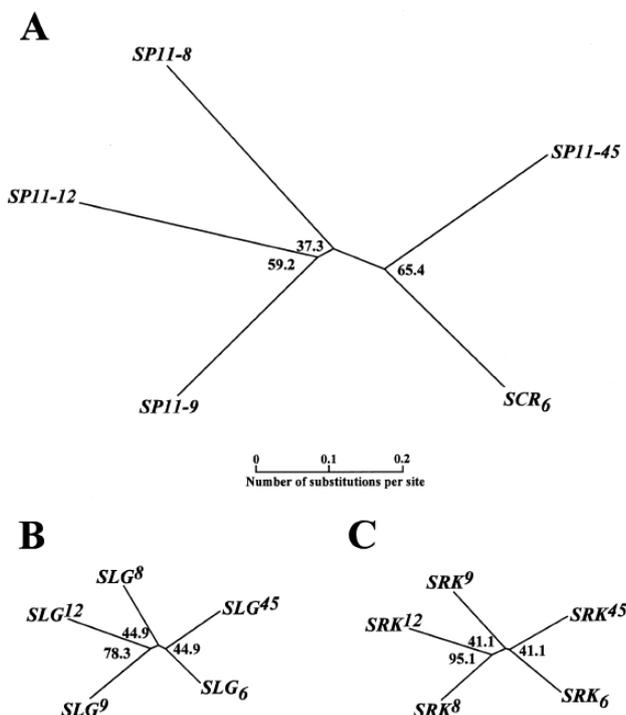


Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of SP11/SCR (A), SLG (B) and SRK (C). Bootstrap probabilities for clusters are shown as percentages. The bar under the tree shown in (A) represents the number of amino acid substitutions per site (Watanabe et al. 2000)

체에서는 발현이 관찰되었다. 이와 같이 화분의 우열성은 열성 *S* haplotype의 *SP11/SCR* 유전자 발현이 억제되어 생기는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 우열성이 나타나는 양배추에서도 열성 *SP11/SCR* 유전자가 발견되었고 (Iwano et al. 2003; Shiba et al. 2004), *Arabidopsis*의 근연종이며 자가불화합성을 나타내는 *A. lyrata*에서도 관찰되었다 (Kusaba et al. 2002). 따라서 배추과 작물의 자가불화합성에서 보여지는 우열성 현상은 열성 인자의 억제에 의한 것이라고 생각되었다.

열성 *SP11/SCR* 유전자의 발현 억제기구의 해명

우성/열성 헤테로 개체에 있어서 mono-allelic인 열성 *SP11/SCR* 유전자의 발현억제가 어떠한 기구에 의해 일어나는가를 해석하였다. 식물에 있어서 DNA 메틸화

(methylation) 기구에 있어서는 1) transposon 등의 전이를 억제하고 있는 게놈의 침묵 (gene silencing), 2) 성 특이적인 형질발현 (genomic imprinting), 3) 종간 교잡시에 있어서 유전자량 보정 (nucleolar dominance), 4) 부모세대의 표현형이 유전적 변이를 계속 받지 않고 유전하는 현상 (Paramutation) 등이 관련되어 있다는 것이 보고되었다 (Chan et al. 2005). 이 DNA 메틸화는 histone 수식과 병행하여 후천적 유전자 발현 제어기구의 주원인으로 알려져 있다. 그래서 Shiba 등 (2006)은 열성측의 *SP11/SCR* 유전자 발현 억제에 있어서 게놈 DNA의 메틸화 가능성을 검토하였다. 일반적으로 동물과 식물의 발생, 분화에 있어서 유전자 영역의 메틸화 상태는 본질적으로 상이하다는 것이 지적되고 있다. 동물에서는 수정 직후 수정란의 게놈 전체가 저 메틸화 상태로 된 후, 조직 특이적 혹은 성 특이적인 메틸화 상태로 되는 등 발생, 분화의 과정에서 유전

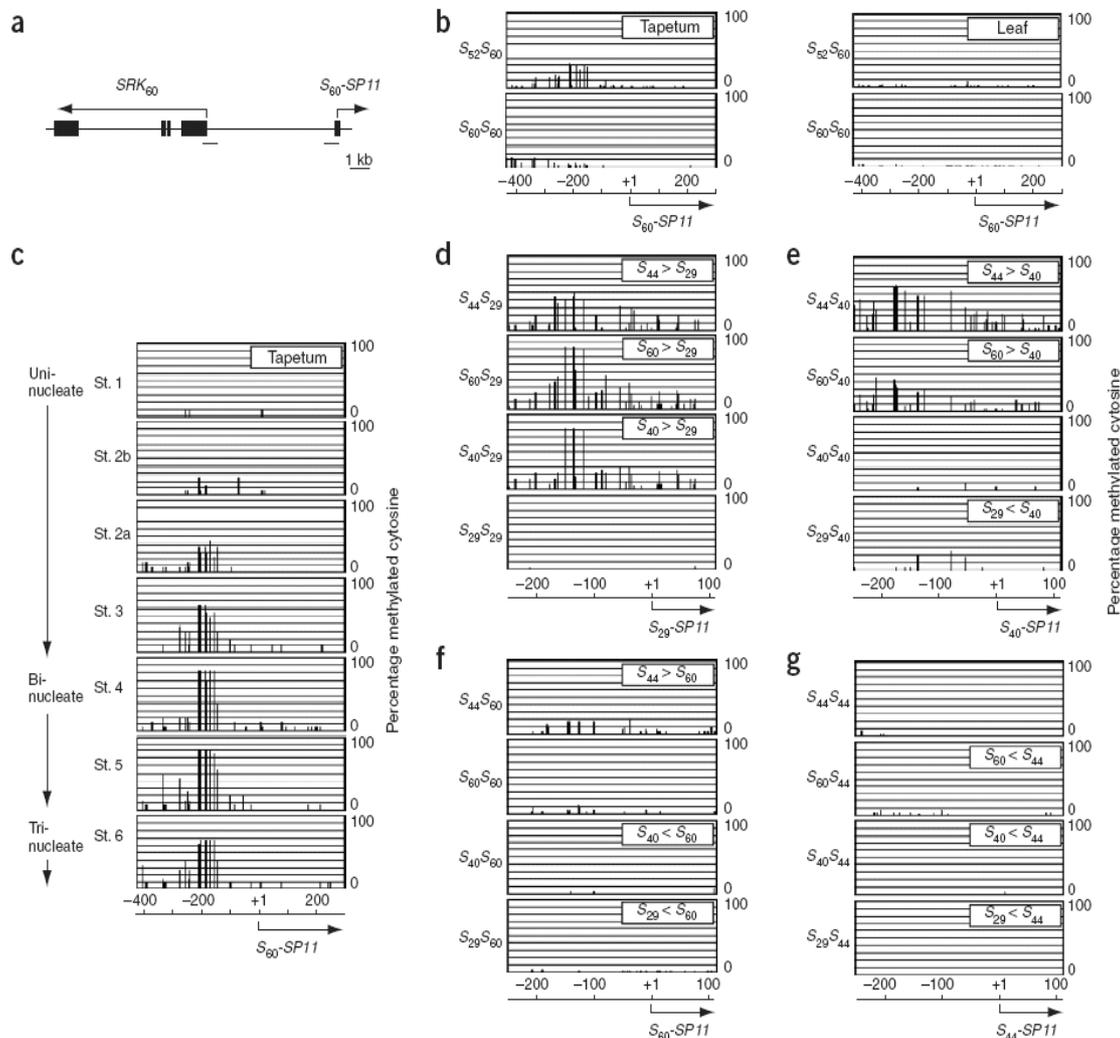


Fig. 4 Analyses of DNA methylation state in the *SP11* region of class II *S*-heterozygotes. (a) Genomic structure of the region around the *S*-locus of the *S₆₀*-haplotype. Filled rectangles represent exons. (b) *S₆₀-SP11* methylation profile in anther tapetum and leaf. (c) Changes in *S₆₀-SP11* methylation profiles during anther development. (d) *S₂₉-SP11* methylation profile. (e) *S₄₀-SP11* methylation profile. (f) *S₆₀-SP11* methylation profile. (g) *S₄₄-SP11* methylation profile (Shiba et al. 2006)

자영역의 메틸화 상태가ダイナ믹하게 변화한다는 것이 보고되었다. 식물에서도 세대를 넘어 메틸화 상태가 유지된다는 것이 지적되었으며 (Kakutani 2002), 시기 및 조직 특이적인 메틸화의 변화가 유전자 발현을 제어하는 예로는 DNA 메틸화의 소실이 배유세포에서 일어난다는 것이 유일한 보고이었다 (Kinoshita 2004). Shiba 등 (2006)은 동물에서 발견되어지는 시기 및 조직 특이적인 DNA 메틸화의 가능성을 생각하여 약의 융단세포로부터 계놈 DNA를 추출하여 DNA 메틸화를 조사하였다. 그 결과 우성/열성 헤테로 개체에서 열성 *SP11/SCR* 유전자의 *cis*-element 부위 및 그 주변 영역에서 특이적으로 *de novo* 메틸화가 되어있는 것을 발견하였다 (Fig. 4a, b) (Shiba et al. 2006). 또한 우열의 관계가 분명한 다수의 S haplotype 조합에 있어서도 열성 *SP11/SCR* 유전자 특이적인 DNA 메틸화가 확인되었다 (Fig. 4d, e, g, f) (Shiba et al. 2006). 예를 들면 $S^{40}S^{60}$ 헤테로 개체에서는 앞에서도 설명한 것과 같이 S^{40} 이 S^{60} 에 열성이고 S^{40} 유래의 *SP11/SCR*이 메틸화되었다. 그러나 우성의 관계인 $S^{29}S^{40}$ 헤테로 개체에서는 S^{40} 유래 *SP11/SCR*의 메틸화는 관찰되지 않았으며 열성인 S^{29} 유래 *SP11/SCR*이 메틸화 되었다. 또한, 이 메틸화는 융단조직에서 *SP11/SCR* 유전자가 발현하기 직전에 특이적으로 일어나며 (Fig. 4c), 잎, 꽃잎, 주두, 화분 등에서는 나타나지 않았다. 이상의 결과로부터 우성/열성 헤테로개체에서는 열성측 *SP11/SCR* 유전자의 5' 영역인 *cis*-element 부위가 DNA 메틸화되어 열성측 *SP11/SCR* 유전자의 발현이 억제되고, 우성측 *SP11/SCR* 유전자의 5' 영역인 *cis*-element 부위는 메틸화 되지 않기 때문에 우성측 *SP11/SCR* 유전자는 발현하게 된다. 따라서 우성/열성 헤테로 개체의 융단세포에서는 우성측의 *SP11/SCR* 단백질만이 생산되어 우성측의 S 표현형만이 나타난다고 고찰하였다.

결론

오랜 기간의 분자적 연구로 인하여 배추과 작물의 자가불화합성의 S 표현형을 결정하는 화분측 인자와 주두측 인자가 각각 *SP11/SCR*과 *SRK*라는 것이 명확하게 밝혀졌지만 자가불화합성의 인식기구 전체가 명확하게 밝혀진 것은 아니다. 즉 *SP11/SCR*과 *SRK*의 S domain이 어떻게 상호작용 하는가? 또는 *SLG*는 *SP11/SCR*과 *SRK*의 반응에 있어서 어떻게 자가불화합성 안정화를 시키는가? 이러한 의문점 등을 분자수준에서 해석하지 않으면 안될 것이다. 또한, 화분유래의 *SP11/SCR*이 주두 *SRK*에 의해 인식된 후, 주두 세포에서의 정보전달계 해석도 금후의 중요한 과제일 것이다. 이 정보전달계의 하류 문제에 관해서는 지금까지 *SRK*의 kinase domain과 상호작용하는 단백질이 2종류 단리되어 있다 (Bower et al. 1996; Gu et al. 1998). 그중 하나인 *ARC1*은 *SRK* kinase domain의 인산화에 의존하여 인산화 된다는 것이 보고되었고, 이 유전자를 파괴한 형질전환체에서 표현형이 자가화합성으로 변환하였다 (Stone et al. 1999). 따라서 *ARC1*은 *SRK*의 kinase domain과 직접 상호작용하여 자기화분을 인식한 후, 인식한 정보를 하류에 전달하고 있다고 생각되어지고 있다. 이러한 인식반응을 모식적으로 나타내면 Fig. 5와 같은 모델이 추측 되어진다. 또한 *SRK*에서 자기화분을 인식한 후, 시그널의 전달은 복잡한 네트워크를 형성하고 있을 가능성도 생각 되어지며 자기화분의 발아를 억제하는 기구도 아직 밝혀지지 않았다. 이러한 연구에는 다수의 자가불화합성 돌연변이체 해석이 중요한 해결방법중의 하나일 것이다. 본 연구자의 실험실에서는 양배추의 자가불화합성 변이체인 자가화합성 계통 (Fig. 6)을 이용하여 인식반응 후, 세포내로 시그널을 전달하는 신규 유전자군을 탐색하고 있다. 또한 돌연변이체의 S 유전자좌

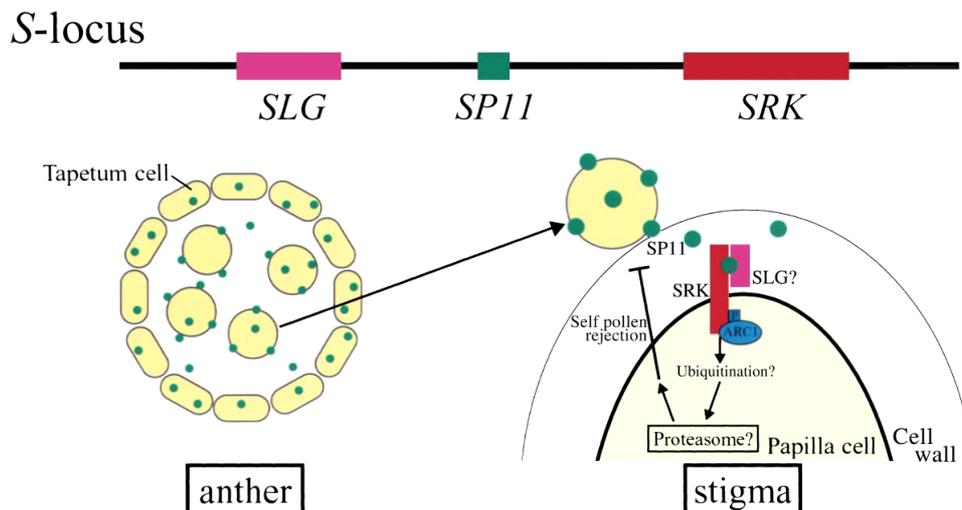


Fig. 5 Schematic model for self-pollen recognition in *Brassica* species (Watanabe et al. 2003)

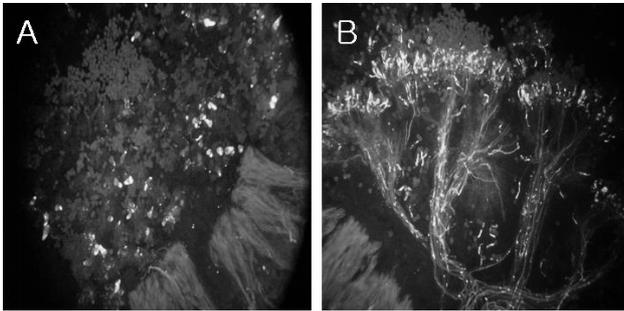


Fig. 6 Pollen tube development 24 hours after self-pollination in *B. oleracea*

A; self-incompatibility line. B; self-compatibility line (Park et al. 2009)

에 위치하고 있는 *SLG*, *SRK* 및 *SP11/SCR* 유전자는 정상적으로 발현하고 있는 것을 확인하였고 (Park et al. 2009), *ARCI*과 같은 *SRK* 하류 유전자 발현 조사 및 기능을 검토하는 동시에, F₂ mapping 집단을 작성하여 자가불화합성 관련 신규 유전자 발굴에 전력을 다하고 있다.

우열관계에 있어서 다수의 *S* haplotype 조합에서 항상 상대적으로 열성측 *SP11/SCR* 유전자의 *cis*-element부위만이 메틸화 되는 것일까? 이것에 관해서는 현재 밝혀지지 않았다. 최근 RNA 의존성 DNA 메틸화 (RdDM)를 통한 분자기구에 의해 표적부위가 특이적으로 메틸화되어지는 사례가 보고되었다 (Matzke and Birchler 2005). 또한 야생주의 배유조직에서 특이적으로 발현하는 imprinting 유전자인 FWA 유전자의 promoter 영역에도 메틸화 부위가 존재하였다 (Soppe et al. 2000). 이 영역은 SINE retrotransposon 같은 배열이 direct repeat를 형성하고 있었고, 위의 repeat 배열을 저 메틸화 변이주에서 발현시키면 메틸화 부위의 신규 메틸화와 FWA 유전자의 발현억제가 나타났다 (Kinoshita et al. 2007). 이와 같이 계놈에 존재하는 repeat 배열을 기원으로 한 RNA 산물이 표적부위의 메틸화를 야기시키는 기구가 자가불화합의 우열성현상에서도 움직이고 있을 가능성도 있다. 즉, 우성 *SP11/SCR* 유전자 주변의 계놈에 존재하는 여러 가지 repeat 배열 유래의 small RNA나 non coding RNA 등이 열성 *SP11/SCR* 유전자의 메틸화 표적부위에 특이적으로 결합하면 mono-allelic적인 신규 DNA 메틸화를 일으킨다는 것이다. 복수의 우성 혹은 열성계통의 *SP11/SCR* 유전자 주변의 계놈배열 해석으로부터 *SP11/SCR* 유전자 주변의 계놈 중에는 복수의 repeat 배열이 존재하였고, 그 중에는 열성 *SP11/SCR* 유전자의 *cis*-element부위와 상동의 배열도 존재하였다 (Kakizaki et al. 2006). 이들 repeat 배열이 융단조직에서 특이적으로 발현하는가? 또는, *S* haplotype 특이성이 존재하여 이들이 모든 우열성 현상을 설명할 수 있는 구조인가? 등의 해석이 금후 연구의 초점이 될 것이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 2007 0301034037)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Bower MS, Matias DD, Fernandes-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rothstein SJ, Goring DR (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
- Brace J, King GJ, Ockendon DJ (1994) A molecular approach to the identification of *S*-alleles in *Brassica oleracea*. *Sex Plant Reprod* 7:203-208
- Cabrillaca D, Delorme V, Garinb J, Ruffio-Châblec V, Girantona JL, Dumasa C, Gaudea T, and Cocka JM (1999) The *S*^{LS} self-incompatibility haplotype in *Brassica oleracea* includes three *S* gene family members expressed in stigmas. *Plant Cell* 11:971-986
- Chan SWL, Henderson IR, Jacobsen SE (2005) Gardening the genome; DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet* 6:351-360
- Darwin C (1876) Effects of cross-and self-fertilization in the vegetable Kingdom. D Appleton New York
- Darwin C (1877) Different forms of flowers on plants of the same Species. John Murry London
- Doughty J, Hedderson F, McCubbin A, Dickinson H (1993) Interaction between a coating-borne peptide of the *Brassica* pollen grain and stigmatic *S*- (self- incompatibility) locus-specific glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci* 90:467-471
- Doughty J, Dixona S, Hiscocka SJ, Willisb AC, Parkinc IAP, Dickinsona HG (1998) PCP-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the *S* locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *Plant Cell* 10: 1333-1347
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Takayama S, Fukui K (1999) Centromeric location of an *S*-RNase gene in *Petunia hybrida* Vilm. *Theor Appl Genet* 99:391-397
- Goring DR, Glavin TL, Schafer U, Rothstein SJ (1993) An *S* receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1-bp deletion. *Plant Cell* 5:531-539
- Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias DD, Goring DR (1998) Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci* 95:382-387
- Hatakeyama K, Takasaki T, Watanabe M, Hinata K (1998a) High sequence similarity between *SLG* and the receptor domain of *SRK* is not necessarily involved in higher dominance relationships in stigma in self-incompatible *Brassica rapa* L.. *Sex Plant Reprod* 11:292-294
- Hatakeyama K, Takasaki T, Watanabe M, Hinata K (1998b) Molecular characterization of *S* locus genes, *SLG* and *SRK*, in a pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica*

- rapa* L.. Genetics 149:1587-1597
- Hatakeyama K, Watanabe M, Takasaki T, Ojima K, Hinata K (1998c) Dominance relationships between *S*-alleles in self-incompatible *Brassica campestris* L.. Heredity 80:241-247
- Hinata K, Watanabe M, Yamakawa S, Satta Y, Isogai A (1995) Evolutionary aspects of the *S* related genes of the *Brassica* self-Incompatibility system: Synonymous and Nonsynonymous Base Substitutions. Genetics 140:1099-1104
- Isogai A, Takayama S, Tsukamoto C, Ueda Y, Shiozawa H, Hinata K, Okazaki K, Suzuki A (1987) *S*-locus-specific glycoproteins associated with self-incompatibility in *Brassica campestris*. Plant Cell Physiol 28:1279-1291
- Iwano M, Sakamoto K, Suzuki G, Watanabe M, Takayama S, Fukui K, Hinata K, Isogai A (1998) Visualization of a self-incompatibility gene in *Brassica campestris* L. by multicolor FISH. Theor Appl Genet 96:751-757
- Iwano M, Shiba H, Funato M, Shimosato H, Takayama S, Isogai A (2003) Immunohistochemical studies on translocation of pollen *S*-haplotype determinant in self-incompatibility of *Brassica rapa*. Plant Cell Physiol 44:428-436
- Kakizaki T, Takada Y, Fujioka T, Suzuki G, Satta Y, Shiba H, Isogai A, Takayama S, Watanabe M (2006) Comparative analysis of the *S*-intergenic region in the class-II *S* haplotypes of self-incompatible *Brassica rapa* (syn. *campestris*). Genes Genet Syst 81:63-67
- Kakizaki T, Takada Y, Ito A, Suzuki G, Shiba H, Takayama S, Isogai A, Watanabe M (2003) Linear dominance relationship among four class-II *S* haplotypes in pollen is determined by the expression of *SP11* in *Brassica* self-incompatibility. Plant Cell Physiol 44:70-75
- Kakutani T (2002) Epi-alleles in plants: Inheritance of epigenetic information over generations. Plant Cell Physiol 43:1106-1111
- Kamisugi Y, Nakayama S, O'Neil CM, Mathias RJ, Trick M, Fukui K (1998) Visualization of the *Brassica* self-incompatibility *S*-locus on identified oilseed rape chromosomes. Plant Mol Biol 38:1081-1087
- Kinoshita T, Miura A, Choi Y, Kinoshita Y, Cao X, Jacob-sen SE, Fischer RL, Kakutani T (2004) One-way control of *FWA* imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. Science 303:521-523
- Kinoshita Y, Saze H, Kinoshita T, Miura A, Soppe WJ, Koornneef M, Kakutani T (2007) Control of *FWA* gene silencing in *Arabidopsis thaliana* by SINE-related direct repeats. Plant J 49:38-45
- Kishi-Nishizawa N, Isogai A, Watanabe M, Hinata K, Yamakawa S, Shojima S, Suzuki A (1990) Ultrastructure of papillar cells in *Brassica campestris* revealed by liquid helium rapid-freezing and substitution-fixation method. Plant Cell Physiol 31:1207-1219
- Kusaba M, Nishio T, Satta Y, Hinata K, Ockendon D (1997) Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparisons of class I *SLG* alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implications for the evolution and recognition mechanism. Proc Natl Acad Sci 94:7673-7678
- Kusaba M, Nishio T (1999) Comparative analysis of *S* haplotypes with very similar *SLG* alleles in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. Plant J 17:83-91
- Kusaba M, Tung CW, Nasrallah ME, Nasrallah JB (2002) Monoallelic expression and dominance interactions in anthers of self-incompatible *Arabidopsis lyrata*. Plant Physiol 128:17-20
- Matsushita M, Watanabe M, Yamakawa S, Takayama S, Isogai A, Hinata K (1996) The *SLGs* corresponding to the same *S*²⁴-haplotype are perfectly conserved in three different self-incompatible *Brassica campestris* L.. Gense Genet Syst 71:255-258
- Matzke MA, Birchler JA (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. Nat Rev Genet 6:24-35
- Nasrallah JB, Kao Th, Chen CH, Goldberg ML, Nasrallah ME (1987) Amino-acid sequence of glycoproteins encode by three alleles of the *S*-locus of *Brassica oleracea*. Nature 326:617-619
- Nasrallah JB, Kao Th, Goldberg ML, Nasrallah ME (1985) A cDNA clone encoding an *S*-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. Nature 318:263-267
- Nasrallah JB, Rundle SJ, Nasrallah ME (1994) Genetic evidence for the requirement of the *Brassica S*-locus receptor kinase gene in the self-incompatibility response. Plant J 5:373-384
- Nasrallah ME, Kandasamy MK, Nasrallah JB (1992) A genetically defined transacting locus regulates *S*-locus function in *Brassica*. Plant J 2:497-506
- Nishio T, Hinata K (1977) Analysis of *S*-specific proteins in stigma of *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. Heredity 38:391-396
- Nou IS, Lee HY, Kim JH (1993a) Research trend on Homomorphic self-incompatibility: Genetic analysis and molecular research on sporophytic self-incompatibility. Kor J Breed 25:65-80
- Nou IS, Watanabe M, Isogai A, Hinata K (1993b) Comparison of *S*-alleles and *S*-glycoproteins between two wild population of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. Sex Plant Reprod 6:79-86
- Park JI, Lee SS, Watanabe M, Takahata Y, Nou IS (2002) Identification of *S*-alleles using polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence of the *S*-locus receptor kinase in breeding lines of *Brassica oleracea*. Plant Breed 121:192-197
- Park JI, Lee SS, Kang KK, Watanabe M, Nou IS (2001) Identification of *S*-genotypes by PCR-RFLP in breeding lines of *Brassica*. Mol and Cells 12:227-232
- Park JI, Lee IH, Jung GH, Nou IS (2009) Characterization of the stigma side self-incompatibility genes in a self-compatible *Brassica oleracea*. J of Life Sci 19:1666-1671
- Shiba H, Hinata K, Suzuki A, Isogai A (1995) Breakdown of self-incompatibility in *Brassica* by antisense RNA of the *SLG* gene. Proc Japan Acad Ser B 71:81-83
- Shiba H, Iwano M, Entani T, Ishimoto K, Shimosato H, Che FS, Satta Y, Ito A, Takada Y, Watanabe M, Isogai A, Takayama S (2002) Dominant/recessive relationship in pollen expression of self-incompatibility is determined by the transcriptional level of the pollen determinant gene in the *S*-heterozygotes of

- Brassica*. Plant Cell 14:491-504
- Shiba H, Kakizaki T, Iwano M, Tarutani Y, Watanabe M, Isogai A, Takayama S (2006) Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation. Nat Genet 38:297-299
- Shiba H, Kimura N, Takayama S, Hinata K, Suzuki A, Isogai A (2000) Alteration of the self-incompatibility phenotype in *Brassica* by transformation of the antisense *SLG* gene. Biosci Biotechnol Biochem 64:1016-1024
- Shiba H, Park JI, Suzuki G, Matsushita M, Nou IS, Isogai A, Takayama S, Watanabe M, (2004) Tandem duplication of *SP11* gene at the *S* locus of *S*^{cl5} haplotype in *Brassica oleracea*. Genes Genet Syst 79:87-93
- Shiba H, Takayama S, Iwano M, Shimosato H, Funato M, Nakagawa T, Che FS, Suzuki G, Watanabe M, Hinata K, Isogai A (2001) A pollen coat protein, *SP11/SCR*, determines the pollen *S*-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. Plant Physiol 125:2095-2103
- Soppe WJ, Jacobsen SE, Alonso-Blanco C, Jackson JP, Kakutani T, Koornneef M, Peeters JM (2000) The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. Mol Cell 6: 791-802
- Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME, Nasrallah JB (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. Proc Natl Acad Sci 88:8816-8820
- Stanchev BS, Doughty J, Scutt CP, Dickinson H, Ronald RD (1996) *Croy 1* cloning of *PCP1*, a member of a family of pollen coat protein (*PCP*) genes from *Brassica oleracea* encoding novel cysteine-rich proteins involved in pollen-stigma interactions. Plant J 10:303-313
- Stone SL, Arnoldo MA, Goring DR (1999) A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in *ARCI* antisense transgenic plants. Science 286:1729-1731
- Suzuki G, Kai N, Hirose T, Fukui T, Nishio T, Takayama S, Isogai A, Watanabe M, Hinata K (1999) Genomic organization of the *S* locus: Identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of *S*^{cl5} haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). Genetics 153:391-400
- Suzuki G, Watanabe M, Nishio T (2000) Physical distances between *S*-locus genes in various *S* haplotypes of *Brassica rapa* and *B. oleracea*. Theor Appl Genet 101:80-85
- Suzuki G, Watanabe M, Toriyama K, Isogai A, Hinata K (1997) Direct cloning of the *Brassica S* locus by using a P1-derived artificial chromosome (PAC) vector. Gene 199:133-137
- Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A, Hinata K (2000) The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. Nature 403:913-916
- Takasaki T, Hatakeyama K, Watanabe M, Toriyama K, Isogai A, Hinata K (1999) Introduction of *SLG* (*S* locus glycoprotein) alters the phenotype of endogenous *S* haplotype, but confers no new *S* haplotype specificity in *Brassica rapa* L.. Plant Mol Biol 40:659-668
- Takayama S, Isogai A, Tsukamoto C, Shiozawa H, Ueda Y, Hinata K, Okazaki K, Koseki K, Suzuki A (1989) Structures of *N*-glycosidic saccharide chains in *S*-glycoproteins, products of *S*-genes associated with self-incompatibility in *Brassica campestris*. Agric Biol Chem 53:713-722
- Takayama S, Isogai A, Tsukamoto C, Ueda Y, Hinata K, Okazaki K, Suzuki A (1987) Sequence of *S*-glycoproteins, products of the *Brassica campestris* self-incompatibility locus. Nature 326:102-104
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Asano K, Hara M, Che FS, Watanabe M, Hinata K, Isogai A (2000a) Isolation and characterization of pollen coat proteins of *Brassica campestris* that interact with *S* locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. Proc Natl Acad Sci 97:3765-3770
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che FS, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A (2000b) The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. Proc Natl Acad Sci 97:1920-1925
- Thompson KF, Taylor JP (1966) Non-linear dominance relationships between *S* alleles. Heredity 21:345-362
- Walker JC, Zhang R. (1990) Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the *S*-locus glycoproteins of *Brassica*. Nature 345:743-746
- Watanabe M, Hinata K (1999) Biology of *Brassica* coenospecies. (Eds.: C. Gomez-Campo), Elsevier, Amsterdam. pp149-183.
- Watanabe M, Ito A, Takada Y, Ninomiya C, Kakizaki T, Takahata Y, Hatakeyama K, Hinata K, Suzuki G, Takasaki T, Satta Y, Shiba H, Takayama S, Isogai A (2000) Highly divergent sequences of the pollen self-incompatibility (*S*) gene in class-I *S* haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L.. FEBS Lett 473:139-144
- Watanabe M, Ono T, Hatakeyama K, Takayama S, Isogai A, Hinata K (1997) Molecular characterization of *SLG* and *S*-related genes in a self-compatible *Brassica campestris* L. var. yellow sarson. Sex Plant Reprod 10:332-340
- Watanabe M, Suzuki G, Toriyama K, Takayama S, Isogai A, Hinata K (1999) Two anther-expressed genes downstream of *SLG*^{cl5}: identification of a novel *S*-linked gene specifically expressed in anthers at the uninucleate stage of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L.. Sex Plant Reprod 12:127-134
- Watanabe M, Takasaki T, Toriyama K, Yamakawa S, Isogai A, Suzuki A, Hinata K (1994) A high degree of homology exists between the protein encoded by *SLG* and the *S* receptor domain encoded by *SRK* in self-incompatible *Brassica campestris* L.. Plant Cell Physiol 35:1221-1229
- Watanabe M, Yamakawa S, Isogai A, Hinata K (2003) Recent progresses on self-incompatibility research in *Brassica* species. Breeding Science 53:199-208
- Yamakawa S, Shiba H, Watanabe M, Shiozawa H, Takayama S, Hinata K, Isogai A, Suzuki A (1994) The sequences of *S*-glycoproteins involved in self-incompatibility of *Brassica campestris* and their distribution among Brassicaceae. Biosci Biotech Biochem 58:921-925