

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

2010-2011

רעות ניסקה-שיצר, שרון שפיר – פקולטה לחקלאות, רחובות
גרשון מיינרט – מטע מרום גולן
מרטין גולדווי – מיי"גל, ק"ש
דורון שניידר – מו"פ צפון

תוכן:

עמודים

1	מבוא
	חומרים ושיטות
1	1. המטע
1	2. מקור החומר הצמחי לאנליזות DNA
2	3. הפקת DNA
2	4. תגובת PCR להגברת אללי <i>S-RNase</i> ו- <i>SFB</i>
2	5. שיבוט וריצוף הגנים
2	6. אנליזה של רצף ה-DNA ורצף חומצות האמינו המשוער של החלבונים
2	7. מבנה מרחבי משוער של חלבוני S-RNase
	תוצאות ודיון
3	1. ריצוף אללי <i>S-RNase</i>
5	2. איפיון תכולת אללי <i>S</i> בצאצאים ממטע עם מפרים
6	3. איתור מוטציות בגנים של <i>S6-SFB</i> ובגן <i>S6-RNase</i>
9	המשך המחקר
9	ספרות

מבוא

השסק שייך למשפחת הוורדניים, 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* (*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 ההפלואידי, מסמנים את ה-*S-RNase* הזרים (מהפלוטיפ *S* שונה) לפירוק במערכת ה-Ubiquitin אבל מגינים על חלבוני ה-*S-RNase* העצמי מפני פרוק. כתוצאה מכך בהאבקה זרה אין פירוק RNA בנחשון הנביטה, ולעומת זאת בהאבקה עצמית מתרחש עיכול ה-RNA על ידי ה-RNase (המוגנת) וגרגר האבקה מושבת.

בשסק קיים אמנם מנגנון GSI, אך זנים רבים ידועים כבעלי יכולת הפריה עצמית. במסגרת מחקר שערכנו (Niska et al., 2010) ריצפנו חלקית 4 אללי *S* מזני השסק המסחריים 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו 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* בצאצאי האבקה פתוחה (זרעים מפירות בשלים), שהתפתחו במטע עם מפרים, הוביל להבנה שלוקוס *S6* אחראי ליכולת ההפריה העצמית בשלושת הזנים הללו ולקביעת שיעור ההאבקה הזרה במטע. בהמשך המחקר התחלנו לבחון מהם הגורמים בלוקוס *S6* שהביאו לשבירת מנגנון GSI בזני השסק 'עכו 1' ו'יהודה' באמצעות ריצוף הגנים ל-*SFB* השייכים ללוקוס זה, וריצוף הגן *S6-RNase* השלם.

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: DNA מעלים מעצי המטע שימש לאפיון וריצוף אללי *S* מהזנים ההוריים 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו 1'. בקטיף נאספו מכל אחד מהזנים פירות, שהתפתחו לאחר האבקה פתוחה בעצים סמוכים לעצי שני הזנים האחרים. הזרעים הונבטו ומהעלים שלהם הופק

DNA לאנליזה של אללי S. מכל פרי נבדקו 1-2 זרעים בלבד. DNA מזרע שאופיין כהומוזיגוט ל-S6 שימש לאנליזה אללי SFB מלוקוס זה.

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: 100mM Tris pH 8, 2% hexadecyltrimethylammonium bromide [CTAB], 20mM ethylenediaminetetra acetic acid [EDTA] pH 8, 1.4M NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone [PVP] MW=40000 ו-2-mercaptoethanol 1%. 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. תגובת PCR להגברת אללי S-RNase ו-SFB: הגברת קטעי DNA של אללי S מזני השסק 'אברי', 'יהודה' ו'עכו' נערכה בתגובת PCR עם תחלים אוניברסלים של אללי S מאגס (טבלה 1). עבור כל אלל שרוצף נבנו תחלים ייחודיים, ששימשו לזיהוי ספציפי שלו בתגובת PCR (טבלה 1). להגברת אלל S6-RNase השלם שימשו תחלים נוספים ששימשו להגברת קצות הגן (טבלה 1).

להגברת אללי SFB מלוקוס S6 שימשו התחלים FjbFB1 (5'-) ו-RjbFB1 (5'-) (CCAAGTCTCTGATGMGRTTCAAATG -3'). (Sassa et al., 2007) (SRGTTAGKWGTTTTGTCCATGAAC-3' annealing 56°C). טמפ' 1X Ex Taq, 20ng DNA: 25µl בנפח 20 pmol, dNTP, 0.2 mM, 1.5mM MgCl₂, buffer (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), מכל אחד מהתחלים ו-1.25 U Ex Taq (Takara). תגובות ה-PCR נערכו במכשיר MyCycler apparatus (BioRad, Hercules, CA).

תוכניות ה-PCR להגברת S-RNase ו-SFB מפורטות בטבלה 2.

5. שיבוט וריצוף הגנים: תוצרי PCR של אללי S-RNase מ-DNA של הזנים ההוריים או אללי SFB מצאצא הומוזיגוט ללוקוס S6 שובטו לפלסמיד pGEMT (Promega, Madison, WI) 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>) ו-SeqManII (Madison, WI) DNASTAR Lasergene 6.

7. 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 (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA).

טבלה 1: תנאים ותחלים עבור תגובות PCR לריצוף וזיהוי אללי *S-RNase* משסק.

טמפי annealing	אורך הקטע המוגבר	פריימר 5'→3' antisense	פריימר 5'→3' sense	מס' בבנק הגנים	הגן RNase
48		GYGGGGGCARTYT ATGAA ¹	TTTACGCAGCAATATC AG ¹		<i>S</i> חלקי
52	514	CTGCAAAGASTRAY CTCAACC [S2- (627- 647), S4- (654-674) and S6- (604-624)]	AATAAAACCATGAAT TCCCTGGC (133-155)	GU384665	<i>S2</i> חלקי
56	539 ³	As for <i>S2</i>	GGTAATTGCTAGATA GACTAA (274-294) ²	GU384666	<i>S3</i> חלקי
56	355	As for <i>S2</i>	GCATACCAGAGAGAA AAATTA (319-339) ²	GU384667	<i>S4</i> חלקי
58	234	As for <i>S2</i>	CAACCACAATACAGG ACGACG (390-410) ²	GQ202269	<i>S6</i> חלקי
52		As for <i>S</i>	TTAVTMATTAATHTG CCTCG		<i>S6</i> קצה 5'
52		YATACTAGCTAGCC GCG	As for <i>S</i>		<i>S6</i> קצה 3'

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.

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

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		Anneal. Temp. ¹	2
	56	0.5	72	3	
	70	2	28	94	1
20	94	0.25		Anneal. Temp.	1
	56	0.5		72	1
	70	2.5	1	94	1
1	70	7		Anneal. Temp.	1
				72	5

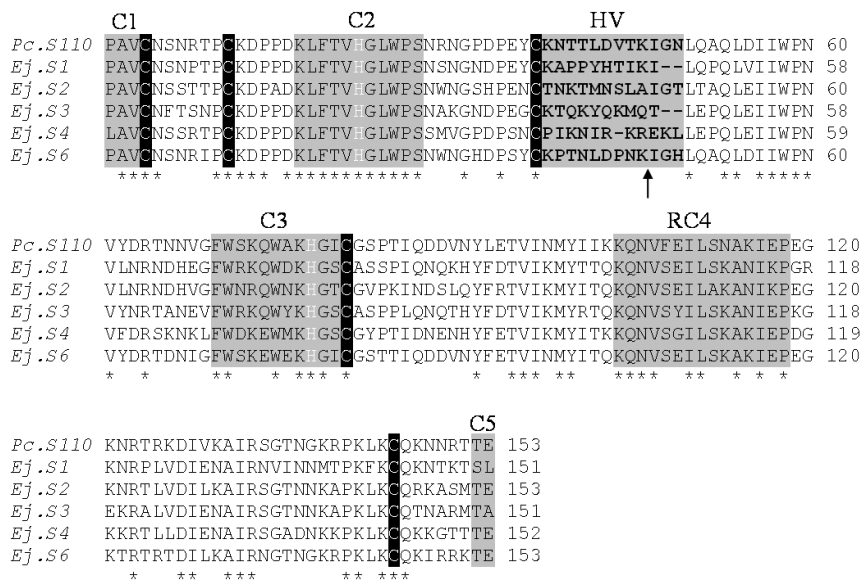
¹מפורט בטבלה או ב"חומרים ושיטות".

תוצאות ודיון

1. ריצוף 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) ויעכו ו' הוא *S4-S6* (גנים מס. GU384667 ו-GQ202269, בהתאמה). מכאן שכולם נמצא אלל *S6-RNase*. *S2, S3* ו-*S4-RNase* רוצפו 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-94-24 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 *S6-RNase* ל-*S1-S4 RNases* משק עומד על 62-65% (תמונה 1). רצף חומצות האמינו החלקי שהתקבל עבור אלל *S6-RNase* מכיל את כל התכונות הידועות של *S-RNases*: שלושה אתרים שמורים C2, C3 ו-RC4, כמו גם חמישה שיירי ציסטאין ושני שיירי היסטידין שמורים החיוניים לפעילות *RNase* (Royo et al., 1994).



תמונה 1: השוואה של רצף חומצות אמינו משוער של *S-RNase* משק. 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, S2, S3, S4* ו-*S6* של שסק (*Eriobotrya japonica*, *Ej*) ומאלל *S-110* מאגס אירופי (*Pyrus communis*, *Pc*).

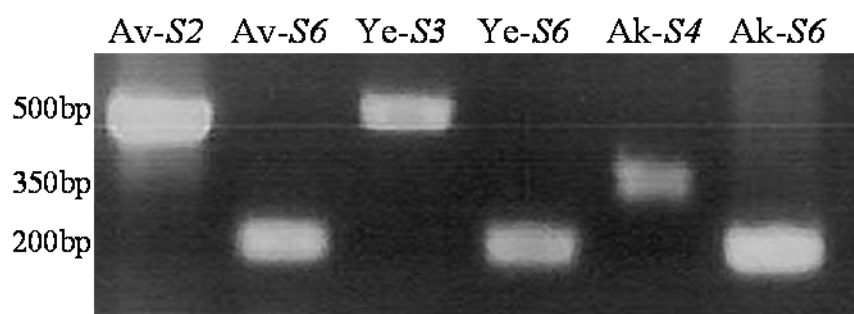
2. איפיון תכולת אללי S בצאצאים ממטע עם מפרים

בשלב הראשון של איפיון תכולת אללי *S-RNase* בצאצאי 'אברי', '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 1). בתמונה 2 ניתן לראות את תוצרי ה-PCR הספציפיים לכל אחד מאללי *S-RNase*.

מהתפלגות אללי *S-RNase* בצאצאי 'אברי', 'יהודה' ו'עכו 1' ניתן להסיק על שיעור ההפריה העצמית והזרה לאחר האבקה פתוחה במטע בו נטועים לסירוגין עצים משלושת הזנים:

א. הפריה עצמית: בזן 'אברי' מבוטאים אללי S2 ו-S6, לכן צאצאי הפריה עצמית שלו יכילו 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) יכילו את הצירופים: S3-S3, S3-S6 או S6-S6 וצאצאים עצמיים של הזן 'עכו 1' (S6-S4) יכילו את הצירופים: S4-S4, S4-S6 או S6-S6. בטבלה 3 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.

ב. האבקה זרה: דרגת ההאבקה הזרה במטע נקבעה לפי תכולת אללי S הזרים בצאצאי האבקה פתוחה במטע עם מפרים (טבלאות 3 ו-4). לדוגמא: שבעה מתוך 31 צאצאי הזן 'אברי' התקבלו כתוצאה מהפריה זרה עם גרגר אבקה נושא אלל S3 מ'יהודה' (S6-S3 ו-S2-S3). יש לשער שמספר דומה של צאצאי 'אברי' 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 הפרח, 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 ראיה 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 'אבריי' (AV), 'יהודה' (Ye) ו'עכו 1' (Ak) בתגובת PCR ייחודית עם תחלים ספציפיים

טבלה 3: התפלגות אללי *S* בצאצאי 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו 1' שהתקבלו מהאבקה פתוחה במטע עם מפרים בעונת 2008-09.

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

טבלה 4: שיעור ההאבקה הזרה בצאצאי 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו 1' שהתקבלו מהאבקה פתוחה במטע עם מפרים בעונת 2008-09.

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

¹בהתאם לתוצאות מטבלה 3

3. איתור מוטציות בגנים של *S6-SFB* ובגן *S6-RNase*

במסגרת העבודה מצאנו שלושת הזנים: 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו 1', נושאים את הפלוטיפ *S6* (מכילים את האלל *S6-RNase*). בנוסף הראינו שלושת הזנים הם בעלי התאם עצמי, כאשר כל הצאצאים

העצמיים נושאים את האלל *S6-RNase*. לפיכך אנו מניחים שיכלת ההפריה העצמית בזני השסק שבדקנו קשורה במוטציה כלשהיא בלוקוס זה. בכל לוקוס *S* מצויים שני סוגי גנים: גן ל-*S-RNase* וגנים השייכים למשפחת *SFB* (ראה מבוא). מוטציה באחד מהם עשויה להוביל לשבירת מנגנון אי ההתאם העצמי (GSI). כדי לבדוק השערה זו ריצפנו גנים של *SFB* השייכים להפלוטיפ *S6* (*S6-SFB*) ובדקנו את מסגרת הקריאה שלהם. השתמשנו לשם כך ב-DNA מצאצאים הומוזיגוטיים להפלוטיפ *S6* (רק *S6-RNase* מבוטא בהם) שמצאנו בסעיף הקודם. ריצוף קצות הגן של *S6-RNase* בוצע אף הוא, כדי לקבוע האם קיימת באזורים אלה מוטציה היכולה להצביע על בעיה בפעילות האנזים.

ריצוף גנים *S6-SFB*: רצף גנים *S6-SFB* נקבע ב-DNA מצאצא הומוזיגוט להפלוטיפ *S6* מכל אחד מהזנים 'אבריי', 'יהודה' ו'עכו' 1'. נמצאו שלושה רצפים שונים של *S6-SFB*, Ej-1, Ej-2, ו-Ej-3, שהופיעו בכל שלושת הצאצאים. רצף חומצות האמינו של שלושת הגנים, שהוסק מרצף ה-DNA, נראה תקין. שלושת הרצפים שהתקבלו הם בעלי דמיון רב ביותר, 97%-98%, ל-SFB ידועים ממינים אחרים, למרות שאחוז הדמיון ברמת חומצות האמינו ביניהם נמוך (60-67%) (טבלה). אין לשלול כי קיימים עוד גנים של *S6-SFB* בלוקוס *S6* שטרם מצאנו.

טבלה 5: SFB מלוקוס *S6* של שסק¹.

SFB משסק	מספר חומצות אמינו	דמיון ל- Ej-1	דמיון ל- Ej-2	דמיון ל- Ej-3	רצף SFB בעל דמיון גבוה ביותר
Ej-1	350		63%	60%	SFBB מסוג γ (ADE43141.1) מתפוח (<i>Malus x Domestica</i>) 97%
Ej-2	394	63%		67%	MdFBX3 מסוג α או β (BAJ11952) מתפוח (<i>Malus x Domestica</i>) 96%
Ej-3	400	60%	67%		SFBB28 מסוג α (ACH54105.1) מאגס סיני (<i>Pyrus x bretschneideri</i>) 88%

מספר חומצות האמינו והדמיון בין הגנים התקבלו על-סמך רצף חומצות האמינו, שהוסק מרצף ה-DNA

רצף חומצות האמינו המשוער של **S6-RNase השלם**: רצף הגן השלם *S6-RNase* התקבל מהזן 'עכו' 1'. בהשוואת הרצף עם אלל *S4-RNase* מתפוח ואלל *S3-RNase* מאגס יפני נמצאה תוספת של 24 בסיסים בקצה 3' של הגן, לאחר האזור השמור C5. תוספת זו באה לידי ביטוי בתוספת 8 חומצות אמינו בקצה C של רצף החלבון המשוער (תמונה 3).

[Matsuura et al \(2001\)](#) פרסמו את המבנה המרחבי של האנזים S3-RNase מאגס יפני. [Hiratsuka et al \(2002\)](#) 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 תוספת זו בנויה בעיקרה

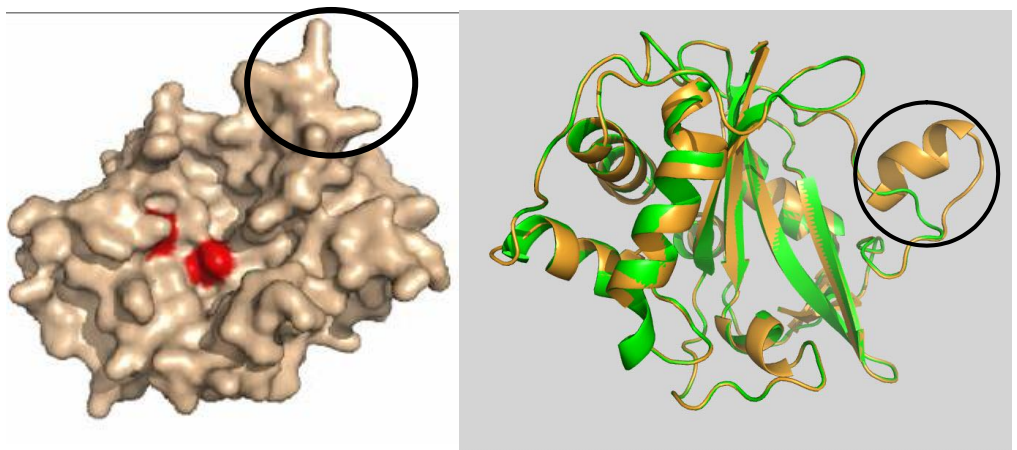
מסליל אלפא (תמונה 4). יש לבחון האם השינוי המרחבי הזה פוגע בפעילות האנזימטית של S6-RNase. במידה וכך הדבר, בהתאם למנגנון ה-GSI המקובל כיום יש להניח שאנזימי S6-RNase מעמוד העלי נכנסים לנחשון נביטה נושא הפלוטיפ S6. בנחשון הנביטה הם אינם מסומנים לפירוק מצד אחד, אך מנגד הם אינם פעילים. כיוון שלא מתרחש פירוק של מולקולות RNA נחשון הנביטה מהפלוטיפ S6 מתארך בעמוד העלי נושא הפלוטיפ זה ויכולה להתקבל הפריה עצמית של הביציות. כדי לבחון השערה זו בכוונתנו לבדוק את פעילות S6-RNase בגיל פעילות נטיבי.

```

                                C1                C2
apple_S4      MGIITRMIVMVTHLFSLVLSLSSSTVCGFDYFQFTQQYQPAACNSNPTPCCKDPTDKLFTVH 60
Pear_S3       MGIITGMVHVMMWFLLLIVLILCSSTVCGYDYFQFTQQYQLAVCNSNRTLCKDPPDKLFTVH 60
Loquat_S6     MAITGMIYMVTKVFLTLVLLSWSSTVCGFDYFQFTQQYQPAVCNSNRIPCKDPPDKLFTVH 60
               * . ** * : : * : * * * * . : : : : * . : : * * * * * : : : * * * * *
                                HV                C3
apple_S4      GLWPSNKGIGRDPPEYCKTRNRR-KRAKTLPEQLEIIWPNVLDRTNHTCFWRPQWKKHCTCG 119
Pear_S3       GLWPSMMVCPDPSKCPKKNIR-KREKLEHQLEIIWPNVFDRTKNMLFWDREWMMKHGSGC 119
Loquat_S6     GLWPSNWNCHDPSYCKPTNLDPNKIGHLQQLDIIWPNVYDRTDNICFWSKEWERHGIIC 120
               ***** * ** . * * : : * : * : : ***** * * : : * ** * *
                                C4
apple_S4      YPTIQNENDYFETVIRMYITKQNVSRILSKAKIEPDGQSRPLVDIENAIRNGTHNKKPK 179
Pear_S3       YPTIDNENHYFETVIRMYISKKQNVSRILSKAKIEPDGKRALLDIENAIRNGADNKKPK 179
Loquat_S6     STTIQDDVMYFETVINMYITQRQNVSEILSKAKIEPECKTRTRTDILKAIIRNGTNGKRPK 180
               . ** : : . : ***** : * * : : ***** : * : * . * * : ***** : : * *
                                C5
apple_S4      FRCQKMNCGVTELVEITLCSDEKNRAHFIDCPMPFLP-----GSPYLCPNISIRY 227
Pear_S3       LKCQKKGTTTELVEITLCSDEKSEHFIDCPHPFEP-----ISPHYCPTNMIKY 227
Loquat_S6     LKCQKIRRKTELVEITLCSDEKSLTQFINCPYPLKPKSSSPFKPKSSPYFCPLNFIKY 236
               : ****      ***** : ***** . : ** : * * * * *      * * : * * * *

```

תמונה 3: השוואה של רצף חומצות האמינו המשווער של S6-RNase משטק ל-S3-RNase מאגס יפני (Acc. No. ABO25421) ו-S4-RNase-1 מתפוח (Acc. No. FJ943270).



תמונה 4: מימין השוואה של המבנה המרחבי המשווער של חלבון S6-RNase משטק (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 מסומנת התוספת של 8 חומצות אמינו.

המשך המחקר :

1. לאור שיעור ההפריה הזרה הגבוה (46%-10) במטע שסק עם מפריים, בכוונתנו לבחון את תרומתם של דבורי דבש ומאביקים נוספים לחנטה בשסק. בנוסף, נבדוק האם נטיעת מטעים מעורבים משפרת את הפוריות ואיכות הפרי, כיוון שדווח שהאבקה זרה משפרת את החנטה, מעלה מספר זרעים בפרי ומשפרת את גודלו.
2. בכוונתנו לבחון האם שבירת מנגנון אי ההתאם העצמי בלוקוס *S6* נובעת מאיבוד הפעילות של האנזים *S6-RNase*, כתוצאה ממוטציה בה נוספו 24 בסיסים לסוף הגן (תוספת של 8 חומצות אמינו בחלבון). נבדוק זאת בגיל פעילות IEF נטיבי.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Niska, R., Goldway, M. and Schneider, D. 2010. The *S6* locus is responsible for self-compatibility in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *HortScience*. 45: 1146-1149.

- Royo, J., C. Kunz, Y. Koyama, M. Anderson, A.E. Clarke, and E. Newbigin. 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.
- 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.