

L'incompatibilità nelle piante da frutto: i meccanismi di rigetto

L'INCOMPATIBILITÀ GAMETOFITICA NELLE ROSACEE: GENERALITÀ SUL LOCUS S
E SUI MECCANISMI DI RIGETTO DEL POLLINE

La maggior parte delle specie appartenenti alle Angiosperme produce sia gli organi maschili e sia quelli femminili sullo stesso fiore, ma l'evoluzione ha favorito lo sviluppo di barriere genetiche allo scopo di evitare auto-fertilizzazione o la fecondazione tra individui geneticamente molto simili. Darwin parla dello sviluppo di queste strategie riproduttive come di uno dei fattori chiave del successo delle angiosperme e nel 1877 asseriva che «la natura detesta l'auto-fecondazione». L'auto-incompatibilità gametofitica (GSI) mediata da ribonucleasi è il meccanismo che impedisce l'autofecondazione nelle specie appartenenti alla famiglia delle Rosacee (cioè pomacee e drupacee). Tra queste specie questo meccanismo di riconoscimento dipende da un singolo locus (denominato locus S) in cui sono presenti almeno due geni: una ribonucleasi (RNasi S, determinante stilare) e un gene che codifica per proteine contenenti un dominio F-box (S-Fbox, determinante pollinico). Con il termine di “allele S” si indica normalmente ogni variante del locus S il quale però è composto da più di un gene e di conseguenza sarebbe più corretto usare il termine “aplotipo S”. Nella pratica quotidiana comunque i due termini si usano come sinonimi. I termini “self” e “non-self” indicano invece rispettivamente l'identità genetica degli alleli S o meno fra polline e pistillo: il polline “self” (recante un allele S geneticamente identico a uno degli alleli S del pistillo) è respinto mentre quello “non-self” (geneticamente non correlato) è accettato per la fecondazione (fig. 1). Le RNasi S quali determinanti femminili nell'incompatibilità gametofitica delle Rosacee

* *Università di Bologna*

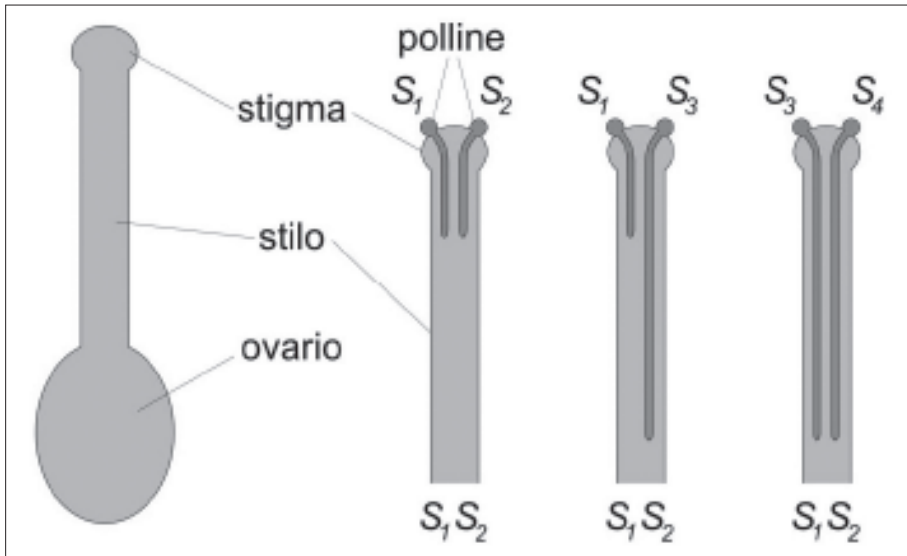


Fig. 1 Schema delle tre possibili combinazioni di incrocio in specie auto-incompatibili: a sinistra 100% incompatibili, al centro 50% compatibili, a destra 100% compatibile (De Franceschi et al., 2011)

sono note da moltissimi anni (sin da Sassa et al., 1992). Per quanto riguarda la natura del determinante maschile, solo recentemente sono stati identificati alcuni geni espressi in modo specifico nel polline codificanti per proteine contenenti un dominio F-box (Entami et al., 2003; Ushijima et al., 2003; Yamane et al., 2003; Sassa et al., 2007; Tao e Iezzoni, 2010; De Franceschi et al., 2011a; De Franceschi et al., 2011b; De Franceschi et al., 2011c). Il rigetto del polline avviene attraverso un meccanismo di degradazione proteica che viene innescato dal riconoscimento alplotipo-specifico delle RNasi S (fig. 2): nei tubetti “non-self” una variante allelica di una proteina Fbox riconosce specificamente una RNasi S e ne determina la degradazione attraverso “ubiquitinazione” (Zhang et al., 2010). Al contrario un tubetto “self” non sarebbe in grado di inibire l’attività citotossica delle RNasi S le quali sarebbero libere di degradare tutti gli RNA messaggeri del tubetto pollinico in allungamento causandone il rigetto. Questo meccanismo richiede l’attività proteolitica di numerosi geni che non appartengono al locus S, per esempio, un SLF-interacting SKP1-like (SSK), una subunità di cullina, un RING-BOX1 (RBX1) e un E2 ubiquitin-binding protein (Zhang et al., 2010). Tra gli altri geni che sono esterni al S-locus, ma che sono coinvolti in questo meccanismo bisogna ricordare la Transglutaminasi (TGasi), un enzima calcio-dipendente che durante la crescita dei tubetti

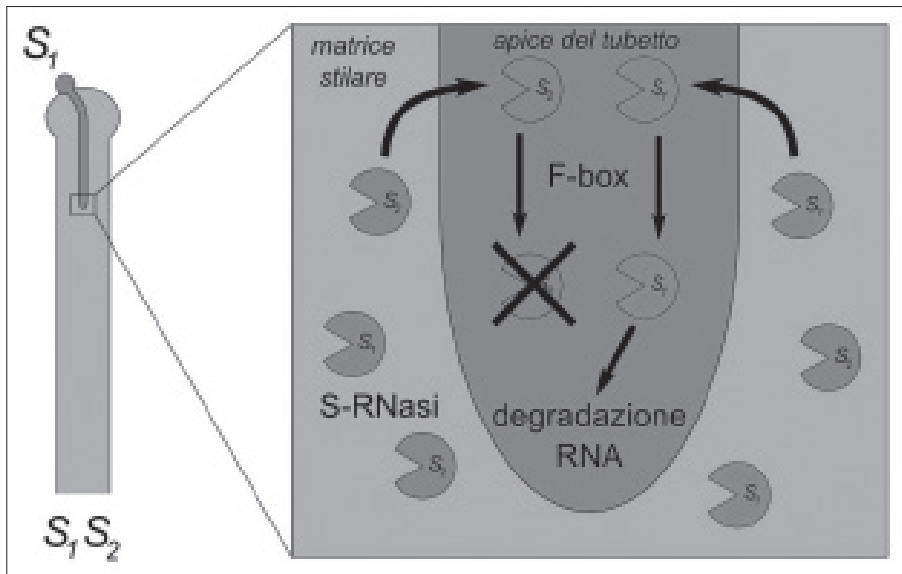


Fig. 2 Rigo del polline recante l'allele S_1 in un pistillo S_1/S_2 . Le RNasi S sono importate in modo aspecifico all'interno del tubetto pollinico dalla matrice stilare. La RNasi S_2 è inattivata dalle proteine F-Box espresse dal polline S_1 , il quale non è però in grado di degradare le RNasi S_1 . Quindi la RNasi S_1 degraderà gli mRNA del polline provocandone il rigo (da De Franceschi et al., 2011)

pollinici è coinvolto nella polimerizzazione di actina e nella formazione del citoscheletro. A oggi non è ancora stato chiarito come l'attività di tutti questi geni sia coordinata dal meccanismo di riconoscimento dei determinanti pollinici e stilari. In *Pyrus pyrifolia* (il pero giapponese) è noto che le RNasi S nelle combinazioni di incrocio incompatibili sono in grado di indurre alterazioni a carico del citoscheletro. Nelle Papaveraceae un fenomeno simile si evolve in una forma di morte cellulare programmata (PCD) (Thomas et al., 2006). Tuttavia non è ancora stato chiarito se le RNasi S stesse possono essere considerate degli iniziatori di programmi di morte cellulare programmata che si estrinsecano nel rigo del polline negli incroci incompatibili nelle specie appartenenti alle Rosacee. Questa ricerca avrà delle importantissime ricadute applicative in specie di grande interesse economico quali quelle appartenenti alle pomacee (melo e pero) e drupacee (fra le quali ciliegio, albicocco e mandorlo) in cui il successo della fecondazione è basilare per l'allegagione e lo sviluppo del frutto. Le conoscenze dei vari aspetti relativi al funzionamento e al controllo genetico di questo fenomeno favoriranno nel prossimo futuro la selezione e l'affermazione di nuove varietà autofertili come sta già avvenendo in ciliegio, mandorlo e albicocco.

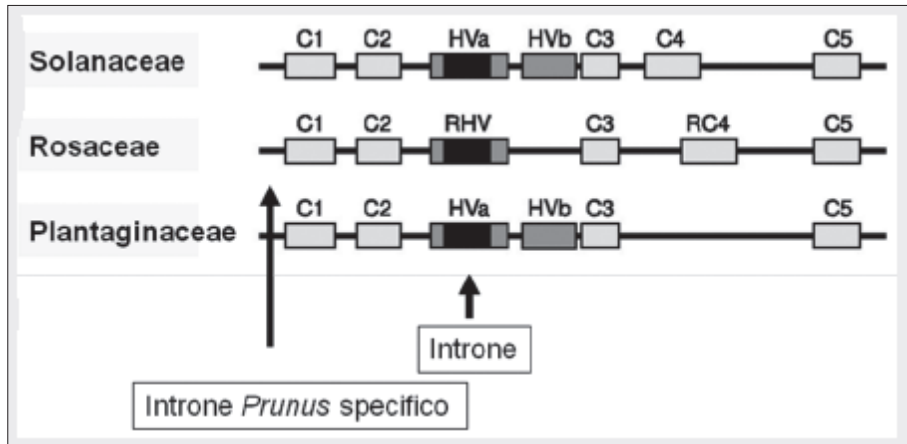


Fig. 3 Struttura del gene per l'RNasi S. C rappresenta i domini conservati (in grigio); HV indica i domini ipervariabili (in bianco); RC indica il dominio conservato numero 4 delle Rosacee (modificato da Tao e Iezzoni, 2010)

STRUTTURA E FUNZIONE DEL DETERMINANTE STILARE S RNASI

Analogamente a quanto descritto in altre specie, le RNasi S sono glicoproteine che svolgono la funzione di determinante stilare nell'incompatibilità gametofitica sia nelle Pyrinae sia nelle Prunoideae (Broothaerts et al., 1995; Sassa et al., 1996; Tao et al., 1997; Zuccherelli et al., 2002). Questi geni sono stati molto ben caratterizzati in tutte le specie appartenenti al Rosaceae e centinaia di sequenze geniche sono oggi a disposizione della comunità scientifica nelle banche dati.

La struttura genica delle RNasi S delle Rosaceae prevede la presenza di cinque regioni conservate (da C1 a C5), il quarto dominio (RC4) è presente nelle Rosacee in una posizione diversa rispetto a quanto osservato nelle Solanaceae e nelle Plantaginaceae, e vi è la presenza di una sola regione ipervariabile (RHV) (fig. 3). I domini conservati sono molto importanti per la specificità di azione di questo enzima mentre la regione ipervariabile sembra essere fortemente coinvolta nel riconoscimento "self" / "non-self" (Tao e Iezzoni, 2010). In tutte le RNasi caratterizzate nelle specie appartenenti alle Rosacee è presente un introne che si trova all'interno della regione ipervariabile mentre, ma solo nel genere *Prunus*, un ulteriore introne si trova tra il peptide segnale e il codone di inizio della proteina (Igc e Kohn, 2001).

Come già accennato, le RNasi S svolgono un ruolo citotossico che, in incroci incompatibili, è responsabile per il rigetto polline nel terzo superiore dello stilo. Al contrario, l'inattivazione dell'attività RNasica negli incroci compatibili è il requisito fondamentale per la crescita dei tubetti pollinici nella matrice stilare e per la successiva fecondazione dell'ovulo nell'ovario.

♂/♀	S ₁	S ₂
S ₁₀₁	47%	52%
S ₁₁₁	1%	0%

Tab. 1 Segregazione degli alleli S in una progenie di pero derivata dell'incrocio Hayatama (S₁S₂) x Wilder (S₁₀₁S₁₁₁)

La presenza di introni all'interno della struttura genica delle RNasi S (con dimensioni altamente variabili tra i diversi alleli S) è stata fondamentale per sviluppare protocolli di PCR per S-genotyping (la genotipizzazione degli alleli S). Questo strumento è il supporto più potente per programmi di selezione volti a definire i gruppi inter-fertilità tra le varietà appartenenti a specie in cui l'auto-incompatibilità è predominante (Zuccherelli et al., 2002; Sanzol e Herrero, 2002; Sutherland et al., 2004; Zisovith et al., 2004; Halasz et al., 2005; Goldway et al., 2009).

L'attività di S-genotyping ha fatto emergere anche elementi di criticità in un modello che, sulla base degli schemi di riconoscimento degli S alleli, prevede percentuali di compatibilità negli incroci molto precise. Infatti teoricamente la percentuale di compatibilità in incroci tra varietà con alleli 2, 1 o 0 in comune dovrebbe essere rispettivamente 0%, 50% e 100%. Queste percentuali nella pratica non sono mai così definite e, in alcuni casi, sono state descritte percentuali inusuali: i) occasionalmente si può avere produzione di frutta in incroci incompatibili; ii) segregazioni distorte di S-alleli rispetto al 100% teorico in incroci totalmente compatibili. Un'alta omologia di sequenza fra due S-alleli presenti nei due parentali negli incroci controllati può influire sui relativi rapporti di segregazione nelle progenie? La varietà di pero giapponese Hayatama (S1-S2) e quella di pero europeo Wilder (S101-S111) presentano questa situazione relativamente agli alleli S1 e S111 che sono molto simili. Analizzando la segregazione degli alleli S nella popolazione derivata dall'incrocio Hayatama x Wilder si è osservato che S111 è presente in un solo semenzale su 77 individui della progenie mentre viene rigettato in tutti gli altri casi (tab. 1; De Franceschi et al., risultati non pubblicati).

Questo esempio apre una prospettiva nuova nella comprensione dei meccanismi di rigetto del polline negli incroci controllati, prospettiva di cui si dovrà tenere conto per determinare in modo ancora più efficace, i gruppi di inter-fertilità fra le varietà appartenenti a specie in cui l'autoincompatibilità è prevalente.

STRUTTURA E FUNZIONE DEL DETERMINANTE POLLINICO S FBOX

Analogamente a quanto riportato per le Solanaceae e Plantaginaceae, il de-

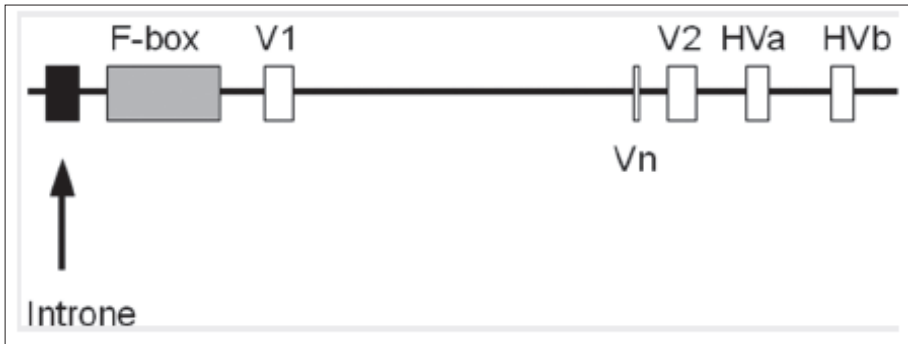


Fig. 4 Struttura delle proteine contenenti un dominio F-box (in grigio). V and HV (in bianco) indicano i domini variabili e ipervariabili (modificato da Tao e Iezzoni 2010)

terminante pollinico dell'auto-incompatibilità gametofitica mediata da ribonucleasi nelle Rosaceae è stato identificato diversi anni dopo il determinante stilare. Tale determinante è stato caratterizzato dapprima nelle Prunoidee (Entani et al., 2003; Yamane et al., 2003). Gli autori hanno chiamato questi geni del locus S F-box (SFB). In *Prunus* un singolo gene F-box determina la funzione pollinica (Tao e Iezzoni, 2010), mentre in melo, pero europeo e giapponese più geni S-locus F-box (denominati S-locus F-Box Brothers o SFBBs) sono stati recentemente identificati e descritti quali candidati per questa specificità: tutti questi geni sono espressi in modo specifico nel polline e sono strettamente associati alla RNasi S all'interno del locus S (Sassa et al., 2007; Minamikawa et al., 2010; De Franceschi et al., 2011a e 2011b).

Per quanto riguarda la struttura, SFB e SFBBs contengono un dominio F-Box, due regioni variabili (V1 e V2) e due iper-variabili (HVA e HVB; Ikeda et al., 2004) (fig. 4). Tali regioni sembrano essere coinvolte nel riconoscimento "self" / "non-self". I domini F-box sono diffusi in proteine che devono interagire con altri substrati proteici. In particolare erano già state descritte proteine con tali caratteristiche nei complessi per degradazione proteolitica attraverso il proteasoma 26S. Queste proteine dovrebbero interagire specificamente con le S-RNasi per inibire l'attività ribonucleasica e, di conseguenza, la citotossicità dell'enzima all'interno del tubetto pollinico "non-self" in incroci compatibili (il caso delle Pyrinae), o di interagire con le RNasi S e lasciarle attive nel polline "self" nel caso di incroci incompatibili (il caso delle Prunoidee) e bloccarne la crescita (Tao e Iezzoni, 2010; fig. 5).

Nella sottotribù delle Pyrinae il ruolo svolto dai molti geni SFBB all'interno del singolo S locus è ancora da chiarire. Tale struttura assomiglia molto a quella descritta in *Petunia*. In questo modello sperimentale è stato osservato



Fig. 5 *Interazione fra il determinante pollinico e stilare nelle Pyrinae e nel genere Prunus: nel primo caso l'interazione fra i due determinanti provoca l'inattivazione della RNasi S, nel secondo è elemento imprescindibile per il mantenimento della sua citotossicità (modificato da Tao e Iezzoni, 2010)*

che ogni gene SLF (così sono chiamati i geni S-FBox in questo modello) svolgeva il ruolo di determinante pollinico solo nei confronti di una o poche RNasi S, e che quindi la funzione pollinica nel suo complesso doveva essere svolta da un pool di molti geni. Questo nuovo modello di riconoscimento è stato per questo motivo definito “modello collaborativo di riconoscimento non-self”. Ogni RNasi S, una volta entrata in modo aspecifico nel tubetto, dovrà essere legata da una specifica proteina F-box perché sia ubiquitinata e successivamente degradata.

Perché questo sia possibile ogni aplotipo S dovrà necessariamente possedere un numero di geni F-box sufficiente a riconoscere e degradare tutti gli alleli “non-self” della RNasi S, mentre dovrà essere privo dei geni deputati al riconoscimento della sola RNasi S “self”.

Questo modello sembra adattarsi molto bene al caso specifico delle Pyrinae ma l'evidenza sperimentale è ancora da produrre.

DALLO STUDIO DEI MUTANTI POLLINICI E STILARI AL SUPERAMENTO DELLE BARRIERE GENETICHE DELL'INCOMPATIBILITÀ

Una trattazione completa delle differenze osservate fra pomacee e drupacee per quanto riguarda la struttura e funzionalità del locus S deve tenere in considerazione il diverso comportamento dei mutanti che sono associati al superamento dell'autoincompatibilità. In *Prunus* sono noti da tempo mutanti dei geni che codificano per il determinante pollinico, mutanti nei quali inserzioni o delezioni di porzioni del gene risultano determinanti nel superamento

SPECIE	DETERMINANTI STILARI	DETERMINANTI POLLINICI
<i>Pyrus communis</i>	S121°	-
<i>Pyrus pyrifolia</i>	S4 sm	-
<i>Prunus avium</i>	-	S3'; S4'
<i>Prunus mume</i>	-	S1', S3'
<i>Prunus armeniaca</i>	-	Sc
<i>Prunus cerasus</i>	-	S1', S13'

Tab. 2 Mutazioni note a carico dei determinanti stilari e pollinici

dell'incompatibilità (tab. 2, modificato da Tao e Iezzoni, 2010). In albicocco la mutazione dell'SFB nell'aplotipo Sc è ben nota da tempo (Vilanova et al., 2006), ma non sembra essere l'unica fonte di compatibilità. Gareksheikbayat (2010) ha analizzato recentemente le varietà di Bora (autocompatibile grazie all'aplotipo Sc), Portici (autocompatibile, ma sprovvista dell'aplotipo Sc) e la varietà da esse derivata Maia (autocompatibile che non ha ricevuto l'allele Sc da Bora). 'Maia' e 'Portici' devono essere portatrici di una mutazione in grado di conferire loro autocompatibilità che non è stata ancora caratterizzata. Analoghi risultati sono stati descritti in ciliegio dolce a carico degli aplotipi S3 e S4, le cui mutazioni nel determinante pollinico hanno conferito alle varietà che ne sono in possesso autocompatibilità (Tao e Iezzoni, 2010). Se in *Prunus* la perdita della funzione pollinica conferisce autocompatibilità significa che in queste specie determinante il polline agisce proteggendo la RNasi S "self" da un inibitore generale, consentendo di esercitare la propria funzione citotossica. Contrariamente al *Prunus*, nelle pomacee i mutanti non funzionali della funzione pollinica associati ad auto-compatibilità non sono mai stati descritti. Nel pero sono invece noti mutanti del determinante stilare. Una delezione di una regione genomica di 236 kb nell'aplotipo S4-RNasi della varietà di pero giapponese Nijisseiki ha prodotto un aplotipo mutante S4sm che ha prodotto la varietà derivata autofertile Osa-Nijisseiki (Okada et al., 2008). Inoltre in pero europeo l'allele mutato S121 è stato identificato nelle due varietà autocompatibili Abugo e Ceremeño (Sanzol et al., 2009) (tab. 2). In questo caso un elemento TRIM è stato trovato nel introne della RNasi S, ma è ancora da dimostrare che questa sia la causa della perdita di funzionalità di questo allele il quale non è espresso negli stili dei due genotipi auto-compatibili (Sanzol et al., 2009).

In letteratura sono descritti diversi altri geni (che non sono localizzati nel locus S) i quali svolgono comunque una funzione nei meccanismi di rigetto del polline. Alcuni di questi geni, come già accennato sono coinvolti nell'attività del complesso SCF (SLF-interacting SKP1-like, cullina, RING-BOX1 e

σ^7/ϕ	S_1	S_8
S_1	42%	22%
S_8	22%	36%

Tab. 3 *Segregazione di alleli S in una progenie di albicocco derivata dall'autoimpollinazione della varietà Katy (S_1S_8) (modificato da Wu et al., 2010)*

E2 ubiquitin-binding protein), altri sono fondamentali per la crescita del tubetto pollinico quali la transglutaminasi (TGasi). Possono mutazioni a carico di questi geni esterni al locus S modificare i meccanismi di rigetto del polline “self” e diventare sorgenti di autofertilità?

In letteratura sono già descritti casi in cui questo fenomeno si è verificato. I report che descrivono la compatibilità auto derivata da mutazioni esterni al locus S sono già disponibili. In ciliegio dolce è noto il caso della varietà Cristobalina in cui la mutazione che ne conferisce autofertilità è localizzata nel LG 3 e non nel linkage group 6 in cui ha sede il locus S delle drupacee (Cachi et al., 2010). La varietà Katy di albicocco (la cui combinazione allelica al locus S è S_1 - S_8) sembra avere un comportamento simile. Questa varietà viene fecondata sia dai pollini che trasportano il gene SFB1 sia da quelli recanti il gene SFB8 (tab. 3; Wu et al., 2010). In questo lavoro è chiaramente descritto che non sono state identificate alterazioni nei geni SFB1 e SFB8, quindi si esclude che l'autofertilità derivi dalla presenza dell'allele Sc. Analogamente a Cristobalina anche Katy dovrebbe possedere una mutazione a carico di un gene esterno al locus S.

La conoscenza del ruolo dei geni coinvolti nei meccanismi di rigetto del polline ha già permesso di sviluppare applicazioni nel campo dell'ingegneria genetica per la produzione di nuovi genotipi autofertili. La varietà di melo Elstar è stata geneticamente modificata mediante approccio di silenziamento genico a carico dell'S RNasi S3 e questa pianta GM è risultata, come atteso, autofertile (Broothaerts et al., 2004). Tale strategia potrà essere in futuro utilizzata anche su altre cultivar di melo e pero mentre nelle drupacee, per utilizzarla, bisognerà silenziare i geni S FBox.

CONCLUSIONI

In questi ultimi anni la ricerca nel campo della biologia florale, e in particolare sui meccanismi di incompatibilità e rigetto del polline, ha prodotto numerose nuove scoperte che sono state determinanti per chiarire il ruolo di molti geni (sia quindi dei determinanti stilari e pollinici, sia degli altri geni esterni al locus S) che sono coinvolti in questo meccanismo.

Attraverso la genotipizzazione degli alleli S è stato inoltre finalmente possibile definire su base molecolare i gruppi di inter-fertilità in quattro specie: melo, pero, ciliegio e albicocco.

Sebbene tali geni siano stati ampiamente studiati e caratterizzati, la ricerca di base non ha ancora chiarito alcuni aspetti importanti quali il significato delle diverse strutture del locus S che si sono evolute nelle pomacee e nelle drupacee e la ragione per cui in alcune combinazioni di incrocio in queste specie gli alleli S non segregano seguendo le modalità attese. Tali informazioni avranno anche importanti ricadute applicative perché permetteranno una più precisa definizione dei gruppi di inter-fertilità fra varietà nelle specie in cui l'auto-incompatibilità è predominante. La conoscenza dei mutanti auto-fertili dovrà essere invece maggiormente utilizzata per lo sviluppo di marcatori molecolari che facilitino la selezione di nuove varietà portatrici di questo carattere.

Fra le strategie che hanno già dimostrato di saper raggiungere l'auto-fertilità non bisogna sottovalutare l'apporto che potrà essere fornito dalle tecniche di ingegneria genetica. Il dibattito che si sta sviluppando pro e contro l'uso di queste tecnologie non dovrà dimenticare i vantaggi offerti dagli approcci di silenziamento genico. Se poi ci riferiamo al recente dibattito a favore delle sole piante cisgeniche (in cui possono essere utilizzati solo geni nativi identificati nella specie utilizzata nella trasformazione) non bisogna dimenticare che il silenziamento genico non potrà mai essere applicato nella produzione di piante cisgeniche e, pur comprendendo le ragioni che recentemente hanno spinto molti centri di ricerca a guardare con favore queste tecnologie, rinunciare a queste potenzialità sarebbe a nostro avviso comunque un errore.

RIASSUNTO

Un passaggio fondamentale per il successo evolutivo delle Angiosperme risiede nello sviluppo di strategie riproduttive mirate a inibire l'auto-fertilità. L'auto-incompatibilità di tipo gametofitico rappresenta una di queste strategie ed è diffusa in diverse famiglie fra le quali le Rosacee. Tale meccanismo è determinato da geni localizzati nel locus S: una ribonucleasi (RNasi S, determinante stilare) e proteine contenenti un dominio F-box (S-Fbox, determinante pollinico). Le RNasi S sono ben caratterizzate grazie alla "genotipizzazione degli alleli S", approccio nato per definire i gruppi inter-fertilità tra le varietà in specie auto-incompatibili e che si è rivelato idoneo per identificare gli alleli mutati nei genotipi auto-fertili. In questo lavoro verranno descritte le dinamiche evolutive del locus S nelle Rosacee, i meccanismi di rigetto del polline e le strategie per ottenere genotipi auto-fertili in queste specie, strategie che, essendo mirate alla produttività, avranno finalità opposte a quelle consociative naturali.

ABSTRACT

Angiosperms are the most widespread and evolved plants; a key step for their success has been promoting cross-fertilization as a reproductive strategy. The gametophytic self-incompatibility (GSI) system is one of these strategies and it occurs in several families, among which the Rosaceae. Self-incompatibility is determined by the S-locus haplotypes: pistil specificity is determined by a ribonuclease S (S-RNase) while the pollen one is a protein containing an F-box domain (S-Fbox). S-RNases have been characterized in detail thanks to genotyping assays for the S alleles (S-genotyping): this approach was used to define the inter-fertility groups among varieties of self-incompatible species, and it allowed to identify some mutated alleles that originated new self-fertile genotypes. In this review, all of these aspects have been considered as well as the evolution of GSI in Prunoideae (ie *Prunus*) and Pyrinae (ie *Malus* and *Pyrus*). The transgenic approaches used for breaking GSI will be also discussed.

BIBLIOGRAFIA

- BROOThAERTS W., JANSSENS G.A., PROOST P., BROEKAERT W.F. (1995): *cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple*, «Plant Molecular Biology», 27, pp. 499-511.
- BROOThAERTS W., KEULEMANS J., VAN NERUM I. (2004): *Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing*, «Plant Cell Rep.», 22, pp. 497-501.
- CACHI A.M., WÜNSCH A. (2011): *Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (Prunus avium L.)*, «Journal of Experimental Botany», 62, pp. 1847-1856.
- DARWIN C. (1877): *The various contrivances by which orchids are fertilized by insects*, John Murray, London, p. 293.
- DE FRANCESCHI P., DONDINI L., SANSAVINI S. (2011c): *Il controllo genetico dell'autoincompatibilità gametofitica nelle Rosaceae*, «Italus Hortus», 18, pp. 9-20.
- DE FRANCESCHI P., PIERANTONI L., DONDINI L., GRANDI M., SANSAVINI S., SANZOL J. (2011a): *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 Genetics and Genomes», 4, pp. 663-683.
- DE FRANCESCHI P., PIERANTONI L., DONDINI L., GRANDI M., SANZOL J., SANSAVINI S. (2011b): *Cloning and mapping multiple S-locus F-box genes in European pear (Pyrus communis L.)*, «Tree Genetics and Genomes», 7, pp. 231-240.
- DI SANDRO A., SERAFINI-FRACASSINI D., DEL DUCA S., DELLA MEA M., DE FRANCESCHI P., DONDINI L., FALERI C., CAI G. AND SANSAVINI S. (2007): *Pollen Transglutaminase in Pear Self Incompatibility and Relationship with S-RNases and S-Allele Variability*, «Acta Horticulturae», 800, pp. 423-426.
- ENTANI T., IWANO M., SHIBA H., CHE F.S., ISOGAI A., TAKAYAMA S. (2003): *Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of Prunus mume: Identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity*, «Genes Cells», 8, pp. 203-213.
- GHARESHEIKHBAYAT R. (2010): *Self-incompatibility in apricot (Prunus armeniaca): new achievements and molecular aspects of S-locus allele segregation*, «PhD. Thesis University of Bologna».

- 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*, «Scientia Horticulturae», 119, pp. 417-422.
- 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, pp. 57-66.
- IKEDA K., IGIC B., USHIJIMA K., YAMANE H., HAUCK N.R., NAKANO R., SASSA H., IEZZONI A.F., KOHN J.R., TAO R. (2004): *Primary structural features of the S haplotypespecific F-box protein, SFB, in Prunus*, «Sexual Plant Reproduction», 16, pp. 235-243.
- IGIC B., KOHN R. (2001): *Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases*, «Proceedings Natural Academy of Science», 98, pp. 13167-13171.
- 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, pp. 796-799.
- 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, pp. 61-67.
- MINAMIKAWA M., KAKUI H., WANG S., KOTODA N., KIKUCHI S., KOBATA T., SASSA H. (2010): *Apple S locus region represents a large cluster of related, polymorphic and pollen-specific F-box genes*, «Plant Molecular Biology», 74, pp. 143-154.
- OKADA K., TONAKA N., MORIYA Y., NORIOKA N., SAWAMURA Y., MATSUMOTO T., NAKANISHI T., TAKASAKI-YASUDA T. (2008): *Deletion of a 236kb region around S4-RNase in a stylar-part mutant S4^{am}-haplotype of Japanese pear*, «Plant Molecular Biology», 66, pp. 389-400.
- SANZOL J. (2009): *Pistil-function breakdown in a new S-allele of European pear, S21*, confers self-compatibility*, «Plant Cell Reports», 28, pp. 457-467.
- SANZOL J., HERRERO M. (2002): *Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (Pyrus communis L.)*, «Euphytica», 128, pp. 325-331.
- SASSA H., HIRANO H., IKEHASHI H. (1992): *Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese Pear (Pyrus serotina Rehd.)*, «Plant Cell Physiology», 33, pp. 811-814.
- SASSA H., HIRANO H., NISHINO T., KOBATA T. (1997): *Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (Pyrus serotina)*, «Plant Journal», 12, pp. 223-227.
- 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, pp. 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*, «Molecular and General Genetics», 250, pp. 547-557.
- SUTHERLAND B.G., ROBBINS T.P., TOBUTT K.R. (2004): *Primers amplifying a range of Prunus S-alleles*, «Plant Breeding», 123, pp. 582-584.
- TAO R., IEZZONI A.F. (2010): *The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in Prunus exhibits distinct genetic and molecular features*, «Scientia Horticulturae», 124, pp. 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 Physiology», 38, pp. 304-311.
- THOMAS S.G., FRANKLIN-TONG V.E. (2004): *Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen*, «Nature», 429, pp. 305-309.

- 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, pp. 771-781.
- YAMANE H., USHIJIMA K., SASSA H., TAO R. (2003): *The use of the S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, as a molecular marker for S-haplotypes and self-compatibility in Japanese apricot (Prunus mume)*, «Theoretical and Applied Genetics», 107, pp. 1357-1361.
- 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 Physiology», 142, pp. 629-641.
- WU J., GU C., DU Y.H., WU H.Q., LIU W.S., LIU N., LU J., ZHANG S.L. (2011): *Self-compatibility of 'Katy' apricot (Prunus armeniaca L.): is associated with pollen-part mutations*, «Sexual Plant Reproduction», 2011 Mar, 24 (1), pp. 23-35. Epub 2010 Jul 24.
- ZISOVICH A.H., STERN R.A., SAPIR G., SHAFIR S., GOLDWAY M. (2004): *The RHV region of S-RNase in the European pear (Pyrus communis) is not required for the determination of specific pollen rejection*, «Sexual Plant Reproduction», 17, pp. 151-156.
- ZHANG Y., ZHAO Z., XUE Y. (2009): *Roles of Proteolysis in Plant Self-Incompatibility*, «Annual Review of Plant Biology», 60, pp. 21-42.
- ZUCCHERELLI S., TASSINARI P., BROOThaerts W., TARTARINI S., DONDINI L., SANSAVINI S. (2002): *S-allele characterization in self-incompatible pear (Pyrus communis L.)*, «Sexual Plant Reproduction», 15, pp. 153-158.

