

דו"ח ניסויי מעבדה לאפיון הגורמים לשבירת מנגנון אי-ההתאם-העצמי בשסק

2010-2012

רעות ניסקה-שיצר, שרון שפיר – פקולטה לחקלאות, רחובות

גרשון מיינרט – מטע מרום גולן

מרטין גולדווי, צליל בראס – מיי"גל, ק"ש

דורון שניידר – מו"פ צפון

תוכן:

עמוד

1מבוא
	חומרים ושיטות
11. המטע
22. מקור החומר הצמחי לאנליזות DNA, RNA וחלבון
23. הפקת DNA
24. תגובות PCR להגברת אללי <i>S-RNase</i> ו- <i>SFBB-S6</i>
35. שיבוט וריצוף הגנים
36. אנליזה של רצף ה-DNA ורצף חומצות האמינו המשוער של החלבונים...
47. רמת הביטוי של <i>S-RNase</i> בעליים
48. מבנה מרחבי משוער של חלבוני <i>S-RNase</i>
59. גיל נטיבי לפעילות אנזימטית של <i>S-RNase</i> בעליים
	תוצאות
51. רצף חומצות האמינו המשוער של אללי <i>S-RNase</i>
72. אפיון תכולת אללי <i>S-RNase</i> בצאצאים ממתע עם מפרים
93. רמת הביטוי של <i>S-RNase</i> בעליים
104. מבנה מרחבי משוער של <i>S6-RNase</i>
105. פעילות אנזימטית של <i>S-RNase</i> בעליים
116. רצף חומצות האמינו המשוער של אללי <i>SFBB</i> מלוקוס <i>S6</i>
13מסקנות
13ספרות

מבוא

השסק שייך למשפחת הוורדניים (Rosaceae), תת משפחת הגרעיניים (Maloideae), כמו התפוח והאגס, בהם קיים מנגנון גנטי של אי-התאם עצמי גמטופיטי GSI למניעת הפריה עצמית. בצמחים אלה תכונת אי ההתאם נקבעת על ידי לוקוס פולימורפי יחיד המכיל מספר גנים. לוקוס זה מכונה לוקוס *S*, כאשר גנוטיפ ספציפי של לוקוס *S* מכונה הפלוטיפ *S*. גרגר אבקה, הנוחת על צלקת עמוד העלי נובט בצלקת ומתארך בעמוד העלי לכיוון הביציות. במידה והפלוטיפ *S* של גרגר האבקה זהה לאחד מאלו המבוטאים בעלי ייעצר גידול נחשון הנביטה בעמוד העלי ולא תתרחש הפריה. במידה והפלוטיפ *S* של גרגר האבקה שונה מאלו המבוטאים בעלי נחשון הנביטה יתארך בעמוד העלי ותיתכן התלכדות עם תא הביצה. הפנוטיפ של העלי וגרגר האבקה נקבעים לפחות על-ידי שני גנים שונים, האחד מבוטא בעלי ונקרא *S-RNase* והאחר מבוטא בגרגר האבקה ונקרא *SFB* (*SFB*) *S-haplotype-specific F-box*. הוא חלבון מסוג F-box השייך למערכת ה-Ubiquitin לפרוק החלבונים. מקובל להניח שמנגנון הדחייה הביוכימי כולל כניסת חלבוני *S-RNase*, משני האללים המבוטאים בעלי, לנחשון הנביטה של גרגר האבקה. חלבוני *SFB*, המבוטאים בנחשון הנביטה של גרגר האבקה הפלואידי, מסמנים את מולקולות ה-*S-RNase* הזרות (מהפלוטיפ *S* שונה) לפירוק במערכת ה-Ubiquitin, בעוד שמולקולות ה-*S-RNase* העצמיות נשארות פעילות (De Franceschi et al., 2012). כתוצאה מכך בהאבקה זרה אין פירוק RNA בנחשון הנביטה, ולעומת זאת בהאבקה עצמית מתרחש עיכול ה-RNA על ידי ה-*RNase* וגרגר האבקה מושבת. במינים גרעיניים (Maloideae) מקובל להניח כי קיים מגוון גנים ל-*SFB* בכל הפלוטיפ ולכן הם מכונים *SFB* (*SFB*) *S locus F-box brothers* (Sassa et al., 2007).

בשסק קיים אמנם מנגנון GSI, אך זנים רבים ידועים כבעלי יכולת הפריה עצמית. במסגרת מחקר שערכנו (Niska et al., 2010) ריצפנו ארבעה אללי *S-RNase* מזני השסק המסחריים 'אבריי', 'יהודה' ויעכו 1'. בכל הזנים נמצא אלל *S6*, כאשר האלל השני הוא: *S2*, *S3* ו-*S4*, בהתאמה. בנוסף פיתחנו שיטה לזיהוי של כל אחד מהאללים באופן ספציפי. זיהוי תכולת אללי *S-RNase* בצאצאי האבקה פתוחה (זרעים מפירות בשלים) אפשר לקבוע את שיעור ההאבקה הזרה במטע המכיל את שלושת הזנים הללו. התוצאות הובילו גם להבנה שלוקוס *S6* אחראי ליכולת ההפריה העצמית בכל הזנים שנבדקו. בריצוף הגנים ל-*SFB* השייכים ללוקוס *S6* התקבלו ארבעה רצפים חדשים הנראים נורמליים. בריצוף הגן השלם של *S6-RNase* מצאנו תוספת של 24 בסיסים סמוך לקצה ה-3'. מוטציה זו אפשרה אמנם את ביטוי הגן ברמת m-RNA, אך פגעה באופן ברור בפעילותו האנזימטית של החלבון.

מסקנה: שבירת מנגנון אי ההתאם הגמטופיטי בזני השסק 'אבריי', 'יהודה' ויעכו 1' התקבלה כתוצאה מתוספת של 24 בסיסים ב-*S6-RNase*, שגרמה לפגיעה בפעילות האנזימטית של החלבון.

חומרים ושיטות

1. המטע: הניסויים נערכו במטע שסק של קיבוץ מרום-גולן, הנמצא בצפון הכנרת. המטע ניטע ב-2002, המרווח בין העצים 4 x 6 מ'. במטע 6 שורות עצי 'יהודה'. בשורה הרביעית נטועים לחילופין, בין עצי

‘יהודה’, עצי ‘אבריי’ או עצי ‘עכו 1’. עצי שלושת הזנים פרחו בו זמנית במהלך אוקטובר 2008. הפירות נקטפו בין התאריכים 15/2-5/4/09.

2. מקור החומר הצמחי לאנליזות DNA, RNA וחלבון: DNA, מעלים מעצי המטע שהוזכר, שימש לאפיון וריצוף אללי *S* מהזנים ההוריים ‘אבריי’, ‘יהודה’ ו‘עכו 1’. בקטיף נאספו פירות מכל אחד מהזנים, שהתפתחו לאחר האבקה פתוחה בעצים סמוכים לעצי שני הזנים האחרים. הזרעים הונבטו ומהעלים שלהם הופק DNA לאנליזה. מכל פרי נבדקו 1-2 זרעים בלבד. DNA מזרע שאופיין כהומוזיגוט ל-*S6* שימש לאנליזות אללי *SFB* מלוקוס זה. לאנליזות RNA וחלבון שימשו עליים מפרחי שסק טריים שהוקפאו ונשמרו ב-70°C עד לשימוש.

3. הפקת DNA: DNA גנומי מעלים הופק לפי Doyle and Doyle (1987). 100-200mg עלים, שנשמרו ב-70°C, נכתשו במכתש ועלי בנוכחות חנקן נוזלי. האבקה הכתושה הורחפה ב-700µl בופר הפקה המכיל: 20mM, 2% hexadecyltrimethylammonium bromide [CTAB], 100mM Tris pH 8: 1% polyvinylpyrrolidone [PVP], 1.4M NaCl, ethylenediaminetetra acetic acid [EDTA] pH 8 ו-2-mercaptoethanol MW=40000. התערובת הודגרה 30 דקות ב-65°C, תוך כדי ערבוב. לאחר קירור לטמפרטורת החדר, נערכו שני מיצויים עם chloroform:octanol (24:1). ה-DNA הושקע בעזרת Ethanol והומס במים.

4. תגובות PCR להגברת אללי *S-RNase* ו-*SFB*: להגברה ראשונית של קטעי DNA של אללי *S-RNase* מזני השסק ‘אבריי’, ‘יהודה’ ו‘עכו 1’ נערכה בתגובת PCR עם תחלים אוניברסלים של אללי *S* מאגס (Ishimizu et al., 1998). עבור כל אלל שרוצף נבנו תחלים ייחודיים, ששימשו לזיהוי ספציפי שלו בתגובת PCR. להגברת אללי *S-RNase* השלמים שימשו תחלים שנבנו על-פי רצפים מקצוות אללי *S-RNase* מאגס יפני. פרוט התחלים מופיע בטבלה 1.

להגברת אללי *SFB* מלוקוס *S6* שימשו התחלים FjpFB1 (5'-) ו-RjpFB1 (5'-) (CCAAGTCTCTGATGMGRTTCAAATG) ו- (SRGTTAGKWGTTTTGTCCATGAAC-3') מאגס יפני (Sassa et al., 2007). טמפי' annealing 56°C.

התערובת לתגובת ה-PCR הכילה את המרכיבים הבאים בנפח 25µl: 20ng DNA, 1X Ex *Taq* buffer, 20 pmol מכל אחד, dNTP, 0.2 mM, 1.5mM MgCl₂, (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 1.25 U Ex *Taq* (Takara) ו-MyCycler apparatus נערכו במכשיר (BioRad, Hercules, CA).

תוכניות ה-PCR להגברת רצף *S-RNase* החלקי, קצוות ה-*S-RNase* ו-*SFB* מפורטות בטבלה 2.

טבלה 1: תנאים ותחלים עבור תגובות PCR לריצוף וזיהוי ספציפי של *S-RNase* משק.

טמפי annealing	אורך הקטע המוגבר	פריימר 5'→3' antisense	פריימר 5'→3' sense	מס' הגן בבנק הגנים	הגן RNase המוגבר
48	תלוי בגן	GYGGGGGCARTYT ATGAA ¹	TTTACGCAGCAATATC AG ¹		<i>S</i> כללי חלקי
52	514	CTGCAAAGASTRAY CTCAACC [S2- (627- 647), S4- (654-674) and S6- (604-624)]	AATAAAACCATGAAT TCCCTGGC (133-155)	GU384665	<i>S</i> 2 ספציפי חלקי
56	539 ³	Antisense for partial <i>S</i> 2	GGTAATTGCTAGATA GACTAA (274-294) ²	GU384666	<i>S</i> 3 ספציפי חלקי
56	355	Antisense for partial <i>S</i> 2	GCATACCAGAGAGAA AAATTA (319-339) ²	GU384667	<i>S</i> 4 ספציפי חלקי
58	234	Antisense for partial <i>S</i> 2	CAACCACAATACAGG ACGACG (390-410) ²	GQ202269	<i>S</i> 6 ספציפי חלקי
54	תלוי בגן	Antisense for partial <i>S</i>	TTAVTMATTAATHTG CCTCG (18-37)	AB002140 ⁴	קצה <i>S</i> 5' כללי חלקי
54	תלוי בגן	YATACTAGCTAGCC GCG (760-752)	Sense for partial <i>S</i>	AB002140 ⁴	קצה <i>S</i> 3' כללי חלקי

¹תחלים אוניברסלים מ-*S-RNase* מאגס יפני *Pyrus pyrifolia* (Ishimizu et al., 1998).

²חלק מהתחל או כולו ממוקם באינטרון

³אורך הגן הוסק מרצף הגן המצופה.

⁴תחלים אוניברסלים תוכננו על פי השוואה בין הרצף השלם של מספר גנים של *S-RNase* מאגס יפני, ביניהם *S3-RNase*

(Acc. No. AB002140)

טבלה 2: תנאי תגובות ה-PCR להגברת *S-RNase* ו-*SFB* משק.

הגברת <i>SFB</i>			הגברת <i>S-RNase</i>		
No. of cycles	Temp (°C)	Time (min.)	No. of cycles	Temp (°C)	Time (min.)
1	94	2	1	94	5
10	94	0.25	28	Anneal. Temp. ¹	2
	56	0.5		72	3
	70	2		94	1
20	94	0.25	1	Anneal. Temp.	1
	56	0.5		72	1
	70	2.5		94	1
1	70	7	1	Anneal. Temp.	1
				72	5

¹מפורט בטבלה או ב"חומרים ושיטות".

5. שיבוט וריצוף הגנים: תוצרי PCR של אללי *S-RNase* מ-DNA של הזנים ההוריים או אללי *SFB*

מצאצא הומוזיגוט ללוקוס *S6* שובטו לפלסמיד (Promega, Madison, WI) pGEMT ורוצפו לשני

הכיוונים בעזרת מכשיר הריצוף ABI 3730 XL (PE Bio System, Foster, CA).

6. אנליזה של רצף ה-DNA ורצף חומצות האמינו המשוער של החלבונים: האנליזה נערכה בעזרת

התוכנות BLAST (NCBI), Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>), BoxShade,

ו-SeqManII' (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) ו-DNAstar Lasergene 6

(Madison, WI).

7. רמת הביטוי של *S-RNase*: RNA הופק מעליים של פרחי הזנים 'אברי', 'יהודה' ו'עכו' 1' בשיטה שתוארה על-ידי Gasic et al. (2004). עליים נאספו בפריחה והוקפאו ב-70°C עד לשימוש. לכל זן נערכו שלוש הפקות RNA בלתי תלויות, כל הפקה מכל העליים מ-40 פרחים שונים (0.2-0.5 ג' דוגמא). בסיום ההפקה ה-RNA טופל ב-DNase (חב' Ambion). cDNA התקבל מ-2µg RNA בעזרת High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (חב' Applied Biosystems). שלבי התגובה כללו: 25°C 10min, 37°C 2hr, 85°C 5min.

תחלים ספציפיים המגבירים קטע של כ-200 בסיסים תוכננו עבור כל אחד מהגנים S2, S3, S4, ו-S6. *RNase* עבור גן הביקורת הפנימי שימשו תחלים מרצף הגן ל-*Actin* מאגס אירופי (Acc. No. AF386514) (טבלה 3).

תגובת qRT-PCR בוצעה עם 5µl cDNA. ריכוז כל אחד מהתחלים 6pM ובנפח סופי של 15 µl עם KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (חב' Kapa Biosystems) במכשיר Corbett Rotor-Gene 6000 ובהסתמך על תוכנת Rotor-Gene 6000 Version 1.7. תנאי ה-qRT-PCR היו: 15min 95°C; 52 מחזורים של: 95°C 15sec, 60°C 30sec ו-72°C 30sec; 72°C 90sec; בשלב האחרון התגובה חוממה בקצב של 1°C כל 5sec עד ל-99°C. כל אחת מהתגובות נערכה בטרופליקטים, כאשר ביקורת שלילית ללא cDNA non template control- (NTC) בוצעה עבור כל זוג תחלים.

רמת הביטוי היחסית של כל אחד מה-*S-RNase* התקבלה מחישוב השכיחות היחסית של ה-mRNA שלו לעומת m-RNA של *Actin*, ששימש כגן ביקורת פנימי, לפי Muller et al (2002).

טבלה 3: תחלים עבור תגובות qRT-PCR לקביעת הביטוי היחסי של אללי *S-RNase* משטק.

הגן המוגבר RNase	מס' הגן בבנק הגנים	פריימר sense 5'→3'	פריימר antisense 5'→3'	אורך הקטע המוגבר ¹
S2	GU384665	AATAAAACCATGAAT	GAAAGTATTGCAA GCTGTCG (426-445)	162
S3	GU384666	CTGACAAGTTGTTTAC GG (62-79)	GTCTGGTTCTGTAA TGGGGG (581-600)	214
S4	GU384667	GCATGGTAGGACCTG ACC (101-113)	CGTTTCAAAGTAAT GGTTCTCG (456-477)	192
S6	GQ202269	AAGCCAACAACTTG GATCCT (226-246)	CAGGATTCAGAG ACGTTTTG (551-571)	222
<i>Actin</i> ³	AF386514	GGTGTTCATGGTTGGTA TG (1-18)	ACACGGAGCTCATT GTAG (147-164)	181

¹אורך הקטע המוגבר ללא האינטרון.

²בסוגריים מספרי הבסיסים לפי הרצף הגנומי של הגן בבנק הגנים

³גן ביקורת פנימי, התחלים מרצף גן *Actin* מאגס אירופי (*Pyrus communis*).

8. מבנה מרחבי משוער של חלבוני *S-RNase*: המודלים התקבלו בעזרת התוכנה Swiss Model Workspace (Arnold et al., 2006) והושו זה לזה בעזרת PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, San Carlos, CA). (2002).

9. גיל נטיבי לפעילות אנזימטית של *S-RNase* בעליים: הפקת החלבונים מהעליים נעשתה לפי [Boskovic and Tobutt \(1996\)](#). כל העליים מ-70°C פרחים, שנשמרו ב-70°C, נכתשו במכתש ועלי בנוכחות חנקן נוזלי. האבקה הכתושה עורבבה עם 0.5ml תמיסת מיצוי שהכילה: 30%, 10% dimethyl sulfoxide, 0.05% Triton X-100, 0.1% sodium metabissulphite, sucrose (Bio-Rad 0.2% Pharmalyte pH 3-10) ו-0.05% Triton X-100. התערובת סורכה ב-4°C, 14,000rpm, 1hr. הנוזל העליון, שהכיל את החלבונים המסיסים, נלקח לקביעת חלבון ([Bradford et al., 1976](#)) ולהרצה בגיל.

חלבונים, שמוצו מהעליים, הופרדו בגיל נטיבי בהתאם לנקודה האיזואלקטרית שלהם (pI). הגיל הכיל: (Bio-Rad) 7.5% acrylamide/Bis-acrylamide (Sigma), 10% sucrose, 4% Ampholyte Bio-Lyte 3/10, 0.04M ammonium persulfate (Bio-Rad) ו-0.04M TEMED (Bio-Rad) 15µl. תמיסת של 0.04M DL-glutamic acid ו-0.1M NaOH שימשו כבופר אנודה ובופר קטודה, בהתאמה. הרצת הדוגמאות התבצעה במערכת גילים מסוג Mini-Protean II (Bio-Rad) ב-4°C. שלבי ההרצה: דרך הגיל הועבר מתח של 50V למשך 30 דקות. לאחר מכן 22µg חלבון הוטענו בכל בארית, כאשר לדוגמת החלבון הוסף חצי הנפח של בופר הטענה (הכולל 300µl glycerol, 375µl תמיסת מיצוי כני"ל ו-325µl ddH₂O). המשך הרצת הדוגמאות בגיל כללה את השלבים הבאים: 1hr 65V, 1hr 100V, 1hr 130V ו-1hr 175V. צביעת הגיל לפעילות RNase נעשתה ב-30°C תוך כדי טלטול לפי [Boskovic and Tobutt \(1996\)](#). הגיל הודגר 10 דקות בתמיסת שטיפה, שהכילה 0.1M sodium acetate ו-0.1M KCl וטוטרלה ל-pH 5.8 עם acetic acid. לאחר מכן הגיל הודגר במשך 30 דקות בתמיסה טרייה שהכילה 50mg RNA (cat.R6750 Sigma) מומסים ב-50ml תמיסת שטיפה. בהמשך הגיל הודגר שוב בתמיסת שטיפה למשך 10 דקות, קובע עם תמיסת 7% acetic acid למשך דקה, נצבע במשך 2min על-ידי תמיסת 80mg toluidine blue, 0.2ml acetic acid ו-50ml ddH₂O ונשטף מספר פעמים ב-ddH₂O עד שפסי פעילות ה-*S-RNase* הבהירים התגלו. לבסוף הגיל צולם במכשיר ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad).

תוצאות ודיון

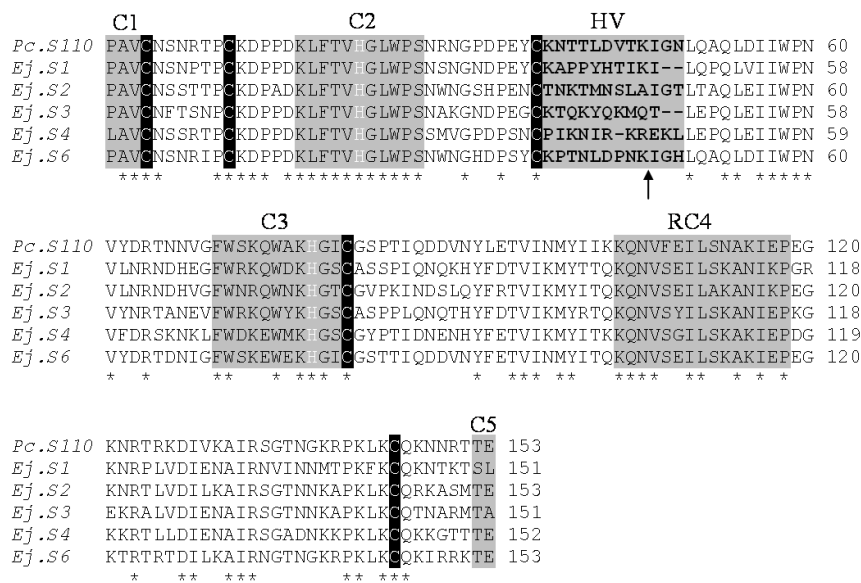
בכל סעיפי המחקר נבדק מנגנון אי ההתאם העצמי בשלושת זני השסק 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו 1', אלא אם צויין אחרת.

1. רצף חומצות האמינו המשוער של אללי *S-RNase*

כל אחד מאללי *S-RNase* מהזנים 'אבריי', 'יהודה', ו'עכו 1' רוצף באופן בלתי תלוי. בהשוואת הרצפים שהתקבלו לגנים מבנק הגנים GenBank נמצא שהגנוטיפ של 'אבריי' הוא S2-S6 (גנים מס. GU384665 ו-GQ202269, בהתאמה), 'יהודה' הוא S3-S6 (גנים מס. GU384666 ו-GQ202269, בהתאמה) ו'עכו 1' הוא S4-S6 (גנים מס. GU384667 ו-GQ202269, בהתאמה). מכאן שכולם נמצא אלל *S6-RNase*. S2, S3 ו-*S4-RNase* רוצפו באופן חלקי זמן קצר לפני פרסום תוצאותינו ([Niska et al., 2010](#)) על-ידי [Carrera et al \(2009\)](#) (מס' הגנים EU442286, EU442287 ו-EU442289, בהתאמה), כאשר אלל S6-

RNase הוא אלל חדש. רצף אללי *S2*, *S3* ו-*S4-RNase* שהתקבלו בעבודתנו הופקדו בבנק הגנים, כיוון שהם ארוכים ב-24-94 בסיסים מהרצפים של *Carrera et al (2009)*.

בעזרת התחלים האוניברסלים רוצפו כ-80% מהבסיסים במסגרת הקריאה (gene's open reading frame) של אללי *S2*, *S3*, *S4* ו-*S6-RNase*. בכל הגנים נמצא אינטרון באתר HV (hypervariable), בדומה לאללי *S-RNase* ממינים אחרים. אורך האינטרון של אלל *S6-RNase* החדש הוא 124 בסיסים. שיעור הדמיון הגבוה ביותר של רצף חומצות האמינו המשוער של שני האקסונים, 83%, התקבל עם *S110-RNase* מאגס אירופי (*Pyrus communis*). שיעור הדמיון בין *S1*-, *S2*-, *S3*-, *S4*- ו-*S6-RNase*, שהוסק מרצף הגן, מכיל את כל התכונות הידועות של *S-RNase*: שלושה אתרים שמורים *C2*, *C3* ו-*RC4*, כמו גם חמישה שיירי ציסטאין ושני שיירי היסטידין שמורים החיוניים לפעילות *RNase* (Royo et al., 1994). בהמשך המחקר ריצפנו את הגן השלם של *S6-RNase* משלושת הזנים ההוריים. מצאנו בגן תוספת של 24 בסיסים סמוך לקצה 3' שלו, הבאה לידי ביטוי בתוספת 8 חומצות אמינו, ששבע מתוכן הן הידרופיליות (ליזין K, סרין S, פרולין P) (תמונה 2). בהמשך המחקר בדקנו כיצד משפיעה תוספת זו על מנגנון אי ההתאם העצמי הגמטופיטי בשלושת זני השסק 'אברי', 'יהודה' ו'עכו' 1.



תמונה 1: השוואה של רצף חומצות אמינו חלקי (משוער) של *S-RNase* משסק. האתרים השמורים (*C1-C5*) והאתר המשתנה (*HV*) מסומנים באפור. שיירי הציסטאינים (אותיות לבנות על רקע שחור) וההיסטידינים (אותיות לבנות על רקע אפור) השמורים מסומנים אף הם. מיקום האינטרון מסומן בחץ. רצפי *S-RNase* הם מאללי *S1* (ACC66149), *S2* (ADC92282), *S3* (ADC92283), *S4* (ADC92284) ו-*S6* (ACS94938) של שסק (*Eriobotrya japonica*, *Ej*) ומאלל *S-110* (BAF35959) מאגס אירופי (*Pyrus communis*, *Pc*).

```

                                C1                C2
apple_S4      HGITRMIYHVTHLFSLVLSLSSSTVGFDFYQFTQQYQPAACNSNPTPKCKDPTDKLFTVH 60
Pear_S3       MGITGCMVHVMMWVLLIVLILCSSTVGYDYFQFTQQYQLAVCNENRTLCRDPDKLFTVH 60
Loquat_S6     MAITGMIYHVTKVFSLTVLILSWSTVGFDFYQFTQQYQPAVCNSNRIPCKDPPDKLFTVH 60
               *.* ** *::: *  : * * **  *****:***** *.* **  *::: *****
                                HV                C3
apple_S4      GLWPSNKIGRDPFYCKTRNR-RKAKTLEPQLEIIWPNVLDRTNHTGFWRPQWRKHCCTC 119
Pear_S3       GLWPSNMVGPDPKSKCPKRNIR-KREKLEHQLEIIWPNVFDRTKNNLFWDRKWMKHCSCC 119
Loquat_S6     GLWPSNWNCHDPSYCKPTNLDPNKIGHLQQLDIIWPNVYDRTDNIGFWSKREWEKHCIGC 120
               ***** * ** *  *  : : * : ** :***** ** : : ** : * ** **
                                C4
apple_S4      YPTIQNENDYFETVIKMYITKQNVSRILSNKAKIEPDCQSRPLVDIENAIKRNTHNKKPK 179
Pear_S3       YPTIDNENHYFETVIKMYISKQNVSRILSKAKIEPDCGKRALLDIENAIKRNADNKKPK 179
Loquat_S6     STTIQDDVNYFETVINMYITKQNVSEILSKAKIEPECKTRTRTDILKAIKRNKTNKRPK 180
               .**::: .*****:***:*****:***:*****:*. *  ** :*****:..**
                                C5
apple_S4      FRCQKNNCWTLEVEITLCSDEKRAHFIDCPMPFLP-----GSPYLCPNISIRY 227
Pear_S3       LKCQKKGTTTELVEITLCSDEKSEHFIDCPHPFEP-----ISPHYCTNNIKY 227
Loquat_S6     LKCQKIRPKTELVEVILCSDEKRLTQFINCPYPLKPKSSSPFKPKSSPYFCPLNFIKY 236
               :****  *****:*****. :**:* * : *  ** : **  *:*

```

תמונה 2: השוואה של רצף חומצות אמינו משוער של הגן השלם של S4-RNase מתפות, S3-RNase מאגס יפני ו- S6-RNase משסק. האתרים השמורים (C1-C5) והאתר המשתנה (HV) מסומנים באפור.

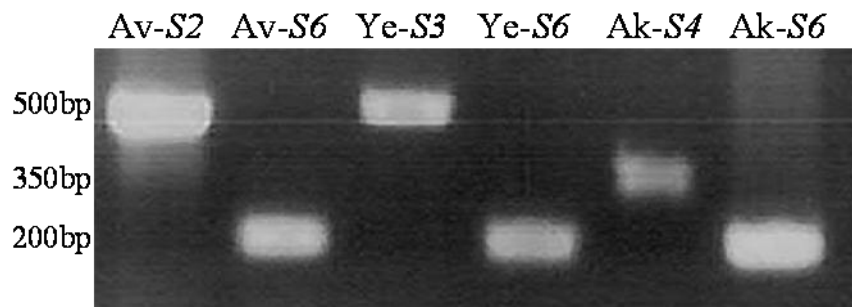
2. איפיון תכולת אללי S-RNase בצאצאים ממטע עם מפרים

בשלב הראשון של איפיון תכולת אללי S-RNase בצאצאי 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו 1', ממטע בו נטועים שלושת המפרים, פיתחנו שיטה לזיהוי ספציפי של כל אחד מאללי S-RNase המסתמכת על תגובת PCR ייחודית עם תחלים ספציפיים (טבלה 5). בתמונה 2 ניתן לראות את תוצרי ה-PCR הספציפיים לכל אחד מאללי S-RNase.

מהתפלגות אללי S-RNase בצאצאי 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו 1' ניתן להסיק על שיעור ההפריה העצמית והזרה לאחר האבקה פתוחה במטע בו נטועים לסירווגין עצים משלושת הזנים: א. הפריה עצמית: בזן 'אבריי' מבוטאים אללי S2 ו-S6, לכן צאצאי הפריה עצמית שלו יכולו את צירופי האללים S2-S2, S2-S6 או S6-S6 וכל שאר הצירופים יעידו על הפריה זרה. בהתאם לכך צאצאים עצמיים של הזן 'יהודה' (S6-S3) יכולו את הצירופים: S3-S3, S3-S6 או S6-S6 וצאצאים עצמיים של הזן 'עכו 1' (S6-S4) יכולו את הצירופים: S4-S4, S4-S6 או S6-S6. בטבלה 5 ניתן לראות שכל צאצאי ההפריה העצמית הכילו את האלל S6. יש לציין שחלק מהצאצאים העצמיים הללו מקורם בהאבקה זרה עם גרגרי אבקה S6 מהזנים האחרים במטע (הנחשבת הפריה עצמית). מכאן ששלושת הזנים הם בעלי התאם עצמי ושאלל S6 יכול לשמש סמן לסלקציה עבור זני שסק בעלי התאם עצמי. בסעיף הקודם הראינו שבגן ל-S6-RNase מצויה תוספת של 24 בסיסים סמוך לקצה ה-3'. ב, העשויה להתבטא כתוספת של 8 חומצות אמינו בקצה C של החלבון. מוטציה זו עשויה לגרום לשבירת מנגנון אי ההתאם העצמי וליכולת ההפריה העצמית בשלושת זני השסק שנבדקו. בהמשך העבודה בדקנו באיזה שלב המוטציה באה לידי ביטוי: שעתוק ל-mRNA, תרגום לחלבון או בפעילות ה-RNase של החלבון (סעיפים 5-3 בפרק זה).

ב. האבקה זרה: דרגת ההאבקה הזרה במטע נקבעה לפי תכולת אללי S הזרים בצאצאי האבקה פתוחה במטע עם מפרים (טבלאות 5 ו-6). לדוגמה: שבעה מתוך 31 צאצאי הזן 'אבריי' התקבלו כתוצאה מהפריה זרה עם גרגר אבקה נושא אלל S3 מ'יהודה' (S6-S3 ו-S2-S3). יש לשער שמספר דומה של צאצאי 'אבריי'

התקבלו מהפריה עם גרגרי אבקה נושאי אלל S6 מהזן 'יהודה', ולכן ניתן להניח ששיעור ההאבקה הזרה בצאצאי 'אברי' הוא 46% (14 מתוך 31 צאצאים). באותו אופן שיעור ההאבקה הזרה המתקבל עבור 'יהודה' הוא 10% ועבור 'עכו 1' הוא 32%. אנו מניחים ששיעור ההאבקה הזרה הנמוך ב'יהודה' התקבל מהיותו הזן העיקרי במטע ו/או כתוצאה מתכונות הפרת, שלא נבדקו בעבודה זו. בהתאמה, כל צאצאי ההפריה הזרה בזנים 'אברי' ו'עכו 1' הכילו את אלל S3 מ'יהודה'. שיעור ההאבקה הזרה הגבוה בצאצאי 'אברי' ו'עכו 1' מרמז על תרומתם של דבורי דבש ומאביקים נוספים לחנטה בשסק כפי שדווח בעבר (McGregor, 1976; Cuevas et al., 2003; Thapa, 2006). תוצאות מחקר זה הן ראייה ראשונה לכך ששיעור ההאבקה הזרה במטע שסק עם מפרים הוא משמעותי. בנוסף, דווח שהאבקה זרה בשסק משפרת את החנטה, מעלה מספר זרעים בפרי ומשפרת את גודלו (Cuevas et al., 2003; Xu et al., 2007). לכן, אף על פי שלהרבה מהזנים יכולת הפריה עצמית, יש לבחון האם נטיעות של שניים או יותר זנים במטע ישפרו את הפוריות של השסק.



תמונה 2: זיהוי אללי *S-RNase* מזני השסק 'אברי' (AV), 'יהודה' (Ye) ו'עכו 1' (Ak) בתגובת PCR ייחודית עם תחלים ספציפיים

טבלה 5: התפלגות אללי S בצאצאי 'אברי', 'יהודה' ו'עכו 1' שהתקבלו מהאבקה פתוחה במטע עם מפרים בעונת 2008-09.

מספר צאצאים	הפריה זרה				הפריה עצמית			צאצאים מהזן
	S2-S4	S2-S3	S6-S4	S6-S3	S6-S2	S2-S2	S6-S6	
31	0	4	0	3	7	0	17	אברי (S6-S2)
38	0	0	2	0	12	0	24	יהודה (S6-S3)
37	4	0	2	0	15	0	16	עכו 1 (S6-S4)

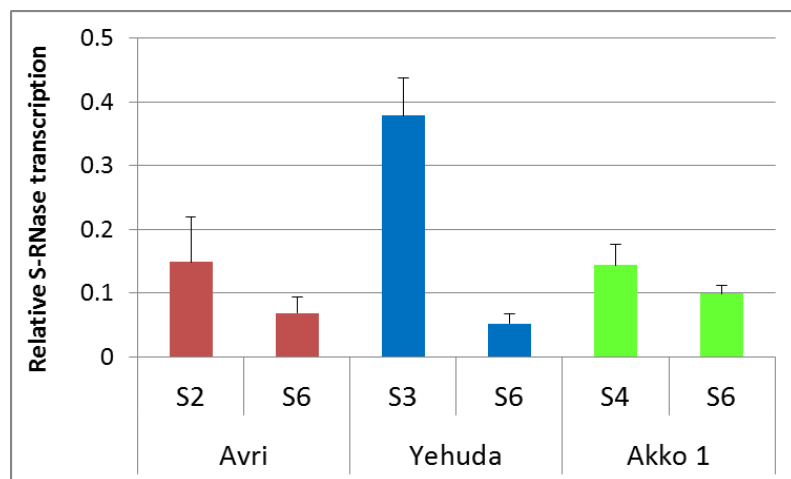
טבלה 6: שיעור ההאבקה הזרה בצאצאי 'אברי', 'יהודה' ו'עכו 1' שהתקבלו מהאבקה פתוחה במטע עם מפרים בעונת 2008-09.

האבקה זרה עם גרגרי צאצאים	האבקה זרה עם גרגרי מהזן	האבקה זרה עם גרגרי אבקה שאינם ¹ S6	האבקה זרה כוללת עם גרגרי אבקה S6 וכאלו שאינם S6
אברי	23%	23%	46%
(S6-S2)	(7/31)	(7/31)	(14/31)
יהודה	5%	5%	10%
(S6-S3)	(2/38)	(2/38)	(4/38)
עכו 1	16%	16%	32%
(S6-S4)	(6/37)	(6/37)	(12/37)

¹בהתאם לתוצאות מטבלה 5

3. רמת הביטוי של אללי *S-RNase* בעליים

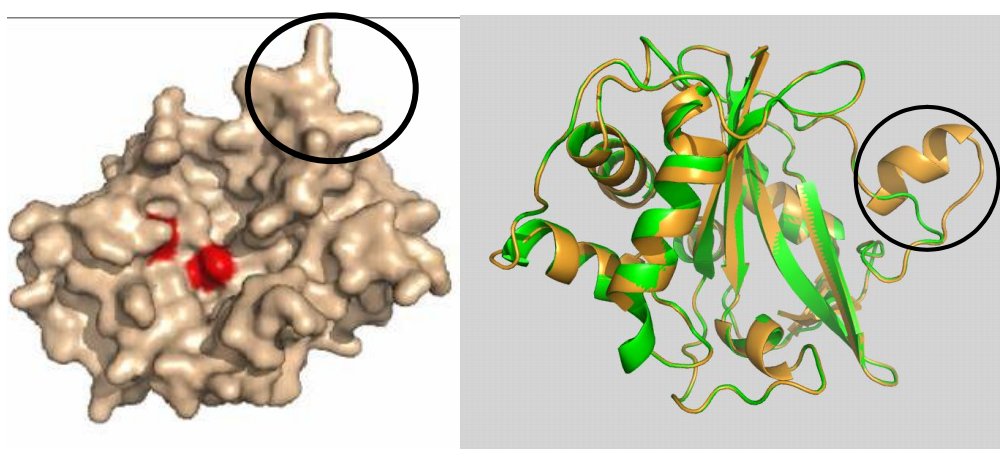
הביטוי היחסי של אללי *S-RNase* מעליים של פרחי שסק מהזנים 'אברי', 'יהודה' ו'עכו 1' נקבע בתגובת qRT-PCR. נמצא שהביטוי היחסי של אלל S6 נמוך בכל הזנים בהשוואה לאלל *S-RNase* השני מאותו הזן פי 2.2, 7.3 ו-1.4 בהתאמה (מובהק סטטיסטית רק בזן 'יהודה') (איור 1). ייתכן שהתוספת של 24 בסיסים סמוך לקצה 3' ברצף *S6-RNase* (תמונה 1) משפיעה על רמת הביטוי של הגן. יחד עם זאת בבדיקה דומה שנערכה בזן התפוח 'סטרקינגי' (S9-S28) נמצא ביטוי גבוה פי 1.5 של *S28-RNase*, בהשוואה לאלל S9, למרות אי התאם עצמי מוחלט הקיים בזן זה (תוצאות לא מובאות). מכאן אנו מניחים שרמת הביטוי של *S6-RNase* בעלי של פרחי השסק משלושת הזנים מאפשרת ייצור חלבון ברמה שיכולה לגרום לדחייה של גרגר אבקה עצמי ושלב זה איננו אחראי על שבירת מנגנון אי ההתאם העצמי.



איור 1: רמת הביטוי היחסי של אללי *S-RNase* בעליים מפרחי שסק מהזנים 'אברי', 'יהודה' ו'עכו 1'.

4. מבנה מרחבי משוער של S6-RNase

Hiratsuka et al (2002) Matsuura et al (2001) פרסמו את המבנה המרחבי של האנזים S3-RNase מאגס יפני. לפיכך (2002) דיווחו כי זן האגס היפני 'Housui' (S3-S5) המכיל RNase זה הוא בעל אי התאם עצמי. לפיכך ניתן להניח שהאנזים S3-RNase פעיל במנגנון GSI. בסימולציה תלת מימדית משוערת של מבנה החלבון S6-RNase משסק בהשוואה ל-S3-RNase מאגס יפני נראה כי מבנה החלבונים דומה, כאשר התוספת של 8 חומצות האמינו סמוך לקצה C של S6-RNase נראית כמעין טבעת בחלק החיצוני של החלבון הבנויה בעיקרה מסליל אלפא (תמונה 3). מבנה זה איננו מפתיע כיוון ש-7 מתוך 8 חומצות האמינו הנוספות הן הידרופיליות (תמונה 2) יש לבחון האם השינוי המרחבי הזה במבנה החלבון פוגע בפעילות האנזימטית של S6-RNase.

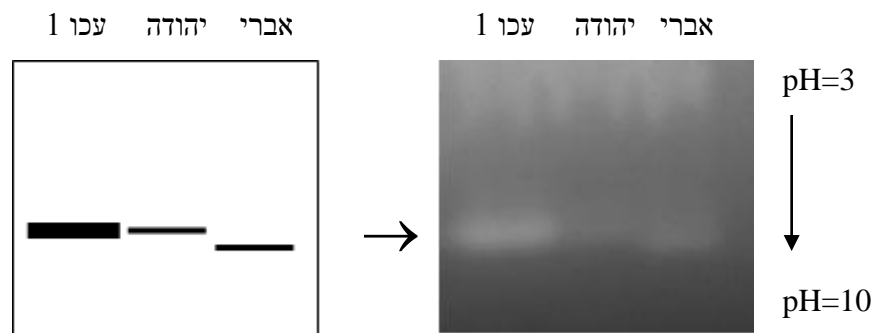


תמונה 3: מימין השוואה של המבנה המרחבי המשוער של חלבון S6-RNase משסק (בכתום) ל-S3-RNase מאגס יפני (Acc. No.ABO25421) (בירוק). משמאל המבנה המרחבי הכולל את מיקום האתר הפעיל של S6-RNase. שיירי היסטידין באתר הפעיל מסומנים באדום. בעיגול שחור מסומן מיקום התוספת של 8 חומצות אמינו.

5. פעילות אנזימטית של S-RNase בעליים:

הפעילות האנזימטית של S-RNase מעליים של פרחי הזנים 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו 1' נבדקה בגיל נטיבי שהורץ לפי pI עם RNA כסובסטרט. כביקורת הורצו חלבונים מעליים של פרחי תפוח 'זהוב' ויסטרקינגי (Schneider et al., 2001). בכל אחד משלושת הזנים התקבל פס פעילות יחיד של S-RNase בנקודת pI דומה לזה של S-RNase מתפוח (תוצאות לא מובאות) (תמונה 4). בזנים 'יהודה' ו'עכו 1' נקודת pI של החלבון זהה, כאשר ב'אבריי' התקבל פס פעילות ב-pH מעט גבוה יותר. אם S6-RNase היה פעיל אנזימטית בעליים היינו אמורים לקבל שני פסי פעילות לכל זן, או לפחות פס פעילות אחד זהה בגובהו בכל הזנים. דבר זה לא התקבל, מכאן שהפעילות האנזימטית של S6-RNase בפירוק RNA נפגעה. ייתכן שהתוספת של 24 הבסיסים סמוך לקצה 3', של הגן, המתבטאת בתוספת של 8 חומצות האמינו סמוך לקצה C של החלבון, גורמת לכך שהמולקולה מזוהה כמולקולה זרה ולכן היא מפורקת

בתא. אפשרות נוספת היא שהתוספת הזו הביאה לפגיעה מרחבית בנגישות של מולקולות ה-RNA אל האתר הפעיל של האנזים, ולכן היא איננה פעילה כ-RNase.



תמונה 4: ג'ל פעילות S-RNase מעליים של פרחי שסק מהזנים 'אברי', 'יהודה' ו'עכו 1'. משמאל איור להמחשת פסי הפעילות בג'ל.

6. רצף חומצות האמינו המשוער של הגנים ל-SFB מלוקוס S6:

רצף גנים ל- SFB נקבע ב-DNA מצאצא הומוזיגוט להפלוטיפ S6 מהזנים 'אברי', 'יהודה' ו'עכו 1'. נמצאו ארבע רצפים חדשים: SFB4-S6 ו-SFB8-S6 התקבלו מצאצאי שלושת הזנים, SFB1a-S6 התקבל מצאצא הומוזיגוט של 'אברי' ו'עכו 1' ו-SFB1b-S6 התקבל מצאצא הומוזיגוט של 'יהודה' בלבד. שמות הגנים נקבעו לפי תת המשפחה של SFBB מאגס יפני בעלת דרגת הדמיון הגבוהה לו ביותר (Kukui et al., 2011). כדי להבדיל בין שני גנים מאותה תת-משפחה נוספה לשם אות לועזית קטנה a) או b) (טבלה 7). רצף חומצות האמינו של ארבעת הגנים, שהוסק מרצף ה-DNA, נמצא תקין (תמונה 5). אחוז הדמיון הגבוה ביותר של הגנים ל-SFB מהפלוטיפ S6 שרוצפו בעבודה זו (86%-97%) הוא לאללי SFBB ידועים מאגס יפני (טבלה 7). אחוז הדמיון ברמת חומצות האמינו בינם לבין עצמם נע בין 59-87% בלבד. העובדה שדרגת הדמיון של רצף חומצות האמינו המשוער של SFBB משקל לגנים מקבילים מאגס יפני גבוהה בהשוואה לדרגת הדמיון בינם לבין עצמם מצביעה על כך שההתפצלות לסוגי ה-SFBB השונים קדמה להתפצלות של מיני הגרעיניים (Kukui et al., 2011) אין לשלול קיומם של עוד גנים של SFB מלוקוס S6 שטרם מצאנו.

טבלה 7: SFBB מלוקוס S6 של שסק¹.

תת משפחה ¹ SFBB	% דמיון גבוה ביותר	אחוז דמיון בין SFBB משסק				מספר ח"א ²	שם הגן ¹
		SFBB8	SFBB4	SFBB1b	SFBB1a		
SFBB1	95% SFBB1-S1 <i>Pyrus pyrifolia</i> (BAK69446)	59%	67%	87%	-	397	EjSFBB1a-S ⁶
SFBB1	86% SFBB1-S3 <i>Pyrus pyrifolia</i> (BAK69447)	61%	69%	-	-	396	EjSFBB1b-S ⁶
SFBB4	95% SFBB4-S3 <i>Pyrus pyrifolia</i> (BAK69457)	64%	-	-	-	391	EjSFBB4-S ⁶
SFBB8	97% SFBBγ <i>Malus domestica</i> (ADE43141)	-	-	-	-	393	EjSFBB8-S ⁶

¹שם הגן נקבע לפי תת המשפחה של SFBB מאגס יפני בעלת דרגת הדמיון הגבוהה לו ביותר (Kukui et al., 2011).
²מספר חומצות האמינו והדמיון בין הגנים התקבלו על-סמך רצף חומצות האמינו, שהוסק מרצף ה-DNA.

EjSFBB1a-S6	MSQVCESETPEDRVVETLSRLPPKSLMRFKCIRRSWCILISTPSFVAKHLNNSMNNKLS	60
EjSFBB1b-S6	MSQVRESETPEDRVVETLSRLPPKSLMRFKCIRKSWCILISTPSFVAKHLNNSMNNKLS	60
EjSFBB4-S6	MSQVRETESEDRVVSIMSKLPPKSLMRFKCIRKSWCTLINSFVAKHLNSVNDKFNSS	60
EjSFBB8-S6	MSQVCESETPEDRMVEILSRLPPKSLMRFKCIRKSWCTLINSPCFVAKHLSDSVGNKLS	60
	←*** ****	
	F-Box	
EjSFBB1a-S6	SSCILLNRCQNHVFPDRSWKPEVFWFSIINLSIDSDHNLHYDVEDLN-IPCPLGGHDFVE	119
EjSFBB1b-S6	SSCILLNRCQNHVFPDRSWKPEVFWFSIINLSIDSDHNLHYDVEDLN-IPCPLGGHDFVE	119
EjSFBB4-S6	STCIPLNRSQVHVFPDKSWKHEVLWSMINFNDVARALYDVEDLN-IPFPDDHQHVL	119
EjSFBB8-S6	STCILLNCSQAHCSEESWKQEILWSVINLSIDGD--ELHYDIEDLTNVFPLKDDHHEVE	118
	* ** * * * . * * * . : . : *	
EjSFBB1a-S6	IGGYCNGIVCVLAWKTLHWIYVILCNPATREFRQLPHSCLLQPSR-SRRKFQLNTISTLL	178
EjSFBB1b-S6	IGGYCNGIVCVLAWKTLHWIYVILCNPATREFRQLPHSCLLQPSR-SRRKFQLNTISTLL	178
EjSFBB4-S6	IHGYNCGIVCVISGK----NILLCNPATREFRQLPDSFLLLPSP-LGGKFELETDFGGL	173
EjSFBB8-S6	IHGCDGIVCITVDEN----FFLCNPATGEFRQLPDSCLLLPLPGVKEKFGLETTLKGL	173
	* * * * * : * * * * * : *	
EjSFBB1a-S6	GFGYDCKAKEYKVVQVIEN--CEYSDAEQYDYHRIALPHTAEVYTTTANSWREIKIDISG	236
EjSFBB1b-S6	GFGYDCKAKEYKVVQVIEN--CEYSDAEQYDYHRIALPHTAEVYTTTANSWREIKIDISG	236
EjSFBB4-S6	GFGYDCRAKDYKVVRIEN--CEYSDERTYHRIPLPHTAEVYTMGTNSWKEIKIDISS	231
EjSFBB8-S6	GFGYDCKAKEYKVVRIIDNYDCEYSDGETYIEHIALPHTAEVYTTMAANSWKEIAIDILS	233
	* * * * * : * * * * * : * * * * * . . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
EjSFBB1a-S6	ETYC-----YTCSVYLNFGFCFWIATDEEDFILSFDLGEIFHRIQLPCRRESDFRFSNLF	291
EjSFBB1b-S6	ETYC-----YTCSVYLNFGFCFWIATDEEDFILSFDLGEIFHRIQLPSRXEFGFTFYGLF	291
EjSFBB4-S6	KTYP-----CSCSVYLNKGFCYWFTRDGEFIFLSFDLGERFHRIQLPSRRESGLEFYIIF	286
EjSFBB8-S6	KILSSYSEPYSYSVYLKGFYWLSCDVEEYIFSFDLANEISDMIELPFRGEFGFKRDGIF	293
	: : * * * * * : * * * * * : *	
EjSFBB1a-S6	LCNKTIASFGSCCNPSDEDSTLYEIWVMDYDGVKSSWTKLLTFGPLKGIENLFTFWKTD	351
EjSFBB1b-S6	LYNESITSYCTRYDPS-EGFKLFEIWVMDYDGVKSSWIKLLTVGPFKGIQYPLTLWKCD	350
EjSFBB4-S6	LCNESIASFCSLYDGG-EDSKLCEIWVMDYDGVKSSWTKLLVAGPFKGIKPLTFWKCD	345
EjSFBB8-S6	LYNESLTYCYCTSYEEP---STLFEIWVMDYDGVKSSWTKHLTAGPFKDMFPLTPWKRD	350
	* * * * * : : : : *	
EjSFBB1a-S6	ELLMETSGGTASSYTSSTGNLNYLHIPPILNQVRAFKALEYVESIV	397
EjSFBB1b-S6	ELLMASCGRVTSYNSSTENLKYVHIPPIINRIINFQALVYVESIV	396
EjSFBB4-S6	ELLMLDTNGRVISYNSSIGYLSYLHIPPIINWVIDSQALTYIESIV	391
EjSFBB8-S6	ELLMITSDGRAASYNSTGNFKYLHIPVPIIN---ENRVVDYVKSII	393
	* * * * * : * * * * * : *	

תמונה 5: השוואה של רצף חומצות אמינו משוער של SFBB מלוקוס S6 משסק (Ej). שם הגן נקבע לפי תת המשפחה של SFBB מאגס יפני בעלת דרגת הדמיון הגבוהה לו ביותר (Kukui et al., 2011). אתרים שמורים ואתרים שמורים יחסית מסומנים בכוכביות ובנקודות, בהתאמה. האזור בעל מוטיב F-Box מסומן בחץ מקווקו.

מסקנות עבור זני השסק המסחריים: 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו' 1:

1. אללי *S-RNase* אופיינו בזנים 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו' 1. בכולם נמצא אלל *S6-RNase*, כאשר האלל השני הוא: *S2*, *S3* ו-*S4*, בהתאמה.
2. פותחה שיטה לזיהוי ספציפי של כל אחד מאללי *S-RNase* באמצעות PCR.
3. מבדיקה של תכולת אללי *S-RNase* בצאצאי האבקה פתוחה עולה ששיעור ההאבקה הזרה במטע עם מפרים הוא: 46% 'אבריי', 10% 'יהודה' ו-32% 'עכו' 1.
4. איפיון תכולת אללי *S* בצאצאים הוביל להבנה שלוקוס *S6* אחראי ליכולת ההפריה העצמית בכל הזנים שנבחנו.
5. רוצפו ארבעה גנים חדשים של *SFB* השייכים ללוקוס *S6*. הרצפים נראים נורמליים.
6. בריצוף הגן השלם של *S6-RNase* נמצאה תוספת של 24 בסיסים סמוך לקצה ה-3'. מוטציה זו אפשרה אמנם את ביטוי הגן ברמת m-RNA, אך פגעה באופן ברור בפעילותו האנוימטית של החלבון.

ספרות:

- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* 22:195-201.
- Boskovic, R. and Tobutt, K.R. 1996. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90: 245-50.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-54.
- Carrera, L., J. Sanzol, M. Herrero, and J.I. Hormaza. 2009. Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (*S-RNases*) in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) (Rosaceae, Pyrinae). *Mol. Breed.* 23:539-551.
- Cuevas, J., Hueso, J.J. and Puertas, M. 2003. Pollination requirements of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. 'Algerie'. *Fruits.* 58: 1-9.
- De Franceschi, P., Pierantoni, L., Dondini, L., Grandi, M., Sansavini, S. and Sanzol, J. 2011. Evaluation of candidate F-box genes for the pollen,S of gametophytic self-incompatibility in the Pyrinae (Rosaceae) on the basis of their phylogenomic context. *Tree Genet. Gen.* 7: 663-683.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.

- Gasic, K., Hernandez, A. and Korban, S.S. 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol Biol Rep.* 22: 437a–437g.
- Hiratsuka, S. and Zhan, S.L. 2002. Cultivar differences in the expression of self-incompatibility in Japanese pears. *Acta Hort.* 587: 437-448.
- Ishimizu, T., Shinkawa, T., Sakiyama, F. and Norika, S. 1998. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *Plant Mol. Biol.* 37:931- 941.
- Kakui, H., Kato, M., Ushijima, K., Kitaguchi, M., Kato, S. and Sassa, H. 2011. Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of S-locus F-box brother genes are consistent with non-self-recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant J.* 68: 1028–1038
- Matsuura, T., Sakai, H., Unno, M., Ida, K., Sato, M., Sakiyama, F. and Norioka, S. .2001. Crystal Structure at 1.5-Å Resolution of *Pyrus pyrifolia* Pistil Ribonuclease Responsible for Gametophytic Self-incompatibility. *J. Biol. Chem.* 276: 45261–45269.
- McGregor, S.E. 1976. *Insect pollination of cultivated crop plants*. Agriculture Handbook 489. USDA-ARS. Washington DC.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., Dobbie, Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques.* 32: 1372-9.
- Niska, R., Goldway, M. and Schneider, D. 2010. The *S6* locus is responsible for self-compatibility in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *HortSci.* 45: 1146-1149.
- Royo, J., Kunz, C., Kowiyama, Y., Anderson, M., Clarke, A.E. and Newbigin, E. 1994. Loss of histidine residue at the active-site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6511-6514.
- Sassa, H., Kakui, H., Miyamoto, M., Suzuki, Y., Hanada, T., Ushijima, K., Kusaba, M., Hirano, H. and Koba, T. 2007. *S locus F-Box brothers*: Multiple and pollen-specific F-box genes with *S* haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics.* 175: 1869-1881.
- Schneider, D., Stern, R.A., Eisikowitch, D. and Goldway, M. 2001. Determination of the self fertilization potency of ‘Golden Delicious’ apple. *J. Hort. Sci. Biotech.* 76: 259-63.
- Thapa, R.B. 2006. Honeybees and other insect pollinators of cultivated plants: a review. *Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science.* 27: 1-23.

- Xu, J.H., Cheng, C.Z., Zhang, L.M., Zhang, Z.H., Xu, Y.J. and Zheng, S.Q. 2007. Pollen parent effects on fruit quality of 'Jiefangzhong' loquat. *Acta Horticulturae (ISHS)*. 750: 361-365.
- Gasic, K., Hernandez, A., Korban, S.S., 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Rep.* 22: 437a-437g