

MONALIZE SALETE MOTA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ALELOS-S E DE LOCOS
MICROSSATÉLITES EM *Prunus salicina* (Lindl.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fisiologia Vegetal).

Orientador: Dr. Valmor João Bianchi

Co-Orientador: Dr. José Antonio Peters

Co-Orientador: Dra. Eugênia Jacira Bolacel Braga

Pelotas, 2008

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M917c

Mota, Monalize Salete

Caracterização molecular de alelos-S e de locos
microssatélites em *Prunus salicina* (Lindl.) / Monalize Salete
Mota - Pelotas, 2008.

48-f.: il.

Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de
Pelotas. - Pelotas, 2008, Valmor João Bianchi , Orientador.

1.Ameixeira japonesa. 2. Marcadores moleculares.
3.Sequências simples repetidas - SSR 4. Auto-Incompatibilidade
I. Bianchi, Valmor (orientador) II. Título.

CDD 634.22

Banca examinadora:

Dr. Valmor João Bianchi

Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha

Dra. Fabiana Roos Nora

*Aos meus pais, Manoel (in memoriam) e
Fiorença, pelo carinho, amor, incentivo e
exemplo de vida;
A Itamir, pelo carinho e amizade;
Aos que, em meu Caminho, me permitem
Crescimento;*

DEDICO.

*"Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há aquelas
que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol." (Pablo Picasso)*

AGRADECIMENTOS

A Deus! Por ser minha Fonte cristalina e Luz irradiante, através das quais me mostrou em Real Valor!

Não temas o caminho. Onde o bem permanece "Deus está". Trabalhe e serve sempre; Deus te inspira e resguarda. Não receies perigos; Deus te garante a paz. Sangram-te os pés na marcha; Deus te trará descanso. Companheiros se foram; Deus jamais te abandona. Por nada te amedrontes; segue e confia em Deus.

(Emmanuel)

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Valmor João Bianchi, pela orientação, apoio, oportunidades de crescimento acadêmico/científico, amizade e conhecimentos transmitidos durante este período de convivência, os quais foram fundamentais para a minha formação.

Aos co-orientadores, Prof. Dr. José Antônio Peters e Prof^a. Dr^a Eugênia Jacira Bolacel Braga, pela orientação, valiosos ensinamentos, carinho e amizade dedicados e todas as oportunidades, a mim dadas, durante este período de estudos e convívio.

Aos meus familiares que sempre me incentivaram, que conhecem as adversidades que a vida me impôs para subir este 'degrau' e, sabem da importância desta conquista.

A Samuel, ‘grande pesquisador’; pelo carinho, amor, amizade e compreensão infinitos e, pelas palavras certas, nos momentos certos e incertos.

A todos os meus Amigos, os quais sabem do Valor da amizade em minha vida.

Aos amigos do laboratório de Caracterização Molecular, pela amizade, carinho, apoio e auxílio nos momentos de real necessidade, especialmente a Alexandre, Luciane e Márcia.

As amigas, Alexandra, Ângela, Letícia, Rosângela e Simone, pela amizade, carinho, incentivo e companheirismo demonstrado em todos os momentos partilhados.

A todos os amigos do LCTP/UFPel, pelo companheirismo e amizade demonstrado durante os meus estudos.

A todos os demais professores, aos funcionários e alunos do Departamento de Botânica e do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela acolhida durante este período, especialmente a Suzi Braga, que muito bem acolhe a todos os alunos e da melhor forma resolve todas as questões que surgem.

A EMBRAPA e ao Viveiro Frutiplan/Pelotas, pela receptividade e doação do material vegetal, bem como pelas fundamentais orientações fornecidas pela pesquisadora da EMBRAPA, Dr. Maria do Carmo Bassols Raseira.

A todos os que de alguma forma, direta ou indireta, colaboraram para a conclusão deste trabalho e para meu Crescimento.

“Muitas das coisas mais importantes do mundo foram conseguidas por pessoas que continuaram tentando quando parecia não haver mais nenhuma esperança de sucesso.”

Dale Carnegie

SUMÁRIO

MOTA, Monalize Salete. **Caracterização molecular de alelos-S e de locos microssatélites em *Prunus salicina* (Lindl.)**. 2008. 48f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A cultura de ameixeira tem papel de destaque na fruticultura mundial. No Brasil, o Estado do Rio Grande do Sul se destaca como maior produtor. Porém, mesmo apresentando elevado potencial de cultivo, alguns fatores têm limitado o aumento da produção, entre eles: a) a variabilidade de clima; b) o uso de porto-enxertos inadequados; c) a incapacidade de autopolinização da maioria das cultivares d) e a idoneidade genética do material vegetal. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar alelos-S relacionados à auto-incompatibilidade gametofítica em *Prunus salicina* (Lindl.) e caracterizar molecularmente as cultivares por meio de locos microssatélites. Para tal fim foram analisadas 11 cultivares de ameixeira japonesa [Santa Rosa, Santa Rita, Reubennel, Pluma 7, América, Rosa Mineira, Amarelinha, The First, Gulfblaze (Clone São Paulo), Gulfblaze (Clone Guaíba) e Harry Pickstone], por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com três pares de *primers* específicos para amplificação de alelos-S e *primers* para cinco locos de microssatélites. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas – Caracterização Molecular, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas. Na amplificação de alelos-S, constatou-se que as concentrações e condições de PCR utilizadas, bem como às

combinações de *primers*, permitiram a efetiva caracterização de alelos-S nas cultivares de *P. salicina* estudadas, bem como, a escolha das polinizadoras mais compatíveis com as cultivares produtoras. O seqüenciamento de alguns dos alelos-S amplificados revelou elevada similaridade com seqüências de nucleotídeos já identificados em outros trabalhos com *Prunus* spp.. Na análise de cinco locos de microssatélites obteve-se um total de 30 polimorfismos possibilitando uma clara identificação dos genótipos de ameixeira japonesa, esclarecendo caso de homonímia entre as cultivares Gulfblaze (Clone São Paulo) e Gulfblaze (Clone Guaíba), no entanto, os polimorfismos não foram suficientes para obter uma boa estimativa da variabilidade genética e análise de agrupamento dos genótipos de ameixeira japonesa avaliados.

Palavras-chave: Ameixeira Japonesa, Marcadores Moleculares, Seqüências Simples Repetidas-SSR, Auto-Incompatibilidade.

SUMMARY

MOTA, Monalize Salete. **Molecular characterization of alleles-S and of microsatellite locus in *Prunus salicina* (Lindl.)**. 2008. 48f. Dissertation (Master of Science) - Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The production of plum is an important commodity around the world. In Brazil, the state of Rio Grande do Sul is the major producer. However, despite the great potential for cultivation, some factors are limiting for increasing the production, such as: a) climate variability; b) use of inadequate stocks; c) pollination of most cultivar is self-incompatible d) doubtful genetic history of the plant material. Considering these problems, the aim of this work was to identify allele-S related to gametophytic self-incompatibility in *Prunus salicina* (Lindl.) and to perform the molecular characterization of cultivars by means of microsatellites locus. For these purposes eleven cultivars of Japanese plum [Santa Rosa, Santa Rita, Reubennel, Pluma 7, América, Rosa Mineira, Amarelinha, The First, Gulfblaze (Clone São Paulo), Gulfblaze (Clone Guaíba) e Harry Pickstone] were analysed by Polymerase Chain Reaction (PCR) using three pairs of primers specific for amplifying the alleles-S and primers for five microsatellite locus. The experiments were performed in the Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas – Caracterização Molecular, of the Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas. In the amplification of alleles-S was observed that the reaction mix for PCR, the PCR conditions, and primers combination, allowed an effective characterization of alleles-S in the cultivars of *P. salicina* and the identification of pollinators more compatible to commercial cultivars. Sequencing analysis of some amplified alleles-S revealed high similarity to

sequences of nucleotides already identified in other studies with *Prunus spp.* In the analysis of five microsatellite locus thirty polymorphisms were obtained allowing a clear identification of Japanese plum genotypes, elucidating the homonymy between the cultivars Gulfblaze (Clone São Paulo) and Gulfblaze (Clone Guaíba). However, the polymorphisms were not sufficient for obtaining a reasonable estimation of the genetic variability and grouping analysis of the Japanese plums evaluated.

Keywords: Japanese Plum, Molecular Markers, Simple Sequences Repeats-SSR, Self-Incompatibility

Lista de Ilustrações

Figura 1 -	Padrões de amplificação de alelos-S obtidos com os <i>primers</i> Pru-C ₂ /Pru-C ₅ e Pru-C ₂ /PCE-R em 11 cultivares de ameixeira japonesa.....	19
Figura 2 -	Padrões de amplificação de alelos-S obtidos com os <i>primers</i> IZ ₁ /IZ ₄ em 11 cultivares de ameixeira japonesa.....	19
Figura 3 -	Representação esquemática das regiões conservadas para alelos-S em Rosáceas, C1, C2, C3, C4 e C5 conforme Beppu (2002). Localização dos <i>primers</i> utilizados em análise de PCR, Pru-C ₂ , PCE-R e Pru-C ₅ e, uma região hipervariável (RHV).....	22
Figura 4	Perfis eletroforéticos gerados por cinco locos SSR em 11 genótipos de ameixeira japonesa.....	31
Figura 5	Dendrograma de similaridade genética de 11 cultivares de <i>P. salicina</i> , gerado pelo método UPGMA, baseado na análise de marcadores cinco locos SSR. Similaridade Genética Média (SGM) = 0,6.	35

Lista de tabelas

Tabela 1	Genótipos de ameixeira japonesa utilizados na análise de variabilidade de locos SSR e de alelos-S	13
Tabela 2	Combinação de <i>primers</i> usados na amplificação de alelos-S, com suas respectivas seqüências de nucleotídeos e temperatura de anelamento	14
Tabela 3	Cultivares, <i>primers</i> usados na amplificação e tamanho dos alelos-S purificados e submetidos ao seqüenciamento	15
Tabela 4	Seqüências de oligonucleotídeos e respectivas temperaturas de anelamento ($T^{\circ}A$) de <i>primers</i> para locos de microssatélites desenvolvidos de biblioteca de DNA de <i>Prunus persica</i> (CIPRIANI, 1999)	17
Tabela 5	Combinação de <i>primers</i> e tamanho aproximado (em pares de bases) dos alelos-S amplificados em cultivares de ameixeira japonesa	21
Tabela 6	Relação das cultivares de ameixeira japonesa utilizadas em análises de PCR e suas respectivas polinizadoras	23
Tabela 7	Relação de compatibilidade gametofítica entre cultivares de ameixeira japonesa baseada nos alelos-S do loco Pru-C ₂ /Pru-C ₅ , amplificados por PCR	24
Tabela 8	Relação de compatibilidade entre cultivares de ameixeira, baseada nos alelos-S do loco Pru-C ₂ /PCE-R, amplificados por PCR	24
Tabela 9	Relação de cultivares de ameixeira japonesa e suas polinizadoras estabelecidas a partir das análises de compatibilidade dos alelos-S amplificados	25

Tabela 10	Comparação entre as seqüências dos alelos-S, de <i>Prunus salicina</i> , obtidas por meio de seqüenciamento, com as seqüências depositadas no banco de dados de nucleotídeos no BLAST do NCBI	28
Tabela 11	Freqüência alélica de locos SSR, registrados em 11 genótipos de ameixeira japonesa	31
Tabela 12	Similaridade genética de 11 genótipos de ameixeira japonesa, estimada pelo Coeficiente <i>Simple Matching</i> , a partir de marcadores de SSR	32

Índice

SUMÁRIO	vi
SUMMARY	viii
Lista de ilustrações	x
Lista de tabelas	xi
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 Importância da cultura da Ameixeira	04
2.2 Auto-incompatibilidade gametofítica.....	06
2.3 Marcadores Moleculares	09
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Material Vegetal	13
3.2 Extração de DNA	14
 3.3 Identificação de alelos-S de incompatibilidade em ameixeira japonesa – Experimento 1	14
3.3.1 Detecção de polimorfismo e caracterização dos alelos-S por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	14
3.3.2 Seqüenciamento dos fragmentos de DNA produzidos por PCR	15
3.3.3 Análise <i>in silico</i> das seqüências de nucleotídeos.....	16
 3.4 Diferenciação genético-molecular de genótipos de ameixeira japonesa pela análise de locos microssatélites (SSR) – Experimento 2	16
3.4.1 Análise de locos microssatélite (SSR)	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18

4.1 EXPERIMENTO 1 - Identificação de alelos-S de incompatibilidade em ameixeira japonesa	18
4.1.1 Amplificação de alelos-S	18
4.1.2 Compatibilidade entre cultivares e suas polinizadoras	22
4.1.3 Análise de seqüenciamento de alelos amplificados	26
4.2 EXPERIMENTO 2 - Diferenciação genético-molecular de genótipos de ameixeira japonesa pela análise de locos microssatélites (SSR)	30
4.2.1 – Amplificação dos locos SSR	30
4.2.2 – Análise genética dos locos SSR	32
5 CONCLUSÕES	36
6 REFERÊNCIAS	37
Apêndices	44
Anexos	46

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, depois da China e da Índia, sendo que em 2007, exportou 918 mil toneladas, representando 14% a mais que em 2006. Para 2008, a estimativa é de crescer 10%. Se concretizado, o percentual resultará em marca recorde de exportação de 1 milhão de toneladas de frutas (IBRAF, 2008). Por seu potencial de geração de emprego e de renda, a fruticultura ocupa hoje posição estratégica na expansão do agronegócio brasileiro. A base agrícola da cadeia produtiva abrange cerca de 2,3 milhões de hectares e gera 5,6 milhões de empregos, ou seja, 27% do total da mão-de-obra agrícola ocupada no País (PORTOCARRERO, 2005).

Dentre as espécies de clima temperado exploradas no Brasil, a ameixeira tem sido uma das frutíferas de maior difusão nos últimos anos, graças, principalmente, ao plantio de variedades introduzidas e selecionadas. No Brasil, é cultivada em diversos estados, principalmente no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, devido às condições climáticas favoráveis (SEGANFREDO, 1995) e também, pela diversidade de cultivares adaptadas aos microclimas dessas regiões. Entretanto, a produção brasileira ainda é pequena e insuficiente para suprir a demanda do mercado. Anualmente, o país importa cerca de 20 mil toneladas ao ano desta fruta, que se destinam, na quase totalidade, ao consumo *in natura*; uma pequena parte passa por processamento industrial e são comercializadas na forma de passas, geléias, licores e destilados (CHAGAS et al., 2007).

Um dos principais fatores que limitam o aumento da produção nacional de ameixeiras é, sem dúvida, o clima. A ocorrência de geadas tardias e o acúmulo de baixo número de horas de frio são variáveis climáticas de grande importância na escolha das regiões de maior aptidão para a cultura, bem como a escolha da cultivar adequada, uma vez que são determinantes da produtividade e da qualidade final da fruta. Outro fator que contribui para a baixa produção desta frutífera é a utilização de pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Bastch] como porta-enxerto, o qual é multiplicado por sementes, ocorrendo segregação genética deste material, produzindo pomares desuniformes quanto ao porte. Além disso, a vida útil da planta fica limitada, devido ao pessegueiro possuir uma menor longevidade em relação à ameixeira (EMBRAPA, 2005).

Nesse contexto, a qualidade e a idoneidade genética das mudas utilizadas pelo produtor de frutas são extremamente importantes. Existem algumas cultivares geneticamente próximas que são morfologicamente muito similares e difíceis de diferenciar mediante comparação de caracteres morfofenológicos. De acordo com Goulão et al. (2001), existe pouco conhecimento sobre a variabilidade genética das cultivares de *Prunus salicina* (Lindl.), incluindo seleções recentes e seus híbridos envolvendo várias espécies, como *P. armeniaca*, *P. munsoniana* entre outras e, também sobre o número de genitores utilizados em programas de melhoramento. Para superar estas limitações, marcadores moleculares baseados em DNA têm sido utilizados para caracterizar e identificar cultivares. Dentre estes marcadores, os de locos microssatélites (SSR – Seqüências Simples Repetidas) têm se mostrado os mais adequados.

Outro problema enfrentado por produtores e melhoristas é a auto-incompatibilidade gametofítica, ou seja, a incapacidade de autopolinização de muitas cultivares, devido à presença de um loco multialélico (contendo os denominados alelos-S) que codifica para enzimas que interrompem a formação do tubo polínico no processo de polinização, impedindo a fecundação. Como resultado, estas cultivares dependem de polinizadoras compatíveis para produzirem frutos, ou seja, seu pólen deverá efetivamente fecundar o pistilo da cultivar produtora, caso contrário não haverá produção. O conhecimento dos alelos-S de cada cultivar se torna de fundamental importância para o manejo dos pomares quanto à adequada polinização das flores (TAKAYAMA; ISOGAI, 2005).

A caracterização dos alelos-S das cultivares de interesse comercial, num primeiro momento, possibilitaria identificar quais genótipos seriam mais adequados para uso como plantas polinizadoras e, a partir do conhecimento dos alelos-S e por meio do uso da tecnologia de introdução de genes “antisense” e/ou “RNAi”, possibilitaria a produção de plantas transgênicas, nas quais os genes que codificam para S-RNases não seriam traduzidos, eliminando, desta forma, a necessidade de cultivares polinizadoras, o que, associado a garantia de idoneidade genética das plantas, reduz os custos de produção em consequência da não utilização de cultivares doadoras de pólen.

Frente a estes problemas, a utilização de ferramentas biotecnológicas têm grande potencial de aplicação na cultura da ameixeira, tanto por meio do uso de marcadores moleculares para conduzir estudos de variabilidade genética ou dar

garantias de correspondência varietal, quanto para identificar e melhorar o manejo da cultura, ou para a conversão de plantas auto-incompatíveis em auto-férteis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da cultura da Ameixeira

Muitos botânicos indicam ser a ameixeira o núcleo central de divergência do gênero *Prunus*, que por sucessivas variações originou os diferentes gêneros da família das Rosáceas. Duas espécies principais estruturam a maioria das cultivares atualmente existentes. Uma dessas espécies é denominada de *Prunus domestica* (L.) e é vulgarmente conhecida como ameixeira européia, originária do Cáucaso, da Turquia e da Pérsia. A outra é denominada *Prunus salicina* Lindl., conhecida como ameixeira japonesa, originária do Extremo Oriente (CASTRO, 2003), também fazem parte da constituição de muitas cultivares as espécies *P. insititia* e *P. cerasifera* (ameixeira mirabolão ou mirabolano) (JOLY, 1993).

A espécie mais cultivada no Brasil é *P. salicina*, de menor exigência em frio e mais adaptada às condições de invernos do sul do país. A ameixeira européia é pouco cultivada devido à alta exigência em frio para a superação da dormência, porém tem grande importância econômica em outros países. No apêndice A, pode ser observado o zoneamento agroclimático do Rio Grande do Sul, feito de acordo com as horas de frio de cada região e a necessidade de cada cultivar, considerando a susceptibilidade ao risco de geadas tardias.

Desde 1980, experimentos com ameixeiras européias têm sido feitos objetivando identificar cultivares aptas para o cultivo, pois se trata de uma espécie com potencial de cultivo em algumas regiões serranas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, ampliando assim a matriz varietal de ameixeiras, porém o uso de cultivares desta espécie ainda é restrito e se limita a duas cultivares ‘D’Agen’ e ‘Stanley’ (EMBRAPA, 2005).

No Brasil, a área cultivada com ameixeira japonesa tem grande potencial para ampliação, pois o volume produzido é insuficiente para atender a demanda, mesmo havendo condições edafoclimáticas favoráveis para o cultivo. A exportação de frutas frescas de ameixeira aumentou 3.233,3% em volume e 539,53% em valor em 2006 em relação a 2005. No entanto, o valor comercializado em US\$ ainda é muito pequeno quando comparado com outras frutíferas de clima temperado, como a macieira, que alcançou US\$ 31,915 milhões (ABF, 2007). Anualmente, o país importa cerca de 20 mil toneladas por ano de ameixas (CHAGAS et al., 2007).

As ameixeiras são frutíferas arbóreas, perenes, pertencentes à família Rosaceae, subgenêro *Prunophora*, são cultivadas economicamente em diversas partes do mundo e em várias condições climáticas, devido às varias espécies existentes e ao resultado de hibridações ocorridas ao longo do desenvolvimento da cultura. No Brasil, entre as regiões produtoras, destacam-se principalmente os Estados do Sul. O Rio Grande do Sul destaca-se como maior produtor, seguido por Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Minas Gerais (CASTRO, 2003), devido às condições climáticas mais favoráveis, em relação aos demais estados e a diversidade de cultivares introduzidas, adaptadas e selecionadas às condições locais de produção.

Nos últimos 10 anos, houve um incremento significativo da área plantada com ameixeiras na região da campanha do Rio Grande do Sul. Porém, passados alguns anos, quando a produção da região deveria entrar no mercado, hectares de ameixeiras tiveram de ser eliminadas. Parte do problema foi devido à grande incidência de bacteriose (*Xanthomonas arboricola* pv *pruni* e *Xylella fastidiosa*) e, principalmente, ao fato de que a maior parte da área foi plantada com a cv. América, considerada a preferida do mercado sul-brasileiro, porém é uma cultivar auto-incompatível. Em alguns casos, houve o plantio da planta polinizadora, entretanto, a escolha não foi correta para as condições climáticas locais, ou o número de plantas não foi suficiente, resultando em perdas significativas de produção (Informação verbal)¹.

¹ Informação fornecida pela Drª Maria do Carmo Raseira Brassol, pesquisadora da EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007.

A polinização que consiste na transferência de pólen da antera para o estigma não garante a fecundação. O sucesso da polinização e subsequente frutificação são influenciados por fatores internos (compatibilidade, período de receptividade do estigma e dos óvulos, etc.) e externos (temperatura, precipitação, incidência de ventos, etc.). Assim a transferência do pólen das cultivares polinizadoras para a cultivar comercial pode ser seriamente prejudicada por condições ambientais, como ventos, que prejudicam a atividade de insetos polinizadores (RASEIRA, 2003).

O plantio de cultivares auto-compatíveis resolveria o problema da polinização e da incompatibilidade, garantindo frutificação efetiva e maior produção, reduzindo a importação de ameixas para consumo fresco, principalmente nos meses de novembro a março. Desta forma, a informação e o entendimento a respeito da auto-incompatibilidade reprodutiva de cada cultivar se torna de extrema importância e interesse nos estudos de melhoramento e manejo de pomares desta espécie.

2.2 Auto-incompatibilidade gametofítica

A reação de compatibilidade do pólen pode ser controlada geneticamente pelo genoma do próprio gametófito ou pelo genoma do genitor esporofítico, podendo ser dividida em duas classes: gametofítica, com o gene “S” sendo transcrito e traduzido no gametófito, após a segregação dos genes na meiose; e esporofítica, com o gene sendo transcrito e provavelmente traduzido antes da meiose, no tecido do esporófito (LEWIS, 1994).

Antes da descoberta da influência dos alelos-S no mecanismo de incompatibilidade reprodutiva, os pomares eram plantados levando em consideração apenas a época de floração das cultivares produtoras e doadoras de pólen, o que acarretava grandes perdas de produção. Portanto, a simples coincidência do período de floração entre cultivares em um pomar de ameixeira não é garantia de boa fecundação se não existir compatibilidade de alelos-S entre a parte receptora e doadora de pólen.

Segundo Schifino-Wittmann; Dall’Agnol (2002), a auto-incompatibilidade gametofítica (AIG) ocorre quando a especificidade do pólen é gerada pelo alelo-S do genoma haplóide do grão de pólen (gametófito) e, a auto-incompatibilidade esporofítica (AIE), ocorre quando a especificidade é gerada pelo genótipo diplóide da planta adulta (esporófito) que deu origem ao grão de pólen. Conseqüentemente, no sistema gametofítico, o fenótipo do grão de pólen corresponde ao seu genótipo,

enquanto, no esporofítico, o fenótipo do grão de pólen é o mesmo que o da planta que o gerou ou planta-mãe.

A auto-incompatibilidade gametofítica é o sistema mais comum entre as plantas e supõem-se, o mais primitivo. De acordo com Bruckner et al. (2006), as principais características do sistema gametofítico são: controle monogênico (*gene-S*) com alelos múltiplos; controle gametofítico do fenótipo do pólen; alelos com ação individual no estigma, sem nenhuma interação; tubos polínicos incapazes de crescer nos estiletes que tenham um alelo-*S* em comum. Esse sistema apresenta três tipos de interação de compatibilidade: totalmente incompatível, quando ambos os alelos são comuns; parcialmente compatível em que, apenas um alelo é diferente, então metade dos grãos germinam e o tubo polínico penetra no estigma e estilete, realizando a fertilização, enquanto o restante é inibido, geralmente no estilete; e plenamente compatível, quando os quatro alelos são diferentes (Anexo A).

As famílias Rosaceae e Solanaceae, mesmo que evolutivamente distintas, possuem o sistema de incompatibilidade gametofítica similar. As pesquisas em Solanaceaes têm identificado um *S-loco* contendo um gene multialélico que codifica para *S-RNases* (SAPIR et al., 2004).

As *S-RNases* se expressam exclusivamente no pistilo, tendo as proteínas localizadas principalmente na parte superior do estilete onde ocorre a inibição. As RNases degradam o RNA do tubo polínico produzido pelo mesmo alelo-*S*. Conforme as hipóteses formuladas por Takayama; Isogai (2005), o *loco-S* é um complexo multigênico que segregá como uma unidade. Os variantes desse complexo são chamados alelos-*S* ou haplótipos-*S*. O reconhecimento da autopolinização ocorre em nível de interação proteína-proteína das partes feminina e masculina; a resposta incompatível ocorre quando as duas partes se originam do mesmo alelo-*S*. De maneira geral, um grande número de alelos diferentes em uma população assegura um número suficiente de polinizações compatíveis, não comprometendo a fertilidade (HESLOP-HARRISON, 1983).

A ameixeira japonesa, que possui a maioria das cultivares auto-inférteis, apresenta o sistema de auto-incompatibilidade gametofítica (SAPIR et al., 2004). Como resultado, estas dependem de polinizadoras para produzirem frutos, ou seja, seu pólen deverá efetivamente fecundar o pistilo da cultivar produtora, caso contrário não haverá produção.

Muito embora existam cultivares de *P. salicina* com níveis variados de auto-fecundação, a informação a respeito dos alelos-S de cada cultivar se torna de grande importância.

Glicoproteínas e RNAses envolvidas no processo de auto-incompatibilidade, que segregam junto com os alelos-S já foram identificadas, e os cDNAs que codificam para estas proteínas, em alguns casos, clonados (KAUFMANN et al., 1992; NEWBIGIN et al., 1993; BOSKOVIC; TOBUTT, 1996; DE NETTANCOURT, 1997, 2000). Existe uma relação entre RNAses e S-glicoproteínas e, portanto, com a reação de incompatibilidade. As RNAses estão presentes desde a superfície das papilas estigmáticas, tecido condutor do estilete, até o ovário, o que coincide com o trajeto do tubo polínico. Supõe-se que as RNAses suspendam o crescimento do tubo polínico por meio da degradação do RNA, mas os processos celulares que levam ao reconhecimento e à degeneração/eliminação dos tubos polínicos incompatíveis ainda não estão bem claros (HARING et al., 1990; DE NETTANCOURT, 1997, 2000; TAKAYAMA; ISOGAI, 2005). Segundo Wheeler et al. (2003), um gradiente de Ca⁺² também estaria associado à reação de auto-incompatibilidade, porém esta resposta necessita de estudos mais conclusivos.

Baseando-se nos resultados com Solanaceae, a estrutura primária total de S-RNases de Rosaceae tem sido determinada (SASSA et al., 1996; ISHIMIZU et al., 1998; MATSUMOTO et al., 1999), revelando ser constituída por cinco regiões conservadas, C1 a C5, e uma região hipervariável (RHV) incluindo um ítron (BROOTHAERTS et al., 1995). A partir destes trabalhos pioneiros, S-RNases de Rosaceae tem sido clonadas e estudados (ISHIMIZU et al., 1998; SAKURAI et al., 2000). De acordo com Sutherland et al. (2004), em *Prunus*, numerosos alelos-S foram parcialmente seqüenciados, revelando conter dois ítrons altamente polimórficos. *Primers* baseados nas regiões conservadas, especialmente aquelas que flanqueiam o segundo ítron polimórfico, têm sido desenvolvidos para amplificar e caracterizar alelos-S, através da identificação do tamanho do produto de PCR (*Polymerase chain reaction*).

De acordo com Beppu et al. (2002), a determinação de alelos-S baseada nos métodos convencionais de polinização e testes de crescimento do tubo polínico consome muito tempo, o mesmo não ocorrendo quando da utilização de PCR para analisar seqüências que codificam para S-RNases. Estas estratégias de análise foram usadas para determinar os alelos-S de várias espécies frutíferas da família

Rosaceae como cerejeira (*P. avium* L.), amendoeira (*P. dulcis* Mill.), umezeiro japonês (*P. mume* Sieb. et Zucc.), tendo seus cDNAs clonados (TAO et al., 1997, 1999; USHIJIMA et al., 1998; TAO et al., 1999; YAEGAKI et al., 2001; *apud* BEPPU et al., 2002), *Prunus malus* L. (JANSSENS et al., 1995), *Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak. (ISHIMIZU et al., 1999), além de *Prunus dulcis* Mill. (TAMURA et al., 2000). Em ameixeira japonesa (*P. salicina*) foram detectadas S-RNases na cultivar auto-incompatível 'Sordum' e seus cDNAs foram clonados e seqüenciados (YAMANE et al., 1999). A diversidade de alelos-S em cultivares de ameixeira japonesa, também foi verificada por Beppu et al. (2002), sendo que a partir deste estudo, foram construídos *primers* específicos para os alelos S^4 e S^5 .

Métodos que permitam avaliar antecipadamente a compatibilidade genética de alelos-S entre cultivares são de grande interesse, na medida em que permitem selecionar precocemente cultivares totalmente compatíveis, do ponto de vista genético-reprodutivo, que serão então mais promissoras (MOTA; OLIVEIRA, 2005).

Não dispensando os ensaios de polinização controlada a campo, a avaliação molecular dos alelos-S, de cada cultivar, torna todo o processo de seleção de uma polinizadora muito mais eficiente, já tendo sido utilizada para diversas frutíferas (BROOTHAERTS et al., 1995; ISHIMIZU et al., 1999; YAEGAKI et al., 2001).

A identificação molecular de alelos-S em ameixeira japonesa é uma importante estratégia para o estabelecimento de pomares com cultivares compatíveis reprodutivamente e, assim, melhorar o *fruit set* e a produção dos pomares. A caracterização desses alelos-S, associado à tecnologia de transformação genética de plantas, potencializa os trabalhos de melhoramento genético com o objetivo de obter cultivares autoférteis; uma vez que o uso destas ferramentas da biotecnologia permite a introdução de seqüências de S-RNases em orientação *antisense*, promovendo o silenciamento de genes responsáveis por este tipo de fenótipo e, consequentemente, eliminando o problema da auto-compatibilidade reprodutiva.

2.3 Marcadores Moleculares

Até pouco tempo, a identificação varietal era baseada apenas nas características morfofenológicas e pomológicas (SANSAVINI, 1998). Entretanto, esta metodologia apresenta limitações operativas-temporais e um custo elevado; além de não permitir o acesso a todo o genoma, o que leva a inevitáveis dúvidas de

interpretação quando os genótipos em estudo possuem características morfofenotípicas muito similares (BIANCHI et al., 2002).

Com o avanço da biotecnologia e o uso de marcadores moleculares, a possibilidade de desenvolvimento de variedades novas foi ampliada, reduzindo o tempo requerido para a descoberta e/ou identificação de características específicas dentro de progêniens de plantas, bem como a possibilidade de distinguir cultivares geneticamente próximas.

Até meados de 1960, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos. Porém, estes marcadores apresentam a desvantagem de serem somente identificados, em sua maioria, ao nível de planta inteira ou adulta, o que resulta em demora na obtenção de resultados e limita o seu emprego (STEFENON; NODARI; 2003).

Na década de 60, surgiram os primeiros marcadores moleculares – bioquímicos, baseados no isolamento e separação de proteínas e isoenzimas. No entanto, esta técnica rapidamente apresentou limitações como a baixa capacidade de detecção de polimorfismo entre variedades ou espécies próximas (ZIMMER et al., 2005).

Segundo Ferreira; Grattapaglia (1998), por volta de 1980 desenvolveram-se novas técnicas, como métodos de seqüenciamento de DNA, de DNA recombinante e de polimorfismos de fragmentos de DNA. Estas tecnologias de análise da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares”, definidos por esses autores como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentemente a regiões expressas ou não do genoma).

O uso de marcadores de DNA, comparados aos marcadores morfológicos, oferece informações mais estáveis quanto ao caráter fenotípico, uma vez que o fenótipo é a expressão do genótipo em condições ambientais específicas, podendo mudar com o ambiente, no entanto, o genótipo ou a constituição do DNA de um indivíduo se mantém estável durante o ciclo de vida (VIDOR et al., 2002).

Diferentemente dos marcadores enzimáticos, os moleculares podem ser utilizados a partir de amostras de células, de diferentes tecidos e partes da planta (folhas, embriões, cotilédones, pólen, etc.) e também em qualquer estádio de

desenvolvimento da planta, não interferindo no processo biológico que se deseja estudar (ROBINSON, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e Minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats). Já aqueles revelados por amplificação pelo princípio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); STS (Sequence Tagged Sites) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e Microssatélite ou SSR (Simple Sequence Repeats) (MILACH, 1998).

Os marcadores de locos microssatélites são baseados na amplificação de seqüências repetidas em *tandem* (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989) e o seu uso permite a construção de bancos de dados, mapeamento genético, podendo simplificar a identificação de casos sinonímias e homonímias em um amplo número de cultivares.

Os locos de microssatélites têm assumido um papel importante em análises genéticas no estudo de um grande número de espécies de plantas. Eles são considerados os marcadores mais polimórficos e, devido a sua característica de co-dominância, abundância e distribuição uniforme ao longo do genoma são os mais apropriados para estudos genéticos (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Outra vantagem deste tipo de marcador é a facilidade de troca de informações entre laboratórios, visto que as seqüências dos *primers* proporcionam uma linguagem comum e a identificação alélica em estudos populacionais é direta e objetiva (POWELL et al., 1996; STEPHAN; CHO, 1994).

Marcadores SSR têm sido usado para identificar e caracterizar diferentes espécies de *Prunus* (MARTÍNEZ-GÓMEZ, 2005), como em ameixeira e nectarineira (BIANCHI et al., 2002, 2004), em pêssego (SOSINSKI et al., 2000; ETIENNE et al., 2002; ARANZANA et al., 2003; BIANCHI et al., 2004); amendoeira (JOOBEUR et al., 2000); damasco (HURTADO et al., 2002); e em estudo da diversidade alélica em tomateiro (ARESHCHENKOVA; GANAL, 1999).

Hu et al. (2004) usaram SSRs para avaliar o transferibilidade e o nível de polimorfismo entre cultivares de batata-doce e suas espécies selvagens

relacionadas. Bianchi et al. (2002), analisando apenas cinco locos SSR, agruparam 29 porta-enxertos em seus respectivos subgêneros, *Prunophora* e *Amygdalus*, porém os polimorfismos gerados foram suficientes para um bom agrupamento entre espécies de *Prunus persica* e os demais híbridos analisados, dentro de cada subgenêro.

Mnejja et al. (2004) desenvolveram 35 locos SSR polimórficos com o intuito de averiguar o nível de variabilidade em ameixeira japonesa e observaram que 27 destes locos mostraram alto nível de variabilidade nas cultivares analisadas.

Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (*P/C*) na terminologia de marcadores moleculares (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Sendo assim, é uma ferramenta com grande aplicabilidade para distinção de cultivares de *Prunus* spp.

Considerando a importância da cultura da ameixeira na região Sul do Brasil, tornam-se importantes as pesquisas voltadas à identificação de marcadores moleculares que possam diferenciar e caracterizar cultivares utilizadas comercialmente. A garantia de idoneidade genética do material vegetal é um atributo qualitativo de grande importância em fruticultura e a utilização de mudas de alta qualidade é determinante para se obter boa produtividade.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar os alelos-S relacionados à auto-incompatibilidade gametofítica e distinguir, através de técnicas moleculares, cultivares de ameixeira japonesa, com a finalidade de assegurar a idoneidade genética do material, bem como tornar mais eficiente a escolha das melhores polinizadoras, auxiliando, desta forma, no manejo e instalação de pomares desta cultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas – Caracterização Molecular, do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas – UFPel – RS, no período de março de 2006 a março de 2008.

3.1 Material Vegetal

O material vegetal utilizado para as análises foram folhas jovens de cultivares de ameixeira japonesa (Tabela 1), coletadas no viveiro da Frutiplan – Pelotas/RS e na Embrapa Clima Temperado.

Tabela 1 – Genótipos de ameixeira japonesa utilizados na análise de variabilidade de locos SSR e de alelos-S. UFPel/Pelotas, 2008

Código	Cultivar	Grupo	Espécies
5	Santa Rosa	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
7	Santa Rita	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
8	Reubennel	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
9	Pluma 7	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
10	América	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
11	Rosa Mineira	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
13	Amarelinha	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
14	The first	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
18	Harry Pickstone	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
23	Gulfblaze (Clone São Paulo)	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)
24	Gulfblaze (Clone Guaíba)	Japonês	<i>Prunus salicina</i> (Lindl.)

3. 2 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras contendo 50 mg de folhas usando o método descrito por Doyle; Doyle (1991). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, coletadas para tubos de dois (2) mL juntamente com 900 µL do tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8,0, 0,5% β-Mercaptoetanol, 1% PVP); seguida de incubação em banho-maria por 50 min a 65°C e uma desproteinização com 900 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação, 700 µL de sobrenadante foi coletado para novo tubo com igual volume de etanol absoluto e realizada lavagem com 500 µL de etanol 70%. Para a suspensão final do DNA precipitado foi utilizado Tampão Tris/EDTA ou TE (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase (10 µg/mL). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%, usando como padrão o DNA de Fago *Lambda* digerido com *Hind* III, posteriormente uma solução de trabalho foi diluída para a concentração de 5 ng uL⁻¹.

3.3 EXPERIMENTO 1 - IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS-S DE INCOMPATIBILIDADE GAMETOFÍTICA EM AMEIXEIRA JAPONESA

3.3.1 Detecção de polimorfismo dos alelos-S por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nas reações de PCR foram utilizados 20 ng de DNA de cada amostra; 2,5 µl de 10x PCR buffer; 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada primer; 150 µM de cada dNTPs; 1,25U de Taq DNA polimerase (kit Invitrogen) e água Milli-Q para um volume final de 25 µl. Os primers utilizados na reação de PCR estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Combinação de primers usados na amplificação de alelos-S, com suas respectivas seqüências de nucleotídeos e temperatura de anelamento. UFPel/Pelotas, 2008

Designação do primer	Sequência (5'-3')	Temperatura anelamento (°C)	Referência
Pru-C2 PCE-R	CTA TGG CCA AGT AAT TAT TCA AAC C TGT TTG TTC CAT TCG CYT TCC C	54	Tao et al., 1999, Yamane et al., 2001.
Pru-C2 Pru-C5	CTA TGG CCA AGT AAT TAT TCA AAC C TAC CAC TTC ATG TAA CAA CTG AG	54	Tao et al., 1999.
IZ1 IZ4	CCC GAG ACA TGT TGT TTG CAA G CCC ACC TAT TCT ACC GTT TG	56	Sapir, 2004.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Modelo PCR Sprint – Thermo Electron Corporation. O perfil térmico para a PCR com os diferentes pares de *primers* foi: um ciclo inicial de 94ºC por 5 min, 54ºC por 2 min e 72ºC por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94ºC por 1 min, 54ºC temperatura de anelamento ($T^{\circ}A$) por 2 min 72ºC por 3 min. Com ciclo final de 94ºC por 1 min, 54ºC por 2 min, 72ºC por 10 min e 4ºC por 8 min. $T^{\circ}A$ foi alterada conforme a necessidade para cada par de *primer* (54 ou 56 ºC), conforme apresentado na tabela 2.

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X, a 5 V cm⁻¹. Como marcador de massa molecular foi utilizado DNA Ladder 100 pb e, após a imersão do gel em solução de brometo de etídeo, a visualização dos fragmentos foi realizada sob luz ultravioleta em um fotodocumentador (modelo E-BOX-100 – marca Vilber Lourmat).

3.3.2 Seqüenciamento de fragmentos de DNA produzidos por PCR

Alguns produtos de PCR foram submetidos ao seqüenciamento para confirmar a identidade dos alelos (Tabela 3). Amostras de 100 ng de DNA amplificado, correspondentes a alelos isolados dos géis de agarose, foram seqüenciados utilizando o kit DYEnamic™ ET termination (Amershal Biosciences) conforme protocolo do fabricante. As reações de seqüenciamento foram analisadas em um seqüenciador automático MegaBACE 500 (Amershal Biosciences) e os fragmentos amplificados foram seqüenciados três vezes para confirmação dos resultados.

Tabela 3 – Cultivares e *primers* usados na amplificação e tamanho dos alelos-S purificados e submetidos ao seqüenciamento. UFPel/Pelotas, 2008

Cultivar	Primers	Tamanho aproximado do alelo (em pb)
Rosa Mineira	Pru-C ₂ + Pru-C ₅	800
Rosa Mineira	Pru-C ₂ + Pru-C ₅	600
Rosa Mineira	Pru-C ₂ + PCE-R	500
Rosa Mineira	Pru-C ₂ + PCE-R	400
Santa Rita	Pru-C ₂ + Pru-C ₅	1100
América	Pru-C ₂ + Pru-C ₅	1500
América	IZ ₁ + IZ ₄	500
Santa Rosa	IZ ₁ + IZ ₄	500

3.3.3 Análise *in silico* das seqüências de nucleotídeos

Após o seqüenciamento, a qualidade das seqüências de nucleotídeos foi analisada pela sobreposição dos fragmentos utilizando o software Vector NTI Advance 10.0, AlignX e Contig Express (InforMax, Inc.). A determinação da seqüência consenso foi feita pelo alinhamento dos produtos obtidos utilizando o software ClustalX (THOMPSON et al., 1997). A natureza das seqüências foi confirmada a partir do alinhamento contra seqüências depositadas no banco de dados de nucleotídeos no BLAST do NCBI (National Center for Biotechnology Infomation - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.4 EXPERIMENTO 2 - DIFERENCIAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DE GENÓTIPOS DE AMEIXEIRA JAPONESA PELA ANÁLISE DE LOCOS MICROSSATÉLITES (SSR)

3.4.1 Análise de locos microssatélite (SSR)

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* para locos da série UDP (Tabela 4). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador MJ Research PTC-100, utilizando 2,5 µL de tampão 10x (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl); 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 0,15 µM de cada *primer*; 0,8 unidades de Taq polimerase (Invitrogen); 15 ng de DNA genômico e água Milli-Q para o volume final de 25 µL. Foi usado o seguinte perfil térmico: 1 ciclo (95 °C por 5 min), 35 ciclos (94 °C por 45s; 57 °C por 45s e 72 °C por 45s), mais um ciclo final (72 °C por 8 min).

Aos produtos da reação de PCR foram adicionados 10 µL de solução desnaturante (98% formamida, 10 mM EDTA, 0,05% bromofenol Blue e 0,05% de xylene cyanol), seguido de tratamento térmico a 95 °C por 5 minutos e imersão imediata em gelo. Posteriormente 4,5 µL de cada amostra amplificada foi aplicada ao gel, acompanhada do marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). A eletroforese foi conduzida em gel de poliacrilamida na concentração de 6%, em tampão TBE 1X a 65 volts, por aproximadamente 3 horas. Na revelação dos géis se utilizou nitrato de prata, segundo a metodologia descrita por Bassam et al. (1991).

O perfil eletroforético dos genótipos foi registrado quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas, em conjunto para análise de similaridade, e em cada loco

individual, para o cálculo da freqüência alélica (número médio de alelos por loco, estimado pela média aritmética dos locos estudados). A similaridade genética foi calculada por meio do Coeficiente Simple Matching (SOKAL; SNEATH,1963) e o agrupamento pelo método UPGMA (Unweighted pair group mean average), utilizando o software NTSYS.pc versão 2.1 (ROHLF, 2000).

Tabela 4 – Seqüências de oligonucleotídeos e respectivas temperaturas de anelamento ($T^{\circ}A$) de *primers* para locos de microssatélites desenvolvidos de biblioteca de DNA de *Prunus persica* (CIPRIANI, 1999)

Locos/GenBank Acesso nº	Seqüência dos <i>Primers</i> (5'-3')	$T^{\circ}A$ (°C)
UDP96-001	F: AGTTTGATTTCTGATGCATCC R: TGCCATAAGGACCGGTATGT	57°
UDP96-003	F: TTGCTCAAAAGTGTCTGGC R: ACACGTAGTGCAACACTGGC	57°
UDP96-005	F: GTAACGCTCGCTACCACAAA R: CCTGCATATCACCAACCCAG	57°
UDP96-008	F: TTGTACACACCCCTCAGGCTG R: TGCTGAGGTTCAGGTGAGTG	57°
UDP96-013	F: ATTCTTCACTACACGTGCACG R: CCCCAGACATACTGTGGCTT	57°
UDP96-018	F: TTCTAACATGGGCTATGGCG R: GAAGTTCACATTACGACAGGG	57°
UDP96-019	F: TTGGTCATGAGCTAAGAAAACA R: TAGTGGCACAGAGCAACACC	57°
UDP98-022	F: CTAGTTGTGCACACTCACGC R: GTCGCAGGAACAGTAAGCCT	57
UDP98-024	F: CCTTGATGCATAATCAAACAGC R: GGACACACTGGCATGTGAAG	57
UDP98-407	F: AGCGGCAGGCTAAATATCAA R: AATCGCCGATCAAAGCAAC	57°
UDP98-409	F: GCTGATGGGTTTATGGTTTC R: CGGACTCTTATCCTCTATCAACA	57
UDP98-412	F: AGGGAAAGTTCTGCTGCAC R: GCTGAAGACGACGATGATGA	57°
UDP98- 414	F: AAAAGGCACGACGTTGAAGA R: TTCAGATTGGGAATTGAAG	57°

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1 - Identificação de alelos-S de incompatibilidade gametofítica em ameixeira japonesa

4.1.1 Amplificação de alelos-S

No estudo de amplificação de alelos-S de genótipos de ameixeira (Tabela 1), 11 cultivares auto-incompatíveis ou com compatibilidade parcial foram testadas com três pares de *primers* (Tabela 2).

A combinação de *primers* que apresentou melhor resultado de amplificação foi a de Pru-C₂ com PCE-R (Figura 1), mostrando amplificação de alelos nas 11 cultivares testadas. Cada cultivar apresentou dois alelos distintos, com exceção de ‘Pluma 7’, ‘The First’, ‘Gulfblaze’ (clone proveniente de São Paulo) e ‘Gulfblaze’ (clone proveniente de Guaíba), que apresentaram apenas um alelo amplificado. A combinação dos *primers*, Pru-C₂ e Pru-C₅ (Figura 1) amplificou os alelos-S em 10 cultivares (91%), sendo que destas, oito cultivares tiveram dois alelos amplificados e duas tiveram um único alelo (‘The First’ e ‘Gulfblaze’ de Guaíba). A cultivar ‘Gulfblaze’ (clone de São Paulo) não teve alelos amplificados, sendo um indicativo que esta cultivar possui alelos nulos para este loco.

A combinação dos *primers* IZ₁ e IZ₄ amplificou alelos em apenas três cultivares (27,3%) e, em cada uma delas, apresentou um único alelo (Figura 2).

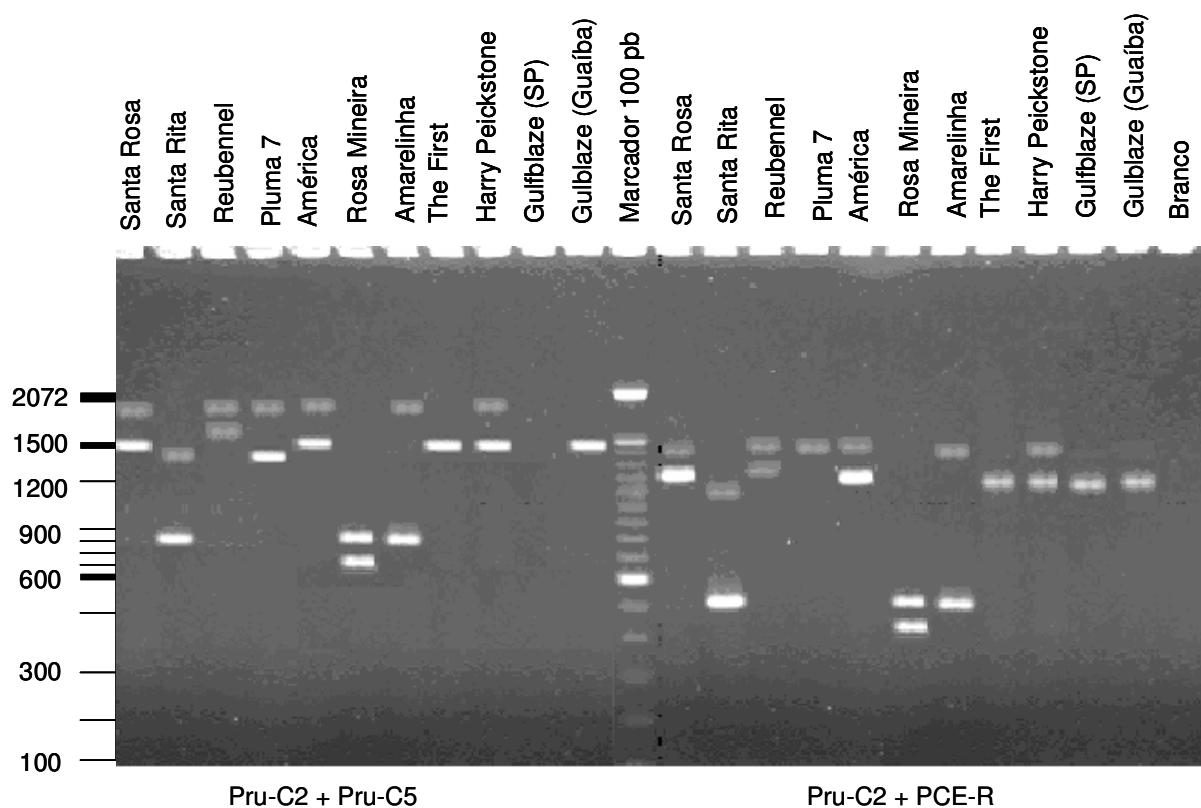


Figura 1 – Padrões de amplificação de alelos-S obtidos com os *primers* Pru-C₂/Pru-C₅ e Pru-C₂/PCE-R em 11 cultivares de ameixeira japonesa.

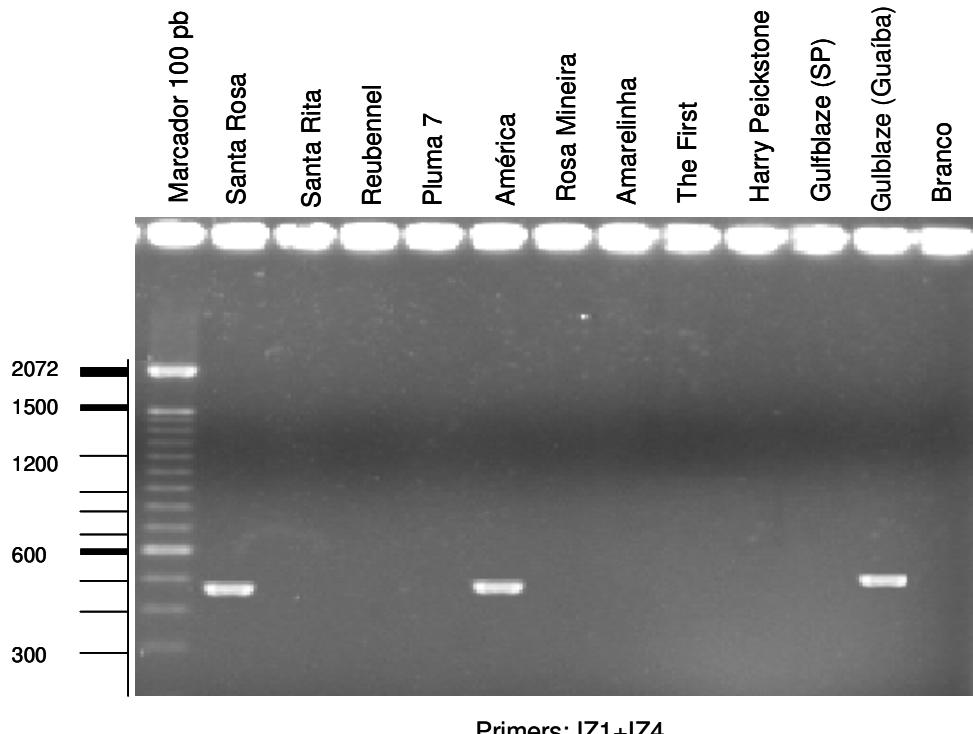


Figura 2 – Padrões de amplificação de alelos-S obtidos com os *primers* IZ₁/IZ₄ em 11 cultivares de ameixeira japonesa.

O tamanho dos alelos obtidos variou entre cultivares bem como entre combinação de *primers*. Com Pru-C₂ e Pru-C₅, seis diferentes alelos foram obtidos entre as 11 cultivares testadas. A visualização do resultado da amplificação mostrou alelos de tamanho em torno de 1900, 1600, 1500, 1400, 800 e 600 pb (Tabela 5). Pru-C₂ e PCE-R também amplificou seis alelos, porém o tamanho destes fragmentos foi menor do que os obtidos com a combinação de *primers* anterior, e ficou sendo de 1500, 1300, 1200, 1100, 500 e 400 pb. A combinação de *primers* IZ₁ e IZ₄ amplificou alelos de mesmo tamanho, em torno de 460 pb.

Na pesquisa realizada por Beppu et al. (2002), com os *primers* Pru-C₂ e PCE-R, foram observados dois alelos em cada cultivar e um total de 9 alelos em 17 cultivares de ameixeira japonesa. Na amplificação com Pru-T₂ e PCE-R apenas uma cultivar não apresentou dois alelos. De acordo com os autores, os alelos de mesmo tamanho com cada conjunto de *primer* seriam derivadas do mesmo gene de S-RNase de *P. salicina*.

Quando comparados os resultados de PCR dos diferentes conjuntos de *primers* usados para flanquear as regiões, Pru-C₂/Pru-C₅ com Pru-C₂/PCE-R, observou-se que a amplificação mostrou tamanhos de fragmentos diferentes, porém um padrão semelhante de distribuição das bandas entre as cultivares (Tabela 5 e Figura 1), ou seja, praticamente as mesmas cultivares apresentaram alelos, porém o tamanho destes alelos em pb destes foi diferente. Variações semelhantes entre os conjuntos de *primers* Pru-C₂/Pru-C₅ e Pru-T₂/PCE foram observadas nas pesquisas realizadas por Beppu et al. (2002).

Com o conjunto de *primers* IZ₁ e IZ₄, apenas três cultivares apresentaram amplificação e de apenas um alelo em cada uma (Tabela 5 e Figura 2). Este fato se justifica quando se leva em consideração que estes *primers* amplificam apenas seqüências exclusivas de um alelo-S específico (SAPIR et al., 2004).

Algumas cultivares mostraram padrões de amplificação diferenciada, como a cultivar 'Pluma 7', que apresentou dois alelos quando usado os *primers* Pru-C₂/Pru-C₅ e apenas um alelo com Pru-C₂/PCE-R. 'Gulfblaze' (clone de São Paulo) não teve alelos-S amplificados com Pru-C₂/Pru-C₅, mas teve um alelo amplificado com Pru-C₂/PCE-R.

Em pesquisas realizadas por Tao et al. (1999), em genótipos de cerejeira, amendoeira e damasqueiro, usando os *primers* Pru-C₂/Pru-C₅, e por Yamane et al. (2001) com os *primers* Pru-C₂/PCE-R, nas mesmas espécies, também foram

observadas variações entre as combinações de *primers*, tendo ocorrido ausência de amplificação em algumas cultivares, semelhante ao que ocorreu no presente estudo.

Tabela 5 - Combinação de *primers* e tamanho aproximado (em pares de bases) dos alelos-S amplificados em cultivares de ameixeira japonesa. UFPel/Pelotas 2008

Cultivar	<i>Primers</i>	<i>Primers</i>	<i>Primers</i>
	Forward: Pru-C ₂	Forward: Pru- C ₂	Forward: IZ ₁
	Reverse : Pru-C ₅	Reverse : PCE-R	Reverse : IZ ₄
Santa Rosa	1900 – 1500	1500 - 1200	460
Santa Rita	1400 – 800	1100 - 400	-
Reubennel	1900 - 1600	1500 - 1300	-
Pluma 7	1900 - 1400	1500	-
América	1900 - 1500	1500 - 1200	460
Rosa Mineira	800 - 600	500 - 400	-
Amarelinha	1900 - 800	1500 – 400	-
The First	1500	1200	-
Harry Pickstone	1900 - 1500	1500 – 1200	-
Gulfblaze (SP)	-	1200	-
Gulfblaze (Guaíba)	1500	1200	460

Essa ausência de amplificação pode ocorrer em alguns casos, significando que se trata de alelos nulos para aquele loco gênico da cultivar sob avaliação. Alelos nulos são descritos em diversos sistemas de microssatélites e são o resultado de mutações, tais como substituição, inserções e deleções em uma ou em ambas as regiões de anelamento dos *primers* no DNA (CALLEN et al., 1993).

Os *primers* utilizados foram construídos, de acordo com a literatura, tendo como local de referência a região conservada entre diferentes espécies de Rosáceas. Na figura 3, observa-se um esquema dessas regiões e os locais de onde foram obtidos os *primers*. De acordo com Beppu et al. (2002), da região C3 se obteve o *primer* PCE-R e, encontra-se entre as regiões C2 e C5 das quais foram obtidos Pru-C₂ e Pru-C₅, respectivamente. O fragmento amplificado pelo par de oligonucleotídeos Pru-C₂/PCE-R tende a ter um menor número de bases do que o fragmento amplificado pelo par de oligonucleotídeos Pru-C₂/Pru-C₅. Tais diferenças no tamanho dos alelos amplificados foram observadas no presente trabalho, quando comparados os conjuntos de *primers*, conforme apresentado na figura 1.

Os “*primers* específicos” IZ₁/IZ₄, foram identificados por Sapir et al. (2004), a partir da clonagem do alelo S4 e foram utilizados para confirmar a compatibilidade entre cultivares.

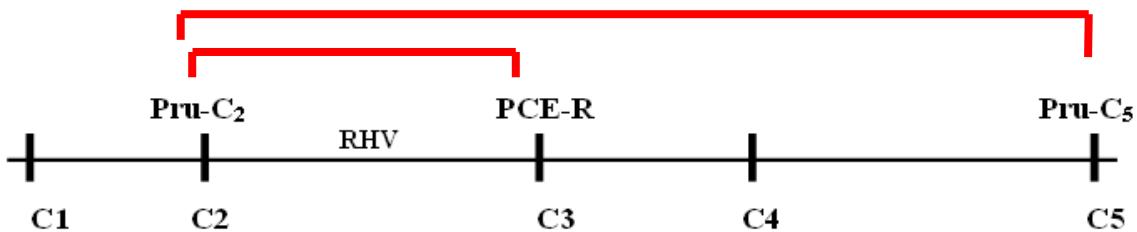


Figura 3 – Representação esquemática das regiões conservadas para alelos-S em Rosáceas, C1, C2, C3, C4 e C5 conforme Beppu (2002). Localização dos *primers* utilizados em análise de PCR, Pru-C₂, PCE-R e Pru-C₅ e, uma região hipervariável (RHV).

4.1.2 Compatibilidade entre cultivares e suas polinizadoras

A auto-incompatibilidade de muitos genótipos de ameixeira japonesa é conhecida e tem sido determinada através de métodos convencionais de polinização e testes de crescimento do tubo polínico. Na tabela 6 são apresentadas as cultivares utilizadas nesta pesquisa, com suas respectivas polinizadoras, indicadas através de estudos morfológicos. De acordo com Barbosa (2006), a característica básica da polinizadora é que floresça junto com a cultivar produtora e, essencialmente, deverá ser compatível com a mesma, ou seja, seu pólen deverá efetivamente fecundar o pistilo da cultivar produtora, caso contrário não haverá produção.

A plena floração da cultivar ‘Gulfblaze’, no Estado de São Paulo, ocorre entre fins de julho até meados de agosto, dependendo do local de cultivo e do tipo de manejo das plantas (BARBOSA, 2006), sugerindo que o período de floração das polinizadoras apesar de bem conhecido, pode ser influenciado por condições climáticas, como chuva, vento, geadas, seca, entre outros, e assim ocasionar variação na polinização efetiva. Portanto, a escolha da planta polinizadora que ofereça as melhores características é essencial para garantir a produção.

Tabela 6 - Relação das cultivares de ameixeira japonesa utilizadas em análises de PCR e suas respectivas polinizadoras. UFPel/Pelotas 2008

Cultivares Produtoras	Cultivares Polinizadoras
Santa Rosa	Santa Rita, The First ou Wickson
Santa Rita	Santa Rosa, Methley ou The First
Reubennel	Rosa Mineira, Amarelinha ou Pluma 7
Pluma 7	Blood Plum, Amarelinha
América	Reubennel, Rosa Mineira
Rosa Mineira	Relativa auto-fertilidade
Amarelinha	Blood Plum, Pluma 7 e Friar
The First	Santa Rita, Santa Rosa ou Methley
Harry Pickstone	Wade, Wickson
Gulfblaze (São Paulo)	Seleções Fla 87-1 e Fla 87-2
Gulfblaze (Clone Guaíba)	Não relatado

Fonte: EMBRAPA/2008

De acordo com a figura 1, na amplificação com os *primers* Pru-C₂/Pru-C₅ e Pru-C₂/PCE-R, a cultivar ‘Santa Rosa’ apresentou, com o primeiro conjunto de *primers*, alelos de tamanho em torno de 1900 e 1500pb, e de 1500 e 1200 pb, com o segundo, padrões semelhantes às das cultivares ‘América’ e ‘Harry Pisckstone’. Estas evidências sugerem que estas três cultivares apresentam auto-incompatibilidade e, dentre as 11 testadas, são as únicas com incompatibilidade total entre elas.

Baseando-se nos resultados de amplificação com os diferentes pares de *primers*, a relação de auto-incompatibilidade e incompatibilidade de alelos-S entre as cultivares, pode ser analisada (Tabelas 7 e 8). Através desta análise pode-se obter a planta mais adequada para ser usada como polinizadora. Verificou-se semi-compatibilidade (SC) entre algumas cultivares, as quais tiveram amplificados dois alelos distintos, porém apresentaram apenas um alelo em comum. Outras, também amplificaram dois alelos, mas se mostraram compatíveis (C), por não terem apresentado nenhum alelo em comum. Enquanto algumas cultivares, que tiveram amplificado apenas um alelo, podem ser consideradas com auto-incompatibilidade parcial (AIP), como no caso de ‘The First’ e ‘Gulfblaze’ (clone de Guaíba) na amplificação com os *primers* Pru-C₂/Pru-C₅ e também com Pru-C₂ e PCE-R. Com este último par de *primers*, a cultivar ‘Pluma 7’, também demonstrou apresentar auto-incompatibilidade parcial, com a amplificação de apenas um alelo, porém com os *primers* Pru-C₂/Pru-C₅ mostrou-se auto-incompatível, amplificando dois alelos. A possibilidade da presença de alelos nulos, já mencionados anteriormente, deve ser levada em consideração também nesta análise.

Tabela 7 – Relação de compatibilidade gametofítica entre cultivares de ameixeira japonesa baseada nos alelos-S do loco Pru-C₂/Pru-C₅, amplificados por PCR. UFPel/Pelotas, 2008

Cultivar	Primers: Forward: Pru-C₂ Reverse: Pru-C₅										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Santa Rosa (1)	AI	C	SC	SC	I	C	SC	SC	I	NA	SC
Santa Rita (2)		AI	C	SC	C	SC	SC	C	C	NA	C
Reubennel (3)			AI	SC	SC	C	SC	C	SC	NA	C
Pluma 7 (4)				AI	SC	C	SC	C	SC	NA	C
América (5)					AI	C	SC	SC	I	NA	SC
Rosa Mineira (6)						AI	SC	C	C	NA	C
Amarelinha (7)							AI	C	SC	NA	C
The First (8)								AIP	SC	NA	SC
Harry Pickstone (9)									AI	NA	SC
Gulfblaze (SP) (10)										NA	NA
Gulfblaze (Guaíba) (11)											AIP

AI – Auto-incompatível; SC – Semi-compatível; C – Compatível; e I – Incompatível; AIP – Auto-incompatibilidade parcial; NA – Não amplificou.

Tabela 8 - Relação de compatibilidade entre cultivares de ameixeira, baseada nos alelos-S do loco Pru-C₂/PCE-R, amplificados por PCR. UFPel/Pelotas 2008

Cultivar	Primers: Forward: Pru-C₂ Reverse: PCE-R										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Santa Rosa (1)	AI	C	SC	SC	I	C	SC	SC	I	SC	SC
Santa Rita (2)		AI	C	C	C	SC	SC	C	C	C	C
Reubennel (3)			AI	SC	SC	C	SC	C	SC	C	C
Pluma7 (4)				AIP	SC	C	SC	C	SC	C	C
América (5)					AI	C	SC	SC	I	SC	SC
Rosa Mineira (6)						AI	SC	C	C	C	C
Amarelinha (7)							AI	C	SC	C	C
The First (8)								AIP	SC	SC	SC
Harry Pickstone (9)									AI	SC	SC
Gulfblaze (SP) (10)										AI	SC
Gulfblaze (Guaíba) (11)											AIP

AI – Auto-incompatível; SC – Semi-compatível; C – Compatível; e I – Incompatível; AIP – Auto-incompatibilidade parcial.

A partir da identificação dos alelos-S foi possível estabelecer uma nova relação de polinizadoras para as cultivares estudadas (Tabela 9). Nesta relação, primou-se por usar somente cultivares que mostraram compatibilidade completa e, mesmo assim pôde ser verificado um número considerável de polinizadoras para algumas cultivares.

A cultivar 'Rosa Mineira' é conhecida por apresentar relativa auto-fertilidade. Nesta relação de polinizadoras estabelecidas (Tabela 9), ela se mostrou compatível com um número maior de cultivares do que as demais, confirmado o que os estudos e as práticas de seleção convencional já haviam estabelecido.

Tabela 9 - Relação de cultivares de ameixeira japonesa e suas polinizadoras estabelecidas a partir das análises de compatibilidade dos alelos-S amplificados. UFPel/Pelotas/2008

Cultivares Produtoras	Cultivares Polinizadoras
Santa Rosa	Santa Rita, Rosa Mineira
Santa Rita	Santa Rosa, Reubennel, América , The First, Harry Pickstone, Gulfblaze (Guaíba)
Reubennel	Rosa Mineira, The First, Gulfblaze (Guaíba)
Pluma 7	Rosa Mineira, The First, Gulfblaze (Guaíba)
América	Rosa Mineira, Santa Rita
Rosa Mineira	Santa Rosa, Reubennel, Pluma 7, América, The First, Harry Pickstone, Gulfblaze (Guaíba)
Amarelinha	The First, Gulfblaze (Guaíba)
The First	Santa Rita, Reubennel, Pluma 7, Rosa Mineira, Amarelinha
Harry Pickstone	Santa Rita, Rosa Mineira
Gulfblaze (São Paulo)	Reubennel, Pluma 7, Rosa Mineira, Amarelinha
Gulfblaze (Guaíba)	Reubennel, Pluma 7, Rosa Mineira, Amarelinha

Baseando-se nestes dados de compatibilidade, a escolha das melhores polinizadoras deverá ser feita levando em consideração, ainda, a variabilidade das condições de clima, principalmente de temperatura e da época de floração. Sendo adequado o uso de mais de uma polinizadora por cultivar comercial, uma vez que, sob determinadas condições, a floração poderá não coincidir completamente (EMBRAPA, 2005).

No estudo de Beppu et al. (2002), foram analisadas diversas cultivares, usando os *primers* Pru-T₂/PCE-R, dentre elas 'Santa Rosa', Late Santa Rosa' e 'Beauty. A cultivar 'Santa Rosa' amplificou alelos de tamanho em torno de 1420 e 1170 pb, os quais foram denominados de S^c e S^e. Estas três cultivares, foram

consideradas auto-compatíveis e constatou-se que elas possuem em comum os alelos S^c e S^e. Outras cultivares testadas apresentaram o alelo-S^c, porém mostraram-se auto-incompatíveis, como 'Oishiwasesumomo' e 'Tayo'. Já a cultivar 'Rio', que amplificou o alelo-S^e, apresentou crescimento do tubo polínico, ou seja, se mostrou auto-compatível, o que demonstra que o alelo-S^e pode ser o responsável pela inversão da auto-incompatibilidade presumida na cultivar 'Santa Rosa'.

Tao et al. (2000, 2002 a, b) também encontraram em cultivares de damasqueiro-japonês (*P. mume* Sieb & Zucc) um gene para S-RNase que poderia ser utilizado como marcador molecular de auto-compatibilidade, assim como o alelo-S^e, citado anteriormente, que quando detectado em ameixeira japonesa também poderá ser utilizado para esta finalidade.

A partir destas informações, ou seja, o conhecimento dos alelos-S responsáveis pela incompatibilidade, bem como do conhecimento de um alelo-S que possa reverter esta incompatibilidade, há a possibilidade, através de métodos biotecnológicos, da transferência de alelos entre cultivares semi-compatíveis, mas que apresentem sincronia de floração.

4.1.3 Análise de Seqüenciamento de alelos amplificados

Com a finalidade de confirmar que se tratava de seqüências codificadoras de S-RNases, bem como averiguar a denominação relacionada a seqüência dos alelos obtida conforme a literatura, parte dos fragmentos foram seqüenciados e a sua seqüência parcial (Anexo B) comparada com as de alelos-S de *P. salicina* depositadas no GenBank. O seqüenciamento foi necessário para permitir a identificação de parte da composição e a ordem de nucleotídeos de alelos amplificados para o alinhamento com as seqüências depositadas nas bases de dados, com o intuito de encontrar seqüências similares.

Várias tentativas de isolamento e purificação de bandas amplificadas nas diferentes cultivares foram feitas, porém somente nas cultivares 'América', 'Rosa Mineira', 'Santa Rita' e 'Santa Rosa' foi possível obter DNA para a etapa de seqüenciamento.

Através da comparação de seqüências, conforme tabela 10, foi possível verificar que o produto da amplificação com os primers IZ₁/IZ₄, seqüenciado com o uso do primer IZ₁, a cultivar 'América' apresentou 100% de identidade com o alelo S^c.

(SAPIR; GOLDWAY, 2006 - BLAST) e, 99% de identidade com o alelo S⁴ conforme Sapir e Goldway - BLAST (2001), enquanto na cultivar ‘Santa Rosa’, apresentou 99% de identidade com o alelo S^c e, também, 99% de identidade com o alelo S⁴ (SAPIR; GOLDWAY, 2006, 2001- BLAST). O que sugere tratar-se do mesmo alelo, já que na visualização dos produtos amplificados (Figura 2), constataram-se bandas de tamanho semelhante. Pequenas diferenças podem ser em função da perda de algumas bases durante o processo de isolamento e purificação das bandas ou mesmo da perda das extremidades durante o seqüenciamento.

De acordo com Schifino-Wittmann; Dall’Agnol (2002), existem algumas espécies que possuem o sistema de auto-incompatibilidade gametofítico, porém na prática apresentam certa fertilidade. Isto aconteceria em função da ativação de genes que tem como função restaurar a fertilidade, de modo a permitir que ocorra o crescimento do tubo polínico e a conseqüente fecundação. Como no caso do alelo S^f em damasqueiro, que ocorre naturalmente ou surgem como resultado de mutações ou poliploidização.

Na cultivar ‘Rosa Mineira’, os alelos amplificados para os locos Pru-C₂/Pru-C₅ e Pru-C₂/PCE-R foram seqüenciados com cada um dos *primers* individualmente. Com Pru-C₂, conforme Beppu et al. (2002), foi encontrada 87% de identidade com o alelo Sⁱ; com Pru-C₅ 94% de identidade com o alelo Sⁱ e, de acordo com Tao et al. (2006 - BLAST), foi observada 88% de identidade com o alelo S^a; enquanto com o primer PCE-R foi verificado 90% de identidade com o alelo S^h (ZHANG et al., 2006; BEPPU et al., 2002- BLAST) e 82% de identidade com S^a (TAO et al., 2006- BLAST).

Nas cultivares ‘Santa Rita’ e ‘América’, os alelos amplificados com os *primers* Pru-C₂/Pru-C₅, foram seqüenciados com Pru-C₅. ‘Santa Rita’ apresentou 94% de identidade com o alelo S^h (BEPPU et al., 2002) e ‘América’ não apresentou identidade com nenhuma seqüência de S-RNases. Conforme se pode observar na tabela 10, a seqüência isolada da cultivar ‘América’ foi consideravelmente pequena, supondo-se insuficiente para uma análise adequada, devido ao grande número de regiões em *tandem* que há no genoma da ameixeira.

Para analisar alelos-S de cultivares de *P. salicina*, adequadas às condições climáticas de Israel, Sapir et al. (2004) testaram diversas combinações de *primers* nas cultivares ‘Wickson’, ‘Royal Zee’ e a polinizadora ‘Red Beaut’ e obtiveram a amplificação de alguns alelos com a combinação Pru-C₂/Pru-C₄R. Estes alelos foram

identificados como S¹, S³, S⁴, S⁵ e S⁶. A análise da seqüência do alelo S¹ revelou que ele é idêntico ao alelo S^a, isolado e analisado por Yamane et al. (1999).

Tabela 10 – Comparação entre as seqüências dos alelos-S, de *Prunus salicina*, obtidas por meio de seqüenciamento, com as seqüências depositadas no banco de dados de nucleotídeos no BLAST do NCBI. UFPel/Pelotas/2008

Cultivar	Primer	Tamanho Alelo (pb)	Acesso	Descrição	Referência
América	IZ1	500	<u>DQ646489.1</u>	100 % de identidade S ^c	Sapir e Goldway, 2006 - BLAST
		500	<u>AF432418.1</u>	99 % de identidade S ⁴	Sapir e Goldway, 2001 - BLAST
		500	<u>DQ646489.1</u>	99 % de identidade S ^c	Sapir e Goldway, 2006 - BLAST
Santa Rosa	IZ1	500	<u>AF432418.1</u>	99 % de identidade S ⁴	Sapir e Goldway, 2001 - BLAST
		500	<u>AB084149.1</u>	87 % de identidade S ⁱ	Beppu et al., 2002- BLAST
Rosa Mineira	Pru-C2	670	<u>AB084149.1</u>	94 % de identidade S ⁱ	Beppu et al., 2002 - BLAST
		800	<u>AB084149.1</u>	88 % de identidade S ^a	Tao et al., 2006 - BLAST
	Pru-C5	800	<u>AB252411.1</u>	90 % de identidade S ^h	Zhang et al., 2006 - BLAST
		420	<u>DQ512914.1</u>	90 % de identidade S ^h	Beppu et al., 2002 - BLAST
Rosa Mineira	PCE-R	420	<u>AB084148.1</u>	82 % de identidade S ^a	Tao et al., 2006 - BLAST
Santa Rita	Pru-C5	900	<u>AB084149.1</u>	94 % de identidade S ^h	Beppu et al., 2002 - BLAST
América	Pru-C5	500	*		

*baixa identidade com alelos-S

Nesta pesquisa, a amplificação usando os *primers* Pru-C₂/PCE-R na cultivar ‘Rosa Mineira’ mostrou dois fragmentos, um com 400 pb e outro com 500 pb, os quais podem ser comparados aos encontrados no estudo de Beppu et al. (2002), que fizeram uso do mesmo par de *primers*, e encontraram fragmentos com tamanho em torno de 470, 1540, 1170, 1290, 1420, 1120, 1230, 520 e 410 pb, aos quais

denominaram de S^a, S^b, S^c, S^d, S^e, S^f, S^g, S^h e Sⁱ, respectivamente. Os fragmentos com tamanho aproximado de 400 pb e 500pb, obtidos no presente trabalho, se assemelham a Sⁱ e a S^a, respectivamente.

Na amplificação da cultivar ‘Santa Rosa’, com os mesmos *primers*, se obteve dois alelos, 1500 pb e 1200 pb. O alelo com 1500 pb pode ser o mesmo alelo S^e obtido por Beppu et al. (2002), pois como o tamanho dos alelos é determinado pela comparação com o marcador, poderão ocorrer pequenas diferenças de visualização na estimativa do tamanho dos alelos.

Comparando as seqüências parciais, como também o tamanho dos alelos obtidos (Tabela 3), supõe-se que os alelos identificados nestas cultivares de *P. salicina* estudadas são, quando comparados os resultados com os de Sapir et al, (2004), S¹ em ‘Rosa Mineira’, S⁴ em ‘América’ e ‘Santa Rosa’ e, de acordo com Beppu et al. (2002), Sⁱ e S^a (S¹) em ‘Rosa Mineira’.

Os resultados obtidos sugerem que o alelo S^e, considerado um alelo de auto-compatibilidade, está presente na cultivar ‘Santa Rosa’, bem como nas outras cultivares que mostraram compartilhar do mesmo alelo. As comparações realizadas mostraram que alelo S^e pode ser o fragmento de tamanho maior na cultivar ‘Santa Rosa’, bem como nas demais cultivares, independente da combinação de *primers* usada. Mas é necessário que novos estudos sejam feitos, bem como, o aprimoramento das técnicas que permita uma determinação exata de toda a seqüência deste alelo-S. A partir deste estudo poderá se fazer uso deste conhecimento em programas de melhoramento de ameixeira, através da obtenção de novas cultivares por meio de técnicas de transformação genética ou mesmo pelo simples fato de fazer a combinação mais adequada entre planta produtora e planta polinizadora. Medidas estas que auxiliariam na redução de alguns dos problemas que limitam a produção desta frutífera.

4.2 Experimento 2 - Diferenciação genético-molecular de genótipos de ameixeira japonesa pela análise de locos microssatélites (SSR)

4.2.1 Amplificação dos locos SSR

Dentre os 13 locos microssatélites ou SSR testados (Tabela 4), cinco produziram bandas nítidas e de boa repetibilidade. Não se obteve produtos amplificados no genótipo ‘Rosa Mineira’ com os *primers* UDP 98407 e UDP 96019 e também, em ‘América’ com o *primer* UDP 96005 e, em ‘The First’ com UDP 96019. Um exemplo do padrão eletroforético obtido com *primers* SSR é apresentado na Figura 4. O número de alelos amplificados em cada genótipo e em cada loco foi de um ou dois, enquanto o número de perfis polimórficos variou de cinco a sete. Os *primers* UDP 96013 e UDP 98407 revelaram o maior número de polimorfismos, com sete alelos distintos amplificados em 11 genótipos. UDP 96019 amplificou seis alelos e UDP 96005 e UDP 96008 amplificaram cinco alelos. No total, os cinco locos avaliados revelaram um total de 30 polimorfismos.

De acordo com McCouch et. al. (2001), muitos estudos relatam diversidade alélica significativamente maior de marcadores microssatélites do que outros marcadores moleculares. O que justifica o seu uso para a diferenciação de cultivares que apresentam na sua constituição genética ancestrais em comum e por consequência, genótipos muito semelhantes. Para Borém; Caixeta (2006), variações nas regiões dos microssatélites resultam em grande número de alelos detectados por loco genético, apresentando elevado poder discriminatório. Por esse motivo, normalmente poucos locos garantem a completa diferenciação dos genótipos de interesse, o que é importante, considerando-se a necessidade de discriminação de cultivares geneticamente muito próximas, ou essencialmente derivadas.

Os dados de freqüência alélica estão apresentados na tabela 11. Os alelos receberam denominações simbólicas e foram analisados separadamente para cada loco. Em relação à análise de freqüência alélica, houve grande variação, onde a maior freqüência apresentada foi do alelo E (0,41), no loco UDP 96008; seguido por G (0,36) em UDP 96013; B e F (0,28) em UDP 96019; C, D e E (0,25); em UDP 96005; e, F (0,25) em UDP 98407.

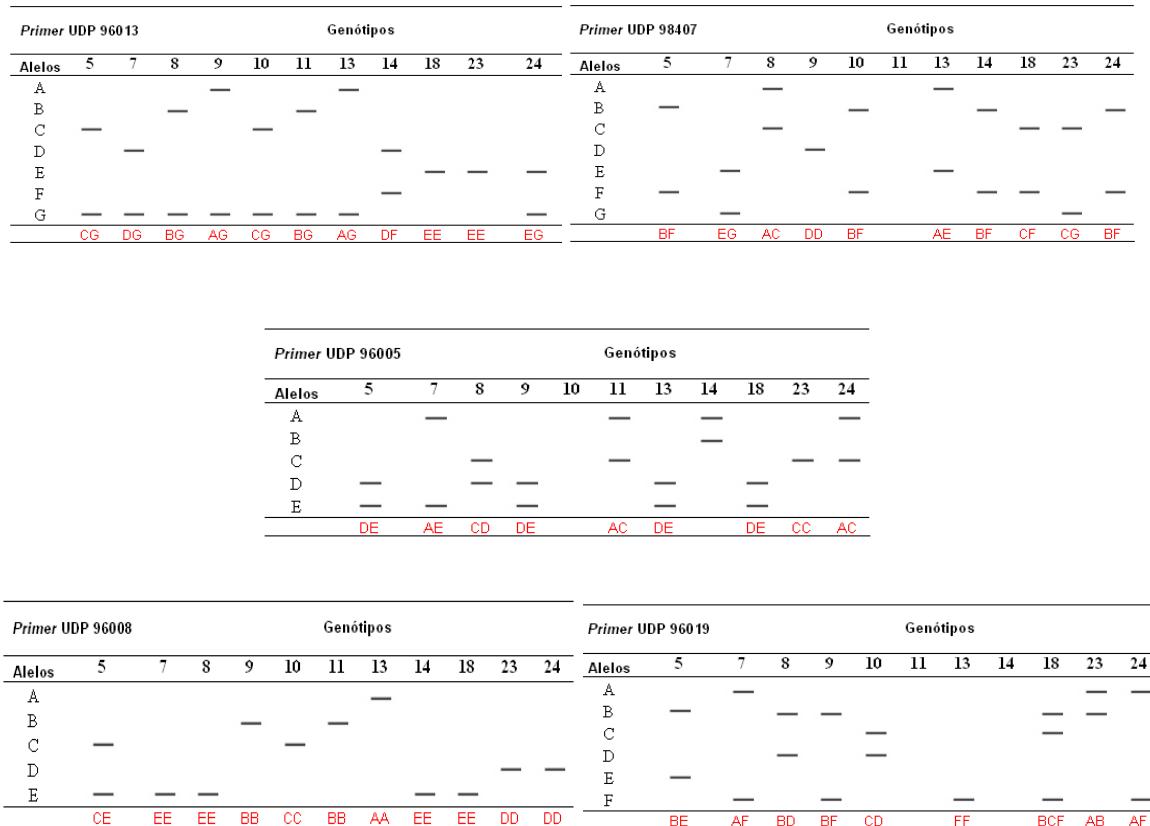


Figura 4 - Perfis eletroforéticos gerados por cinco locos SSR em 11 genótipos de ameixeira japonesa: 5-Santa Rosa, 7-Santa Rita, 8-Reubennel, 9-Pluma7, 10-América, 11-Rosa Mineira, 13-Amarelinha, 14-The First, 18-Harry Pickstone, 23-Gulfblaze (SP), 24-Gulfblaze (Guaíba).

Tabela 11 – Freqüência alélica de locos SSR, registrados em 11 genótipos de ameixeira japonesa. UFPel/Pelotas 2008

FREQUÊNCIA ALÉLICA

Loco	Alelos							
	Alelo A	Alelo B	Alelo C	Alelo D	Alelo E	Alelo F	Alelo G	
UDP 96013	0,09	0,09	0,09	0,09	0,23	0,05	0,36	
UDP 98407	0,10	0,20	0,15	0,10	0,10	0,25	0,10	
UDP 96019	0,17	0,28	0,11	0,11	0,06	0,28	-	
UDP 96005	0,20	0,05	0,25	0,25	0,25	-	-	
UDP 96008	0,09	0,18	0,14	0,18	0,41	-	-	

A freqüência com que um alelo aparece mostra o quanto pode ser útil para ser usado para distinguir os genótipos, logo um alelo muito freqüente, não é um bom parâmetro de diferenciação.

4.2.2 Análise genética dos locos SSR

Os cinco locos SSR foram utilizados para relacionar geneticamente as 11 cultivares. Uma matriz de similaridade genética foi elaborada com os dados produzidos pelos *primers* e a similaridade calculada pelo Coeficiente *Simple Matching* (Tabela 12). A partir dos dados desta matriz foi gerado um dendrograma (Figura 5). A Similaridade Genética Média (SGM) obtida foi igual a 0,6. Embora algumas das cultivares avaliadas possuam alguns dos progenitores em comum, a baixa similaridade registrada entre as mesmas já era esperado, uma vez que são genótipos originados de cruzamentos de diferentes espécies.

Tabela 12 – Similaridade genética de 11 genótipos de ameixeira japonesa, estimada pelo Coeficiente *Simple Matching*, a partir de marcadores de SSR. UFPel/Pelotas 2008

Genótipos	5	7	8	9	10	11	13	14	18	23	24
5 -	1.000										
7 -	0.567	1.000									
8 -	0.633	0.533	1.000								
9 -	0.667	0.633	0.633	1.000							
10 -	<u>0.800</u>	0.520	0.600	0.560	1.000						
11 -	0.471	0.647	<u>0.765</u>	0.647	0.667	1.000					
13 -	0.600	0.700	0.633	<u>0.800</u>	0.560	0.529	1.000				
14 -	0.625	0.667	0.500	0.459	0.684	0.529	0.417	1.000			
18 -	0.700	0.600	0.667	0.700	0.600	0.470	0.633	0.625	1.000		
23 -	0.500	0.600	0.667	0.567	0.480	0.647	0.500	0.500	0.667	1.000	
24 -	0.567	0.667	0.533	0.567	0.680	0.765	0.567	0.667	0.600	<u>0.733</u>	1.000

5-Santa Rosa, 7-Santa Rita, 8-Reubennel, 9-Pluma7, 10-América, 11-Rosa Mineira, 13-Amarelinha, 14-The First, 18-Harry Pickstone, 23-Gulfblaze (SP), 24-Gulfblaze (Guaíba). Valores sublinhados representam as maiores similaridades entre cultivares.

Conforme pode ser observado na tabela 12, as maiores similaridades entre cultivares foram verificadas entre ‘Santa Rosa’ e ‘América’ (80%) e entre as cultivares ‘Pluma 7’ e ‘Amarelinha’ (80%), seguido por ‘Reubennel’ e ‘Rosa Mineira’ (77%); ‘Gulfblaze’ (Clone proveniente de São Paulo) e ‘Gulfblaze’ (Clone proveniente de Guaíba) (73%). A relação de semelhança entre a matriz de similaridade e o agrupamento em dendrograma apresentou relativa similaridade (0,62), sendo um

indicativo de que o número de polimorfismos, revelados pelos cinco locos SSR, não suficientes para garantir um bom agrupamento das cultivares avaliadas.

O dendrograma gerado a partir dos marcadores obtidos com os *primers* SSR evidenciou a similaridade entre as cultivares e mostrou a formação de três grupos distintos (Figura 5). Em um destes agrupamentos estão as cultivares ‘Gulfblaze’ (Clone proveniente de São Paulo) e ‘Gulfblaze’ (Clone proveniente de Guaíba), que embora apresentem a mesma denominação, molecularmente verificou-se que são genótipos distintos, ou seja, que se trata de um caso de homonímia. Esta separação foi visualizada através da amplificação dos locos UDP 98407 e UDP 96019. Não se tem a informação a respeito dos progenitores destas cultivares, porém neste agrupamento elas estão reunidas juntamente com ‘Reubennel’ e ‘Rosa Mineira’, onde se sabe que ‘Reubennel’ é um híbrido de ‘Gaviota’ e ‘Methley’ x ‘Wickson’, segundo Griesbach (2007).

Outro agrupamento foi formado pelas cultivares ‘Santa Rosa’, ‘América’, ‘Pluma 7’, Amarelinha e ‘Harry Pickstone’. De acordo com dados da EMBRAPA (2005), ‘Santa Rosa’ é um híbrido das cultivares *P. salicina* x *P. munsoniana* x *P. americana* e ‘América’ é um híbrido de *P. salicina* x *P. munsoniana*, esta base de constituição genética comum entre as cultivares explica a relação de similaridade apresentada entre elas. Os progenitores de ‘Pluma 7’ e ‘Amarelinha’ não são descritos na literatura, porém ‘Harry Pickstone’, segundo Castro (2005), é derivada do cruzamento de ‘Methley’ x ‘Wickson’. Os progenitores do terceiro grupo formado, ‘Santa Rita’ e ‘The First’, também não foram encontrados descritos na literatura.

Através destes dados pode-se observar que houve polimorfismo em todos os genótipos, mostrando que a análise de locos SSR permite diferenciar de maneira segura os genótipos de ameixeira analisados. Resultados semelhantes foram obtidos Bianchi et al. (2004), os quais atribuíram o alto polimorfismo a presença de diferentes espécies na constituição das cultivares de ameixeira, as quais foram analisadas através de marcadores SSR, RAPD e AFLP. Já Ortiz et al. (1997) atribuem esta alta variabilidade genética observada em cultivares de ameixeira à auto-incompatibilidade que existe entre os diferentes genótipos.

A confiabilidade e poder da técnica de análise de SSR foi demonstrada por Sosinski et al. (2000), na identificação de diferenças em pessegueiros da cultivar ‘Springcrest’, onde SSR revelou polimorfismo suficiente para detectar a variabilidade genética entre plantas da mesma cultivar, porém originadas de três fontes

diferentes. O mesmo foi verificado por Venturi et al. (2002) em espécies do gênero *Prunus*. Esta técnica também tem sido utilizada com bastante sucesso em plantas de videira, na análise de *fingerprinting* de 74 cultivares (SILVESTRONI et al., 1997) e na verificação de casos de sinonímia e homonímia (FILIPPETTI et al., 1999), na herdabilidade de caracteres e estabilidade em diversas espécies frutíferas (CIPRIANI et al., 2000) e na identificação do sexo de mamão papaya (PARASNIS et al., 1999).

A diferenciação de cultivares com a técnica SSR tem sido demonstrada em diversos estudos, dentre eles, Aranzana et al. (2002) analisaram genótipos de pêssego com *primers* SSR, diferentes dos que se fez uso neste trabalho, mas obtiveram alto polimorfismo e conseguiram diferenciar 24 dos 25 genótipos que foram analisados. Mostrando com isto a alta precisão da técnica para a análise em questão. Na análise de ameixeiras, Bianchi et al. (2002) fizeram uso de 11 *primers* SSR e com cinco deles (UDP 96001, UDP 96008, UDP 96013, UDP 97403, UDP 98409) conseguiram distinguir as cultivares 'Settembre Rosa' e 'Autumn Giant', consideradas muito similares. Enquanto as cultivares de ameixeira européia, 'Empress' e 'Grossa di Felisio', mostraram perfis idênticos com todos os 11 *primers* SSR testados, porém resultados semelhantes foram obtidos por Pancaldi et al. (2000), supondo que as cultivares européias correspondem ao mesmo genótipo. Bianchi et al. (2002) também avaliaram as cultivares 'Santa Rosa', 'Santa Rita', 'Pluma 7' e 'América', as quais, mostraram agrupamento semelhante ao do presente estudo.

A técnica de SSR utilizada neste estudo permitiu a diferenciação entre as cultivares de ameixeiras analisadas, fazendo uso de poucos locos. Estes resultados permitem supor que esta técnica tende a ser um instrumento extremamente útil na caracterização de cultivares comercialmente difundidas e, complementar as análises morfofenológicas.

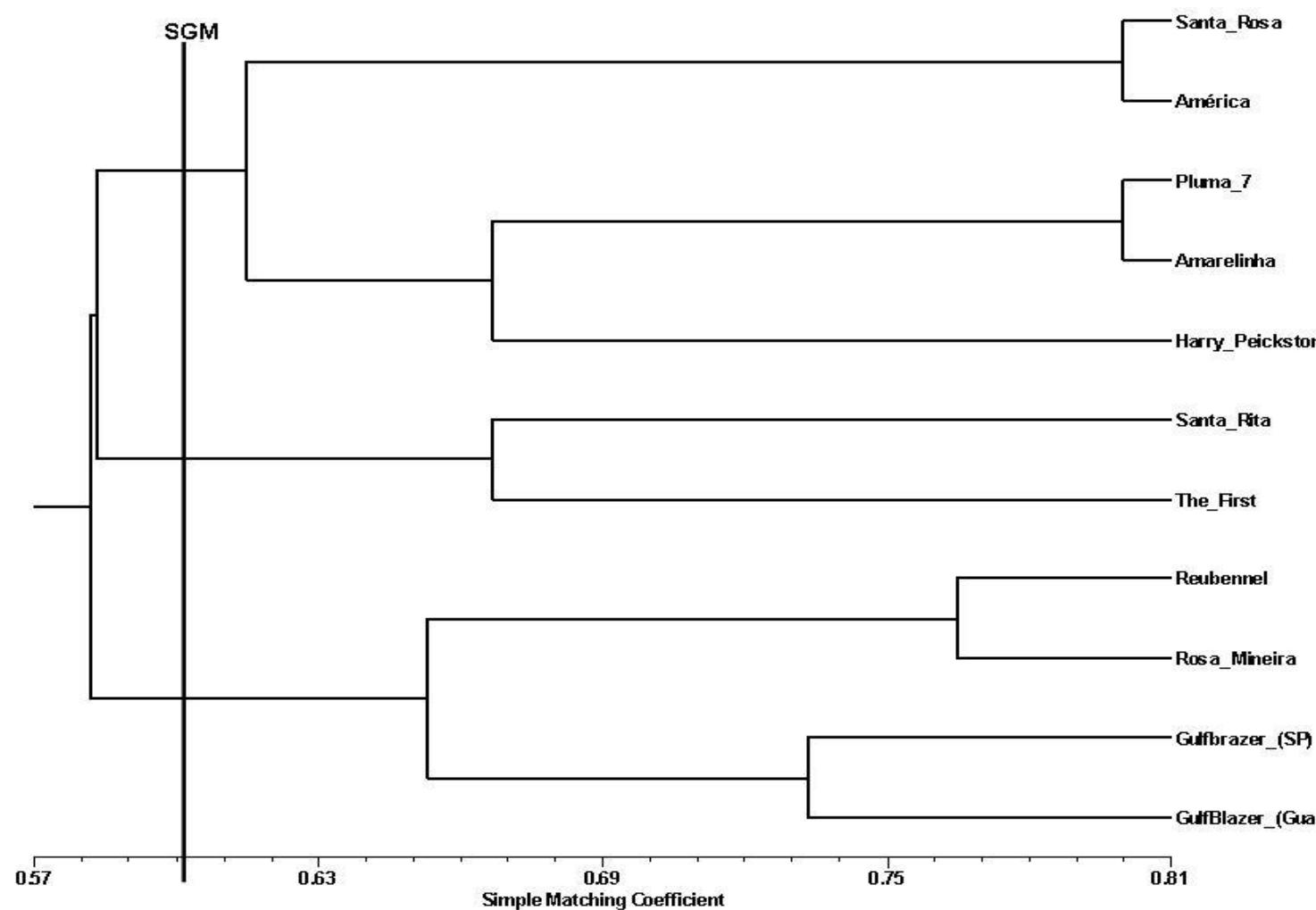


Figura 5 – Dendrograma de similaridade genética de 11 cultivares de *P. salicina*, gerado pelo método UPGMA, baseado na análise de marcadores cinco locos SSR. Similaridade Genética Média (SGM)= 0,6.

5 CONCLUSÕES

As condições de PCR utilizadas, bem como as combinações de *primers* utilizadas, permitem a efetiva caracterização de alelos-S nas cultivares de *P. salicina* estudadas.

O conhecimento dos alelos-S permite a escolha satisfatória de cultivares polinizadoras mais compatíveis com as cultivares produtoras.

O seqüenciamento dos alelos-S exige novos ensaios para a obtenção de seqüências mais exatas e completas.

Polimorfismo de cinco locos de SSR possibilita uma clara identificação em genótipos de ameixeira japonesa e resolver casos de homonímias.

Polimorfismos de apenas cinco locos de SSR não são suficientes para obter uma boa estimativa da variabilidade genética e análise de agrupamento em ameixeira japonesa.

6 REFERÊNCIAS

ABF - ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2006. 136p

ARANZANA, M.J.; GARCIA-MAS, J.; CARBO, J.; ARUS, P. Development and variability analysis of Microsatellite markers in peach. **Plant Breeding**, Spain v.121, p. 87–92, 2002.

ARESHCHENKOVA, T., GANAL, M.W. Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions. **Genome**, Canada. Vol.42, p.536–544. 1999.

BARBOSA, W. **Gulfblaze**: nova opção de ameixa para o Estado de São Paulo. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <<http://www.infobibos.com/Artigos/Ameixa/Ameixa.htm>>. Acesso em: 20/5/2008.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver stainingof DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.196, p.80-83, 1991.

BEPPU, K.; YAMANE, H.; YAEGAKI, H.; YAMAGUCHI, M.; KATAOKA, I.; TAO, R. Diversity of S-RNase genes and S-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, United Kingdom, v.77, n.6, p.658-664, 2002.

BIANCHI, V.J.; VENTURI, S.; FACHINELLO, J.C.; TARTARINI, S.; SANSAVINI, S. I marcatori AFLP e SSR, rivolutivi nella identificazione genetica delle varietà di susino. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, n.4, p.83-87, 2002.

BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W. et al.. Caracterização molecular de cultivares de pêssego e nectarina com microssatélites. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.3, p.490-493, 2004.

BLAST/NCBI – Disponível: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acessado: 20/03/2008

BORÉM, A., CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374p.

- BOSKOVIC, R; TOBUTT, K.R. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. **Euphytica**, Netherlands, v.90, p.245-250, 1996.
- BROOTHAERTS, W.; JANSSENS, G.A.; PROOST, P.; BROEKAERT, W.F. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v.27, p.499-511, 1995.
- BRUCKNER, C.H.; SUASSUMA, T.M.F.; RÊGO, M.M.; NUNES, E.S. **Auto-incompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético** – Cap. 13. EMBRAPA, 2006.
- CALLEN DF, THOMPSON AD, SHEN Y, PHILLIPS HA, RICHARDS HI, MULLEY JC, and SUTHERLAND GR. Incidence and origin of “null alleles” in the“AC” microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, USA, v.52, p.922-927, 1993.
- CASTRO, L.A.S. **Ameixa produção**. Pelotas: Embrapa-SPI, 2003. 115p. (Frutas do Brasil; 43).
- CHAGAS, E.A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; DALL`ORTO, F.A.C. **Aspectos técnicos do cultivo da ameixeira**. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/ameixeira/index.htm>. Acessado em: 08/02/2007.
- CIPRIANI, G., LOT, G., HUANG, W.-G., MARRAZZO, M.T., PETERLUNGER, E., e TESTOLIN, R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): Isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg. v.99, p.65–72, 1999.
- DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. Berlin, 2000. 320p.
- DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin: Springer, 1997. 230p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, p.13-15, 1991.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Clima Temperado - **Zoneamento Agroclimático para Ameixeira no Rio Grande do Sul – DOC 151**, Pelotas/RS, 2005.
- ETIENNE, C. et al. Isolation and characterization of six peach cDNAs encoding key proteins in organic acid metabolism and solute accumulation: involvement in regulating peach fruit acidity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.114, n.2, p.259-270, 2002.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA- CENARGEN, 1998. 220 p.

FILIPPETTI, I.; INTRIERI, C.; SILVESTRONI, O. Individuazione di omonimie e di sinonimie in alcune cultivar di *Vitis vinifera* attraverso metodi ampelografici e analisi Del DNA a mezzo di microsatelliti. **Rivista di Frutticoltura**. Bologna, n.7/8, p.79-84, 1999.

GOULAO, L.; MONTE-CORVO, L.; OLIVEIRA, C.M. Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: Amplified fragment length polymorphisms and inter-simple sequence repeats. **Journal American Society Horticulturae Science**, Alexandria, v.126, n.1, p.72-77. 2001.

GRIESBACH J. Growing Temperate Fruit Trees in Kenya. **World Agroforestry Centre**, Nairobi. 2007. 128pp.

HARING, V.; GRAY, J.E.; McCLURE, A. Self-incompatibility: a self-recognition system in plants. **Science**, Washington, USA, v.250, p.937-941, 1990.

HESLOP-HARRISON, J. Self-incompatibility: phenomenology and physiology. Proceedings of the Royal Society of London B, v.218, p.371-395, 1983. IBRAF, Estatísticas Instituto Brasileiro de Frutas Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/> Acessado 20/06/2008.

HU, J., CHEN, J., GULYA, T.J. e MILLER, J.F. TRAP markers for a sunflower downy mildew resistance gene from a new *Helianthus annuus* source, PI468435. Proc. 16th Int. **Sunflower Conference**. Aug. 29-Sept. 2, Fargo, ND, USA. pp. 623-629. 2004

HURTADO, M.A.; ROMERO, C.; VILANOVA, S.; ABBOTT, A.G.; LLÁCER, G.; BADENES, M.L. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.), and mapping of PPV (sharka) resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg. V.105, p.182-191, 2002.

IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas, estatísticas. Disponível em : <http://www.ibraf.org.br/>. Acessado em: 20/06/2008.

ISHIMIZU, T.; ENDO, T.; YAMAGUCHI-KABATA, Y.; MAKAMURA, K.T.; SAKIYAMA, F.; NORIOKA, S. Identification of regions in which positive selection may operate in S-RNase of Rosaceae: implication for S-allele-specific recognition sites in S-RNase. **FEBS Letters**, Heidelberg, v.440, p.337-342, 1998.

ISHIMIZU, T.; INOUE, K.; SHIMONAKA, M.; SAITO, T.; TERAI, O.; NORIOKA, S. PCR-based method for identifying the S- genotypes of Japanese pear cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.98, p.961-967, 1999.

JANSSENS, G.A.; GODERRIS, I.G.; BROEKAERT, W.; BROOTHAERTS, W. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg. V.91, p.691-698, 1995.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. Edição 11. São Paulo: Nacional, 1993. 777p.

JOOBEUR, T.; PERIAM, N.; De VICENTE, M.C.; KING, G.J.; ARÚS, P. Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers. **Genome**, Ontario, v.43, p.649–655, 2000.

KAUFMANN, H.; KIRCH, H.; WEMMER, T. Sporophytic and gametophytic self-incompatibility. In: CRESTI, M.; TIEZZI, A. **Sexual plant reproduction**. Berlin: Springer, p.115-125, 1992.

LEWIS, D. Gametophytic-sporophytic incompatibility. In: WILLIAMS, E.G.; CLARKE, A.E.; KNOX, R.B. **Advances in cellular and molecular biology of plants: genetic control of self incompatibility and reproductive development in flowering plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v.2, p.88-101, 1994.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscleaction gene. **Annual Journal Human Genetics**. Boston, v.44, n.3, p.397-401, 1989.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; RUBIO, M.; DICENTA, F.; GRADZIEL, T.M.; SOZZI; G.O. Application of Recent Biotechnologies to *Prunus* Tree Crop Genetic Improvement. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, Chile. v.32, p.73-96, 2005.

MATSUMOTO, S.; KITAHARA, K.; KOMORI, S.; SOEJIMA, J. A new S-allele in apple, 'Sg' and its similarity to the 'Sf' allele from 'Fuji'. **HortScience**, Alexandria, v.34, p.708-710, 1999.

MCCOUCH, S.R.; TEMNYKH, S.; LUKASHOVA, A.; COBURN, J.; DECLERCK, G.; CARTINHOUR, S.; HARRINGTON, S.; THOMSON, M.; SEPTININGSI, E.; SEMON M.; MONCADA, P.; JIMING, L. Microsatellite markers in rice: Abundance, diversity and applications. In: **Rice Genetics IV**. IRRI. Manila, Philippines, p.117-135, 2001.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 17-28.1998.

MNEJJA, M. J.; GARCIA-MAS, W.; HOWAD, M. L.; BADENES; ARUS, P. Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. **Molecular Ecology**. Oxford, v.4, p.163–165. 2004.

MOTA, M., OLIVEIRA, C. M. **Identificação de alelos S na pereira 'Rocha' e determinação da compatibilidade entre cultivares**, 2005. Disponível em: <<http://www.isa.utl.pt/files/pub/id/Mota Oliveira 2005 ActaPortHort1.pdf>> Acessado em: 14 de maio, 2007.

NEWBIGIN, E.; ANDERSON, M.A.; CLARKE, A.E. Gametophytic self-incompatibility systems. **The Plant Cell**, Rockville USA, v.5, p.1315-1324, 1993.

ORTIZ, A.; RENAUD, R.; CALZADA, I.; RITTER, E. Analysis of plum cultivars with RAPD markers. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.72, p.1-9. 1997.

PANCALDI, M.; VINATZER, B.; SANSAVINI, S. Utilità delle analisi molecolari per risolvere li sinonimie nel susino. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, n.7/8, p.67-72. 2000.

- PARASNIS, A. S. Microsatellite (GATA)_n revels sex-especific differences in papaya. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg. V.99, p.1047-1052, 1999.
- PORTOCARRERO, M.A. Um setor organizado. **Anuário Brasileiro da Fruticultura**, Editora Gazeta, Santa Cruz do Sul, p.13, 2005.
- POWELL, W., G. MACHRAY, e J. PROVAN. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science**, Oxford, v.1, p.215-222, 1996.
- RASEIRA, M.C.B. Polinização. In: CASTRO, L.A.S. Ameixa/Produção, EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas, RS) – Brasília: EMBRAPA **Informação Tecnológica**, p.30-33, 2003.
- ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. ed. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, p. 329-380, 1998.
- ROHLF, J.F. **NTSYS – pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis System**. Version 2.1. Setauket. NY: Exeter Software, 2000. 38p.
- SAKURAI, K.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. Self- incompatibility alleles of apple cultivars and advanced selection. **HortScience**, Alexandria, v.35, p.116-119, 2000.
- SANSAVINI, S. Biotecnologie frutticole: le nuove frontiere delle ricerche per il miglioramento genetico e la propagazione delle piante da frutto. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, n.5, p.75-81, 1998.
- 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.
- SASSA, H.; NISHIO, T.; KOWYAMA, Y.; HIRANO, H.; KOBA, T.; IKEHASHI, H. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.250, p.547–557, 1996.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. e DALL'AGNOL, M. Self-Incompatibility In Plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p.1083-1090, 2002.
- SEGANFREDO, R.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. Influência do ácido indolbutírico e de épocas de coleta de estacas no enraizamento de cultivares de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.1, n.1, p.40-42, 1995.
- SILVESTRONI, O. FILIPPETTI, I.; INTRIEREI, C. I microsatellite applicati allá selezione clonale della vite. In: SANSAVINI S.; PANCALDI, M. Riconoscimento e rispondenza genetica delle peante da frutto con tecniche di *fingerprinting*. **Atti del Convegno AGRO-BIO-FRUT**, Cesena, p.55-63, 1997.
- SOKAL, R.R. and SNEATH, P.H.A. **Principles of Numeric Taxonomy**. W.H. Freeman, San Francisco, 1963.

SOSINSKI, B.; GANNAVARAPU, M.; HAGER, L.D. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, n.101, p.421-428, 2000.

STEFENON. V. M.; NODARI, R. O. Marcadores moleculares no melhoramento da Araucária. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, Distrito Federal, vol.31, p.95-99, 2003.

STEPHAN W., S. CHO. Possible role of natural selection in formation of tandem-repetitive noncoding DNA. **Genetics**, USA, vol.136, p.333-341, 1994.

SUTHERLAND, B.G.; ROBBINS, T.P.; TOBUTT, K.R. Primers amplifying a range of *Prunus* S-alleles. **Plant Breeding**, Oxford v.123, p.582-584, 2004.

TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A. Self-Incompatibility in Plants. **Annual Review of plant Biology**, Palo Alto CA, USA, v.6, p.467-489, 2005.

TAMURA, M.; USHIJIMA, K.; SASSA, H.; HIRANO, H.; TAO, R.; GRADZIEL, T. M.; DANDEKAR, A.M. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele specific PCR analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg. V.101, p.344-349, 2000.

TAO, R.; YAMANE, H.; SASA, H.; MORI, H.; GRANDZIEL, T.M.; SUGIURA,A. Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.38, p.304-315, 1997.

TAO, R.; YAMANE, H.; e 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.

TAO, R. HABU, T.; NAMBA, A.; YAMANE, H. Inheritance of S^f-RNase in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. **Theoretical and applied Genetics**, Heidelberg , v.105, p.222-228, 2002a.

TAO, R. HABU, T.; YAMANE, H. e SUGIURA, A. Characterization and cDNA cloning for S^f-RNase, a molecular marker for self-incompatibility, in Japanese apricot (*Prunus mume*). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.71, p.595-600, 2002b.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.24, p.4876-4882, 1997.

USHIJIMA, K.; SASSA, H.; TAO R.; YAMANE, H.; DANDEKAR, A.M.; GRADZIEL, T.M.; HIRANO, H. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the SRNases in Rosaceae. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.260, p.261–268, 1998.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V. et al.. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.32, no.3, p.415-420, 2002.

VENTURI, S.; BIANCHI, V.J.; SANSAVINI, S. Aggiornamento nelle tecnologie del fingerprinting: AFLP e altri marcatori ad alta qualitá polimorfica. **Italus Hortus**, Roma, v.9, n.3, p.25-26, 2002.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can be Typed Using the Polymerase Chain-Reaction. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v.44, n.3, p.388-396, 1989.

WHEELER, M.J.; ARMSTRONG, S.A.; FRANKLIN-TONG, V.E.; FRANKLIN, F.C.H. Genomic organization of the *Papaver rhoeas* self-incompatibility S1 locus. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster , v.54, p.131–139, 2003.

YAEGAKI, H.; SHIMADA, T.; MORIGUCHI, T.; HAYAMA, H.; HAJI, T.; YAMAGUCHI, M. Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v.13, p.251-257, 2001.

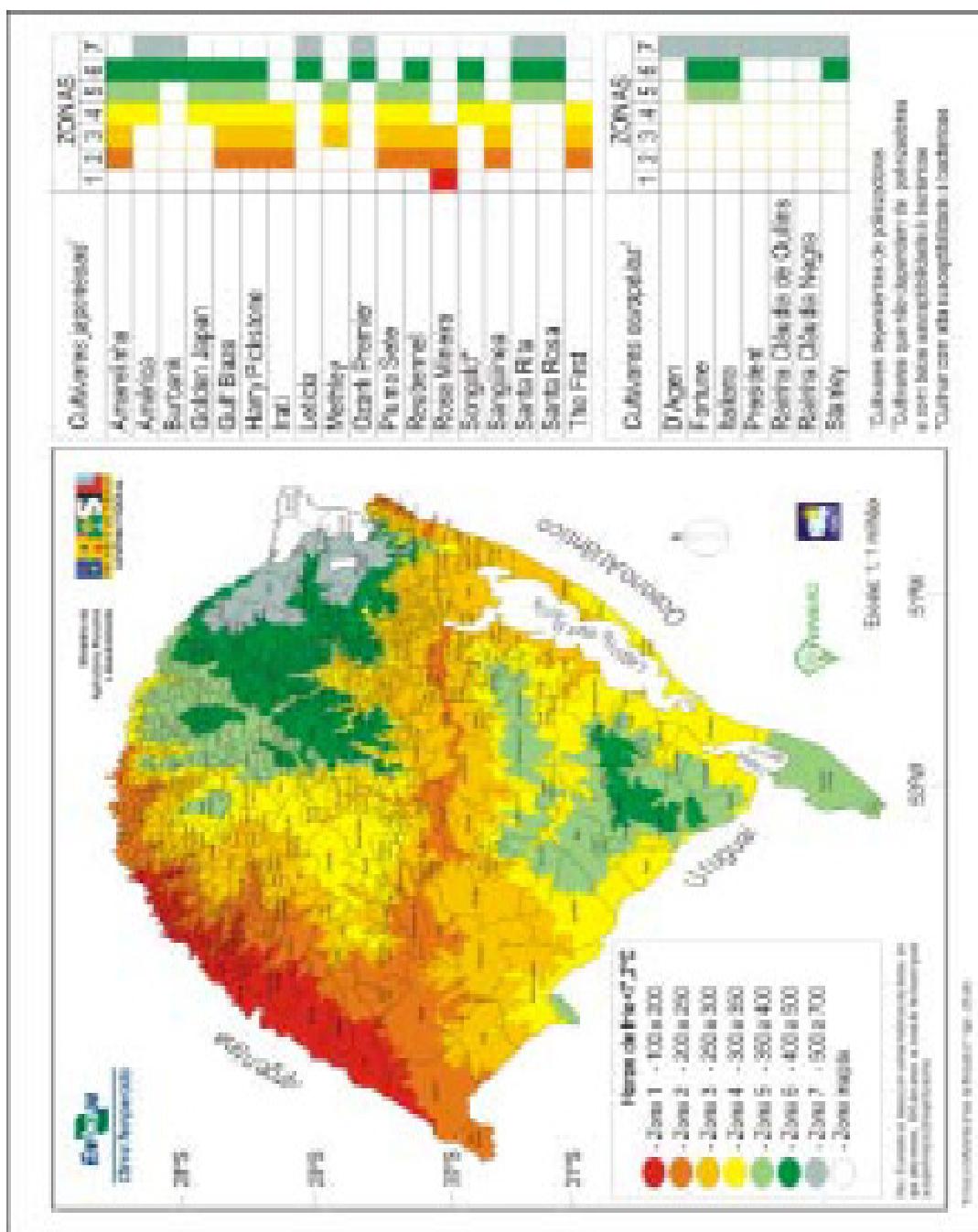
YAMANE, H.; TAO, R.; SUGIURA, A. Identification and cDNA cloning for S-RNases in self-incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Sordum). **Plant Biotechnology**, Bristol, v.16, p.389-396, 1999.

YAMANE, H.; TAO, R; SUGIURA, A.; HAUCK, N.R.; IEZZONI, A.F. Identification and characterization of S-RNases in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). **Journal of the American Society for Horticulture Science**, Mount Vermon, vol.126, p.661–667, 2001.

ZIMMER, P. D. (Org.); OLIVEIRA, A. C. de (Org.); MALONE, G.(Org.). **Ferramentas da Biotecnologia no melhoramento Genético Vegetal**. 1. ed. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2005. v.1. 157 p.

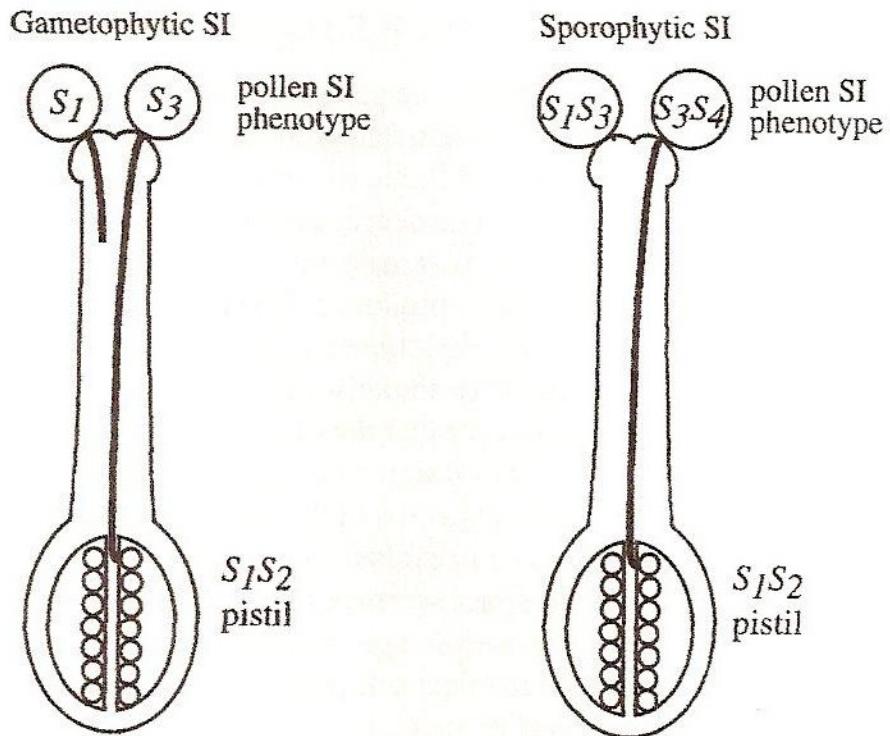
APÊNDICES

APÊNDICE A – Zoneamento agroclimático para ameixeira no Rio Grande do Sul.
EMBRAPA/2005.



ANEXOS

Anexo A -



Anexo A - Ilustração da base genética da auto-incompatibilidade (AI) gametofítica e esporofítica. O cruzamento entre uma planta feminina S_1S_2 e uma planta masculina S_1S_3 seria compatível se a espécie apresentasse o sistema gametofítico, mas seria incompatível no caso do sistema esporofítico. No sistema gametofítico, o fenótipo dos grãos de pólen S_1S_3 serão S_1 e S_3 , respectivamente. O pólen portando o alelo S_1 é rejeitado, pois encontra no pistilo da planta S_1S_2 um alelo idêntico, porém o pólen S_3 é capaz de efetuar a fertilização (S_1S_3 , S_2S_3). Já no sistema esporofítico os grãos de pólen S_1 e S_3 se comportam como se portassem ambos os alelos (S_1 e S_3), assim, estando presente o alelo S_1 no pistilo, o pólen com fenótipo S_1S_3 não poderá efetuar a fertilização. (Adaptado de ZANETTINI, 2003; McCUBBIN; KAO, 2000).

Anexo B - Seqüências parciais de nucleotídeos avaliadas através do software Vector e ClustalX, tamanho dos alelos e das moléculas seqüenciadas (pb). UFPel/Pelotas 2008

Cultivar	Primer	Alelo (pb)	Seqüência (pb)	Seqüência
América	IZ1	460	448	CCACCTATTCTACCGTTGACAAAAAGAAGAAGAAGAAGCGCAATAGAAAATTACCT-TCAAATGTATAAATTCTCTTAAACATT-T-ATCCATAATATTTCAAAAACCTAC-AAGGC-ATATAATTAAAAAAACTAAAAGATCCTGAAAATCAAATATTGGACTAAAA-CATTTATTGA-GTCCATCAAACACAACCTTGAT-CCTCTCCATATCTCAATTACTAATGATTAGCAAGAAAA-TAGCTTAAATT-AATAA-TAAAGGGTATTTAGGAATAATGGTGGGTGGAAAGATAAGATTGTATTTTCAAATTACATGGTAGTGGGAAAATAGACATTAACCTGCAAACAA GCATAGAAAAGTTACCGTTCAAATGTATAAATTCTCTTAAACATTTCATAATATTTCAAAAACATACAAGGCATATAATTAAAAAC-TAAAAGATCCTGAAAATCAAATATTGGACTAAAACATTATTGAGTCATCAAACACAACCTGATCCTCTCCATATCTCAATTACTAATGATTGTATTTTAC-ATGG-TG-AGTGGGAAAATAGGAC-ATGGGGT-GGAAATAACAGC-ACTCTTATAAA-AATATAAGC-GATGT-CAACGGAGTCTAGCATAGTGAAAATGACATTAACTGCAAACAAACATGTCTCGCTTACTGTTGCACGTCAGAGGGNGTATCTTCAGTTGCTGATTTAATGGGTGATGCTATGTCGAGTACTTCCATGTTGTGCGGATGTGTACGATTGAAGCGTTTAAGGATCTCTGTAATATTGTGTGATTCCACATTGATTGTGATCGCTGGAAGTATTGCATTATGTTAATGTATCCGTTCTGGAACATGTACCATGTTGTTCCATTCTGCCTCCAAAACTTGTATCATTGCCACTTCACGCTCTGCCAAGACATACTTACAGTCTGGATCGTAAATAAGGAAACTCGACTCTCGTCTATATATCCTGGAGTTGTAATCTGCAACGAAGGAGGGGTGCCTTGAGTTAAACTGCTTAAATATTGATACTATGTCGGAGTAGTGTCCATGTTGTGCGACTTGGTACAGATTGAACGCATTATTAAGGATATTGGAATATTGAACAAATGTTCACTGCTGACANAAACCCTTTGANTGCACTTCCCCTGGTNAAGACATCTCAGTCTGGATCGCTAAATAAGGAAACTGAGGCATCCAAGTATACATATTACGAGAAAAAGTAGAAA GTGCNGATCAGGTAAAGCACGAAGGACGGGTGTCCCAGTTGNTGTTAATGGGTGATCTATGTCGAGCTACTTCCGTATGTGTCGGATGTACG AAAAAATTGCTTGCATTTCACCGTTGGGNTAAGATATCTCAGTTGGCATCGCAATGGGNAGTACTTGAGGACATCAGCAATAGGAAACTGAGGCATCCAAGTCAAGCAATATAGATATTTTGTTCCCGGGCCCCGTCGGGGGGTTTCC
Santa Rosa	IZ1	460	414	CAATTACTAATGATTAGCAAAGAAAAATAGCTTGAATTAAATT-AAAG-GGTATTTAGGAA-TAA-TGGTGGGTGGAAAGATAAGATTGTATTTT--CAAATTAC-ATGG-TG-AGTGGGAAAATAGGAC-ATGGGGT-GGAAATAACAGC-ACTCTTATAAA-AATATAAGC-GATGT-CAACGGAGTCTAGCATAGTGAAAATGACATTAACTGCAAACAAACATGTCTCGCTTACTGTTGCACGTCAGAGGGNGTATCTTCAGTTGCTGATTTAATGGGTGATGCTATGTCGAGTACTTCCATGTTGTGCGGATGTGTACGATTGAAGCGTTTAAGGATCTCTGTAATATTGTGTGATTCCACATTGATTGTGATCGCTGGAAGTATTGCATTATGTTAATGTATCCGTTCTGGAACATGTACCATGTTGTTCCATTCTGCCTCCAAAACTTGTATCATTGCCACTTCACGCTCTGCCAAGACATACTTACAGTCTGGATCGTAAATAAGGAAACTCGACTCTCGTCTATATATCCTGGAGTTGTAATCTGCAACGAAGGAGGGGTGCCTTGAGTTAAACTGCTTAAATATTGATACTATGTCGGAGTAGTGTCCATGTTGTGCGACTTGGTACAGATTGAACGCATTATTAAGGATATTGGAATATTGAACAAATGTTCACTGCTGACANAAACCCTTTGANTGCACTTCCCCTGGTNAAGACATCTCAGTCTGGATCGCTAAATAAGGAAACTGAGGCATCCAAGTATACATATTACGAGAAAAAGTAGAAA GTGCNGATCAGGTAAAGCACGAAGGACGGGTGTCCCAGTTGNTGTTAATGGGTGATCTATGTCGAGCTACTTCCGTATGTGTCGGATGTACG AAAAAATTGCTTGCATTTCACCGTTGGGNTAAGATATCTCAGTTGGCATCGCAATGGGNAGTACTTGAGGACATCAGCAATAGGAAACTGAGGCATCCAAGTCAAGCAATATAGATATTTTGTTCCCGGGCCCCGTCGGGGGGTTTCC
Rosa Mineira	Pru-C2	600	306	CGGATGTGTACGATTGAAGCGTTTAAGGATCTCTGTAATATTGTGTGATTCCACATTGATTGTGATCGCTGGAAGTATTGCATTATGTTAATGTATCCGTTCTGGAACATGTACCATGTTGTTCCATTCTGCCTCCAAAACTTGTATCATTGCCACTTCACGCTCTGCCAAGACATACTTACAGTCTGGATCGTAAATAAGGAAACTCGACTCTCGTCTATATATCCTGGAGTTGTAATCTGCAACGAAGGAGGGGTGCCTTGAGTTAAACTGCTTAAATATTGATACTATGTCGGAGTAGTGTCCATGTTGTGCGACTTGGTACAGATTGAACGCATTATTAAGGATATTGGAATATTGAACAAATGTTCACTGCTGACANAAACCCTTTGANTGCACTTCCCCTGGTNAAGACATCTCAGTCTGGATCGCTAAATAAGGAAACTGAGGCATCCAAGTATACATATTACGAGAAAAAGTAGAAA GTGCNGATCAGGTAAAGCACGAAGGACGGGTGTCCCAGTTGNTGTTAATGGGTGATCTATGTCGAGCTACTTCCGTATGTGTCGGATGTACG AAAAAATTGCTTGCATTTCACCGTTGGGNTAAGATATCTCAGTTGGCATCGCAATGGGNAGTACTTGAGGACATCAGCAATAGGAAACTGAGGCATCCAAGTCAAGCAATATAGATATTTTGTTCCCGGGCCCCGTCGGGGGGTTTCC
Rosa Mineira	Pru-C5	800	200	ACTCTCGTCTATATATCCTGGAGTTGTAATCTGCAACGAAGGAGGGGTGCCTTGAGTTAAACTGCTTAAATATTGATACTATGTCGGAGTAGTGTCCATGTTGTGCGACTTGGTACAGATTGAACGCATTATTAAGGATATTGGAATATTGAACAAATGTTCACTGCTGACANAAACCCTTTGANTGCACTTCCCCTGGTNAAGACATCTCAGTCTGGATCGCTAAATAAGGAAACTGAGGCATCCAAGTATACATATTACGAGAAAAAGTAGAAA GTGCNGATCAGGTAAAGCACGAAGGACGGGTGTCCCAGTTGNTGTTAATGGGTGATCTATGTCGAGCTACTTCCGTATGTGTCGGATGTACG AAAAAATTGCTTGCATTTCACCGTTGGGNTAAGATATCTCAGTTGGCATCGCAATGGGNAGTACTTGAGGACATCAGCAATAGGAAACTGAGGCATCCAAGTCAAGCAATATAGATATTTTGTTCCCGGGCCCCGTCGGGGGGTTTCC
Rosa Mineira	PCE-R	500	110	AAACCCTTTGANTGCACTTCCCCTGGTNAAGACATCTCAGTCTGGATCGCTAAATAAGGAAACTGAGGCATCCAAGTATACATATTACGAGAAAAAGTAGAAA ATACATATTACGAGAAAAAGTAGAAA GTGCNGATCAGGTAAAGCACGAAGGACGGGTGTCCCAGTTGNTGTTAATGGGTGATCTATGTCGAGCTACTTCCGTATGTGTCGGATGTACG AAAAAATTGCTTGCATTTCACCGTTGGGNTAAGATATCTCAGTTGGCATCGCAATGGGNAGTACTTGAGGACATCAGCAATAGGAAACTGAGGCATCCAAGTCAAGCAATATAGATATTTTGTTCCCGGGCCCCGTCGGGGGGTTTCC
Santa Rita	Pru-C5	800	96	GTGCNGATCAGGTAAAGCACGAAGGACGGGTGTCCCAGTTGNTGTTAATGGGTGATCTATGTCGAGCTACTTCCGTATGTGTCGGATGTACG TCGGATGTGTACG AAAAAATTGCTTGCATTTCACCGTTGGGNTAAGATATCTCAGTTGGCATCGCAATGGGNAGTACTTGAGGACATCAGCAATAGGAAACTGAGGCATCCAAGTCAAGCAATATAGATATTTTGTTCCCGGGCCCCGTCGGGGGGTTTCC
Rosa Mineira	PCE-R	500	110	AAAAAATTGCTTGCATTTCACCGTTGGGNTAAGATATCTCAGTTGGCATCGCAATGGGNAGTACTTGAGGACATCAGCAATAGGAAACTGAGGCATCCAAGTCAAGCAATATAGATATTTTGTTCCCGGGCCCCGTCGGGGGGTTTCC
América	Pru-C5	1500	30	TTCCCGGGCCCCGTCGGGGGGGGTTTCC

