

Identificação de alelos S na pereira 'Rocha' e determinação da compatibilidade entre cultivares

Mariana Mota & Cristina M. Oliveira

Secção de Horticultura, Departamento de Produção Agrícola e Animal, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017, Lisboa, Portugal
mariana@isa.utl.pt, crismoniz@isa.utl.pt

Resumo

Em muitas espécies fruteiras, a produção de frutos está dependente da polinização cruzada entre cultivares, devido à existência de um mecanismo determinado geneticamente de auto-incompatibilidade gametofítica. Quase todas as cultivares de pereira com interesse comercial são auto-incompatíveis, sendo também o caso da 'Rocha', o que implica a presença de árvores polinizadores no pomar. A escolha de uma boa polinizadora é assim determinante para o sucesso da produção. A aplicação da análise molecular à identificação dos alelos das S-RNases, que determinam o mecanismo de auto-incompatibilidade, permite a determinação da compatibilidade genética entre cultivares, possibilitando a identificação de cultivares geneticamente incompatíveis e complementa os ensaios de campo necessários à avaliação da simultaneidade de épocas de floração. Com vista à selecção de cultivares polinizadoras totalmente compatíveis com a 'Rocha', procedeu-se à identificação dos alelos S nesta cultivar. Desenhou-se um par de iniciadores que hibrida em regiões muito conservadas de vários alelos S já identificados em *Pyrus communis*. Estes iniciadores foram utilizados para amplificar por PCR sequências parciais dos alelos S da cv. Rocha, tendo-se obtido dois fragmentos. Estes fragmentos foram clonados no vector pCRII através do método TA e totalmente sequenciados. A análise e comparação das sequências obtidas com outras sequências armazenadas nas bases de dados, confirmou a identificação de sequências parciais de alelos S da cv. Rocha. Os mesmos iniciadores foram utilizados em reacções de amplificação similares para avaliar a presença de alelos distintos nas cultivares 'Cem anos', 'Pêra de Água', 'Amêndoa', 'Carapineira', 'Clapp's Rouge' e 'Beurré Precoce Morettini', potenciais polinizadoras da 'Rocha'. O padrão de amplificação obtido para a 'Carapineira' indicia um caso de compatibilidade total, apontando os padrões obtidos para as restantes cultivares para casos de semi-compatibilidade.

Palavras-chave: S-RNase, *Pyrus communis*, incompatibilidade sexual, PCR

Abstract

Title: Identification of S-alleles in 'Rocha' pear and determination of compatibility among cultivars.

Fruit production depends on cross pollination between cultivars, due to the genetically determined mechanism of sexual gametophytic self-incompatibility. Nearly all pear cultivars grown for commercial purpose show this behavior, including the 'Rocha' pear, demanding the presence of pollinator trees in the orchards. The choice of a good pollinator is vital for a successful fruit production.

The use of molecular methods to identify the alleles coding for the S-RNases involved in the self-incompatibility mechanism, contributes to the determination of genetic compatibility between cultivars. The knowledge about these S-alleles enables the identification of cultivars that are genetically incompatible and complements the field trials that are necessary to evaluate simultaneity of flowering periods. With the goal of selecting pollinators totally compatible with the pear cultivar 'Rocha', nucleotide sequences of its S-alleles were identified. One pair of primers hybridizing with strongly conserved regions of different S-alleles already identified in *Pyrus communis* was synthesized. These primers were used in PCR reactions to amplify partial sequences of S-alleles of 'Rocha' and two amplification fragments were obtained. Amplified fragments were cloned into the vector pCRII using TA method and fully sequenced. Sequence comparison with nucleotide sequences stored in databases confirmed the identification of partial sequences of S-alleles from 'Rocha' pear. Same primers were used in PCR reactions to evaluate the presence of different alleles in the pear cultivars 'Cem anos', 'Pêra de Água', 'Amêndoa', 'Carapinheira', 'Clapp's Rouge' and 'Beurré Precoce Morettini', putative pollinators of 'Rocha' cultivar. Amplification pattern observed for the 'Carapinheira' indicates total compatibility, whereas the other profiles suggest semi-compatibility.

Keywords: S-RNase, *Pyrus communis*, sexual incompatibility, PCR

Introdução

A autoincompatibilidade gametofítica é um mecanismo controlado geneticamente que impede a autopolinização e promove a polinização cruzada. Este mecanismo ocorre naturalmente na pereira europeia *Pyrus communis*, tal como em outras espécies da família *Rosaceae*, sendo controlado pelo S-locus, um locus multialélico que codifica glicoproteínas com actividade ribonucleásica (S-RNases). Estas enzimas bloqueiam o crescimento do tubo polínico no estilete, impedindo a polinização. Assim, o planeamento de um pomar de pereiras implica a introdução de cultivares intercompatíveis, por forma a garantir a polinização e níveis de produção razoáveis. A escolha da(s) cultivar(es) polinizadora(s) assume assim grande importância. A compatibilidade entre cultivares foi durante muito tempo exclusivamente determinada de forma empírica, através de ensaios de campo. No entanto, estes trabalhos são muito demorados e por vezes de difícil interpretação, por influência de factores ambientais ou até de parâmetros fisiológicos, que tornam também difícil a distinção entre semi-compatibilidade e compatibilidade total. A identificação molecular dos alelos S de diferentes cultivares de pereira através da reacção em cadeia da polimerase (PCR) contribuiu para minorar estas dificuldades, ao possibilitar a identificação da sequência nucleotídica dos diferentes alelos S de cada cultivar e, consequentemente, a avaliação do genótipo de cada cultivar no que se refere a estes alelos. São já conhecidos vários alelos S de *Pyrus communis* (Zuccherelli *et al.*, 2002; Zisovich *et al.*, 2004). Este trabalho visou identificar os alelos S da cultivar 'Rocha', cultivar de pereira mais importante em Portugal, e compará-los com os alelos S de cultivares de pereira comuns nas nossas condições, potenciais polinizadoras da 'Rocha'. Seleccionaram-se várias cultivares, umas mais adequadas ao início da floração (ex: 'Beurré Precoce Morettini') e outras à fase intermédia desta (ex: 'Carapinheira', 'Clapp's Rouge') (Silva, 2001).

Um par de iniciadores que hibridam em regiões conservadas de alelos S de pereira já identificados foi sintetizado e utilizado na amplificação de sequências parciais de alelos S de 'Rocha', de 'Cem anos', de 'Pêra de Água', de 'Amêndoa', de 'Carapineira', de 'Clapp's Rouge' e de 'Beurré Precoce Morettini'. Os fragmentos obtidos na reacção de amplificação da 'Rocha' foram sequenciados e a sua sequência comparada com sequências de alelos S de pereira armazenados no GenBank para confirmar que se tratava de sequências codificadores de S-RNases.

Material e métodos

Material vegetal: Folhas jovens de pereira cvs. 'Rocha', 'Cem anos', 'Pêra de Água', 'Amêndoa', 'Carapineira', 'Clapp's Rouge' e 'Beurré Precoce Morettini' foram colhidas na Primavera de 2004, congeladas em azoto líquido e mantidas a -80°C.

Extracção de DNA: O DNA genómico foi purificado de folhas jovens pelo método de Doyle & Doyle (1990), utilizando-se 5 ml tampão + 1% β -ME/grama de tecido vegetal e incluindo-se uma digestão com RNase (10 μ g/ml, 30min a 37°C) antes da precipitação com isopropanol. O DNA foi recuperado por centrifugação, lavado em etanol 76% $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 10mM, seco ao ar e dissolvido em TE. O DNA foi quantificado em gel de 1,2% agarose em 1 x TAE (Sambrook *et al.*, 1989) corado com brometo de etídio, por comparação com o standard molecular comercial λ HindIII/EcoRI (Fermentas).

Desenho de iniciadores específicos: Os iniciadores específicos para identificação de sequências parciais de alelos S das cultivares de pereira em estudo foram desenhados com base na análise de sequências nucleotídicas de alelos S de *Pyrus communis* já armazenadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências dos alelos Sh (AY513852), Sj (AF457594), Sk (AY103408), So (AY261994), Sd (AY513853), Sb (AF457595), Si (AF518319), Sp (AY421968), Sn (AY195840), Sm (AY159323), e Sl (AY103409) foram alinhadas utilizando o software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). O iniciador Sall-F (5' TTTACGCAGCAATATCAGC 3') foi desenhado no início do exão 1 destas sequências. O iniciador Sall-R foi desenhado numa zona conservada no exão 2, degenerando-se as posições que não eram totalmente conservadas no alinhamento (5' TTTTGYTTCYBGGTTRTGTAC 3'). Os iniciadores foram sintetizados por Thermo Electron Corporation.

Amplificação de sequências parciais de alelos S de pereira: As reacções de amplificação por PCR foram realizadas num volume total de 25 μ l contendo 100 -150 ng de DNA genómico, 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 mM Tris HCl (pH 8,8 a 25°C), 0,01% Tween-20, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μ M dNTPs, 0,2 μ M de cada um dos iniciadores Sall-F e Sall-R e 0,5 U de *Taq* polimerase (Bioline). A reacção de PCR foi incubada num termociclador Biometra UNO, programado para um passo inicial de desnaturação de 3 min a 94°C, 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 1 min a 52°C e 1 min 30 a 72°C, e um passo final de extensão de 10 min a 72°C. Um controlo negativo (ausência de DNA na reacção de PCR) foi incluído. Os produtos amplificados foram analisados por electroforese em gel de 2% agarose em 1 x TAE (Sambrook *et al.*, 1989) e visualizados sob luz ultravioleta após marcação com brometo de etídio (0,5 μ g/ml).

Clonagem no vector pCRII, amplificação dos fragmentos clonados e sequenciação: Os produtos amplificados foram clonados no vector pCRII (Invitrogen), seguindo as normas do fabricante. O DNA plasmídico foi purificado por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e utilizado em reacções de amplificação com iniciadores específicos para o vector pCRII (M13-48 (rev) 5' AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA 3' e T7SEQ 5' CGTAATACGACTCACTATAGG 3'). As reacções de amplificação de 25 µl incluíram 0,2 µl de DNA plasmídico e foram realizadas nas condições acima descritas, mas com uma temperatura de emparelhamento de 60°C. Os produtos amplificados foram analisados como anteriormente descrito, purificados através do QIAGEN PCR Purification Kit (QIAGEN) e sequenciados automaticamente. As reacções de sequenciação foram conduzidas pela empresa STAB Vida, utilizando iniciadores específicos do vector (T7 fwd e M13 rev). Para cada fragmento, as duas cadeias foram sequenciadas.

Análise das sequências: As sequências obtidas foram processadas com recurso ao software Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e alinhadas recorrendo ao software ClustalW. Análises de homologia foram feitas utilizando o software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Resultados

Amplificação e sequenciação de sequências parciais de alelos S da cultivar 'Rocha': A amplificação por PCR de DNA genómico da cultivar 'Rocha' com os iniciadores Sall-F e Sall-R deu origem a dois fragmentos de DNA, um com aproximadamente 500 bp e o outro ligeiramente superior a 1000 bp, observados após electroforese em gel de agarose, marcação com brometo de etídio e visualização sob luz ultravioleta (Fig. 1). Cada um dos produtos de PCR pode representar um alelo S diferente. Os fragmentos foram clonados e sequenciados, tendo a análise BLAST confirmado tratar-se de sequências parciais dos alelos S desta cultivar. O fragmento menor tem 480 bp e o maior 1133 bp. A comparação da sequência do fragmento menor com as sequências armazenadas nas bases de dados sugere tratar-se de um alelo novo, que apresenta 99% homologia com o alelo Sa, da cultivar 'Doyenne du Comice'. A comparação da sequência do fragmento maior com as sequências armazenadas nas bases de dados aponta para que se trate de uma sequência parcial do alelo Sj, da cultivar 'Spadona' ou do alelo Se, da cultivar 'Max Red Bartlett' (no primeiro caso, há discrepância em um só nucleótido, numa posição degenerada do iniciador Sall-R e, neste último caso, observou-se 100% de homologia).

Amplificação de alelos S de cultivares de pereira potencialmente polinizadoras da 'Rocha': Os fragmentos amplificados por PCR de DNA genómico das cultivares 'Cem anos', 'Pêra de Água', 'Amêndoa', 'Carapineira', 'Clapp's Rouge' e 'Beurré Precoce Morettini', com os iniciadores Sall-F e Sall-R variaram de 500 a 1200 bp. A Fig. 2 mostra o padrão de amplificação observado após electroforese em gel de agarose, marcação com brometo de etídio e visualização sob luz ultravioleta.

Dois fragmentos de tamanho distinto foram detectados para cada genótipo, à excepção das cv. 'Pêra de Água', 'Amêndoa' e 'Carapineira', em que apenas um fragmento é visível no gel. Neste caso, deverá estar-se em presença de dois fragmentos do mesmo tamanho, não separáveis por migração electroforética nestas condições. Nenhuma

cultivar apresenta o padrão de migração da 'Rocha', pelo que todas deverão ser compatíveis (semi- ou totalmente) com esta. A cv. 'Carapineira' apresenta um padrão de amplificação totalmente distinto da 'Rocha', indicando tratar-se de um caso de compatibilidade total. Na 'Pêra de Água', a única banda visível assemelha-se ao fragmento menor da 'Rocha', podendo um dos produtos de PCR presentes nessa banda ser-lhe idêntico. Na 'Amêndoa', observa-se um caso semelhante, mas em relação ao fragmento maior da 'Rocha'. Na 'Clapp's Rouge', 'Beurré Precoce Morettini' e 'Cem anos', obtiveram-se dois fragmentos distintos, migrando um deles de forma idêntica ao fragmento maior da 'Rocha'. O padrão de migração electroforética nestas cultivares ('Pêra de Água', 'Amêndoa', 'Clapp's Rouge', 'Beurré Precoce Morettini' e 'Cem anos'), em que pelo menos um dos fragmentos visíveis migrou de forma semelhante a um dos fragmentos da 'Rocha', podendo tratar-se do mesmo alelo, aponta para que estas cultivares sejam semi-compatíveis com a 'Rocha'.

Discussão

Na maior parte dos pomares de pereiras, o GA₃ é utilizado para aumentar o vingamento, muitas vezes em associação ao paclobutrazol, este último para conferir uma forma adequada ao fruto. No entanto, a utilização destes produtos poderá ser restringida num futuro próximo, tornando muito relevante a utilização de boas polinizadoras, a par dum bom manejo das colmeias. Neste contexto, a selecção de boas cultivares polinizadoras é um factor determinante do sucesso da produção de pêra 'Rocha'. Uma boa polinizadora tem de ter uma época de floração simultânea com a cultivar a polinizar e apresentar compatibilidade genética. Os estudos de campo para avaliar a compatibilidade na polinização são morosos e muito dependentes de factores exógenos, sendo por isso pouco expeditos e fiáveis. Adicionalmente, o vingamento não constitui um índice adequado para analisar a compatibilidade entre cultivares, devido ao efeito de partenocarpia, muito comum nas pereiras (Zuccherelli *et al.*, 2002). O índice de fertilidade (número de sementes/número de flores) é mais útil, mas apresenta a limitação de não distinguir as semi- das totalmente compatíveis (Zuccherelli *et al.*, 2002). Um método que permita avaliar antecipadamente da compatibilidade genética entre cultivares apresenta assim grande interesse, na medida em que permite seleccionar previamente cultivares totalmente compatíveis, do ponto de vista genético, que serão então mais promissoras. Não dispensando os ensaios de campo, a avaliação molecular dos alelos S de cada cultivar torna todo o processo de selecção de uma polinizadora muito mais eficiente, tendo sido já utilizado em diversas fruteiras (Broothaerts *et al.*, 1995, Ishimizu *et al.*, 1999, Yaegaki *et al.*, 2001).

O método utilizado permitiu comparar o genótipo, em termos de alelos S, das diferentes cultivares de pereira. Este método, combinando a PCR com a detecção em gel de agarose, tem a vantagem de permitir uma avaliação rápida dos S-alelos presentes e utilizar apenas uma pequena quantidade de material foliar. No entanto, apresenta a limitação de só permitir identificar claramente as diferenças. A presença de padrões electroforéticos diferentes indica que se trata de alelos distintos. Padrões electroforéticos iguais entre diferentes cultivares não permitem garantir que os alelos são iguais, apenas que apresentam tamanho idêntico ou muito semelhante, sendo necessário clonar e sequenciar os fragmentos para identificar inequivocamente a sequência nucleotídica.

A comparação das sequências identificadas da cultivar 'Rocha' com as sequências armazenadas nas bases de dados permitiu atribuir os produtos de PCR a

alelos S. Nesta medida, é provável que os fragmentos amplificados nas demais cultivares com os mesmos iniciadores também correspondam a sequências de alelos S. No entanto, só a clonagem e sequenciação dos produtos de PCR obtidos poderá confirmar esta informação. O fragmento menor da 'Rocha' deverá corresponder a um alelo novo, posto que, apesar da semelhança com o alelo Sa, há no entanto algumas discrepâncias. Como se sequenciaram as duas cadeias tendo-se obtido sequências totalmente idênticas, será de excluir a hipótese de se tratar de erros de sequenciação. No entanto, não se pode excluir a hipótese de se tratar de erros da polimerase durante a reacção de PCR.

Atendendo à homologia entre o fragmento maior sequenciado da 'Rocha' e os alelos Se/Sj, que já foram considerados o mesmo (Zisovich *et al.*, 2004), as cultivares 'Spadona' e 'Max Red Bartlett' não são totalmente compatíveis com a 'Rocha', não devendo ser seleccionadas como polinizadoras para a 'Rocha' (numa perspectiva de utilização de cultivares totalmente compatíveis), mesmo que apresentassem períodos de floração simultânea nas nossas condições. O padrão de migração idêntico observado para as cultivares 'Clapp's Rouge' e 'Cem anos' sugere que o conteúdo em alelos S possa ser o mesmo nas duas cultivares. Se fôr esse o caso, estas cultivares serão incompatíveis do ponto de vista genético.

Os resultados obtidos apontam para que a 'Carapineira' tenha compatibilidade total com a 'Rocha', o que corrobora a opinião comum de que a 'Carapineira' é uma excelente polinizadora da 'Rocha' (Silva, 2001). No entanto, estes estudos deverão ser complementados com ensaios de fertilização *in vivo*, uma vez que as condições ambientais e até o comportamento das abelhas podem afectar a polinização.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo programa POCTI (BPD14531/2003), FCT, MCES, Portugal.

Referências

- 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.
- Doyle, J.I. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- 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, 968-967.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Silva, A. 2001. Polinização. Livro da Pêra Rocha, ANP, Volume I, Capítulo VII, pp. 137-166.
- Yaegaki, H., Shimada, T., Moriguchi, T., Hayama, H., Haji, T. & Yamaguchi, M. 2001. Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Sex. Plant Reprod.* 13, 251-257.
- Zisovich, A., Stern, R. & Shafir, S. 2004. Identification of seven S-alleles from the European pear (*Pyrus communis*) and the determination of compatibility among cultivars. *J. of Hort. Science & Biotech.* 79, 101-106.

Zuccherelli, S., Tassarini, P., Broothaerts, W., Tartarini, S., Dondini, L. & Sansavini, S. 2002. S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). Sex. Plant Reprod. 15, 153-158.

Quadros e Figuras

1 2 3

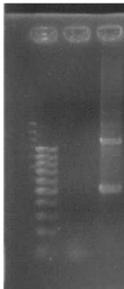


Figura 1. Análise dos produtos de PCR obtidos por amplificação de DNA genómico da cultivar 'Rocha' com os iniciadores Sall-F e Sall-R. Pista 1: produtos da reacção de amplificação da 'Rocha', pista 2: controlo negativo da reacção de PCR (água), pista 3: Marcador molecular 100 bp Ladder (Fermentas).

1 2 3 4 5 6 7 8 9

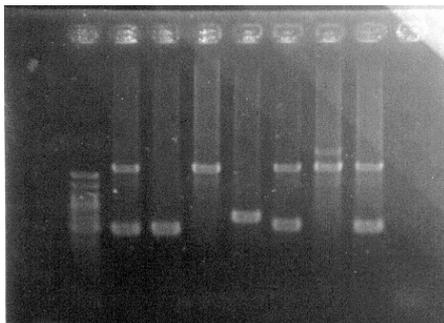


Figura 2. Análise dos produtos de PCR obtidos por amplificação de DNA genómico da cultivar 'Rocha' (pista 2), 'Pêra de Água' (pista 3), 'Amêndoa' (pista 4), 'Carapinheira' (pista 5), 'Clapp's Rouge' (pista 6), 'Beurré Precoce Morettini' (pista 7) e 'Cem anos' (pista 8) com os iniciadores Sall-F e Sall-R. Pista 1: Marcador molecular 100 bp Ladder (Fermentas), pista 9: controlo negativo da reacção de PCR (água).