

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ALELOS-S DE AMEIXEIRA JAPONESA

ÂNDERSON DA ROSA FEIJÓ¹; DANIELA DE CONTI², DAIANE DE PINHO
BENEMANN³, VALMOR JOÃO BIANCHI⁴

¹Bolsista de Iniciação Científica – CNPq - Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, DB-IB-UFPEL-RS - andersonfeijo@hotmail.com

²Doutoranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC - danideconti@yahoo.com.br

³Bióloga, Dra. em Biotecnologia. DB-IB-UFPEL-RS - daiane_bio@yahoo.com.br

⁴Eng. Agr., Dr., Professor Adjunto-DB-IB-UFPEL-RS- valmorjb@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um grande potencial produtivo na área de fruticultura, sendo terceiro maior produtor do mundo, superando em 2011 a marca de 40 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2013). Algumas frutas apresentam maior importância econômica para o Brasil, tanto pelo valor da produção, como a laranja, banana, abacaxi, uva e mamão, quanto pelo volume exportado, no caso de melão, banana, manga e maçã, que em 2010 foram as frutas frescas mais exportadas. Porém outras espécies frutíferas importantes apresentam um déficit de produção, como é o caso da ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.), onde o país ainda possui um volume de produção que não atende a demanda do mercado interno, havendo a necessidade de importação de grandes volumes anuais. No ano de 2010, a ameixa ficou em quarto lugar no ranking de frutas mais importadas, com volume superior a 24 mil toneladas (IBRAF, 2011).

Embora o RS seja um dos principais estados produtores de ameixas, vários fatores contribuem para o baixo desempenho na produção desta fruta, destacando-se o pequeno número de cultivares adaptadas as diferentes condições climáticas, ocorrência de bacterioses como *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* e *Xylella fastidiosa*, bem como a autoincompatibilidade gametofítica. Na grande maioria dos anos as condições climáticas durante o inverno e início da primavera são muito instáveis, não havendo coincidência de floração entre a cultivar produtora e a polinizadora. Considerando que a maioria das cultivares comerciais de ameixeira japonesa são autoincompatíveis (HEGEDÜS; HALÁSZ, 2006), a caracterização molecular dos alelos-S das cultivares que são compatíveis auxiliam significativamente no manejo do pomar para obter boa fecundação e frutificação. A autoincompatibilidade gametofítica é um mecanismo genético determinado por um loco multialélico (alelos-S), onde alelos do mesmo loco controlam a especificidade do pistilo e outros do pólen na reação de autoincompatibilidade (TSUKAMOTO et al. 2008), sendo que em cada genótipo predomina a presença de dois alelos diferentes. Em espécies que apresentam autoincompatibilidade gametofítica a fertilização só ocorre quando pelo menos um dos alelos-S do pólen é diferente dos alelos-S do pistilo, além disso, é necessária a utilização de cultivares polinizadoras compatíveis quanto ao período de floração e que seu o pólen fecunde efetivamente o pistilo da cultivar produtora (DE CONTI, 2012).

A identificação molecular dos alelos-S da ameixeira japonesa torna-se muito importante, pois possibilita melhorar os índices de produtividade, uma vez que permite realizar a escolha adequada de cultivares compatíveis para a implantação do pomar. Somado a isso, a caracterização molecular destes mesmos alelos-S, associada às ferramentas biotecnológicas de transformação genética, possibilita o desenvolvimento

de trabalhos de melhoramento genético visando à obtenção de cultivares autocompatíveis (MOTA, 2010).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular dos alelos-S de 21 cultivares de ameixeira japonesa que apresentam interesse comercial.

2. METODOLOGIA

O material vegetal utilizado para realizar as análises moleculares foram folhas jovens de 21 cultivares de ameixeira japonesa *P. salicina* ('América', 'Pluma 7', 'Reubennel', 'Amarelinha', 'Rosa Mineira', 'Santa Rosa', 'Harry Peikstone', 'Gulf Blaze', 'Gulf Rubi', 'The First', 'Blood Plum', 'Wickson', 'Frontier', 'Estrela Púrpura', 'Santa Rita', 'Methley', 'Friar', 'Seleção A26', 'Planta 16', 'Planta 19' e 'Planta 21'), cuja coleta foi realizada no pomar da Embrapa Clima Temperado – Pelotas-RS. O DNA foi extraído de 150 mg de folhas, conforme descrito por DOYLE e DOYLE (1991). Após, o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% e cada amostra diluída para uma concentração final de 30 ng μL^{-1} .

Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados 30 ng de DNA de cada amostra, 2,5 μL de 10x PCR Buffer, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,4 μM de cada *primer*, 150 mM de cada dNTPs, 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água Milli-Q para um volume final de 25 μL . Os *primers* utilizados nas reações de PCR foram as combinações Pru-C2/Pru-C5 (TAO et al., 1999) e IZ1/IZ4 (SAPIR et al., 2004). A amplificação do DNA foi realizada em aparelho termociclador modelo iCycler (marca BioRad). O perfil térmico utilizado para a PCR foi de uma temperatura inicial de 94°C por 3 min., seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min., 53°C temperatura de anelamento por 1 min., 72°C por 2 min. Com uma temperatura final de 72°C por 5 min.

Após a amplificação dos fragmentos de DNA por PCR, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 1,0 X, a 5 V cm^{-1} . Foi utilizado como marcador de massa molecular o DNA Ladder 100 pb (Ludwig), na sequência o gel permaneceu imerso em solução de brometo de etídeo por 15 min. e a visualização dos fragmentos foi realizada sob luz U.V.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No trabalho foram avaliadas 21 cultivares de ameixeira, sendo que a combinação de *primers* Pru-C2/Pru-C5 foi a que apresentou melhores resultados, com amplificação dos alelos-S em 14 cultivares (Figura 1), sendo que em apenas sete destas ocorreu a amplificação de dois alelos ('Blood Plum', 'Wickson', 'Rosa Mineira', 'Estrela Púrpura', 'Santa Rita', 'Seleção A26' e 'Planta 21'). Com esta combinação de *primers*, os alelos amplificados apresentaram tamanho variando entre 700 a 2.000 pb, e um total de cinco alelos diferentes.

A combinação de *primers* IZ1/IZ4 amplificou os alelos-S somente em três cultivares ('América', 'Gulf Rubi' e 'Santa Rosa'), sendo que em cada uma delas registrou-se a amplificação de apenas um único alelo com tamanho aproximado de 470 pb. Esse resultado se deve ao fato destes *primers* terem sido desenhados para amplificar sequências exclusivas de um alelo-S específico clonado e sequenciado, previamente amplificado com a combinação de *primers* Pru-C2/Pru-C4R (SAPIR et al., 2004), tornando a nova combinação de primers muito mais específica e, conseqüentemente, menos informativa.

Por outro lado, quando se utilizou os *primers* Pru-C2/Pru-C5, em algumas cultivares também não se observou a amplificação de alelos-S. Entretanto, deve-se

levar em consideração que essa falha de amplificação pode estar associada a qualidade do DNA utilizado, ajustes no perfil de amplificação específicos para estas cultivares, ou ainda a necessidade de se desenhar novos *primers* (DONOSO et al., 2009). Embora seja esperado a amplificação de dois alelos em cada cultivar, conforme obtido por DE CONTI (2012), com as combinações de *primers* Pru-C2/Pru-C5 e Pru-C2-PCE-R, é possível que algumas cultivares apresentem os alelos em homozigose e sendo assim, apenas uma banda é observada no gel.

JIE et al., (2005) utilizando a combinação de *primers* Pru-C2/Pru-C5 em cultivares de damasqueiro (*Prunus armeniaca*) obtiveram a amplificação de dois alelos em cada cultivar avaliada, sendo que foram observados nove alelos diferentes nas seis cultivares analisadas com tamanho variando de 300 a 900 pb, demonstrando com isso a existência de uma maior heteroziguidade nesta espécie, em relação a *P. salicina*.

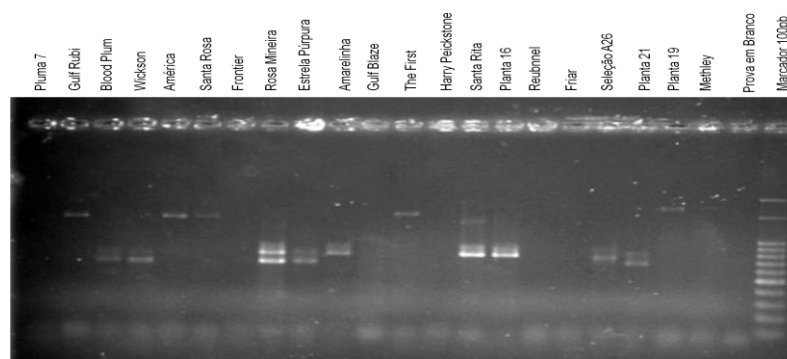


Figura 1. Padrões de amplificação de alelos S obtidos pela combinação de *primers* Pru-C2/Pru-C5 em 21 cultivares de ameixeira.

Tabela 1. Relação de compatibilidade gametofítica entre cultivares de ameixeira, que apresentaram amplificação de alelos-S utilizando os *primers* Pru-C2/Pru-C5.

Cultivar	Gulf Rubi	Blood Plum	Wickson	América	Santa Rosa	Rosa Mineira	Estrela Púrpura	Amarelinha	The First	Santa Rita	Planta 16	Seleção A26	Planta 21	Planta 19
Gulf Rubi	AI	C	C	SC	SC	C	C	C	SC	C	C	C	C	C
Blood Plum		AI	I	C	C	I	I	SC	C	SC	SC	SC	I	C
Wickson			AI	C	C	I	I	SC	C	SC	SC	SC	I	C
América				AI	I	C	C	C	SC	C	SC	C	C	C
Santa Rosa					AI	C	C	C	SC	C	SC	C	C	C
Rosa Mineira						AI	I	SC	C	SC	SC	SC	I	C
Estrela Púrpura							AI	SC	C	SC	SC	SC	I	C
Amarelinha								AI	C	SC	SC	SC	SC	C
The First									AI	C	C	SC	C	C
Santa Rita										AI	SC	SC	SC	C
Planta 16											AI	SC	SC	C
Seleção A26												AI	SC	C
Planta 21													AI	C
Planta 19														AI

AI- autoincompatível; I- incompatível; SC- semicompatível; C-compatível.

Nas cultivares onde se obteve amplificação é possível determinar com eficiência uma relação de plantas que possuem compatibilidade entre si (Tabela 1). As cultivares 'Blood Plum', 'Wickson', 'Rosa Mineira', 'Estrela Púrpura' e 'Planta 21' apresentaram o mesmo padrão de alelos amplificados, com tamanho em torno de 700 e 850 pb, indicando que estas cultivares possuem incompatibilidade total entre si, por possuírem os mesmos alelos. As cultivares em que se detectou apenas um alelo com os *primers* Pru-C2/Pru-C5, a princípio podem ser consideradas como cultivares de autoincompatibilidade parcial com as demais cultivares, até não se caracterizar o segundo alelo. Por outro lado, nas cultivares 'América', 'Gulf Rubi' e

‘Santa Rosa’, que apresentaram um único alelo amplificado com os *primers* IZ1/IZ4, não é possível obter informação quanto a compatibilidade.

4. CONCLUSÕES

A combinação de *primers* Pru-C2/Pru-C5, possibilita uma efetiva caracterização dos alelos-S de nove das 14 cultivares onde se obteve amplificação.

Com caracterização dos alelos-S é possível realizar a escolha mais efetiva das cultivares que apresentam compatibilidade reprodutiva a nível molecular, no sentido de obter melhor fecundação e frutificação das plantas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE CONTI, D. **Caracterização anatômico-fisiológica e molecular da compatibilidade reprodutiva de ameixiras japonesa**. 2012, 66 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

DONOSO, J. M., AROS, D., MENESES, C., INFANTE, R. Identification of S-alleles associated with self-incompatibility in apricots (*Prunus armeniaca* L.) using molecular markers. **Journal of Food Agriculture and Environment**, Finlândia, v.47, p. 270-273, 2009.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochestes, v.1, p.13-15, 1991.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. FAOSTAT. 2013. Acessado em 26/07/2013. Online. Disponível em: <http://www.faostat.fao.org/>.

HEGEDÜS, A.; HALÁSZ, J. Self-incompatibility in plums (*Prunus salicina* Lindl., *Prunus cerasifera* Ehrh. and *Prunus domestica* L.). A minireview. **International Journal of Horticultural Science**, Budapest, v.12, p.137-140, 2006.

IBRAF – **Instituto Brasileiro de Frutas**. 2011. Acessado em 26/07/2013. Online. Disponível em: <http://ibraf.org.br/>.

JIE, Q.; Shupeng, G.; Jixiang, Z.; Manru, G.; Huairui, S. Identification of self-incompatibility genotypes of apricot (*Prunus armeniaca* L.) by S-allele-specific PCR analysis. **Biotechnology Letters**. v.27. n. 16, p. 1205-1209, 2005.

MOTA, M. S. **Caracterização molecular de alelos-S e de locos microssatélites em *Prunus salicina*** (Lindl.). 2008, 48 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2008.

SAPIR G.; STERN, R.A.; EISIKOWITCH, D.; GOLDWAY, M. Cloning of four new Japanese plum S-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Warwick, v.79, n.2, p.223-227, 2004.

TAO, R.; YAMANE, H.; SUGIURA, A. Molecular Typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in Sweet Cherry. **Journal of the American Society for Horticulture Science**, Mount Vermon, v.124, n.3, p.224-233, 1999.

TSUKAMOTO, T.; POTTER, D.; TAO, R.; VIEIRA, C. P.; VIEIRA, J.; IEZZONI, A. F. Genetic and molecular characterization of three novel S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 59, n. 11, pp. 3169–3185, 2008.