

## Il controllo genetico dell'autoincompatibilità gametofitica nelle Rosaceae

Paolo De Franceschi\*, Luca Dondini\*\* e Silvano Sansavini

*Dipartimento di Colture Arboree, Università di Bologna*

Ricezione: 29 agosto 2011; Accettazione 14 novembre 2011

### Genetic control of gametophytic self-incompatibility in the Rosaceae

**Abstract.** The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility (GSI) system, being present in members of the three families Rosaceae, Solanaceae and Plantaginaceae, is one of the most widespread mechanisms that plants have evolved to prevent inbreeding and promote outcrossing. Despite being evolutionarily a highly favorable trait for those species who have perfect flowers, self-incompatibility is an undesired feature for some crops, such as pome and stone fruits, in which fruit set is directly dependent on the success of the fertilization process; for this reason, it has been extensively studied in the last years. It acts through a specific pollen-pistil recognition mediated by female (pistil-expressed) and male (pollen-expressed) proteins, whose genes lay in the single, multigenic and multiallelic S locus. The female S determinant is a stylar ribonuclease (S-RNase), whereas its male counterpart was only recently identified as a single or multiple pollen-specific F-box proteins. In incompatible pollen tubes, the S-RNases act as cytotoxins, causing the degradation of the cellular RNA and likely triggering a programmed cell death (PCD) program. If the pollen is recognized as “non-self”, on the contrary, S-RNases are inhibited, presumably through a specific proteolytic degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. Several studies in the last years contributed to unveiling the structure and function of the S locus genes in Rosaceous species. Surprisingly, a key difference seems to exist between the *Prunus* group and the Pyrinae, such as apple and pear. In the first group the pollen S function is provided by a single S-locus F-box gene, named SFB (for S-haplotype-specific F-Box), that seems to interact in an allele-specific manner with the “self” S-RNase to protect it from inhibition; in apple and pear, on the contrary, the pollen S function seems to be exerted by a pool of F-box proteins named SFBB (S-locus F-Box Brothers), each having specificity for one or a few “non-self” S-RNase alleles; each S haplotype contains a number of SFBBs sufficient to recognize all the S-RNase alleles except the “self” one. In this case, contrarily to *Prunus*, the specific interaction between a F-box protein and the S-RNase leads to its inhibition rather than its protection; nevertheless, the

result is the same: only the “self” S-RNase can escape inhibition and remains active to trigger pollen rejection. The study of self-incompatibility in pome and stone fruits, besides its importance for understanding key mechanisms in plant reproduction, has provided along the last years valuable tools of practical interest for growers and breeders: PCR-based S-genotyping assays proved to be a fast and reliable method to determine compatibility groups of varieties, and the molecular characterization of spontaneous and induced mutants facilitated the selection of new self-compatible cultivars in several species.

**Key words:** S locus, S-RNase, F-box.

### Introduzione

La maggior parte delle angiosperme, fra cui le Rosaceae da frutto, è in grado di produrre fiori ermafroditi perfetti, contenenti cioè sia gli organi maschili (stami) che quelli femminili (pistilli). Nonostante questo comporti una naturale tendenza all'autoimpollinazione, i processi evolutivi di queste piante hanno favorito lo sviluppo di barriere genetiche atte ad impedire la possibilità di autofecondazione, promuovendo quindi l'allogamia; fra queste barriere rientrano i meccanismi di autoincompatibilità. Charles Darwin considerava questa strategia riproduttiva uno dei fattori chiave del successo evolutivo delle angiosperme, e in uno scritto del 1877 commentò “*Nature abhors self-fertilization*”, cioè “la Natura detesta l'autofecondazione”. L'autoincompatibilità rappresenta quindi un importante meccanismo per il successo evolutivo di molte specie vegetali; tuttavia, sul piano agronomico, viene considerato un carattere indesiderato per quelle specie coltivate, come le pomacee e le drupacee, in cui l'allegagione e lo sviluppo del frutto dipendono largamente dal successo della fecondazione. Per questo motivo l'autoincompatibilità è stata ampiamente studiata negli ultimi decenni, portando a significative acquisizioni che hanno consentito di svelare molti aspetti relativi al funzionamento ed al controllo genetico di questo fenomeno, favorendo l'introduzione e l'affermazione di varietà autofertili (es. ciliegio, mandorlo e albicocco).

\* pdefra@agrsci.unibo.it \*\* ldondini@agrsci.unibo.it

## Il controllo genetico

La famiglia delle Rosaceae presenta un meccanismo di autoincompatibilità di tipo gametofitico (GSI) comune anche alle famiglie Solanaceae e Plantaginaceae; l'autofecondazione è impedita attraverso un riconoscimento specifico fra polline e pistillo, con conseguente inibizione selettiva della crescita di quei tubetti pollinici riconosciuti dal pistillo come *self*, cioè derivati dallo stesso individuo o da individui geneticamente correlati (De Nettancourt, 2001). La specificità di questo meccanismo di riconoscimento dipende da un singolo locus, chiamato locus S (da Sterilità), che contiene almeno due geni: uno espresso nel pistillo (il determinante femminile) ed uno nel polline (determinante maschile). Con il termine “alleli S” ci si riferisce comunemente ad ogni variante del locus S, anche se, contenendo quest'ultimo più di un gene, è più corretto parlare di “aplotipi S”; i due termini sono comunque largamente accettati come sinonimi. Con i termini *self* e *non-self* si indica l'identità genetica o meno degli alleli S fra polline e pistillo (fig. 1). Il determinante femminile di questo tipo di

auto-incompatibilità è una ribonucleasi specifica del locus S (S-RNasi) (Sassa *et al.*, 1992). Per quanto riguarda la natura del determinante maschile, le ricerche degli ultimi anni hanno identificato una serie di proteine espresse specificamente nel polline, caratterizzate dalla presenza di un dominio F-box. Tali geni sono chiamati SLF (per S-Locus F-box) nelle Solanaceae e Plantaginaceae (Lai *et al.*, 2002; Sijacic *et al.*, 2004) e SFB (per S-haplotype-specific F-Box) nelle specie del genere *Prunus* (Ushijima *et al.*, 2003). Sebbene nelle Pyrinae (cui afferiscono melo e pero) la natura del determinante pollinico non sia ancora stata sperimentalmente dimostrata, sono stati identificati nella regione del locus S molti geni F-box, chiamati SFBB (S-locus F-Box Brothers) (Sassa *et al.*, 2007). I determinanti femminile e maschile vengono in contatto durante la crescita del tubetto pollinico nella parte superiore dello stilo: le S-RNasi prodotte nella matrice stilare vengono importate all'interno del tubetto, dove avviene l'interazione con le proteine F-box che porta alla reazione di riconoscimento “*self* / *non-self*”. Questo riconoscimento innesca nelle impollinazioni incompatibili, cioè quando l'allele S portato dal granu-

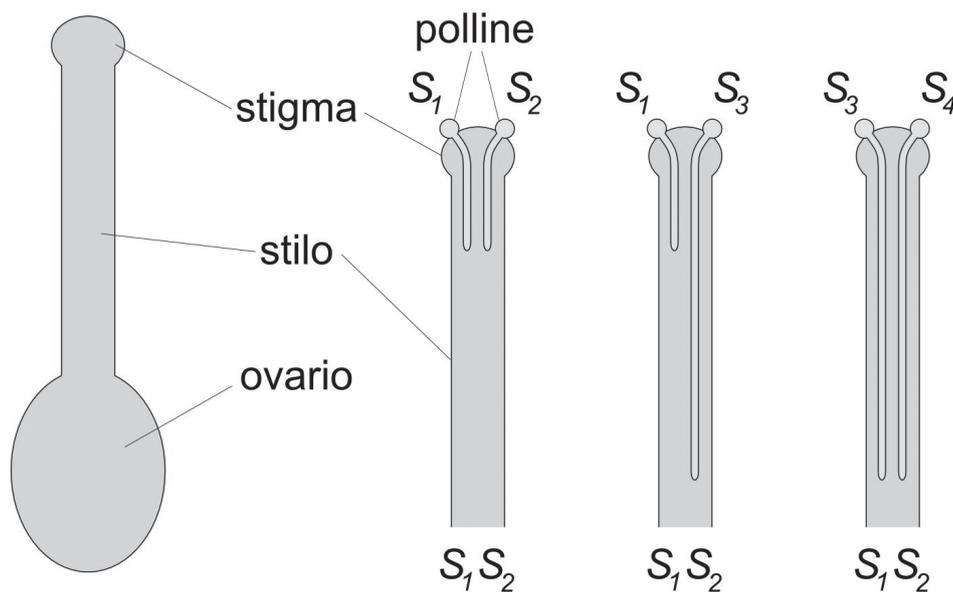


Fig. 1 - Accettazione e rigetto dei tubetti pollinici nel sistema di autoincompatibilità gametofitica. Il tessuto diploide del pistillo (rappresentato a sinistra) esprime gli alleli S1 e S2; l'impollinazione può avere i classici tre esiti di incompatibilità, semicompatibilità e compatibilità totale. Nel caso il polline provenga dalla stessa pianta o da una pianta con gli stessi alleli S, tutti i granuli pollinici sono riconosciuti come *self* e vengono rigettati (incompatibilità totale, stilo a sinistra in figura); la fecondazione non può quindi avvenire. Nel caso invece il polline provenga da un individuo con due alleli S diversi (S3 e S4, a destra) si ha compatibilità totale. Infine, se un solo allele S è in comune fra i due parentali (al centro), solo il polline portatore dell'allele comune (S1) è riconosciuto come *self*, mentre i tubetti che esprimono l'allele *non-self* (S3) possono giungere fino all'ovario per completare la fecondazione.

*Fig. 1 - Acceptance and rejection of pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. The diploid pistil tissue (on the left) expresses the S1 and S2 alleles; pollination has three possible outcomes: incompatibility, half compatibility and full compatibility. If pistils receive pollen from the same plant, or from a plant with the same S genotype S1/S2, pollen tubes are recognized as “self” and rejected (incompatibility, style on the left); ovules can't be fertilized. If pollen grains come from a plant with different S alleles (S3 and S4, style on the right) the combination is fully compatible. Finally, if two plants have one S allele in common, only those pollen tubes that carry the common allele (S1, in the central style) are recognized as “self”, whereas those expressing the “non-self” allele (S3) are allowed to reach the ovary and fecundate the egg cell.*

lo pollinico (aploide) è identico ad uno dei due portati dal tessuto stilare (diploide), l'arresto della crescita del tubetto pollinico attraverso una serie di reazioni che si suppone coinvolga in prima istanza la degradazione degli RNA cellulari del tubetto da parte della stessa S-RNasi (fig. 2). Al contrario, nelle combinazioni compatibili la S-RNasi deve essere riconosciuta e inattivata da parte di una specifica proteina F-box. Il dominio F-box è noto principalmente per il ruolo svolto nel meccanismo di degradazione proteolitica mediato da ubiquitina e proteasoma 26S; in questo meccanismo, le proteine da degradare vengono riconosciute da un complesso enzimatico detto SCF (Skp1 - Cullina - F-box) che le lega covalentemente a una o più unità di ubiquitina, marcandole così per la successiva degradazione da parte del proteasoma. Si ritiene che l'inattivazione delle S-RNasi nei tubetti *non-self* avvenga appunto tramite "ubiquitinazione" e successiva degradazione (Qiao *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009).

Nonostante la specificità del riconoscimento dipenda solo dai determinanti maschili e femminili, questo meccanismo proteolitico ha bisogno dell'azione di altri geni che non sono localizzati nel locus S quali, per esempio, un SLF-interacting SKP1-like (SSK), una Cullina, un Ring Box1 (RBX1) e un E2 ubiquitin-binding protein. Fra gli altri geni esterni al locus S, ma che potrebbero essere coinvolti nell'au-

toincompatibilità gametofitica, bisogna ricordare anche la transglutaminasi (TGasi), un enzima calcio-dipendente che, durante la crescita del tubetto pollinico, è coinvolto nella polimerizzazione dell'actina e nella formazione del citoscheletro del tubetto stesso (Del Duca *et al.*, 2009). Come l'attività di questi geni venga modulata in rapporto all'interazione dei determinanti maschile e femminile, e quindi come avvenga l'inibizione della crescita nei tubetti *self*, non è ancora stato completamente chiarito. In *Pyrus pyrifolia* (pero giapponese) si è osservato che la S-RNasi è in grado, all'interno dei tubetti *self*, di indurre alterazioni del citoscheletro (Liu *et al.*, 2007), degradazione del DNA nucleare, alterazione dei mitocondri e rilascio del citocromo C (Wang *et al.*, 2009). Nella famiglia Papaveraceae, che possiede un meccanismo di autoincompatibilità gametofitica diverso da quello basato sulla S-RNasi, il rigetto dei tubetti *self* comporta gli stessi fenomeni osservati in pero giapponese, e risulta infine in una forma di "morte cellulare programmata" (PCD) (Thomas *et al.*, 2004 e 2006). È quindi probabile, pur non essendo ancora dimostrato, che anche la S-RNasi agisca da iniziatore di un programma di PCD nel processo di rigetto del polline incompatibile delle pomacee e drupacee; la degradazione degli RNA cellulari quindi potrebbe non essere l'unico meccanismo messo in atto dalla S-RNasi per inibire la crescita dei tubetti *self*.

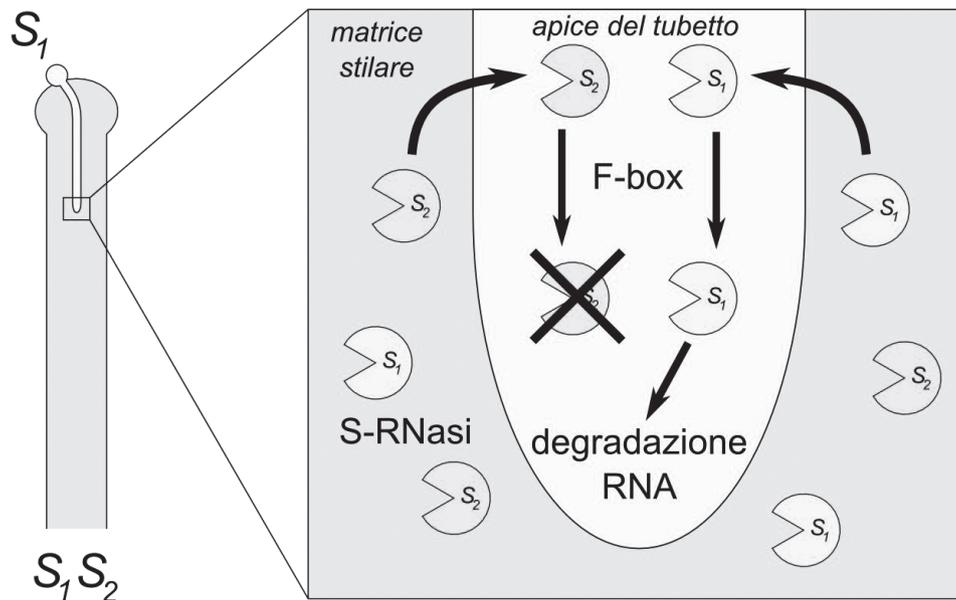


Fig. 2 - Azione della S-RNasi nella reazione di rigetto del polline *self*. Lo stilo produce le S-RNasi degli alleli S1 e S2; queste vengono importate all'interno del tubetto pollinico in crescita, dove avviene l'interazione con le proteine S-locus F-box. Il risultato è l'inibizione delle S-RNasi *non-self* (S2 in figura), mentre quella *self* (S1) viene al contrario lasciata attiva. Si innesca quindi la reazione di rigetto, che parte probabilmente con la degradazione degli RNA cellulari e si conclude con la morte cellulare del tubetto.

Fig. 2 - Role of the S-RNase in *self*-pollen rejection. The styler tissue produces the S-RNase alleles S1 and S2; these are imported by the growing pollen tube, inside which they come in contact with the S-locus F-box proteins. As a result of this interaction, the "non-self" S-RNase allele (S2) are inhibited, whereas the "self" one (S1) remains active. It can thus trigger the rejection reaction, likely starting with the degradation of cellular RNA and ending in the pollen tube cell death.

## Il determinante stilare (S-RNasi)

Analogamente ad altre specie, le S-RNasi costituiscono il determinante femminile dell'autoincompatibilità gametofitica delle Rosaceae (Broothaerts *et al.*, 1995; Sassa *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 1997). Le S-RNasi sono state caratterizzate in varie specie della famiglia delle Rosaceae e nelle banche dati sono oggi disponibili centinaia di sequenze geniche. Questi geni sono espressi in modo specifico nel tessuto trasmettente dello stilo e la proteina prodotta è modificata in modo post-traduzionale attraverso una glicosilazione. La proteina matura è secreta nella matrice extracellulare dove entra in contatto con i tubetti pollinici in crescita, che la importano in modo non S-allele specifico (Luu *et al.*, 2000). La struttura di questi geni è molto simile in tutte le specie appartenenti alle Rosaceae, alle Solanacee e alle Plantaginacee: sono presenti cinque regioni conservate (da C1 a C5), tuttavia nelle Rosaceae la quarta (RC4) è in posizione diversa rispetto a Solanaceae e Plantaginaceae; vi è una sola regione ipervariabile (RHV). I domini conservati sono importanti per la funzionalità dell'enzima mentre la regione ipervariabile sembra essere coinvolta nella specificità di riconoscimento "self/non-self" (Tao e Iezzoni, 2010). Un introne si trova all'interno della regione ipervariabile; solo nelle drupacee, un secondo introne si trova tra il peptide segnale e il codone di inizio della proteina (Igic e Kohn, 2001). La presenza di introni nella struttura di questi geni (con dimensioni estremamente variabili nei diversi alleli) è fondamentale per lo sviluppo di protocolli PCR per la determinazione della composizione allelica al locus S delle varietà (protocolli di S-genotyping). Questo approccio rappresenta un supporto molto potente per definire i gruppi di inter-fertilità tra le varietà appartenenti a specie in cui l'autoincompatibilità è molto diffusa come, per esempio, pero, melo e ciliegio.

Sono molti i lavori che hanno contribuito a definire la composizione allelica nelle diverse varietà di melo (Janssens *et al.*, 1995; Verdoodt *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 1999a e 1999b, 2003a e 2003b; Kitahara *et al.*, 2000; Broothaerts, 2003; Ershadi e Talaii, 2007; Kim *et al.*, 2006 e 2009; Long *et al.*, 2009), pero europeo (Zuccherelli *et al.*, 2002; Zisovich *et al.*, 2004; Sanzol *et al.*, 2006; Takasaki *et al.*, 2006; Moriya *et al.*, 2007; Mota *et al.*, 2007; Sanzol e Robbins, 2008; Goldway *et al.*, 2009; Sanzol 2009a e 2009b), pero giapponese (Ishimizu *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002 e 2007; Takasaki *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2009), ciliegio dolce e acido (Tao *et al.*, 1999; Bošković e Tobutt, 2001;

Sonneveld *et al.*, 2001, 2003 e 2006; Wiersma *et al.*, 2001; Wunsch e Hormaza, 2004; De Cuyper *et al.*, 2005; Bošković *et al.*, 2006; Vaughan *et al.*, 2008; Tsukamoto *et al.*, 2008), albicocco (Romero *et al.*, 2004; Sutherland *et al.*, 2004a; Halasz *et al.*, 2004 e 2005; Haijlou *et al.*, 2006; Vilanova *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008, Gareksheikhsbayat, 2010, Gareksheikhsbayat *et al.*, 2011), mandorlo (Bošković *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2005; Halasz *et al.*, 2008), susino (Sutherland *et al.*, 2004a e 2004b).

### Ricerca dell'autocompatibilità: mutanti di parte stilare

In varie specie si è osservato che mutazioni interne al locus S, spontanee o indotte artificialmente, hanno portato all'acquisizione dell'autofertilità, che è uno degli obiettivi della moderna frutticoltura. La caratterizzazione di mutazioni di questo tipo ha anche consentito di dimostrare che la S-RNasi è il determinante femminile dell'incompatibilità gametofitica nelle Rosaceae: questi mutanti sono caratterizzati dalla completa delezione o da alterazioni della sequenza della S-RNasi, che ne impediscono oppure ne riducono drasticamente l'espressione nel tessuto stilare; in assenza di S-RNasi funzionali il polline non può essere rigettato e il genotipo mutante risulta autofertile. Questi genotipi sono definiti mutanti di parte stilare (SPM) e sono stati caratterizzati sia nelle drupacee (mandorlo, ciliegio, albicocco giapponese) che in alcune pomacee. Fra queste ultime, in pero giapponese è stata caratterizzata una mutazione nell'allele S4, consistente in una delezione di 236 kb; questa delezione ha eliminato il gene della S-RNasi S4: il nuovo allele mutante S4sm, identificato nella varietà di pero nashi 'Osa-Nijisseiki', conferisce quindi autocompatibilità. Questa mutazione è stata molto ben caratterizzata (Sassa *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 2008) ed è stata di fondamentale importanza nello studio della struttura del locus S nelle Pyrinae. Un'altra mutazione in grado di conferire autocompatibilità è stata identificata in pero europeo, nelle varietà spagnole Abugo e Ceremeño, a carico dell'allele S121 (Sanzol, 2009b). In questo caso un elemento trasponibile di tipo TRIM è stato trovato all'interno della sequenza del gene, in corrispondenza dell'introne; la S-RNasi non viene espressa negli stili delle due varietà che sono diventate, per questo motivo, autocompatibili, ma non è ancora chiaro se sia la presenza dell'elemento TRIM ad impedire l'espressione del gene o se possano esistere altre mutazioni in regioni regolatrici a monte o a valle del gene stesso.

Diversamente dal pero, in melo non sono ancora state caratterizzate mutazioni della S-RNasi associate ad autocompatibilità. Tuttavia la cultivar di melo

Elstar è stata utilizzata per un esperimento di trasformazione con il gene della S-RNasi S3 (Broothaerts *et al.*, 2004); l'integrazione di più copie del gene e la sua trascrizione costitutiva ad alti livelli hanno portato ad un'inibizione post-trascrizionale del gene stesso, grazie al fenomeno del "silenziamento" genico mediato da RNA (Eamens *et al.*, 2008). La trasformazione genetica può quindi essere una tecnologia efficace per superare l'autoincompatibilità.

### Il determinante pollinico (S-locus F-box)

L'identificazione del determinante pollinico nelle Rosaceae, così come nelle Solanaceae e Plantaginaceae, è giunta molto più tardi rispetto al determinante stilare; solo nell'ultima decade infatti si è riusciti ad individuare ed a caratterizzare i geni F-box presenti nel locus S. In *Prunus*, in particolare, un singolo gene F-box (SFB) determina la specificità del polline (Tao e Iezzoni, 2010); questo gene è stato sequenziato ormai da un vasto pool di alleli S in varie specie, ed è utilizzato unitamente alla S-RNasi per la genotipizzazione al locus S delle varietà. La struttura del gene SFB è caratterizzata da un dominio F-Box estremamente conservato all'estremità 5', due regioni variabili (V1 e V2) e due ipervariabili (HVA e HVB) (Ikeda *et al.* 2004a). Le regioni ipervariabili e variabili sembrano essere coinvolte nella specificità dell'interazione con il determinante femminile, e quindi nel riconoscimento "self / non self" proprio della GSI. Come atteso, il gene SFB ha dimostrato di essere altamente polimorfico fra i diversi aplotipi S, esibendo livelli di variabilità allelica del tutto simili a quelli della S-RNasi.

#### Ricerca dell'autocompatibilità: mutanti di parte pollinica

Si è osservato che, analogamente a quanto accade per la S-RNasi, mutazioni che eliminino o alterino l'espressione di SFB risultano nella perdita dell'autoincompatibilità. La maggior parte dei mutanti autofertili caratterizzati finora nelle specie di *Prunus* è infatti riconducibile a specifiche alterazioni a carico di SFB; questi genotipi sono definiti mutanti di parte pollinica (PPM). Tali mutanti sono stati estremamente utili per lo studio della funzione di questi geni e per la dimostrazione del loro ruolo come determinanti pollinici. La caratterizzazione molecolare dei mutanti difettivi per SFB nel genere *Prunus* ha inoltre permesso lo sviluppo di strumenti a supporto del miglioramento genetico (Ikeda *et al.*, 2004b; Ushijima *et al.*, 2004; Sonneveld *et al.*, 2005; Vilanova *et al.*, 2006; Tao e Iezzoni, 2010) per la selezione assistita con marcatori

molecolari (MAS) finalizzata all'ottenimento di nuovi genotipi autofertili. Altre sorgenti di autocompatibilità in questo genere potranno essere identificate e caratterizzate in futuro in varie specie; ad esempio, fra i vari mutanti autofertili nelle drupacee è noto l'allele Sc di albicocco, in cui è avvenuta una mutazione a carico del gene SFB. Tuttavia non tutte le varietà autofertili in questa specie sono portatrici di questa mutazione, come evidenziato da una recente analisi condotta sulle tre varietà autocompatibili Bora (portatrice dell'allele Sc), Portici (priva dell'allele Sc) e Maya, derivata dall'incrocio fra Bora e Portici (anch'essa priva dell'allele Sc) (Gharesheikhyat, 2010; Gharesheikhyat *et al.*, 2011). In questo caso è evidente che l'autocompatibilità di 'Portici' e 'Maya' debba avere un'origine diversa ed indipendente dall'allele Sc, anche se la natura di tale mutazione resta ancora da chiarire. In particolare, in alcuni casi (come nella varietà spagnola di ciliegio 'Cristobalina') (Cachi e Wunsch, 2010) l'autocompatibilità può sorgere per perdita della funzione pollinica pur non derivando da mutazioni a carico del gene SFB; in questo caso quindi si deve trattare di mutanti di parte pollinica (PPM) legati geni esterni al locus S. Anche se il gene responsabile non è ancora stato identificato, è quindi evidente come in *Prunus* il corretto funzionamento dell'apparato di riconoscimento polline-pistillo debba necessariamente coinvolgere anche geni diversi da quelli del locus S, che pure rimangono gli unici responsabili della specificità.

#### Il caso delle pomacee

Per quanto riguarda le pomacee, la situazione sembra decisamente più complessa. L'individuazione dei geni SFBB nella regione del locus S è arrivata molto più tardi (Sassa *et al.*, 2007), e la molteplicità di questi geni ha suscitato inizialmente molti dubbi su quanti e quali fra questi fossero effettivamente responsabili della funzione pollinica dell'autoincompatibilità. Il numero di geni SFBB presenti in un singolo aplotipo può infatti superare la decina (Sassa *et al.*, 2010, Minamikawa *et al.*, 2010), ma sembra essere piuttosto variabile fra aplotipi diversi (Okada *et al.*, 2011). A complicare ulteriormente la situazione, uno studio sulla segregazione di questi geni in pero europeo (De Franceschi *et al.*, 2011a) ha dimostrato come una parte di essi, pur essendo strettamente associati al locus S, non vi appartengano effettivamente in quanto si trovano ad una distanza dalla S-RNasi tale da consentire rari eventi di ricombinazione (*crossing over*). Studi sui profili filogenetici dei geni SFBB e della S-RNasi hanno inoltre dimostrato come ogni gene SFBB, se analizzato singolarmente, abbia un livello di variabilità allelica nettamente inferiore a quello della

S-RNasi (Newbigin *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2009; De Franceschi *et al.*, 2011b): ciò ha messo inizialmente in dubbio la possibilità di considerare gli SFBB come candidati al ruolo di determinanti pollinici, in quanto era difficile ipotizzare che geni con un livello di variabilità così ridotto potessero garantire il riconoscimento allele-specifico di un gene estremamente polimorfo come la S-RNasi. A ciò si aggiunge il fatto che, diversamente dal genere *Prunus*, nelle pomacee non sono mai stati caratterizzati a livello molecolare mutanti autocompatibili di parte pollinica; non è stato quindi possibile stabilire alcuna associazione funzionale fra SFBB e specificità pollinica nell'autoincompatibilità. Solo di recente studi condotti su altre specie modello (*Petunia*) hanno fornito una spiegazione plausibile a queste apparenti incongruenze, permettendo di elaborare un nuovo modello, illustrato di seguito, per l'interazione fra S-RNasi e SFBB (Kubo *et al.*, 2010).

### **I modelli di riconoscimento polline-pistillo in *Prunus* e nelle pomacee**

Nonostante drupacee e pomacee appartengano alla stessa famiglia, la diversa struttura del locus S (con un singolo gene SFB in *Prunus*, e molteplici SFBB nelle Pyrinae) suggerisce che possa esistere una differenza funzionale tra i meccanismi di autoincompatibilità dei due gruppi.

A supportare questa ipotesi hanno contribuito anche due evidenti differenze riscontrate fra *Prunus* e le due pomacee melo e pero; la prima riguarda un fenomeno definito “interazione competitiva”, che si manifesta con l'acquisizione dell'autofertilità da parte di genotipi tetraploidi. Diversamente dalle normali piante diploidi, questi individui possiedono non due ma quattro copie di ogni cromosoma, e quindi quattro alleli S. Il polline da loro prodotto, anziché essere aploide, è diploide: porta quindi due copie del locus S. Si è osservato che il polline portatore di due alleli S diversi (polline eteroallelico), che esprime due determinanti pollinici diversi contemporaneamente, perde la capacità di essere riconosciuto come *self* e rigettato dal pistillo, risultando quindi autocompatibile; il polline omoallelico (cioè dotato di due alleli S identici) al contrario viene rigettato normalmente. L'interazione competitiva è presente in melo e pero, i cui individui tetraploidi (molto rari) risultano autofertili (Lewis e Modlibowska, 1942, Adachi *et al.*, 2009), ma non nel genere *Prunus*: specie tetraploidi come il ciliegio acido (*P. cerasus*) mantengono infatti un normale fenotipo autoincompatibile (che tuttavia può essere superato grazie alle frequenti mutazioni a carico del

locus S o di altri fattori, già descritte nelle sezioni precedenti) (Hauck *et al.*, 2002 e 2006).

La seconda differenza riscontrata fra *Prunus* e i generi *Malus* e *Pyrus* riguarda la presenza di mutanti di parte pollinica; nonostante siano stati tentati gli stessi approcci di mutagenesi, in melo e pero sono stati ottenuti solamente mutanti di parte stilare (cioè a carico della S-RNasi), mentre solo in *Prunus* sono noti vari casi in cui la mutazione di SFB risulta nell'acquisizione dell'autofertilità, come precedentemente descritto. Questo ha portato ad ipotizzare un'importante differenza funzionale: mentre in *Prunus* l'assenza del determinante pollinico consente al polline di crescere anche su pistilli *self*, in melo e pero l'effetto della stessa delezione risulterebbe letale per il polline; esattamente al contrario di quanto avviene in *Prunus*, nelle pomacee in assenza del determinante pollinico i tubetti verrebbero rigettati anche da pistilli *non-self* (Golz *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2010).

#### *Il genere Prunus: interazione fra S-RNasi e SFB*

Questa differente modalità d'azione del determinante pollinico è stata correlata al modello di degradazione proteolitica della S-RNasi. In entrambi i casi, si ritiene che la condizione necessaria perché il tubetto possa crescere lungo lo stilo sia la capacità di ubiquitinare e quindi degradare le S-RNasi. Il modello di riconoscimento di *Prunus* (fig. 3) ipotizza l'esistenza di un “inibitore generale” che svolge questo ruolo in maniera non allele-specifica: tutte le S-RNasi possono cioè essere riconosciute e degradate da questa proteina, ancora sconosciuta. Tuttavia, nel caso della reazione *self*, c'è un riconoscimento allele-specifico fra S-RNasi e SFB, e quest'ultimo protegge la S-RNasi dall'inibitore generale, per esempio legandola ed impedendone l'ubiquitinazione, oppure mediando l'ubiquitinazione dell'inibitore stesso. La S-RNasi resta quindi intatta ed attiva, portando al blocco della crescita del tubetto (Tao e Iezzoni, 2010). Questo modello spiega perché la delezione di SFB risulta nell'acquisizione dell'autofertilità: in assenza di SFB anche la S-RNasi *self* diventa bersaglio dell'inibitore generale, che ne causa la degradazione consentendo l'accettazione del tubetto. Il modello elaborato per *Prunus* è quindi un meccanismo di riconoscimento *self* mediato da un singolo fattore (SFB).

#### *I generi Malus e Pyrus: interazione fra S-RNasi e SFBB*

Per il sistema di riconoscimento delle pomacee sono stati elaborati diversi modelli nel corso degli anni, che prendevano in considerazione l'interazione fra la S-RNasi ed un singolo determinante pollinico

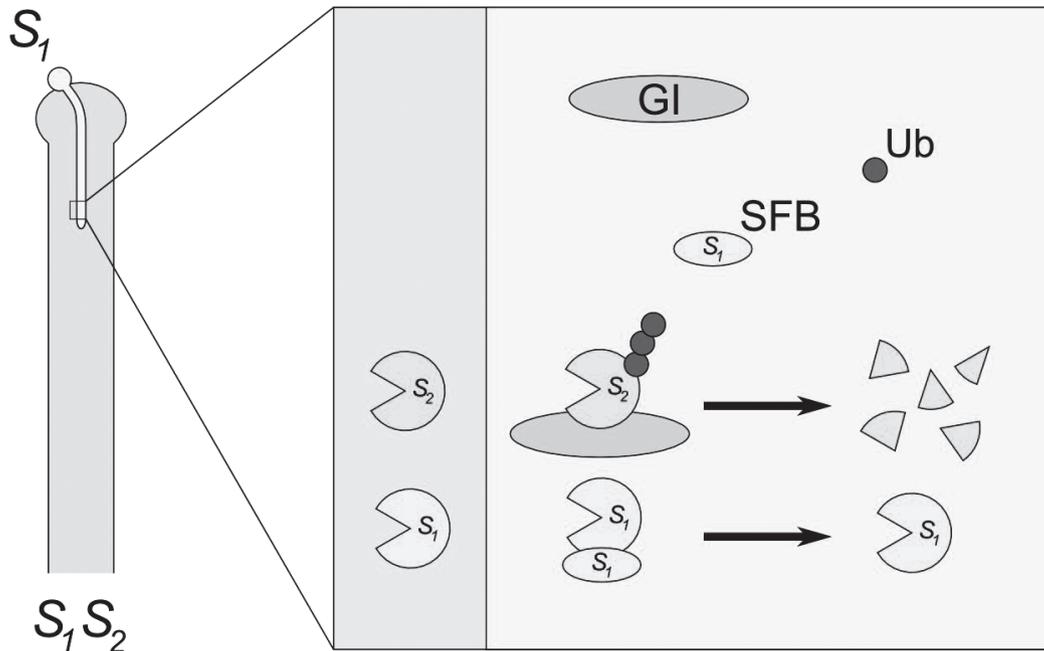


Fig. 3 - Modello di interazione fra S-RNasi e SFB in *Prunus*. Questo sistema è dotato di un inibitore generale (GI in figura), che lega in maniera aspecifica tutti gli alleli di S-RNasi e ne media l'ubiquitinazione. La proteina marcata da più unità di ubiquitina (Ub) viene destinata alla degradazione tramite il complesso macromolecolare del proteasoma. La S-RNasi *self* (S1 in figura), tuttavia, viene legata in maniera allele-specifica dalla proteina SFB; questo legame impedisce l'azione dell'inibitore generale, mantenendo quindi intatta ed attiva la S-RNasi, che innesca il rigetto del tubetto pollinico.

*Fig. 3 - Model for the interaction between S-RNase and SFB in Prunus. This system includes a general inhibitor (GI), able to bind and ubiquitinate all the S-RNases in a non allele-specific fashion. Once the protein is marked with ubiquitin (Ub) it is degraded by the proteasome. The "self" S-RNase allele (S1), however, is specifically recognized by SFB; this interaction protects the S-RNase from the general inhibitor, thus leaving it active and able to trigger the pollen tube rejection.*

(Hua *et al.*, 2008), ma nessuno di questi si è rivelato capace di spiegare efficacemente le particolari caratteristiche funzionali, strutturali e filogenetiche del locus S e dei geni SFBB. Tuttavia recentemente sono stati condotti esperimenti di trasformazione in *Petunia* (Kubo *et al.*, 2010), specie caratterizzata da una struttura del locus S molto simile a quella di melo e pero: anche *Petunia*, infatti, possiede un alto numero di geni F-box interni al locus S, chiamati SLF. Poiché, come precedentemente descritto, è noto che l'espressione contemporanea di due determinanti pollinici diversi risulta nell'acquisizione dell'autocompatibilità per il fenomeno dell'interazione competitiva, la funzione di questi geni è stata testata inserendoli mediante trasformazione genetica in genotipi appropriati, e verificando se fossero o meno in grado di rendere la pianta autofertile. Si è verificato che ogni gene SLF era in grado di riprodurre l'interazione competitiva solo in alcune delle piante trasformate, a seconda degli alleli S delle stesse; ciò ha dimostrato che ogni singolo SLF agiva da determinante pollinico solo nei confronti di una o poche S-RNasi, e che quindi la funzione pollinica nel suo complesso non poteva essere svolta da un singolo gene, ma doveva necessariamente richiedere l'azione di molti SLF diversi.

Sulla base di queste evidenze sperimentali è stato formulato un nuovo modello di riconoscimento, definito modello collaborativo di riconoscimento *non-self* (fig. 4); questo prevede che ogni S-RNasi, una volta entrata nel tubetto, debba essere legata da una specifica proteina F-box, che ne media l'ubiquitinazione causando la successiva degradazione proteolitica. Pertanto ogni aplotipo S possiede un numero di geni F-box sufficiente a produrre tutte le proteine necessarie per riconoscere e degradare tutti gli alleli *non-self* della S-RNasi, essendo invece privo di geni deputati al riconoscimento della sola S-RNasi *self*. Ad esempio, l'aplotipo S1 conterrebbe tutti i geni F-box necessari al riconoscimento delle S-RNasi degli alleli S2, S3, S4 etc, ma non quello per la stessa S-RNasi S1 (fig. 4). Di conseguenza, nella reazione incompatibile, la S-RNasi *self* sarebbe l'unica a sfuggire al riconoscimento ed all'inibizione da parte del pool di proteine F-box, restando attiva e causando il rigetto del tubetto stesso. Questo modello prevede quindi un meccanismo di riconoscimento *non-self* mediato da fattori multipli.

Pur essendo stato elaborato per *Petunia*, il modello collaborativo di riconoscimento *non-self* sembra adattarsi perfettamente anche al sistema di autoincompati-

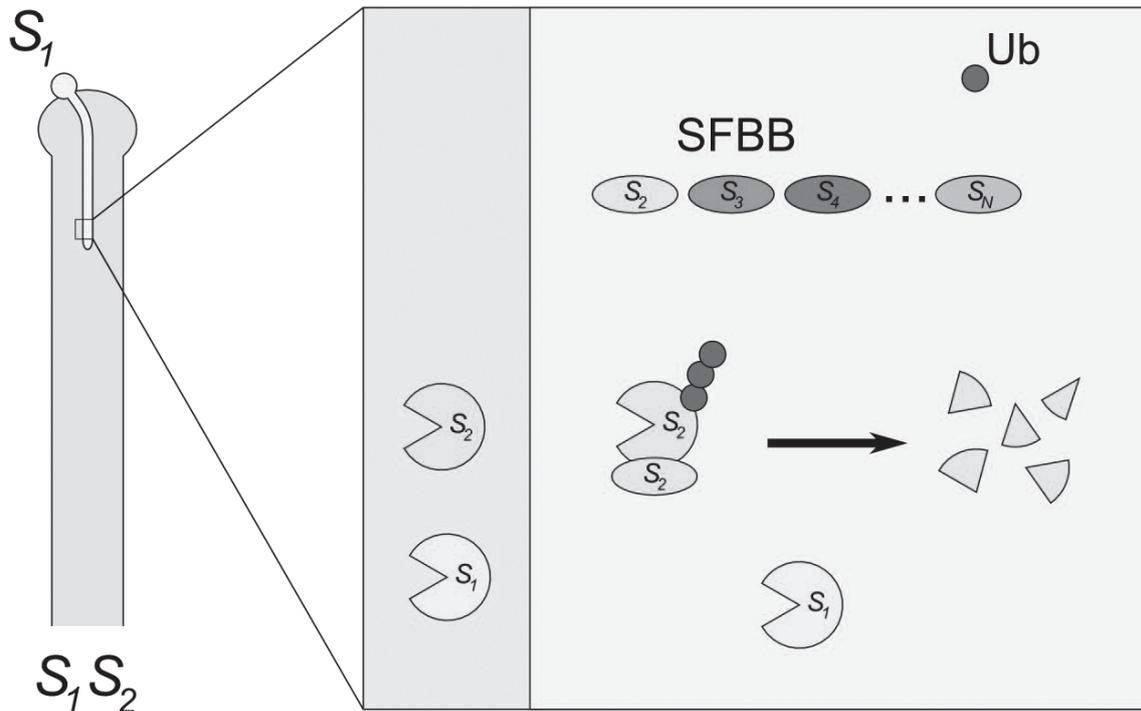


Fig. 4 - Modello di interazione fra S-RNasi e SFBB nelle pomacee. In questo caso il locus S non produce una singola proteina F-box come nel caso di *Prunus*, ma un pool di proteine SFBB ognuna con la capacità di riconoscere specificamente un solo o pochi alleli di S-RNasi. Ogni S-RNasi *non-self* (come la S2 in figura), una volta importata nel tubetto, viene legata da uno specifico SFBB: in questo caso, l'interazione risulta nell'ubiquitinazione della S-RNasi e quindi nella sua successiva degradazione proteolitica. Ogni aplotipo S, tuttavia, è privo di geni SFBB specifici per la propria S-RNasi: il polline dell'aplotipo S1 non può quindi riconoscere e degradare la S-RNasi S1, che porta alla reazione di incompatibilità.

*Fig. 4 - Model for the interaction between S-RNase and SFBB in pome fruit species. Unlike in *Prunus*, the S locus of *Malus* and *Pyrus* encodes a pool of SFBB proteins rather than a single SFB, and each of them is able to specifically recognize one or a few "non-self" S-RNase alleles. Each "non-self" S-RNase (as is the case of the S2 allele in the image), once imported by the pollen tube, is bound by a specific SFBB: this interaction results in the ubiquitination of the S-RNase and in its subsequent proteolytic degradation. Each S haplotype, however, lacks SFBBs targeted to the "self" S-RNase: pollen bearing the S1 haplotype can't specifically recognize and degrade the S1-RNase, that can thus trigger the self-incompatibility reaction.*

bilità delle pomacee. Infatti, oltre ad essere compatibile con il fenomeno dell'interazione competitiva (la presenza contemporanea di due aplotipi S garantirebbe abbastanza geni F-box per poter riconoscere e degradare tutti gli alleli di S-RNasi), spiega anche per quale motivo non sia possibile isolare mutanti di parte pollinica per alterazione dei geni SFBB: mentre in *Prunus* la funzione di SFB è quella di proteggere la S-RNasi dalla degradazione, nelle pomacee l'azione dei diversi SFBB sarebbe quella di marcare la stessa S-RNasi per la degradazione; per questo motivo, la delezione di uno o più geni SFBB risulterebbe nell'incapacità di degradare uno o più alleli di S-RNasi, causando quindi il rigetto del tubetto pollinico anche da parte di pistilli *non-self*. Infine, essendo ogni gene SFBB deputato al riconoscimento di un solo o pochi alleli di S-RNasi, è plausibile che i livelli di polimorfismo riscontrati sui singoli SFBB siano molto più ridotti di quelli della S-RNasi.

Anche se una prova funzionale a dimostrazione dell'applicabilità del modello collaborativo alle

Pyrinae non è ancora stata prodotta, un forte indizio in tal senso è derivato dall'analisi del già citato mutante di parte stilare S4sm di pero giapponese. La regione di 236 kb eliminata dalla delezione nell'aplotipo mutante è stata interamente sequenziata nell'aplotipo originale S4 (Okada *et al.*, 2008). Si è osservato che, oltre al gene della S-RNasi, la delezione ha eliminato anche un gene SFBB, chiamato S4-Fbox0. Poiché il polline S4sm viene normalmente rigettato dai pistilli S4, inizialmente si ritenne che la delezione avesse alterato soltanto la funzione stilare, lasciando invece intatta quella pollinica: il gene S4-Fbox0 venne quindi inizialmente considerato estraneo al meccanismo di riconoscimento dell'autoincompatibilità. Tuttavia, incroci condotti fra piante portatrici dell'aplotipo mutato ed altre varietà di pero giapponese hanno a sorpresa evidenziato come il polline S4sm venga costantemente rigettato dai pistilli portatori dell'aplotipo S1. È quindi possibile che S4-Fbox0 sia il gene responsabile del riconoscimento della S-RNasi S1: la sua delezione risulterebbe quindi nell'incapacità di

ubiquitinare e degradare questa S-RNasi, che pertanto, pur non appartenendo ad un allele *self*, resterebbe attiva e causerebbe la reazione di rigetto. La delezione di S4-Fbox0, quindi, sembra aver alterato la funzione pollinica non come avviene con il gene SFB di *Prunus*, cioè risultando nell'autocompatibilità, ma secondo quanto previsto dal modello collaborativo di riconoscimento *non-self*.

## Conclusioni

La ricerca sull'autoincompatibilità nelle specie da frutto negli ultimi anni ha prodotto, grazie soprattutto agli sviluppi della biologia molecolare, l'acquisizione di importanti informazioni che hanno contribuito a svelare molti aspetti di questo meccanismo. Lo studio di questo fenomeno è di grande interesse sia dal punto di vista biologico, per la comprensione di processi di fondamentale importanza nella riproduzione e nell'interazione cellula-cellula, sia da un punto di vista applicativo. La caratterizzazione di mutanti autofertili in varie specie ha infatti messo a disposizione dei programmi di miglioramento genetico strumenti insostituibili per l'ottenimento di nuove varietà con migliori caratteristiche produttive. È questo il caso soprattutto delle varie specie coltivate di *Prunus*, in cui le mutazioni che conferiscono autocompatibilità sono relativamente frequenti e legate a diversi fattori genici, ed hanno consentito di ottenere varietà ormai largamente apprezzate e diffuse nei frutteti. Nelle pomacee, al contrario, tali mutazioni sono molto più rare e solo ora si sta iniziando a comprendere a livello molecolare il meccanismo di interazione fra determinanti stilari e pollinici del locus S.

Da un punto di vista evolutivo, è estremamente interessante notare come all'interno di una stessa famiglia, le Rosaceae, si siano formati due meccanismi distinti di riconoscimento, che pure sembrano avere un'origine comune ed un significato biologico identico; infatti, nonostante le differenze nel meccanismo molecolare e nella struttura del locus S, i due sistemi derivano uno dall'altro (si ritiene che il sistema di *Prunus* si sia evoluto come variante a partire da quello delle pomacee) e producono lo stesso risultato, cioè la forzata allogamia.

Lo studio dell'autoincompatibilità gametofitica potrà quindi focalizzarsi nell'immediato futuro su una serie di aspetti, da quello biologico molecolare a quello evolutivo ed a quello applicativo, mirando all'ottenimento di informazioni di grande interesse teorico-pratico.

## Riassunto

Le specie da frutto appartenenti alle Rosaceae sono dotate del sistema di autoincompatibilità gametofitica mediata da S-RNasi; questo meccanismo prevede un riconoscimento specifico fra polline e pistillo, mediato da proteine femminili (S-RNasi) e maschili (proteine F-box) codificate dal singolo locus multigenico S. Negli ultimi anni la ricerca in questo settore, soprattutto grazie agli sviluppi della biologia molecolare, ha consentito di chiarire molti aspetti relativi alla struttura ed al funzionamento del locus S. Le conoscenze acquisite hanno inoltre importanti risvolti applicativi, che vanno dai saggi molecolari di genotipizzazione S, alla selezione assistita per l'ottenimento di varietà autofertili, già possibile in molte specie da frutto.

**Parole chiave:** locus S, S-RNasi, F-box.

## Bibliografia

- ADACHI Y., KOMORI S., HOSHIKAWA Y., TANAKA N., ABE K., BESSHO H., WATANABE M., SUZUKI A., 2009. *Characteristics of fruiting and pollen tube growth of apple autotetraploid cultivars showing self-compatibility*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78: 402-409.
- BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R., 2001. *Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases*. Theor. Appl. Genet. 103: 475-485.
- BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R., BATLLE I., DUVAL H., MARTINEZ-GOMEZ P., GRADZIEL T.M., 2003. *Stylar ribonucleases in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes*. Plant Breeding 122: 70-76.
- BOŠKOVIĆ R., WOLFRAM B., TOBUTT K.R., CEROVIC R., SONNEVELD T., 2006. *Inheritance and interactions of incompatibility alleles in the tetraploid soar cherry*. Theor. Appl. Genet. 112: 315-326.
- BROOThAERTS W., 2003. *New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles*. Theor. Appl. Genet. 106: 703-714.
- BROOThAERTS W., JANSSENS G.A., PROOST P., BROEKaERT W.F., 1995. *cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple*. Plant Mol. Biol. 27: 499-511.
- BROOThAERTS W., KEULEMANS J., VAN NERUM I., 2004. *Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing*. Plant Cell Rep. 22: 497-501.
- CACHI A.M., WUNSCH A., 2011. *Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (Prunus avium L.)*. J. Exp. Bot. 62: 1847-1856.
- CASTILLO C., TAKASAKI T., SAITO T., YOSHIMURA Y., NORIOKA S., NAKANISHI T., 2001. *Reconsideration of S-genotypes assignments, and discovery of a new allele based on S-RNase PCR-RFLPs in Japanese pear cultivars*. Breeding Sci 51: 5-11.
- CHEN G., ZHANG B., ZHAO Z., SUI Z., ZHANG H., XUE Y., 2010. *'A life or death decision' for pollen tubes in S-RNase-based self-incompatibility*. J. Exp. Bot. 61: 2027-2037.
- DARWIN C., 1877. *The various contrivances by which orchids are fertilized by insects*. John Murray (London).
- DE CUYPER B., SONNEVELD T., TOBUTT K.R., 2005. *Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries*. Mol. Ecol. 14: 945-955.

- DE FRANCESCHI P., PIERANTONI L., DONDINI L., GRANDI M., SANSAVINI S., SANZOL J., 2011b. *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. Genomes 7: 663-683.
- DE FRANCESCHI P., PIERANTONI L., DONDINI L., GRANDI M., SANZOL J., SANSAVINI S., 2011a. *Cloning and mapping multiple S-locus F-box genes in European pear (Pyrus communis L.)*. Tree Genet. Genomes 7: 231-240.
- DE NETTANCOURT D., 2001. *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants*. Springer (Berlin).
- DEL DUCA S., SERAFINI-FRACASSINI D., BONNER PLR., CRESTI M., CAI G., 2009. *Effects of post-translational modifications catalyzed by pollen transglutaminase on the functional properties of microtubules and actin filaments*. Biochem. J. 418: 651-664.
- EAMENS A., WANG M.B., SMITH N.A., WATERHOUSE P., 2008. *RNA silencing in plants: yesterday, today and tomorrow*. Plant Physiol. 146: 456-468.
- ERSHADI A., TALAH AR., 2007. *Identification of S-alleles in 40 apple (Malus × domestica) cultivars by allele-specific PCR amplification*. Acta Hort. 760: 111-115.
- GHARESHEIKHBAYAT R., 2010. *Self-incompatibility in apricot (Prunus armeniaca); new achievements and molecular aspects of S-locus allele segregation*. PhD. Thesis, Univ. of Bologna.
- GHARESHEIKHBAYAT R., DE FRANCESCHI P., DONDINI L., SANSAVINI S., 2011. *Origine dell'autocompatibilità dell'albicocco e confronto fra varietà autofertili ed autosterili*. Frutticoltura 6: 22-28.
- GOLDWAY M., TAKASAKI T., SANZOL J., MOTA M., ZISOVICH A.H., STERN R.A., SANSAVINI S., 2009. *Renumbering the S-RNase alleles of European pears (Pyrus communis L.) and cloning the S109 RNase allele*. Sci. Hort. 119: 417-422.
- GOLZ J.F., OH H.Y., SU V., KUSABA M., NEWBIGIN E., 2001. *Genetic analysis of Nicotiana pollen-part mutants is consistent with the presence of an S-ribonuclease inhibitor at the S locus*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98: 15372-15376.
- GU Q.Q., ZHANG Q.L., HU H.J., CHEN Q.L., LUO Z.R., 2009. *Identification of self-incompatibility genotypes in some sand pears (Pyrus pyrifolia Nakai) by PCR-RFLP analysis*. Agr. Sci. China 8:154-160.
- HAJILOU J., GRIGORIAN V., MOHAMMADI S.A., NAZEMMIEH A., ROMERO C., VILANOVA S., BURGOS L., 2006. *Self- and cross-(in)compatibility between important apricot cultivars in northwest Iran*. J. Hort. Sci. Biotech. 81: 513-517.
- HALASZ J., FODOR A., HEGEDUS A., PEDRYC A., 2008. *Identification of a new self-incompatibility allele (S31) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection*. Sci. Hort. 116: 448-455.
- HALASZ J., HEGEDUS A., HERMAN R., STEFANOVITS-BANYAI R., PEDRYC A., 2005. *New self-incompatibility alleles in apricot (Prunus armeniaca L.) revealed by stylar ribonuclease assay and S-PCR analysis*. Euphytica 145: 57-66.
- HALÁSZ J., RUTHNER S., BÉKEFI Z., PEDRYC A., 2004. *S-genotype characterization of several Hungarian apricot varieties*. 14<sup>th</sup> FESPB Congress, Krakow, Acta Physiol. Plant. 26: 168.
- HAUCK R.N., YAMANE H., TAO R., IEZZONI A.F., 2002. *Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry (Prunus cerasus L.)*. Sex. Plant Reprod. 15: 39-46.
- HAUCK R.N., YAMANE H., TAO R., IEZZONI A.F., 2006. *Accumulation of nonfunctional S-Haplotypes results in the breakdown of gametophytic self-incompatibility in tetraploid Prunus*. Genetics 172: 1191-1198.
- HUA Z., FIELDS A., KAO T.H., 2008. *Biochemical Models for S-RNase-Based Self-Incompatibility*. Mol Plant 1: 575-585.
- IGIC B., KOHN J.R., 2001. *Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98: 13167-13171.
- IKEDA K., IGIC B., USHIJIMA K., YAMANE H., HAUCK N.R., NAKANO R., SASSA H., IEZZONI A.F., KOHN J.R., TAO R., 2004a. *Primary structural features of the S-haplotype specific F-box protein, SFB, in Prunus*. Sex. Plant Reprod. 16: 235-243.
- IKEDA K., WATARI A., USHIJIMA K., YAMANE H., HAUCK N.R., IEZZONI A.F., TAO R., 2004b. *Molecular markers for the self-compatible S4'-haplotype, a pollen-part mutant in sweet cherry (Prunus avium L.)*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 129: 724-728.
- ISHIMIZU T., INOUE K., SHIMONAKA M., SAITO T., TERAI O., NORIOKA S., 1999. *PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars*. Theor. Appl. Genet. 98: 961-967.
- JANSSENS GA., GODERIS IJ., BROEKAERT WF., BROOThAERTS W., 1995. *A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR*. Theor. Appl. Genet 91: 691-698.
- KIM H.T., HATTORI G., HIRATA Y., KIM D.I., HWANG J.H., SHIN Y.U., NOU I.S., 2006. *Determination of self-incompatibility genotypes of Korean apple cultivars based on S-RNase PCR*. J. Plant Biol. 49: 448-454.
- KIM H.T., HIRATA Y., NOU I.S., 2002. *Determination of S-genotypes of pear (Pyrus pyrifolia) cultivars by S-RNase sequencing and PCR-RFLP analyses*. Mol Cells 13: 444-451.
- KIM H.T., KAKUI H., KOBAYASHI T., HIRATA Y., SASSA H., 2007. *Cloning of a new S-RNase and development of a PCR-RFLP system for the determination of the S-genotypes of Japanese pear*. Breeding Sci. 57: 159-164.
- KIM H.T., KAKUI H., KOTODA N., HIRATA Y., KOBAYASHI T., SASSA H., 2009. *Determination of partial genomic sequences and development of a CAPS system of the S-RNase gene for the identification of 22 S haplotypes of apple (Malus × domestica Borkh.)*. Mol Breeding 23: 463-472.
- Kitahara K., Soejima J., Komatsu H., Fukui H., Matsumoto S., 2000. *Complete sequences of the S-genes 'Sd-' and 'Sh-RNase' cDNA in apple*. Hortscience 35:712-715.
- KUBO K., ENTANI T., TAKARA A., WANG N., FIELDS A.M., HUA Z., TOYODA M., KAWASHIMA S., ANDO T., ISOGAI A., KAO T.H., TAKAYAMA S., 2010. *Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility*. Science 330: 796-799.
- LAI Z., MA W., HAN B., LIANG L., ZHANG Y., HONG G., XUE Y., 2002. *An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of Antirrhinum is expressed specifically in pollen and tapetum*. Plant Mol Biol 50: 29-42.
- LEWIS D., MODLIBOWSKA I., 1942. *Genetical studies in pears. IV. Pollen-tube growth and incompatibility*. J. Gen. 43: 211-222.
- LIU Z.Q., XU G.H., ZHANG S.L., 2007. *Pyrus pyrifolia stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes in vitro*. Protoplasma 232: 61-67.
- LONG S., LI M., HAN Z., WANG K., LI T., 2009. *Characterization of three new S-alleles and development of an S-allele-specific PCR system for rapidly identifying the S-genotype in apple cultivars*. Tree Genet Genomes 6: 161-168.
- LUU D., QIN X., MORSE D., CAPPADOCIA M., 2000. *S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility*. Nature 407: 649-651.
- MATSUMOTO S., FURUSAWA Y., KITAHARA K., KOMORI S., SOEJIMA J., 2003a. *Partial genomic sequences of S6-, S12-, S13-, S14-, S17-, S19-, and S21-RNases of apple and their allele designation*. Plant Biotechnol 20: 323-329.
- MATSUMOTO S., FURUSAWA Y., KOMATSU H., SOEJIMA J., 2003b. *S-allele genotypes of apple pollenizers, cultivars and lineages including those resistant to scab*. J. Hort. Sci. Biotech. 78: 634-637.
- MATSUMOTO S., KITAHARA K., KOMORI S., SOEJIMA J., 1999a. *A new S-allele in apple, 'Sg', and its similarity to the 'Sf' allele from Fuji*. HortScience 34: 708-710.
- MATSUMOTO S., KOMORI S., KITAHARA K., IMAZU S., SOEJIMA J., 1999b. *S-genotypes of 15 apple cultivars and self-compatibility of 'Megumi'*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 236-241.
- MINAMIKAWA M., KAKUI H., WANG S., KOTODA N., KIKUCHI S., KOBAYASHI T., SASSA H., 2010. *Apple S locus region represents a large cluster of related, polymorphic and pollen-specific F-*

- box genes*. Plant Mol. Biol. 74: 143-154.
- MORIYA Y., YAMAMOTO K., OKADA K., IWANAMI H., BESSHO H., NAKANISHI T., TAKASAKI T., 2007. *Development of a CAPS marker system for genotyping European pear cultivars harboring 17 S alleles*. Plant Cell Rep. 26: 345-354.
- MOTA M., TAVARES L., OLIVEIRA C.M., 2007. *Identification of S-alleles in pear (Pyrus communis L.) cv. 'Rocha' and other European cultivars*. Sci. Hort. 113: 13-19.
- NEWBIGIN E., PAAPE T., KOHN J.R., 2008. *RNase-based self-incompatibility: puzzled by pollen S*. Plant Cell 20: 2286-2292.
- OKADA K., TONAKA N., MORIYA Y., NORIOKA N., SAWAMURA Y., MATSUMOTO T., NAKANISHI T., TAKASAKI-YASUDA T., 2008. *Deletion of a 236 kb region around S4-RNase in a stylar-part mutant S4sm-haplotype of Japanese pear*. Plant Mol. Biol. 66: 389-400.
- OKADA K., TONAKA N., TAGUCHI T., ICHIKAWA T., SAWAMURA Y., NAKANISHI T., TAKASAKI-YASUDA T., 2011. *Related polymorphic F-box protein genes between haplotypes clustering in the BAC contig sequences around the S-RNase of Japanese pear*. J. Exp. Bot. 62: 1887-1902.
- ORTEGA E., SUTHERLAND B.G., DICENTA F., BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R., 2005. *Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new S-alleles and correlation of reported S genotypes*. Plant Breeding 124: 188-196.
- QIAO H., WANG H., ZHAO L., ZHOU J., HUANG J., ZHANG Y., XUE Y., 2004. *The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in Antirrhinum*. Plant Cell 16: 571-581.
- ROMERO C., VILANOVA S., BURGOS L., MARTINEZ-CALVO J., VICENTE M., LLACER G., BADENES M.L., 2004. *Analysis of the S-locus structure in Prunus armeniaca L. Identification of S-haplotype specific S-RNase and F-box genes*. Plant Mol. Biol. 56: 145-157.
- SANZOL J., 2009a. *Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (S-RNases) in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles*. Tree Genet. Genomes 5: 393-405.
- SANZOL J., 2009b. *Pistil-function breakdown in a new S-allele of European pear, S21°, confers self-compatibility*. Plant Cell Rep. 28: 457-467.
- SANZOL J., ROBBINS T.P., 2008. *Combined analysis of S alleles in European pear by fertilization efficiency of pollinations and PCR based S-genotyping: correlation between S phenotypes and S-RNase genotype*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 133: 213-224.
- SANZOL J., SUTHERLAND B.G., ROBBINS T.P., 2006. *Identification and characterization of genomic DNA sequences of the S-ribonuclease gene associated with self-incompatibility alleles S1 to S5 in European pear*. Plant Breeding 125: 513-518.
- SASSA H., HIRANO H., IKEHASHI H., 1992. *Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (Pyrus serotina Rehd.)*. Plant Cell Physiol 33: 811-814.
- SASSA H., HIRANO H., NISHIO T., KOBATA T., 1997. *Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (Pyrus serotina)*. Plant J. 12: 223-227.
- SASSA H., KAKUI H., MINAMIKAWA M., 2010. *Pollen-expressed F-box gene family and mechanism of S-RNase-based gametophytic self-incompatibility (GSI) in Rosaceae*. Sex Plant Reprod. 23: 39-43.
- SASSA H., KAKUI H., MIYAMOTO M., SUZUKI Y., HANADA T., USHIJIMA K., KUSABA M., HIRANO H., KOBATA 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.
- SASSA H., NISHIO T., KOWYAMA Y., HIRANO H., KOBATA T., IKEHASHI H., 1996. *Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily*. Mol. Gen. Genet. 250: 547-57.
- SIJACIC P., WANG X., SKIRPAN A.L., WANG Y., DOWD P.E., MCCUBBIN A.G., HUANG S., KAO T.H., 2004. *Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility*. Nature 429: 302-305.
- SONNEVELD T., ROBBINS T.P., BOSKOVIĆ R., TOBUTT K.R., 2001. *Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection*. Theor. Appl. Genet. 102: 1046-1055.
- SONNEVELD T., TOBUTT K.R., ROBBINS T.P., 2003. *Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers*. Theor. Appl. Genet. 107: 1059-1070.
- SONNEVELD T., ROBBINS T.P., TOBUTT K.R., 2006. *Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron PCR products*. Plant Breed 125: 305-307.
- SONNEVELD T., TOBUTT K.R., VAUGHAN S.P., ROBBINS T.P., 2005. *Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of Prunus avium is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene*. Plant Cell 17: 37-51.
- SUTHERLAND B.G., ROBBINS T.P., TOBUTT K.R., 2004a. *Primers amplifying a range of Prunus S-alleles*. Plant Breed. 123: 582-584.
- SUTHERLAND B.G., TOBUTT K.R., ROBBINS T.P., 2004b. *Molecular genetics of self-incompatibility in plums*. Acta Hort. 663: 557-562.
- TAKASAKI T., MORIYA Y., OKADA K., YAMAMOTO K., IWANAMI H., BESSHO H., NAKANISHI T., 2006. *cDNA cloning of nine S alleles and establishment of a PCR-RFLP system for genotyping European pear cultivars*. Theor. Appl. Genet. 112: 1543-1552.
- TAKASAKI T., OKADA K., CASTILLO C., MORIYA Y., SAITO T., 2004. *Sequence of the S9-RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating S1- to S9-allele in Japanese pear*. Euphytica 135: 157-167.
- TAO R., IEZZONI A.F., 2010. *The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in Prunus exhibits distinct genetic and molecular features*. Sci. Hort. 124: 423-433.
- TAO R., YAMANE H., SASSA H., MORI H., GRADZIEL T.M., DANDEKAR A.M., SUGIURA A., 1997. *Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (Prunus dulcis)*. Plant Cell Physiol. 38: 304-311.
- TAO R., YAMANE H., SUGIURA A., MURAYAMA H., SASSA H., MORI H., 1999. *Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 124: 224-233.
- THOMAS S.G., FRANKLIN-TONG V.E., 2004. *Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen*. Nature 429: 305-309.
- THOMAS S.G., HUANG S., LI S., STAIGER C.J., FRANKLIN-TONG V.E., 2006. *Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen*. J. Cell Biol. 174: 221-229.
- TSUKAMOTO T., POTTER D., TAO R., VIEIRA C.P., VIEIRA J., IEZZONI A.F., 2008. *Genetic and molecular characterization of three novel S-haplotypes in sour cherry (Prunus cerasus L.)*. J. Exp. Bot. 59: 3169-3185.
- USHIJIMA K., SASSA H., DANDEKAR A.M., GRADZIEL T.M., TAO R., HIRANO H., 2003. *Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism*. Plant Cell 15: 771-781.
- USHIJIMA K., YAMANE H., WATARI A., KAKEHI E., IKEDA K., 2004. *The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of Prunus avium and P. mume*. Plant J. 39: 573-86.
- VAUGHAN S.P., BOŠKOVIĆ R., GISBERT-CLIMENT A., RUSSELL K., TOBUTT K.R., 2008. *Characterization of novel S-alleles from cherry (Prunus avium L.)*. Tree Genet. Genom. 4: 531-541.

- VERDOODT L., VAN HAUTE A., GODERIS I.J., DE WITTE K., KEULEMANS J., BROOHTAERTS W., 1998. *Use of the multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction*. Theor. Appl. Genet. 96: 294-300.
- VIEIRA J., FONSECA N.A., VIEIRA C.P., 2009. *RNase-based gametophytic self-incompatibility evolution: questioning the hypothesis of multiple independent recruitments of the S-pollen gene*. J. Mol. Evol. 69: 32-41.
- VILANOVA S., BADENES M.L., BURGOS L., MARTINEZ-CALVO J., LLACER G., ROMERO C., 2006. *Self-Compatibility of Two Apricot Selections Is Associated with Two Pollen-Part Mutations of Different Nature*. Plant Physiol. 142: 629-641.
- WANG C.L., XU G.H., JIANG X., CHEN G., WU J.Y., WU H.Q., ZHANG S.L., 2009. *S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of Pyrus pyrifolia in vitro*. Plant J. 57: 220-229.
- WIERSMA P.A., WU Z., ZHOU L., HAMPSON C., KAPPEL F., 2001. *Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (Prunus avium L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis*. Theor. Appl. Genet. 102: 700-708.
- WUNSCH A., HORMAZA J.I., 2004. *Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (Prunus avium L.)*. Theor. Appl. Genet. 108: 299-305.
- ZHANG L., CHEN X., CHEN X., ZHANG C., LIU X., CI Z., ZHANG H., WU C., LIU C., 2008. *Identification of self-incompatibility (S-) genotypes of Chinese apricot cultivars*. Euphytica 160: 241-248.
- ZHANG Y., ZHAO Z., XUE Y., 2009. *Roles of proteolysis in plant self-incompatibility*. Ann. Rev. Plant Biol. 60: 21-42.
- ZISOVICH A.H., STERN R.A., SHAFIR S., GOLDWAY M., 2004. *Identification of seven S-alleles from the European pear (Pyrus communis) and the determination of compatibility among cultivars*. J. Hort. Sci. Biotech. 80: 143-146.
- ZUCCHERELLI S., TASSINARI P., BROOHTAERTS W., TARTARINI S., DONDINI L., SANSAVINI S., 2002. *S-allele characterization in self-incompatible pear (Pyrus communis L.)*. Sex Plant Reprod. 15: 153-158.