

Identificação de alelos S em diferentes cultivares de pereira e avaliação da sua compatibilidade gametofítica com a ‘Rocha’

Mariana Mota, Lucélia Tavares & 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, lucelia.t@sapo.pt, crismoniz@isa.utl.pt

Resumo

Para seleccionar cultivares geneticamente compatíveis com a pereira ‘Rocha’ (*Sa*, *Sj*), procedeu-se à identificação das sequências dos alelos S em cultivares comerciais que têm épocas de floração simultâneas, total ou parcialmente, com a época de floração da pereira ‘Rocha’. As sequências parciais dos alelos S das diferentes cultivares foram amplificadas por PCR com iniciadores específicos destes genes, clonadas e sequenciadas. As pereiras ‘Pêra De Água’ (*S22*, *Sb*), ‘Général Leclerc’ (*Sl*, *Sq*) e ‘Alexandrine Douillard’ (*Sb*, *Sk*) deverão ser totalmente compatíveis. Nas pereiras ‘Amêndoa’, ‘Beurré Precoce Morettini’, ‘Clapp’s Rouge’ e ‘Clapp’s Favourite’, foi identificado o alelo *Sj*, e na ‘Beurré Clairgeau’ o *Sa*, devendo estas cultivares ser semi-compatíveis. As pereiras ‘Carapinheira’ (*Sb*) e ‘Pérola’ (*Sk*) apresentam um alelo distinto dos da ‘Rocha’ e um padrão de amplificação totalmente distinto, sugerindo compatibilidade total. Nas pereiras ‘Passe Crassane’ (*Sr*) e ‘Beurré D’Avril’ (*S4*), identificou-se um alelo distinto dos presentes na ‘Rocha’, indicando compatibilidade, mas não se pôde distinguir entre compatibilidade total e parcial, uma vez que o padrão de amplificação não exclui que o alelo desconhecido possa ser o *Sa* da ‘Rocha’.

Palavras-chave: S-RNase, *Pyrus communis*, polinização cruzada, PCR, incompatibilidade gametofítica.

Abstract

Identification of S alleles of different pear cultivars of the “Oeste” region and evaluation of their gametophytic compatibility with ‘Rocha’ pear. In order to select pear cultivar which are genetically compatible with ‘Rocha’ (*Sa*, *Sj*), the identification of S alleles sequences of commercial cultivars with bloom periods overlapping (partially or totally) the bloom period of ‘Rocha’ was performed. Partial sequences of the S alleles from the different cultivars were amplified with specific primers, cloned and sequenced. ‘Pêra De Água’ (*S22*, *Sb*) ‘Général Leclerc’ (*Sl*, *Sq*) and ‘Alexandrine Douillard’ (*Sb*, *Sk*) should be totally compatible. It was identified a *Sj* allele in the cultivars ‘Amêndoa’, ‘Beurré Precoce Morettini’, ‘Clapp’s Rouge’ e ‘Clapp’s Favourite’ and an allele *Sa* in ‘Beurré Clairgeau’, indicating that these cultivars are semi-compatible with ‘Rocha’. ‘Carapinheira’ (*Sb*) and ‘Pérola’ (*Sk*) carry a different allele from the ones of ‘Rocha’ and an amplification pattern completely dissimilar suggesting full compatibility. In ‘Passe Crassane’ (*Sr*) and ‘Beurré D’Avril’ (*S4*), a different allele from the S alleles of ‘Rocha’ was identified indicating compatibility, but total or partial compatibility remained unclear, since the amplification pattern does not exclude that the unknown allele might be *Sa* from ‘Rocha’.

Keywords: S-RNase, *Pyrus communis*, cross polination, PCR, gametophytic self-incompatibility.

Introdução

A pereira ‘Rocha’ é uma das dez mais importantes cultivares de pereira comercializadas em todo o mundo, contribuindo com cerca de 97 % da produção nacional de peras. Os pomares de pêra ‘Rocha’ ocupam actualmente mais de 11 000 ha em Portugal, concentrando-se 91 % desta área na região Oeste (ANP, 2003). Na pereira ‘Rocha’, tal como em muitas fruteiras, a produção de frutos de qualidade está dependente da polinização cruzada, devido à existência de um mecanismo determinado geneticamente de auto-incompatibilidade gametofítica. A expressão deste mecanismo impede o desenvolvimento do tubo polínico dos grãos de pólen de genótipo idêntico ao presente nos gametófitos femininos e torna necessária a presença de árvores polinizadoras geneticamente compatíveis no pomar.

Nos anos mais recentes, o grande interesse comercial dos frutos desta cultivar de pereira e a possibilidade de escoamento de grandes produções conduziram ao estabelecimento de pomares monovarietais, fazendo uso da capacidade partenocárpica da pereira ‘Rocha’, que se intensificou pela aplicação de hormonas de síntese. Esta opção tem conduzido à formação regular de frutos na ausência de cultivares polinizadoras, contornando os inconvenientes ao nível económico e de manejo do pomar inerentes à utilização de várias cultivares, mas as crescentes preocupações com a eventual perda de qualidade resultante da aplicação destes produtos evidenciam a limitação desta opção e a importância da escolha de boas polinizadoras, geneticamente compatíveis, com épocas de floração coincidentes, exigências edafoclimáticas e manejos semelhantes e, tanto quanto possível, com produção de frutos comercialmente interessantes.

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 condições fisiológicas que tornam difícil a distinção entre semi-compatibilidade (só 50 % dos grãos de pólen se desenvolvem) e compatibilidade total (100 % dos grãos de pólen podem germinar). Um método que permita avaliar antecipadamente a compatibilidade genética entre as diferentes cultivares de pereira apresenta assim grande interesse, na medida em que permite seleccionar previamente cultivares totalmente compatíveis, do ponto de vista genético, que serão mais promissoras.

Não dispensando os ensaios de campo, a avaliação molecular dos alelos S, codificadores das S-RNases que determinam o mecanismo de auto-incompatibilidade, torna todo o processo de escolha de uma polinizadora muito mais eficiente, tendo sido já utilizada em diversas fruteiras (Broothaerts et al., 1995; Ishimizu et al., 1999; Yaegaki et al., 2001). Metodologias envolvendo a reacção em cadeia da polimerase (PCR) permitem a identificação de forma expedita do conteúdo em alelos S de cada cultivar e foram já utilizadas para identificar alelos S de várias cultivares europeias de *Pyrus communis* (Zuccherelli et al., 2002; Zisovich et al., 2004) e, também, sequências parciais dos alelos da pereira ‘Rocha’ (Mota & Oliveira, 2005), que permitiram a atribuição do genótipo *Sa*, *Sj* a esta cultivar.

Este trabalho visou identificar os alelos S de diferentes cultivares de pereira já utilizadas na “região Oeste” e definir potenciais polinizadoras geneticamente compatíveis com a pereira ‘Rocha’. Foram analisadas as cultivares comerciais de pereira que têm épocas de floração simultâneas, total ou parcialmente, com a época de floração da pereira ‘Rocha’. Sequências parciais de alelos S destas cultivares foram amplificadas, com o par de iniciadores que havia sido utilizado na identificação de

alelos S da pereira ‘Rocha’ (Mota & Oliveira, 2005), clonadas e sequenciadas e o conteúdo em alelos S deduzido por homologia com sequências já armazenadas no GenBank.

Material e Métodos

Material vegetal: Folhas jovens das pereiras ‘Pêra De Água’, ‘Général Leclerc’, ‘Amêndoa’, ‘Beurré Precoce Morettini’, ‘Clapp’s Rouge’, ‘Clapp’s Favourite’, ‘Beurré Clairgeau’, ‘Carapinheira’, ‘Pérola’, ‘Alexandrine Douillard’, ‘Passe Crassane’ e ‘Beurré D’Avril’ foram colhidas nas Primaveras de 2004 e 2006 nos pomares experimentais da Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade e do Instituto Superior de Agronomia, 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, 30 min a 37 °C) antes da precipitação com isopropanol. O DNA foi recuperado por centrifugação, lavado em etanol 76 % $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 10 mM, seco ao ar e dissolvido em TE. O DNA foi quantificado em gel de 1,2 % agarose em $1 \times \text{TAE}$ (Sambrook et al., 1989), corado com brometo de etídio, por comparação com o standard molecular comercial λ *HindIII/EcoRI* (Fermentas).

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 (Mota & Oliveira, 2005) 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 s a 94 °C, 60 s a 52 °C e 90 s a 72 °C e um passo final de 10 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2 % em $1 \times \text{TAE}$ (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 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 μ l incluíram 0,2 μ l de DNA plasmídico e foram realizadas nas condições acima descritas, mas com uma temperatura de emparelhamento de 58 °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 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Análises de homologia foram feitas utilizando o software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Resultados e Discussão

Sequências parciais de alelos S das pereiras ‘Pêra de Água’, ‘Général Leclerc’, ‘Amêndoa’, ‘Beurré Precoce Morettini’, ‘Clapp’s Rouge’, ‘Clapp’s Favourite’, ‘Beurré Clairgeau’, ‘Carapinheira’, ‘Pérola’, ‘Alexandrine Douillard’, ‘Passe Crassane’ e ‘Beurré D’Avril’ foram amplificadas a partir de DNA genómico por PCR com iniciadores específicos e separadas por electroforese em gel de agarose. Dois produtos foram visualizados nos casos das pereiras ‘Général Leclerc’, ‘Beurré Precoce Morettini’, ‘Clapp’s Rouge’, ‘Clapp’s Favourite’ e ‘Alexandrine Douillard’, tendo sido uma única banda visualizada nos casos das pereiras ‘Carapinheira’, ‘Pêra De Água’, ‘Amêndoa’, ‘Pérola’, ‘Passe Crassane’, ‘Beurré Clairgeau’ e ‘Beurré D’Avril’. O tamanho dos produtos variou entre 480 e 1550 bp (Quadro 1). Os produtos amplificados foram clonados e sequenciados e as sequências obtidas foram analisadas recorrendo ao software BLAST, em busca de homologias com sequências já armazenadas na base de dados. O tamanho dos fragmentos visualizados em gel de agarose e os genótipos deduzidos encontram-se no Quadro 1.

Os S-genótipos deduzidos para cada uma das cultivares de pereira permitem seleccionar polinizadoras geneticamente compatíveis com a pereira ‘Rocha’. As pereiras ‘Pêra De Água’ (*S22, Sb*), ‘Général Leclerc’ (*Sl, Sq*) e ‘Alexandrine Douillard’ (*Sb, Sk*) deverão ser totalmente compatíveis. Nas pereiras ‘Amêndoa’, ‘Beurré Precoce Morettini’, ‘Clapp’s Rouge’ e ‘Clapp’s Favourite’, foi identificado o alelo *Sj* e na ‘Beurré Clairgeau’ o alelo *Sa*, devendo estas pereiras ser apenas semi-compatíveis. Em relação às pereiras ‘Beurré Precoce Morettini’, ‘Clapp’s Favourite’ e ‘Clapp’s Rouge’ a semi-compatibilidade está bem evidenciada, pois foram identificados os dois alelos e o outro é diferente dos da pereira ‘Rocha’. No caso das pereiras ‘Amêndoa’ e ‘Beurré Clairgeau’, em que um só alelo foi identificado, coincidente com um dos alelos presentes na pereira ‘Rocha’, a atribuição da semi-compatibilidade (e não de incompatibilidade) é feita com base na ausência de banda correspondente ao outro fragmento da pereira ‘Rocha’, ou seja, com base na observação de um padrão de amplificação diferente. As pereiras ‘Carapinheira’ (*Sb*) e ‘Pérola’ (*Sk*) apresentam um alelo distinto dos da pereira ‘Rocha’ e um padrão de amplificação totalmente distinto, sugerindo compatibilidade total. Nas pereiras ‘Passe Crassane’ (*Sr*) e ‘Beurré D’Avril’ (*S4*), identificou-se um alelo distinto dos presentes na pereira ‘Rocha’, indicando compatibilidade, mas estes resultados não permitem distinguir entre compatibilidade total e parcial, uma vez que o padrão de amplificação não exclui que o alelo desconhecido possa ser o *Sa* da pereira ‘Rocha’. No entanto, no caso da pereira ‘Passe Crassane’, é já conhecido que o outro alelo é efectivamente o *Sa* (Zuccherelli et al., 2002), permitindo concluir que se trata de um caso de semi-compatibilidade.

Os resultados obtidos na sequenciação dos alelos S realçam a necessidade de precaução aquando da interpretação de padrões de migração electroforética semelhantes, ao mostrar que sequências nucleotídicas completamente distintas podem corresponder a fragmentos que migram de forma semelhante. Adicionalmente, nos casos em que apenas um fragmento é visível no gel, poderá estar-se em presença de dois fragmentos de tamanho semelhante, não separáveis por migração electroforética nestas condições. No caso da pereira ‘Pêra De Água’, apesar de um só fragmento ser visível em gel de agarose, verificou-se a identificação de dois alelos diferentes. Este resultado corrobora o padrão observado em gel desnaturante de poliacrilamida corado com nitrato de prata, de maior resolução, onde duas bandas distintas eram visíveis (dados não apresentados).

As produções obtidas em ensaios de campo têm evidenciado que cultivares de

pereira totalmente compatíveis não são obrigatoriamente melhores polinizadoras que outras semi-compatíveis (Zuccherelli et al., 2002). Assim, a escolha da(s) polinizador(as) deverá garantir a existência de compatibilidade genética, podendo esta ser parcial ou total. Na “região Oeste” têm sido consideradas polinizadoras interessantes para a pereira ‘Rocha’, as pereiras ‘Beurré Precoce Morettini’, ‘Alexandrine Douillard’ e ‘Coscia’, para cobrir o início da floração, as pereiras ‘Carapinheira’, ‘Beurré Clairgeau’, ‘Clapp’s Favourite’ e ‘Passe Crassane’, para uma fase intermédia da floração, e as pereiras ‘Doyenné Du Comice’, ‘Général Leclerc’, ‘Beurré Hardy’ e ‘Williams’, para a fase final da floração. Os resultados aqui apresentados e outros anteriormente publicados (Zuccherelli et al., 2002, Zisovich et al., 2004) permitem enquadrar estas cultivares de pereira em termos de conteúdo em alelos S e definir o grau de compatibilidade genética entre elas (Quadro 2).

Resultados recentemente obtidos permitem-nos sugerir que a pereira ‘Williams’ é uma cultivar semi-compatível com a ‘Rocha’ e a ‘Tosca’, uma outra cultivar potencialmente interessante e totalmente compatível com a ‘Rocha’. Se a primeira não deverá ser recomendada por se tratar de uma cultivar com elevadas necessidades em frio e floração bastante tardia (Silva, 2001), a pereira ‘Tosca’ poderá ser uma boa candidata pois não só apresenta uma floração coincidente com a da ‘Coscia’, cobrindo a primeira fase da floração da ‘Rocha’, como apresenta excelentes características tanto ao nível da árvore como do fruto (Rivalta et al., 1993).

Num contexto de compatibilidade genética, a escolha da cultivar de pereira a utilizar como polinizadora deverá obedecer a critérios de índole agronómica, como sejam a adaptação edafoclimática, a época de floração, a sensibilidade ao fogo bacteriano, as necessidades em frio, o abortamento floral e alternância na floração e ao interesse comercial dos frutos produzidos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo programa POCTI (BPD14531/2003), FCT, MCES, Portugal. Agradece-se ao Eng. Rui de Sousa (ENFVN/INIAP) pela disponibilização de material vegetal.

Referências

- ANP, 2003. <http://www.perarocha.pt/public/>
- 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.
- Mota, M. & Oliveira C.M. 2005. Identificação de alelos S na pereira ‘Rocha’ e determinação da compatibilidade entre cultivares. *Actas Port. Hort.* 6: 232-238.
- Rivalta, L., Bagnara, G.L. & Laghi, M. 1993. Tosca. *Rivista di Frutticoltura*, 5: 101.
- 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. *In* J. Soares, A. Silva & J. Alexandre, *O Livro da Pêra Rocha*, Volume Primeiro, pp. 137-166. Associação Nacional de Produtores de Pêra Rocha. Cadaval.

- 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. 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

Quadro 1 – Tamanho dos fragmentos e S-genótipo deduzido das cultivares de pereira analisadas (Sa, Sb, Sd, Se, Sk, Sl e Sr identificados em *Pyrus communis*, S4 identificado em *Pyrus pyrifolia*, S22 identificado em *Pyrus bretschneideri*)

<i>Pyrus communis</i> L.	Tamanho do fragmento do S-PCR (bp)*	S-genótipo deduzido por análise BLAST das sequências identificadas (tamanho do fragmento)
‘Alexandrine Douillard’	580/1400	Sb (575) / Sk (1409)
‘Amêndoa’	1100/-	Se=Sj (1024)**
‘Beurré D’Avril’	500/-	S4 (502)
‘Beurré Clairgeau’	480/-	Sa (480)
‘Beurré Precoce Morettini’	1100/1400	Se=Sj (1133)** / Sk (1408)
‘Carapinheira’	580/-	Sb (575)
‘Clapp’s Favourite’	500/1100	Sd (504) / Se=Sj (1134)
‘Clapp’s Rouge’	500/1100	Sd (504) / Se=Sj (1133)
‘Général Leclerc’	1500/1300	Sl (1547) / Sq (1418)
‘Passe Crassane’	500/-	Sr (488)
‘Pêra De Água’	480/-	S22 (480) / Sb (575)
‘Pérola’	1400	Sk (1409)

* tamanho estimado por electroforese em gel de agarose

** Sj e Se correspondem ao mesmo alelo

Quadro 2 – Compatibilidade dos alelos S entre cultivares de pereira

Cultivares/ Alelos			AD	Ag	Am	BA	BC	BH	BP M	Car	CF	Cos	CR	DC	GL	PC	Per	Roc	
			Sb Sk	S22 Sb	Sj	S4	Sa	Sc	Sj	Sb	Sd	Sb	Sd	Sa	Sl	Sa	Sk	Sa	Sk
AD	Sb	Sk	I	SC	NI	NI	NI	C	SC	NC	C	I	C	SC	C	C	NC	C	
Ag	S22	Sb		I	NI	NI	NI	C	C	NC	C	SC	C	SC	C	C	NI	C	
Am	Sj				I	?	?	NI	NC	?	NC	NI	NC	NI	NI	NI	?	NC	
BA	S4						I	?	NI	NI	?	NI	NI	NI	NI	NI	?	NI	
BC	Sa							I	NI	NI	?	NI	NI	NI	NI	NI	?	NI	
BH	Sc	Sd							I	C	NI	SC	C	SC	C	C	NI	C	
BPM	Sj	Sk								I	NI	SC	SC	SC	C	C	NC	SC	
Car	Sb										I	NI	NC	NI	NC	NI	?	NI	
CF	Sd	Sj										I	C	I	C	C	NI	SC	
Cos	Sb	Sk											I	C	SC	C	C	NC	C
CR	Sd	Sj												I	C	C	C	NI	SC
DC	Sa	Sb													I	C	SC	NI	SC
GL	Sl	Sq														I	C	NI	C
PC	Sa	Sr															I	NI	SC
Per	Sk																	I	NI
Roc	Sa	Sj																	I

AD - 'Alexandrine Douillard'; Ag - 'Pêra De Água'; Am - 'Amêndoa'; BA - 'Beurré D'Avril'; BC - 'Beurré Clairgeau'; BH - 'Beurré Hardy'; BPM - 'Beurré Precoce Morettini'; Car - 'Carapinheira'; CF - 'Clapp's Favourite'; Cos - 'Coscia'; CR - 'Clapp's Rouge'; DC - 'Doyenné Du Comice'; GL - 'Général Leclerc'; PC - 'Passe Crassane'; Per - 'Pérola'; Roc - 'Rocha'; C - Totalmente compatível; SC - Semi-compatível; I - Totalmente incompatível; NI - Não totalmente incompatível (totalmente compatível ou semi-compatível); NC - Não totalmente compatível (totalmente incompatível ou semi-compatível); ? - Resultados não permitem tirar conclusão