

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Vegetal



DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICO-FISIOLÓGICA E MOLECULAR DA
COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA DE AMEIXEIRAS JAPONESA**

Daniela De Conti

Pelotas, fevereiro de 2012

DANIELA DE CONTI

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 Fisiologia Vegetal.

Orientador: Valmor João Bianchi

Co-orientadores: José Antonio Peters

Maria do Carmo Bassols Raseira

Pelotas, fevereiro de 2012.

Catálogo na publicação:
Maria Fernanda Monte Borges
CRB10/1011

D296c De Conti, Daniela
Caracterização anatômico-fisiológica e molecular da compatibilidade reprodutiva de ameixas japonesa / Daniela De Conti ; orientador Valmor João Bianchi ; co-orientadores José Antonio Peters, Maria do Carmo Bassols Raseira. - Pelotas, 2012.
66 f.

Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pelotas.

1. Prunus salicina 2. Autoincompatibilidade gametofítica 3. Cruzamentos dirigidos 4. Alelos-S 5. PCR 6. Ameixas I. Bianchi, Valmor João (orient.) II. Peters, José Antonio (co-orient.) III. Raseira, Maria do Carmo (co-orient.) IV. Título.

CDD 581.1
634.22

Banca Examinadora:

Dr. Valmor João Bianchi (Presidente)

Dr. Luciano Carlos da Maia (Titular)

Dra. Juliana de Magalhães Bandeira (Titular)

Dra. Elizete Beatriz Radmann (Suplente)

Me pregunto si las estrellas se iluminan
con el fin de que algún día cada uno pueda encontrar la suya
(El Principito)

Aos meus pais Anselmo e Marilene,

Dedico

Aos meus irmãos Evandro, Marilei e Cristiane,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela coragem e perseverança para seguir em frente e acreditar que é possível;

Aos meus queridos pais Anselmo e Marilene que não mediram esforços e amor, sempre confiando na minha capacidade e vontade de vencer, os quais mesmo distantes souberam dosar de maneira ímpar saudade e compreensão para que eu pudesse chegar até aqui;

Aos meus irmãos Evandro, Marilei e Cristiane pelo apoio e amizade, sempre me incentivando e vibrando a cada conquista. Em especial agradeço a minha irmã Cristiane e meu cunhado Márcio pelo lindo presente que me deram meu sobrinho e afilhado Davi, que trouxe mais alegria em nossas vidas;

Ao meu querido amigo, vizinho e namorado Wagner, que se fez presente nesta etapa da minha vida, mostrando que tudo é possível quando se tem fé e determinação. Obrigada por ser meu “aluno” quando precisava de alguém que me ouvisse;

Ao meu orientador Prof. Valmor João Bianchi pelos conhecimentos transmitidos durante este período de convivência, os quais foram de grande valia para a minha formação;

Aos meus co-orientadores Dr^a Maria do Carmo Bassols Raseira e Prof. José Antônio Peters pela atenção, confiança e ensinamentos durante a realização desta etapa;

Aos professores do Curso de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, pelo grande aprendizado e ensinamentos transmitidos;

A todos os colegas do curso de Mestrado, “os 10+” pela agradável convivência, amizade e companheirismo;

Aos meus grandes amigos e irmãos Letícia, Cristina e Júnior! Obrigada por fazerem parte da minha vida, sendo nos momentos de estudos, como também nos momentos de descontração! Vou levar vocês para sempre em meu coração;

Aos meus vizinhos e amigos Ângelo e Luty pela amizade e belos momentos compartilhados;

Aos amigos Tiago, Gérson e Ricardo pelos momentos de descontração, risadas e jantas! Obrigada por tudo;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pelo apoio e incentivo, em especial à Juliana, Márcia, Elizete, Cibele, Isabel, Janete, Elísia, Anderson, Willian e Alírcia pelos agradáveis momentos ao longo destes dois anos de convivência;

Agradeço em especial, a bolsista Liane pela amizade, dedicação, apoio e incansável ajuda;

A Mirian, amiga que fiz durante esses dois anos de convivência a qual levarei comigo para sempre;

Aos funcionários do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, da Embrapa Clima Temperado, Everton e Maicon, por terem me recebido gentilmente na Embrapa, pelo apoio, dedicação e amizade;

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa;

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a concretização desse trabalho e cujos nomes não foram citados aqui. Nunca me esquecerei de vocês.

“Nós somos feitos da mesma matéria dos sonhos”

Shakespeare

RESUMO

DE CONTI, Daniela. Caracterização anatômico-fisiológica e molecular da compatibilidade reprodutiva de ameixeiras japonesa. 2012, 66f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.) é uma frutífera de grande destaque mundialmente. No Brasil, é a espécie de ameixeira mais cultivada, pois apresenta grande número de cultivares adaptadas as diferentes condições climáticas das regiões onde é cultivada. Porém, alguns fatores limitam o aumento da produção nacional de ameixeiras, entre eles destaca-se a autoincompatibilidade gametofítica, devido à presença de um loco multialélico, contendo os denominados alelos-S. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar fisiologicamente e molecularmente os alelos-S de cultivares de ameixeira japonesa relacionados à autoincompatibilidade gametofítica. Para a caracterização fisiológica, realizaram-se experimentos de polinização controlada no campo experimental da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS) e polinização *in vivo*, em laboratório, de três cultivares de ameixeira japonesa (América, Gulf Blaze e Gulf Rubi) onde foram avaliados a frutificação efetiva e o crescimento do tubo polínico (CTP), respectivamente. Para a caracterização molecular, os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas – Caracterização Molecular, (UFPEL/RS). Para tal fim, foram analisadas 19 cultivares de ameixeira japonesa, por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com dois pares de *primers* específicos para amplificação de alelos-S. Nos estudos de compatibilidade reprodutiva, a cv. América apresentou alto *fruit set* quando polinizada com as cvs. Rosa Mineira (26,7%), Amarelinha (8,7%) e Reubennel (12,7%). Os cruzamentos ‘Gulf Blaze’ x ‘Gulf Rubi’, ‘Gulf Rubi’ x ‘Gulf Rubi’ e ‘Gulf Rubi’ x ‘Gulf Blaze’ obtiveram um *fruit set* de 11,36%, 3,84% e 9,94%, respectivamente. Na polinização *in vivo* o CTP atingiu o óvulo ou ovário nesses cruzamentos, com exceção da autopolinização da ‘Gulf Rubi’. Não houve frutificação efetiva, no campo, na autopolinização ‘América’ e ‘Gulf Blaze’ e no

cruzamento 'América x 'Pluma 7'. O CTP nesses cruzamentos não chegou a atingir o óvulo, com exceção da autopolinização da 'Gulf Blaze'. Apenas os cruzamentos 'América' x 'Pluma 7' são incompatíveis e a cultivar América é autoincompatível. Na amplificação de alelos-S, foi possível obter a efetiva caracterização de alelos-S das cultivares estudadas, bem como, a escolha das polinizadoras mais compatíveis com as cultivares produtoras. Verificou-se que as cultivares América e Santa Rosa; Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira, Estrela Púrpura e Planta 21, apresentaram incompatibilidade entre si.

Palavras-chave: *Prunus salicina*; autoincompatibilidade gametofítica; cruzamentos dirigidos, alelos-S, PCR.

ABSTRACT

DE CONTI, Daniela. Anatomical-physiological and molecular characterization of the reproductive compatibility of Japanese plum. 2012, 66f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) is a fruit of great prominence worldwide. In Brazil, one of the most widely cultivated species of plum, because it presents climatic conditions favorable to its cultivation. However, some factors limit the increase in domestic production of plum trees, among them stands out the gametophytic self-incompatibility, due to the presence of a multiallelic codominant locus, containing the so-called S-alleles. Thus, the objective of this study was to identify physiologically and molecularly S-alleles of Japanese plum cultivars related to gametophytic self-incompatibility. For physiological characterization were carried out controlled pollination experiments in the experimental field of Embrapa, Clima Temperado (Pelotas/RS) and the pollination *in vivo* in laboratory, three cultivars of Japanese plum (América, Gulf Rubi and Gulf Blaze) which were evaluated fruit set and pollen tube growth (CTP), respectively. For molecular characterization, experiments were performed in the Laboratory of Plant Tissue Culture and Molecular Characterization, (UFPEL / RS). To this end, we analyzed 19 Japanese plum cultivars by Polymerase Chain Reaction (PCR) with two pairs of specific *primers* for amplification of S-alleles. Crossings 'Gulf Blaze' x 'Gulf Rubi' 'Gulf Rubi' x 'Gulf Rubi' and 'Gulf Rubi' x 'Gulf Blaze' had a fruit set of 11.36%, 3.84% and 9.94% respectively. *In vivo* pollination CTP reached the egg or ovarian in these crosses, with the exception of self-pollination of 'Gulf Rubi'. There was no fruit set in the field, self-pollination in 'América' and 'Gulf Blaze' and crossing 'América x' Pluma 7 '. The CTP in these crosses did not reach the egg, with the exception of self-pollination of 'Gulf Blaze'. Only the cross between 'América' x 'Pluma 7' are incompatible, and America is a self-incompatible cultivar. In amplification of S-alleles was possible to

obtain the effective characterization of alleles-S of cultivars studies, as well as, the choice of pollinating more compatible with the cultivars producing. The cultivars América and Santa Rosa; Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira, Estrela Púrpura and Planta 21 showed incompatibility between them.

Key-words: *Prunus salicina*, gametophytic self-incompatibility, crosses, S-alleles, PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
ARTIGO 1.....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
CONCLUSÕES	33
AGRADECIMENTOS	33
REFERÊNCIAS	33
ARTIGO 2.....	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT	44
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	46

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÕES	51
AGRADECIMENTOS	51
REFERÊNCIAS	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
ANEXO	63
Anexo A	64
Anexo B	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

As espécies frutíferas apresentam um importante papel econômico no Brasil, devido ao potencial de geração de emprego e renda, onde atualmente ocupa posição estratégica na expansão do agronegócio brasileiro. A base agrícola da cadeia produtiva gera 5,6 milhões de empregos, ou seja, 27% do total da mão-de-obra agrícola ocupada no país (PORTOCARRERO, 2005).

Depois de uma queda em 2009, a produção brasileira de frutas voltou a crescer em 2010. Com base nos números do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), estima-se uma safra de 43 milhões de toneladas de frutas, o que representa 5,17% a mais que em 2009, quando chegou a 41 milhões de toneladas. A área plantada foi de 2,179 milhões de hectares. Este resultado mantém o Brasil como terceiro maior produtor mundial de frutas, atrás apenas da China e da Índia (IBGE, 2011).

Dentre as principais espécies frutíferas de clima temperado exploradas no país, destaca-se a ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl). Esta espécie possui grande potencial para ampliação da área cultivada, pois o volume produzido é insuficiente para atender a demanda do mercado, onde se destina na quase totalidade ao consumo *in natura* e uma pequena parte passa por processamento industrial, em forma de passas, geléias, licores e destilados (CHAGAS et al., 2007). Em 2010, a ameixeira ocupou o quarto lugar de fruta fresca mais importada, logo após a pêra, maçã e uva, totalizando cerca de 24 mil toneladas (IBRAF, 2011). O

volume médio de ameixeira comercializado no país entre 2002 e 2007, de acordo com o CEAGESP/SP, é de 1 milhão de toneladas/ano (INSTITUTO FNP, 2007).

A ameixeira é uma espécie frutífera arbórea, perene, pertencente à família Rosaceae, subgênero *Prunophora*, gênero *Prunus*, sendo cultivada economicamente em diversas partes do mundo. No Brasil, é cultivada principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Sul de Minas Gerais, devido às condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo (PASINATO et al., 1998; BIASI et al., 2004). É uma das plantas frutíferas que mais se difundiu nos últimos anos, sendo cultivada em várias condições climáticas, devido às várias espécies existentes e ao resultado de hibridações ocorridas ao longo do desenvolvimento da cultura. Este conjunto de fatores torna a ameixeira uma cultura extremamente atraente para o melhoramento genético, permitindo o desenvolvimento de cultivares que possuem variações bastante amplas em suas características genéticas e fenológicas (CASTRO et al., 2008).

Para muitos botânicos a ameixeira é considerada o núcleo central de divergência do gênero *Prunus* que, por sucessivas variações originou os diferentes gêneros da família das Rosaceae. Duas espécies principais estruturam a maioria das cultivares de ameixeiras atualmente cultivadas no mundo, sendo estas *Prunus domestica* L. (ameixeira européia) originária da Cáucaso, Turquia e Pérsia, e *Prunus salicina* Lindl (ameixeira japonesa) originária do extremo Oriente (MADAIL, 2003). Também fazem parte da constituição de muitas cultivares as espécies *Prunus institia* Linn (ameixeira européia) e *Prunus cerasifera* Ehrh (ameixeira mirabolano). A espécie mais cultivada no Brasil, de menor exigência em frio e mais adaptada às condições de invernos do sul do país é *P. salicina*, comumente referida como ameixeira japonesa. 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 (REVERS; MACHADO, 2005).

Entre os fatores que limitam o aumento da produção nacional de ameixeiras, destaca-se a autoincompatibilidade reprodutiva do tipo gametofítica (GSI - *gametofitic self-incompatibility*) (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002; RASEIRA, 2003; TAKAYAMA; ISOGAI, 2005), ou seja, a incapacidade de autopolinização de muitas cultivares, devido a 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 dependem de polinizadoras compatíveis para produzirem frutos, onde seu pólen deverá efetivamente fecundar o pistilo da cultivar produtora, caso contrário não haverá produção.

A autoincompatibilidade (SI - *self-incompatibility*) é um mecanismo genético presente na maioria das angiospermas, que impede a autofecundação, admitindo que o pistilo rejeite o pólen de indivíduos geneticamente relacionados (WU et al., 2011) contribuindo na manutenção e aumento da diversidade dentro das espécies (ZHANG et al., 2009). Porém, é um dos maiores problemas no manejo das culturas que apresentam essa característica e em programas de melhoramento genético de várias espécies frutíferas, podendo comprometer significativamente a frutificação efetiva e a produtividade dos cultivos (BANDEIRA et al., 2011).

No fenômeno de autoincompatibilidade gametofítica o determinante feminino é uma ribonuclease (S-RNase) sendo expressa no pistilo, onde as suas proteínas, localizadas principalmente na parte superior do estilete, atuam inibindo ou degradando o RNA do tubo polínico que compartilha o mesmo alelo-S do pistilo (MCCUBBIN; KAO, 2000; SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002; TAKAYAMA; ISOGAI, 2005; ZHANG et al., 2009). Por outro lado, o determinante do pólen-S é uma proteína F-box (SFB-*S-haplotype-specific F-box*) que geralmente atua como componente ligante da ubiquitina, envolvida em uma via de degradação protéica (ZHANG et al., 2009), mediada pela ubiquitina de S-RNases de pólen oriundo de cruzamento (TAKAYAMA; ISOGAI, 2005; ZHANG et al., 2009; GHARESHEIKHBAYAT et al., 2011).

A maioria das espécies das cultivares de *P. salicina* apresentam o sistema de AIG, onde, a identificação desses alelos-S é uma importante estratégia para o estabelecimento de pomares com cultivares compatíveis reprodutivamente e, dessa forma, reduzir perdas no campo, devido a baixa frutificação efetiva (BANDEIRA et al., 2011). Deve-se levar em consideração que além de fatores do clima e a presença de insetos no pomar, os quais podem interferir na polinização, uma boa frutificação efetiva depende também do uso de cultivares polinizadoras que apresentam alelos compatíveis e período de floração, parcial ou completamente coincidentes.

Diferentes métodos têm sido utilizados para determinar se uma cultivar ou genótipo é autocompatível ou autoincompatível. Estes incluem: testes de polinização

controlada a campo e *in vivo*, crescimento do tubo polínico e avaliação molecular dos alelos-S das cultivares (DONOSO et al., 2009).

Assim, caracterizar fisiológica e molecularmente a compatibilidade reprodutiva entre cultivares de ameixeira japonesa é de grande valia, pois possibilita seu uso como subsídio para programas de melhoramento genético, além de ser 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, poderá num futuro próximo, potencializar 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, conseqüentemente, eliminando o problema da autocompatibilidade reprodutiva, bem como acelerando o trabalho de melhoramento genético desta espécie.

A presente dissertação está dividida em dois artigos científicos: o primeiro investiga a compatibilidade reprodutiva de cultivares de ameixeira japonesa através de polinizações cruzadas e análises laboratoriais. O segundo artigo foi realizada a caracterização molecular, através da identificação dos alelos-S associados ao mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica em ameixeira japonesa, por meio da análise de PCR.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDEIRA, J. M., THUROW, L. B., PETERS, J. A., RASEIRA, M. C. B., BIANCHI, V. J. Caracterização fisiológica da compatibilidade reprodutiva de ameixeira japonesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, p. 860-867, 2011.

BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; PETRI, J. L.; MARODIN, G. A. B. Cultivares de fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L. B.; MIO, L. M. de; SERRAT, B. M.; MOTTA, A. C.; CUQUEL, F. L. **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: UFPR, p. 5-32, 2004.

CASTRO, L. A. S. de; NAKASU, B. H.; PEREIRA, J. F. M. Ameixeira: Histórico e perspectivas de cultivo. **Circular Técnico nº 70**, Embrapa, ISSN 1981-5999, 10p., 2008.

CHAGAS, E.A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; DALL`ORTO, F. A. C. **Aspectos técnicos do cultivo da ameixeira**. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/ameixeira/index.htm>. Acessado em: 14 de dezembro de 2011.

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

GHARESHEIKHBAYAT, R., FRANCESCHI, P., DONDINI, L., SANSAVINI, S. Origine dell'autocompatibilità dell'albicocco e confront fra varietà autofertili e autosterili. **Frutticoltura**, Bologna, v.6, p. 22-28, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acessado: 17 de dezembro de 2011.

IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp>. Acessado: 29 de dezembro de 2011.

INSTITUTO FNP. Hortifruti, **Agrianual, 2007**: Anuário de Agricultura Brasileira. p. 350, 2007.

MADAIL, J. C. M. Aspectos sócio-econômicos. In: CASTRO, L.A.S. de - eds. Ameixa/Produção, EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas, RS) – Brasília: **EMBRAPA Informação Tecnológica**, p.13-15, 2003.

MCCUBBIN, A. G., & T. H. KAO. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. **Annual Review Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.16, p.333-364, 2000.

PASINATO, V.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. Enraizamento de estacas lenhosas de cultivares de ameixeira (*Prunus spp.*) em condições de campo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, p. 265-268, 1998.

PORTOCARRERO, M. A.; Um setor organizado. **Anuário Brasileiro da Fruticultura**, p.13, 2005.

REVERS, L. F.; MACHADO, C. A. E. Identificação varietal e genotipagem – serviços oferecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Uva e Vinho. **Comunicado Técnico 64**, Embrapa, Bento Gonçalves, ISSN 1808-6802. 5p. Dezembro, 2005.

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.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Self-Incompatibility In Plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.1083-90, 2002.

TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A. Self-Incompatibility in Plants, **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 457-489, 2005.

WU, J., GU, C., DU, Y.-H., WU, H.-Q., LIU, W.S., LIU, N., LU, J., ZHANG, S. L. Self-compatibility of 'Katy' apricot (*Prunus armeniaca* L.) is associated with pollen-part mutations. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin/Heidelberg, v. 24, p. 23-35, 2011.

ZHANG, Y.; ZHAO, Z.; XUE, Y. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.60, p.21-42, 2009.

ARTIGO 1

**HIBRIDAÇÕES, ANÁLISE DE *FRUIT SET* E DO CRESCIMENTO DE TUBOS
POLÍNICOS PARA ESTUDO DA COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA ENTRE
CULTIVARES DE AMEIXEIRA JAPONESA**

(De acordo com as normas da Revista Brasileira de Fruticultura)

1 **HIBRIDAÇÕES, ANÁLISE DE *FRUIT SET* E DO CRESCIMENTO DE TUBOS**
2 **POLÍNICOS PARA ESTUDO DA COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA**
3 **ENTRE CULTIVARES DE AMEIXEIRA JAPONESA**

4
5 DANIELA DE CONTI¹, MARIA DO CARMO BASSOLS RASEIRA², JOSÉ
6 ANTÔNIO PETERS³, VALMOR JOÃO BIANCHI³.

7
8 **RESUMO**

9 O objetivo do trabalho foi caracterizar fisiologicamente a compatibilidade reprodutiva
10 de cultivares de ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl) por meio de hibridações,
11 análise do *fruit set* e do crescimento de tubos polínicos (CTP). O *fruit set* foi
12 determinado 40 dias após a hibridação controlada, realizadas a campo. O grau de
13 compatibilidade foi avaliado *in vivo*, para determinar o CTP. A cv. América
14 apresentou alto *fruit set* quando polinizada com as cvs. Rosa Mineira (26,7%),
15 Amarelinha (8,7%) e Reubennel (12,7%). Os cruzamentos ‘Gulf Blaze’ x ‘Gulf Rubi’,
16 ‘Gulf Rubi’ x ‘Gulf Rubi’ e ‘Gulf Rubi’ x ‘Gulf Blaze’ obtiveram um *fruit set* de
17 11,36%, 3,84% e 9,94% respectivamente. Na polinização *in vivo* o CTP atingiu o
18 óvulo ou ovário nesses cruzamentos, com exceção da autopolinização da ‘Gulf Rubi’.
19 No campo, não houve frutificação efetiva na autopolinização da ‘América’ e ‘Gulf
20 Blaze’ e no cruzamento de ‘América’ x ‘Pluma 7’. O CTP nesses cruzamentos não
21 chegou a atingir o óvulo, com exceção da autopolinização da ‘Gulf Blaze’. Apenas os
22 cruzamentos ‘América’ x ‘Pluma 7’ são incompatíveis e a cultivar América é
23 autoincompatível.

24
25 **Termos para indexação:** *Prunus salicina*, autoincompatibilidade, *fruit set*,
26 hibridações, polinização *in vivo*.

¹ Bióloga, Mestranda em Fisiologia Vegetal, PPGFV – Departamento de Botânica – Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas – RS, Bolsista CAPES, e-mail: danideconti@yahoo.com.br.

² Engenheira Agrônoma, Dr., Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, email: bassols@cpect.embrapa.br.

³ Engenheiro Agrônomo, Prof. Dr. do Departamento de Botânica – Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas – RS, e-mail: valmorjb@yahoo.com; japeters1@hotmail.com.

27 **HYBRIDIZATIONS, ANALYSIS AND *FRUIT SET* POLLEN TUBE**
28 **GROWTH FOR THE STUDY OF REPRODUCTIVE COMPATIBILITY**
29 **BETWEEN CULTIVARS OF PLUM TREE JAPANESE**

30
31
32 **ABSTRACT**

33 The objective of this work was to physiologically characterize the reproductive
34 compatibility of cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl) through
35 hybridization, analysis of fruit set and pollen tube growth (PTG). The fruit set was
36 determined 40 days after the controlled hybridization, carried out in the field. The
37 degree of compatibility was evaluated *in vivo*, to determine the PTG. The cv. América
38 had higher fruit set when pollinated with cvs. Rosa Mineira (26,7%), Amarelinha
39 (8,7%) and Reubennel (12,7%). Crossings ‘Gulf Blaze’ x ‘Gulf Rubi’, ‘Gulf Rubi x
40 Gulf Rubi’ and ‘Gulf Rubi x Gulf Blaze’ had fruit set of 11,36%, 3,84% and 9,94%
41 respectively. *In vivo* pollination PTG reached the egg or ovarian cancer in these
42 crosses, with the exception of self-pollination of ‘Gulf Rubi’. In the field, no fruit set
43 in self-pollination of ‘América’ and ‘Gulf Blaze’ and crossing ‘América x Pluma 7’.
44 The PTG in these crosses did not reach the egg, with the exception of self-pollination
45 of ‘Gulf Blaze’. Only the crossroads 'América' x 'Pluma 7' are incompatible, and
46 America is cultivar self-incompatible.

47
48 **Index terms:** *Prunus salicina*, self-incompatibility, fruit set, hybridizations, *in vivo*
49 pollination.

50
51
52
53
54
55
56

INTRODUÇÃO

57

58

59 A ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.) é uma frutífera de clima temperado
60 cultivada economicamente em várias partes do mundo. No Brasil, é uma das espécies
61 de ameixeira mais cultivada, pois apresenta condições climáticas favoráveis ao seu
62 cultivo (BIASI, 2004).

63 Em virtude das várias espécies existentes e do resultado de hibridações ocorridas
64 ao longo do desenvolvimento da cultura, principalmente pelo plantio de variedades
65 selecionadas, a ameixeira é considerada uma das frutíferas arbóreas que mais se
66 difundiu pelo mundo (CASTRO et al., 2008).

67 Porém, mesmo com grande potencial de cultivo no Brasil, alguns fatores têm
68 limitado o aumento da produção nacional de ameixas, sendo o principal a escaldadura
69 das folhas, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que afeta a qualidade do material
70 propagativo, bem como variações climáticas, o uso de porta-enxertos inadequados e a
71 incapacidade de autopolinização de muitas cultivares (RASEIRA, 2003).

72 A maioria das cultivares de *P. salicina* são autoincompatíveis, devido ao
73 sistema de autoincompatibilidade gametofítica, determinado pela presença de um loco
74 multialélico, contendo os denominados alelos-S (TAKAYAMA; ISOGAI, 2005) que
75 codificam para enzimas que interrompem o crescimento do tubo polínico no processo
76 de polinização (KAUFMANN et al., 1992; NEWBIGIN et al., 1993; BOSKOVIC;
77 TOBUTT, 1996; DE NETTANCOURT, 1997; SAPIR et al., 2004). Como
78 conseqüência, para garantir a fecundação e níveis de produção economicamente
79 aceitáveis, é necessário a implantação de pelo menos uma planta polinizadora para
80 cada quatro produtoras (CASTRO et al., 2008), com compatibilidade e período de
81 floração total ou parcialmente sincronizado (SAPIR et al., 2004).

82 A autoincompatibilidade é um mecanismo genético em plantas hermafroditas
83 que impede a autofecundação, fazendo com que o pistilo rejeite o pólen de indivíduos
84 geneticamente relacionados (WU et al., 2011). Portanto, é um mecanismo que
85 favorece a alogamia, promovendo, desta forma, a manutenção da variabilidade
86 genética (ZHANG et al., 2009). Porém, é uma barreira para programas de

87 melhoramento genético, que buscam a obtenção de novas cultivares, e para o manejo
88 reprodutivo dos pomares.

89 A reação de autoincompatibilidade gametofítica é geneticamente determinada
90 pela presença de um loco polimórfico (S), codificando dois genes ligados que
91 determinam os fenótipos do pólen e pistilo (KAO; TSUKAMOTO, 2004).

92 Quando o alelo-S do grão de pólen haplóide é diferente dos dois alelos-S do
93 pistilo, o tubo polínico pode crescer através do pistilo e fertilizar o óvulo. Por outro
94 lado, quando o alelo-S expresso no pólen é o mesmo que qualquer um dos dois alelos-
95 S expressos no pistilo, o crescimento do tubo polínico é interrompido (GUERRA et al.,
96 2009).

97 Em Rosaceas, nas espécies autoincompatíveis, o determinante do pistilo-S é
98 uma ribonuclease, S-RNase (TAO et al., 1999; ZHANG et al., 2009) que inibe o
99 crescimento do tubo polínico, degradando o RNA do tubo polínico (MCCUBBIN;
100 KAO, 2000; McCLURE et al., 2011). Por outro lado, o determinante do pólen-S é uma
101 proteína F-box, (*SFB S-haplotype specific F-box*) (YAMANE et al., 2003; ZHANG et
102 al., 2009) que geralmente atua como componente ligante da ubiquitina, envolvida em
103 uma via de degradação protéica (ZHANG et al., 2009), mediada pela ubiquitina de S-
104 RNases de pólen oriundo de cruzamento (TAKAYAMA; ISOGAI, 2005).

105 O *fruit set*, como resultado da polinização bem sucedida, é um dos requisitos para
106 se obter alto rendimento na produção de ameixa japonesa. Sendo assim, devido à
107 consequência desta autoincompatibilidade gametofítica é essencial o planejamento do
108 pomar (GUERRA et al., 2009). Métodos confiáveis para determinar a compatibilidade
109 entre as diferentes cultivares incluem a caracterização fisiológica através de
110 polinizações controladas a campo, combinadas com análises laboratoriais, para
111 determinar a viabilidade dos grãos de pólen (SOUZA; RASEIRA, 1998). Além disso,
112 técnicas de microscopia permitem analisar características associadas à germinação dos
113 tubos polínicos e suas taxas de crescimento, servindo também para analisar
114 hibridações efetivas em programas de melhoramento genético e, assim, elucidar
115 características referentes à incompatibilidade reprodutiva (KEARS; INOUE, 1993),
116 sendo considerado um teste de grande valia, uma vez que elimina resultados falsos de

117 incompatibilidade por não serem influenciados pelos fatores ambientais, os quais, a
118 polinização realizada a campo está sujeita.

119 Dada a importância da determinação da compatibilidade reprodutiva em espécies
120 frutíferas, o trabalho teve por objetivo caracterizar fisiologicamente a compatibilidade
121 reprodutiva de cvs. de ameixeira japonesa, por meio de hibridações controladas,
122 seguidas da análise de crescimento de tubo polínico e do *fruit set*, visando auxiliar
123 produtores e melhoristas na escolha dos melhores genótipos para polinização cruzada
124 em programas de melhoramento e no manejo reprodutivo de pomares comerciais.

125

126

127

MATERIAL E MÉTODOS

128

129 As análises de caracterização fisiológica da compatibilidade das cultivares de *P.*
130 *salicina* foram realizadas a campo e no laboratório de melhoramento genético, na
131 estação experimental da Embrapa Clima Temperada (Pelotas/RS) (Latitude 31° 42' e
132 longitude 52° 21') durante dois anos (2010 e 2011). Para isso foram realizadas
133 hibridações controladas, com as seguintes combinações de cultivares: América como
134 genitor feminino, polinizada com América, Rosa Mineira, Pluma 7 e Reubennel; Gulf
135 Blaze como genitor feminino, sendo Gulf Blaze e Gulf Rubi como genitor masculino;
136 Gulf Rubi como genitor feminino, sendo Gulf Blaze e Gulf Rubi como genitor
137 masculino.

138 Nas hibridações a campo, para cada cruzamento, foram utilizadas 150 flores em
139 estádio de balão, sendo estas emasculadas (com exceção da cultivar América, pelo fato
140 de ser autoincompatível), polinizadas e ensacadas com tecido não tecido (TNT) branco
141 por um período de uma semana. Após 40 dias foram avaliadas a percentagem de
142 frutificação efetiva (*fruit set*) em relação ao número de flores polinizadas e ensacadas.
143 Como controle, foi realizada a autopolinização das cultivares produtoras, nas quais os
144 botões florais foram emasculados e polinizados com o pólen da própria cultivar.

145 Na polinização *in vivo*, foram coletados quatro ramos de cada planta, com pelo
146 menos 20 flores em estádio de balão e acondicionados no laboratório, à temperatura
147 ambiente (18-20°C). As flores foram emasculadas e polinizadas manualmente com o

148 pólen de interesse, de acordo com as combinações de cruzamentos (com exceção da
149 cultivar América, pelo fato de ser autoincompatível).

150 Após 120 e 140 horas os pistilos foram coletados, fixados em solução FAA -
151 formol, ácido acético e ácido etílico (1:1:8), e armazenados em geladeira a 4°C, para
152 posterior avaliação da porcentagem de grãos de pólen germinados e o crescimento do
153 tubo polínico (CTP) no pistilo, conforme o método de Wilson e Brown (1957), com
154 algumas adaptações, por meio de coloração histoquímica (CARVALHO, 1989).

155 Depois do preparo das lâminas, estas foram visualizadas em microscópio óptico
156 (Carl Zeiss do Brasil Ltda., São Paulo, SP), com ocular de 10x e objetiva de 40x.
157 Foram observadas 20 lâminas para cada combinação de cruzamento. Avaliou-se a
158 porcentagem de grãos de pólen germinados e o grau de crescimento do tubo polínico,
159 por meio da atribuição de notas de 1 a 7 (Tab. 1), baseado na classificação de Bandeira
160 et al (2011).

161 Nos cruzamentos realizados a campo, foi avaliada a porcentagem de frutificação
162 das 150 flores polinizadas, e, nos cruzamentos *in vivo*, utilizou-se o delineamento
163 experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinco flores. Os
164 dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de
165 Tukey, a 5% de probabilidade de erro, com o programa WinStat 2.0 (MACHADO;
166 CONCEIÇÃO, 2003). Os dados da variável porcentagem de grãos de pólen
167 germinados foram transformados para $(x/100)^{1/2}$, e os graus de desenvolvimento do
168 tubo polínico foram transformados para $\log(x)$.

169

170

171

RESULTADOS E DISCUSSÃO

172

173 Nos cruzamentos realizados a campo no ano de 2011, a cv. América apresentou
174 boa frutificação efetiva 26,7%, 8,7% e 12,7%, quando polinizada com as cvs. Rosa
175 Mineira, Amarelinha e Reubennel, respectivamente (Tab.2). A cv. Gulf Blaze se
176 mostrou compatível quando polinizada com a cv. Gulf Rubi (11,36%) e a cv. Gulf
177 Rubi se mostrou compatível com as cvs. Gulf Blaze (9,94%) e Gulf Rubi (3,84%).
178 Porém, no ano de 2010 a frutificação ocorreu somente quando a cv. América foi

179 polinizada com a cv. Rosa Mineira (0,66%), cv. Gulf Blaze polinizada com a cv. Gulf
180 Rubi (9,8%) e cv. Gulf Rubi polinizada com a cv. Gulf Blaze (2,4%) (Tab.2). Nos
181 demais cruzamentos não houve frutificação, mas mesmo assim não é possível afirmar
182 que a falta de frutificação tenha ocorrido devido à incompatibilidade, sendo que este
183 fato pode estar relacionado a inúmeros fatores ambientais que podem influenciar no
184 sucesso da frutificação.

185 Podem ocorrer diferenças no pegamento de frutos de um ano para outro, pois
186 além da incompatibilidade reprodutiva existente entre as cultivares, as condições
187 climáticas no momento da polinização e após o florescimento, como por exemplo,
188 chuva, vento, geada e seca, também pode ocasionar variação na polinização efetiva,
189 sendo estes fatores importantes a serem considerados (WEINBERGER, 1975;
190 BARBOSA, 2006).

191 Nos últimos anos tem sido verificada baixa frutificação e/ou irregularidades na
192 produção de pêssago, nectarina e ameixa nos pomares de algumas áreas da região sul
193 do Brasil (NAVA et al., 2009). Este fato pode estar relacionado à antecipação do
194 florescimento em virtude da elevada temperatura no período que antecede a floração,
195 onde, segundo Albuquerque et al. (2000) a falta de fecundação neste caso, pode estar
196 relacionado com a imaturidade fisiológica dos óvulos devido à antecipação da
197 floração, além de possuir relação com a degeneração do gametófito masculino o qual
198 tem vida limitada. Esses autores também sugerem que este problema ocorre devido a
199 uma falta de sincronia entre o tempo necessário para o completo desenvolvimento do
200 saco embrionário e a vida útil do tubo polínico sob altas temperaturas.

201 Embora o crescimento incompleto da estrutura do óvulo e do saco embrionário
202 possa em parte estar sob controle genético, a degeneração e o aborto do óvulo podem
203 estar sob controle ambiental (LILLECRAPP et al., 1999), que segundo Nava et al
204 (2009), pode explicar as variações nos resultados de frutificação entre pomares
205 distintos da mesma cultivar e as diferenças ao longo dos anos.

206 No ano de 2010, segundo o Laboratório de Agrometeorologia da Embrapa
207 Clima Temperado (CPACT) - Pelotas/RS houve um aumento da temperatura acima do
208 normal no mês de setembro, o que causou o ressecamento dos botões florais que já
209 haviam florescido. Quanto ao índice pluviométrico, pode-se observar que houve um

210 aumento da precipitação no mês de setembro, prejudicando a polinização controlada,
211 realizada a campo. Já no ano de 2011, a temperatura e a precipitação foram favoráveis,
212 resultando numa sincronia no processo de fecundação, ocorrendo assim uma boa
213 frutificação (Anexo A).

214 Em relação aos cruzamentos *in vivo*, realizados no laboratório, foi observada
215 uma baixa percentagem de grãos de pólen germinados no estigma no ano de 2010 em
216 todas as cultivares avaliadas, indicando que muitos grãos de pólen estavam inviáveis
217 (Fig.1). A percentagem de grãos de pólen germinados no estigma no ano de 2011 foi
218 maior em relação a 2010, embora este valor ainda seja considerado baixo. No ano de
219 2010, no genitor feminino “América”, o pólen da cv. Pluma 7 obteve 36,7% de
220 germinação, diferindo significativamente das cultivares Amarelinha (18,4%) e
221 América (8,0%), não diferindo das cultivares Reubennel (25,8%), e Rosa Mineira
222 (26,1%). Nos cruzamentos realizados com a cv. Gulf Blaze, não houve diferença
223 estatística em nenhuma das cultivares testadas (Fig.1). Entretanto, em 2011, no genitor
224 feminino “América” o pólen da cv. Reubennel obteve o maior número de grãos de
225 pólen germinados no estigma (57,3%), diferindo significativamente das cultivares
226 Amarelinha (34,8%), Rosa Mineira (41,3%) e América (37,1%), não diferindo da cv.
227 Pluma 7 (54,0%) (Fig.1). Já, em relação aos genitores femininos “Gulf Blaze” e “Gulf
228 Rubi”, não houve diferença significativa em nenhuma das cultivares testadas (Fig.1).

229 Para o grau de desenvolvimento do tubo polínico (Fig.2), no ano de 2010, nos
230 cruzamentos realizados com a cv. América como genitor feminino, o pólen das
231 cultivares Pluma 7 e Reubennel apresentaram CTP apenas até o estágio 2, não
232 apresentando crescimento nos demais estádios. O tubo polínico da cv. Amarelinha
233 atingiu com 10% de incidência no grau 3, não apresentando crescimento nos estádios
234 posteriores. Já na cv. Rosa Mineira, apresentou desenvolvimento do tubo polínico até
235 o estágio 6, ou seja, tubo polínico próximo ao óvulo. Quando o genitor feminino foi a
236 cv. Gulf Blaze, os grãos de pólen da cv. Gulf Blaze apresentaram CTP até o grau 2,
237 obtendo maior incidência no grau 1 (85%). Já, a cv. Gulf Rubi, apresentou
238 desenvolvimento do tubo polínico até o estágio 3, no segundo terço do estilete.

239 Em 2011, pode-se observar que nos cruzamentos realizados com a cv. América,
240 o pólen das cultivares Amarelinha, Reubennel e Rosa Mineira apresentaram CTP até o

241 estágio 6 (próximo ao óvulo). O tubo polínico da cv. Pluma 7 atingiu 5% de incidência
242 no grau 5 (tubo polínico no interior do óvulo), não apresentando crescimento nos
243 estádios posteriores. Já na cv. América, apresentou desenvolvimento do tubo polínico
244 até o estágio 3, (tubo polínico do 2º terço do estilete). Quando utilizada a cv. Gulf
245 Blaze como genitor feminino, o pólen da própria cultivar apresentou CTP até o estágio
246 6, que representa tubo polínico próximo ao óvulo. Contudo, os grãos de pólen da cv.
247 Gulf Rubi apresentaram incidência no grau 5 (tubo polínico no interior do ovário).
248 Entretanto, quando se utilizou a cv. Gulf Rubi como genitora feminina ambas as
249 cultivares Gulf Rubi e Gulf Blaze apresentaram CTP até o estágio 3.

250 Com base nos resultados registrados, verificou-se que os grãos de pólen de
251 todas as cultivares utilizadas no presente estudo, foram capazes de germinar no
252 estigma, mesmo que esta percentagem tenha sido relativamente baixa. Este resultado
253 pode estar relacionado com a viabilidade do pólen. No ano de 2010, foi verificada
254 baixa viabilidade do pólen em todas as cultivares polinizadoras (1-10%). Porém, em
255 2011 a viabilidade foi maior, entre 13-82%, contribuindo assim para melhores
256 resultados (Anexo B).

257 Segundo Carvalho (1989) a baixa viabilidade do pólen ocorrido de um ano para
258 outro na mesma cultivar está relacionada com vários fatores, como condições de
259 estresse hídrico, além do manuseio do pólen desde sua coleta até o teste de
260 germinação, assim como as condições nutricionais da planta. Em 2010, houve um
261 período de maior incidência de chuva sendo que este fato pode ter sido o principal
262 responsável pela baixa germinação do pólen neste ano.

263 Em relação ao CTP, pode-se observar que não houve penetração do tubo
264 polínico no óvulo, obtendo apenas crescimento próximo a ele. Na AIG, os tubos
265 polínicos só irão crescer e só irá ocorrer fecundação se o alelo presente no grão de
266 pólen não estiver presente no tecido diplóide do estilete. Por outro lado, quando os
267 alelos são compatíveis, apresentam estrutura normal, com deposição reticulada de
268 calose na zona nuclear e de vacuolação, que protege e permite o seu desenvolvimento
269 para que ocorra a fecundação (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002). Já,
270 quando os alelos são incompatíveis, estes induzem a formação e depósito irregular de
271 calose (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002), promovendo sua inibição

272 ou paralisação do desenvolvimento, podendo romper-se devido à excessiva deposição
273 da própria calose (RAMALHO et al., 1996).

274 O fato de não ter ocorrido a penetração do tubo polínico no óvulo, mas sim sua
275 visualização bem próximo ao mesmo, pode estar relacionada ao tempo decorrido após
276 a polinização, tendo em vista que estudos realizados por Carvalho (1989) com
277 cruzamentos entre cultivares de ameixeira, verificou que nem sempre o tempo de 120
278 horas seria suficiente para a fecundação do óvulo, sendo necessárias 144 horas. Porém,
279 de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, verificou-se que após
280 140h da polinização *in vivo* os pistilos de todas as cultivares testadas estavam secos,
281 impróprios para avaliação, o que confirma que as 120h são as mais adequadas para a
282 avaliação do crescimento do tubo polínico destas cultivares de ameixeira japonesa.

283 Além disso, a imaturidade do órgão reprodutor feminino também pode
284 influenciar na não penetração no óvulo (BANDEIRA et al., 2011). Mas isto não teve
285 influência negativa nos resultados do trabalho, pois o objetivo era apenas verificar se
286 as cultivares são ou não compatíveis através do CTP. Para tanto, observou-se somente
287 se o tubo polínico ultrapassou a barreira da incompatibilidade, que se localiza no terço
288 médio do estilete (estádio 4).

289 Diante dos resultados das hibridações a campo e da polinização *in vivo*, pode-se
290 observar que os cruzamentos entre as cvs. América x Pluma 7 são incompatíveis. Este
291 dado corrobora com os obtidos por Bandeira et al. (2011), os quais não registraram
292 *fruit set* neste cruzamento.

293 Segundo Raseira (2003) e Castro et al. (2008), a campo, para a cv. América
294 recomenda-se as cultivares polinizadoras Reubennel e Rosa Mineira, sendo que este
295 resultado também foi confirmado neste trabalho. Além destas cultivares, foi possível
296 observar que a cultivar Amarelinha também pode ser utilizada como possível
297 polinizadora da cv. América em trabalhos de melhoramento genético, confirmando os
298 dados obtidos por Bandeira et al. (2011).

299 A cultivar Gulf Blaze, segundo os resultados obtidos, pode ser considerada
300 autocompatível, podendo ser polinizadora da ‘Gulf Rubi’. Os cruzamentos entre ‘Gulf
301 Rubi’ x ‘Gulf Rubi’ e ‘Gulf Rubi’ x ‘Gulf Blaze’, conforme os resultados obtidos
302 podem ser considerados compatíveis.

303 Apesar de não ocorrer frutificação efetiva no ano de 2010 de algumas
304 cultivares, tais como Amarelinha e Reubennel, esta ocorreu no ano seguinte,
305 mostrando que os fatores climáticos podem ser determinantes no processo de
306 frutificação efetiva entre as diversas cultivares estudadas. Além disso, foi verificado o
307 crescimento do tubo polínico até o grau 6 na polinização *in vivo*, confirmando a sua
308 compatibilidade reprodutiva.

309 Em relação à autocompatibilidade reprodutiva da cultivar Gulf Rubi, este fato
310 pode estar relacionado à presença de um alelo relacionado à compatibilidade. Em
311 estudos realizados por Beppu et al. (2002), foram analisadas diversas cultivares,
312 usando os *primers* Pru-T₂/PCE-R, dentre elas ‘Santa Rosa’, Late Santa Rosa’ e
313 ‘Beauty, onde estas foram consideradas autocompatíveis e constatou-se que elas
314 possuíam em comum os alelos Sc e Se. Outras cultivares testadas apresentaram o
315 alelo-Sc, porém mostraram-se autoincompatíveis, como ‘Oishiwasesumomo’ e ‘Tayo’.
316 Já a cultivar ‘Rio’, que amplificou o alelo-Se, apresentou crescimento do tubo
317 polínico, ou seja, se mostrou autocompatível, o que demonstra que o alelo-Se pode ser
318 o responsável pela inversão da autoincompatibilidade presumida na cultivar ‘Santa
319 Rosa’.

320 Tao et al. (2002) também encontraram em cultivares de damasqueiro-japonês
321 um gene para S-RNase que poderia ser utilizado como marcador molecular de
322 autocompatibilidade, assim como o alelo-Se, citado anteriormente, que quando
323 detectado em ameixeira japonesa também poderá ser utilizado para esta finalidade.

324 A partir do conhecimento dos alelos-S responsáveis pela incompatibilidade,
325 bem como do conhecimento de um alelo-S que possa reverter esta incompatibilidade,
326 há a possibilidade, através de métodos biotecnológicos, da transferência de alelos entre
327 cultivares semicompatíveis, mas que apresentem sincronia de floração.

328 Através da caracterização fisiológica é possível escolher com maior eficácia as
329 melhores cultivares polinizadoras para a formação de pomares, uma vez que a simples
330 coincidência de floração entre cultivares, não é uma característica confiável para tal
331 procedimento. Aliada a técnica de caracterização molecular dos alelos-S é possível
332 obter com maior precisão e confiabilidade as possíveis polinizadoras, contribuindo
333 assim para estudos de melhoramento genético e também na implantação de pomares

334 com cultivares compatíveis reprodutivamente. A partir destes estudos iniciais, uma
335 gama maior de cultivares deverão ser avaliadas, ampliando desta forma o
336 conhecimento sobre a relação de compatibilidade entre genótipos de ameixeira
337 japonesa para facilitar o manejo dos pomares e auxiliar o melhoramento genético da
338 espécie.

339

340 CONCLUSÕES

341

342 Dos cruzamentos de ameixeira japonesa avaliados, apenas os cruzamentos
343 ‘América’ x ‘Pluma 7’ apresentam incompatibilidade reprodutiva.

344 A cultivar América apresentou autoincompatibilidade reprodutiva.

345

346 AGRADECIMENTOS

347

348 Agradecemos o apoio fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento
349 Científico e Tecnológico (CAPES), por meio da concessão da bolsa de estudo.

350

351

352 REFERÊNCIAS

353

354 ALBUQUERQUE, N., BURGOS, L., EGEEA, J. Consequences to fertilization of the
355 developmental stages of apricot ovules at anthesis. **Journal of Horticultural
356 Science & Biotechnology**, United Kingdom, v. 75, p. 662-666, 2000.

357

358 BANDEIRA, J. M., THUROW, L. B., PETERS, J. A., RASEIRA, M. C. B.,
359 BIANCHI, V. J. Caracterização fisiológica da compatibilidade reprodutiva de
360 ameixeira japonesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, p. 860-867,
361 2011.

362

363 BARBOSA, W. **Gulfblaze: nova opção de ameixa para o Estado de São Paulo.**
364 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em:
365 <<http://www.infobibos.com/Artigos/Ameixa/Ameixa.htm>>. Acesso em: 02/12/2011.

366

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

371

372 BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; PETRI, J. L.; MARODIN, G. A. B. Cultivares de
373 fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L. B.; MIO, L. M. de; SERRAT, B. M.;
374 MOTTA, A. C.; CUQUEL, F. L. **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**.
375 Curitiba: UFPR, p. 5-32, 2004.

376

377 BOSKOVIC, R.; TOBUTT, K.R. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with
378 incompatibility alleles in sweet cherry. **Euphytica**, Netherlands, v.90, p.245-250,
379 1996.

380

381 CARVALHO, T. C. P. **Comportamento de algumas cultivares de ameixeira**
382 **(*Prunus salicina*) quanto à polinização no Rio grande do Sul**. Pelotas:
383 Universidade Federal de Pelotas, 1989, 73p. (Dissertação de Mestrado, Pós-
384 graduação em Agronomia), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 1989.

385

386 CASTRO, L. A. S. de; RASEIRA, M. C. B.; WILSON, B.; NAKASU, B. H.
387 Ameixeira: cultivares indicadas para plantio nas regiões produtoras brasileiras.
388 **Circular Técnico nº 81**, Embrapa, Pelotas, ISSN 1981-5999, 16p., 2008.

389

390 DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin: Springer,1997,
391 230p.

392

393 FRANKEN, J.; CUSTERS, J. B. M.; BINO, R. J. Effects of temperature on pollen
394 tube growth and fruit set in reciprocal crosses between. *Cucumis sativus* and *C.*
395 *metuliferus*. **Plant Breeding**, Germani, v. 100, n. 150, p. 3, 1988.

- 396 GUERRA, M. E.; RODRIGO, J.; LOPES-CORRALES, M.; WUNSCH, A. S-RNase
397 genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments
398 in Japanese plum. **Plant Breeding**, Berlin, v.128, p. 304-311, 2009.
399
- 400 KAO, T.; TSUKAMOTO, T. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-
401 incompatibility. **Plant cell Reports**, Berlin/Heidelberg, v.15, p. 72-83, 2004.
402
- 403 KAUFMANN, H.; KIRCH, H.; WEMMER, T. Sporophytic and gametophytic self-
404 incompatibility. In: CRESTI, M. & TIEZZI, A. **Sexual plant reproduction**. Berlin:
405 Springer, p.115-125, 1992.
406
- 407 KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot,
408 Colorado: University press of Colorado. 1993. 579p.
409
- 410 LILLECRAPP, A. M., WALLWORK, M. A., SEDGLEY, M. Female and male
411 sterility cause low fruit set in a clone of the ‘Trevatt’ variety of apricot (*Prunus*
412 *armeniaca*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.82, p.255–263, 1999.
413
- 414 MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Winstat: Sistema de análise estatística**
415 para Windows. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2003.
416
- 417 MCCUBBIN, A. G.; KAO, T. H. Molecular recognition and response in pollen and
418 pistil interactions. **Annual Review Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.16,
419 p.333-364, 2000.
420
- 421 MCCLURE, B., GARCI, C. F., ROMERO, C. Compatibility and incompatibility in S-
422 RNase-based systems. **Annals of Botany**, Oxford, v.108, p. 647–658, 2011.
423
- 424 NAVA, G. A.; DALMAGO, G. A.; BERGAMASCHI, H.; PANIZ, R.; SANTOS, R.
425 P. dos; MARODIN, G. A. B. Effect of high temperatures in the pre-blooming and

- 426 blooming periods on ovule formation, pollen grains and yield of 'Granada' peach.
427 **Scientia Horticulturae**, Elsevier: Amsterdam, v.122, p. 37–44, 2009.
- 428
- 429 NEWBIGIN, E.; ANDERSON, M.A.; CLARKE, A. E. Gametophytic self-
430 incompatibility systems. **The Plant Cell**, Rockville, v.5, p.1315-1324, 1993.
- 431
- 432 RASEIRA, M.C.B. Polinização. In: CASTRO, L.A.S. Ameixa/Produção, EMBRAPA
433 Clima Temperado (Pelotas, RS) – Brasília: EMBRAPA **Informação Tecnológica**,
434 p.30-33, 2003.
- 435
- 436 SAPIR G.; STERN, R. A.; EISIKOWITCH, D.; GOLDWAY, M. Cloning of four
437 new Japanese plum S-alleles and determination of the compatibility between
438 cultivars by PCR analysis. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**,
439 Warwick, v. 79, n. 2, p. 223-227, 2004.
- 440
- 441 SCHIFINO-WITTMANN, M.T. & DALL'AGNOL, M. Self-Incompatibility In
442 Plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p.1083-1090, 2002.
- 443
- 444 SOUZA, C. M.; RASEIRA, M. C. B. Germinação *in vitro* de pólen de pereira.
445 **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 1, n. 2, p. 219-223, 1998.
- 446
- 447 TAKAYAMA, S. & ISOGAI, A. Self-Incompatibility in Plants, **Annual Review of**
448 **Plant Biology**, Palo Alto, v.56, p.457-489, 2005.
- 449
- 450 TAO, R.; YAMANE, H.; e SUGIURA, A. Molecular Typing of S-alleles through
451 identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in Sweet Cherry.
452 **Journal of the American Society for Horticulture Science**, Mount Vermon, v.124,
453 p.224-233, 1999.
- 454
- 455 TAO, R. HABU, T.; NAMBA, A.; YAMANE, H. Inheritance of Sf-RNase in Japanese
456 apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. **Theoretical and applied**

- 457 **Genetics**, Heidelberg , v.105, p.222-228, 2002a.
458
- 459 WEINBERGER, J. H. Plums. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in**
460 **fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University, p. 336-347, 1975.
461
- 462 WILSON, J. A.; BROWN, S. O. Differential staining of pollen tubes in grass pistils.
463 **Agronomy Journal**, Madison, n. 49. p. 220-222, 1957.
464
- 465 WU, J., GU, C., DU, Y.-H., WU, H.-Q., LIU, W.S., LIU, N., LU, J., ZHANG, S. L.
466 Self-compatibility of ‘Katy’ apricot (*Prunus armeniaca* L.) is associated with pollen-
467 part mutations. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin/Heidelberg, v. 24, p. 23-35,
468 2011.
469
- 470 YAMANE, H.; TAO, R.; SUGIURA, A.; HAUCK, N.R.; IEZZONI, A.F.
471 Identification and characterization of S-RNases in tetraploid sour cherry (*Prunus*
472 *cerasus*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount
473 Vermon, v.126, p.661-667, 2001.
474
- 475 ZHANG, Y.; ZHAO, Z.; XUE, Y. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility.
476 **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.60, p.21-42, 2009.
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487

488

489 **TABELA 1** - Estádios de desenvolvimento do tubo polínico no pistilo das cultivares
490 de ameixeira japonesa (*Prunus salicina*) polinizadas *in vivo* ⁽¹⁾.

Notas*	Grau de desenvolvimento do tubo polínico
 1	Tubo polínico no estigma, sem penetrar no estilete
2	Tubo polínico no 1º terço do estilete
3	Tubo polínico no 2º terço do estilete
4	Tubo polínico no 3º terço do estilete
5	Tubo polínico no interior do ovário
6	Tubo polínico próximo ao óvulo
7	Tubo polínico no óvulo

491

492 ⁽¹⁾ De acordo Franken et al. (1988) e adaptado por Bandeira et al. (2011).

493

494

495 **TABELA 2** - Percentagem de frutificação efetiva dos cruzamentos controlados,
496 realizados a campo, nos pomares de ameixeira japonesa (*Prunus*
497 *salicina* Lindl.) da Embrapa Clima Temperado, na safra de 2009/2010
498 e 2010/2011.

Genitores femininos	Genitores masculinos	Frutificação efetiva (%)	
		2009/2010	2010/2011
	América	0	0
	Rosa Mineira	0,66	26,7
América	Pluma 7	0	0
	Amarelinha	0	8,7
	Reubennel	0	12,7
Gulf Blaze	Gulf Rubi	9,8	11,36
	Gulf Blaze	0	0
Gulf Rubi	Gulf Rubi	0	3,84
	Gulf Blaze	2,4	9,94

499

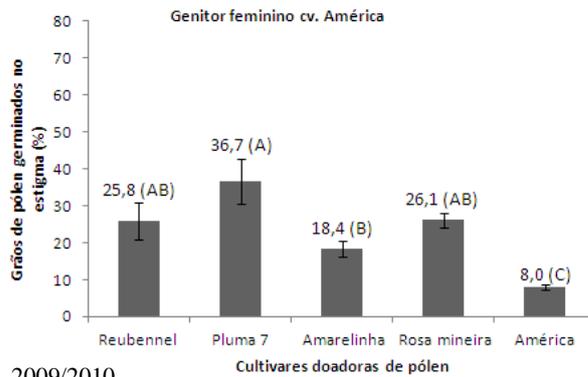
500

501

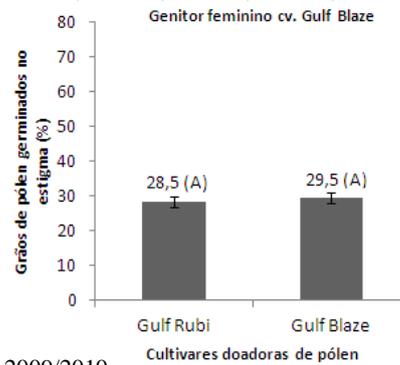
502

503

A



B



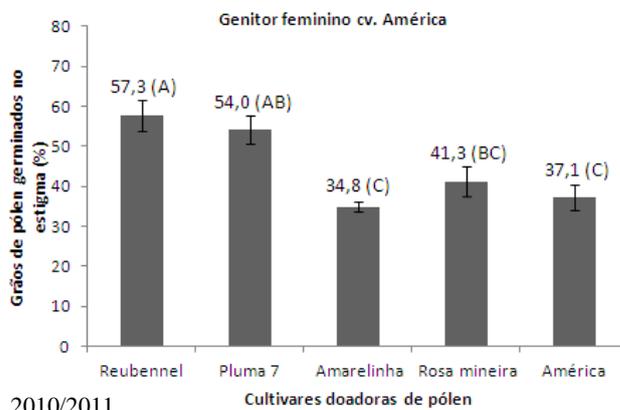
504

2009/2010

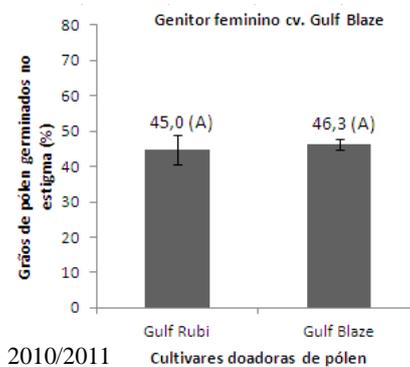
2009/2010

505

C



D



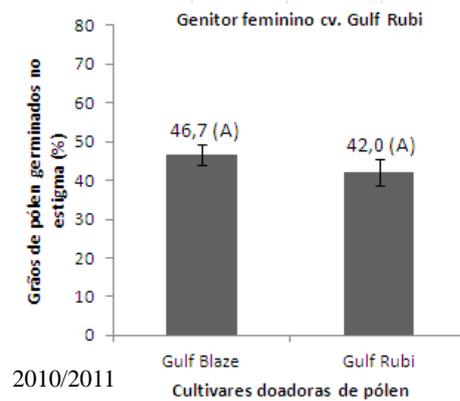
506

2010/2011

2010/2011

507

E



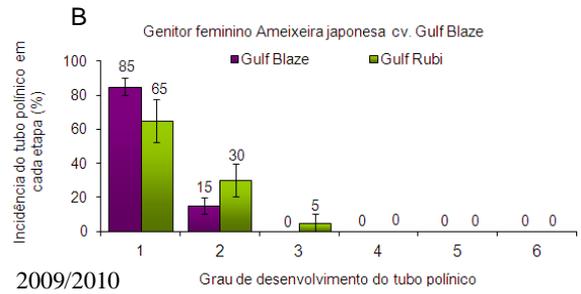
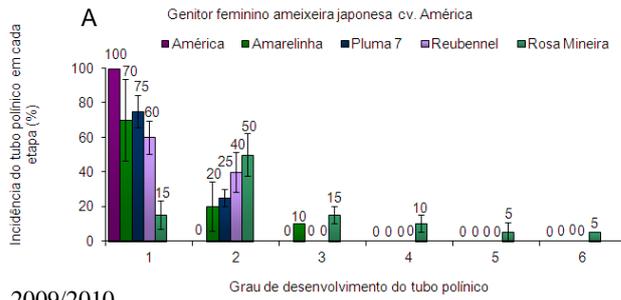
508

509

510 **FIGURA 1** – Percentagem de grãos de pólen germinados no estigma de cultivares de
 511 ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.), nas genitoras femininas
 512 ‘América’ (A e C), ‘Gulf Blaze’ (B e D), ‘Gulf Rubi’ (E) após 120h das
 513 polinizações controladas, realizadas *in vivo* e mantidas em temperatura
 514 ambiente. As barras representam o erro padrão da média.

515

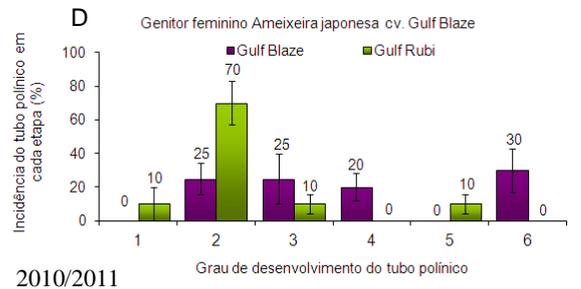
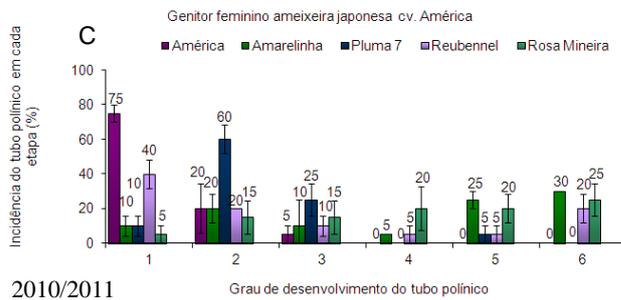
516



517

518

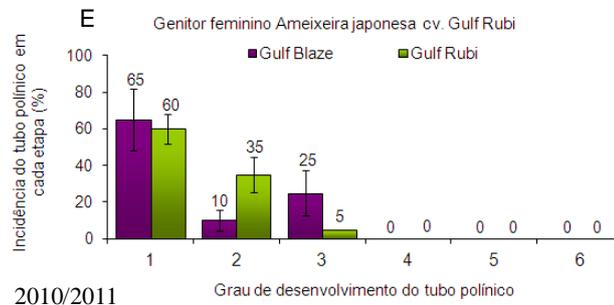
519



520

521

522



523

524

525 **FIGURA 2** - Percentagem de incidência do tubo polínico em cada etapa do percurso
 526 estigma-óvulo de ameixeiras japonesas (*Prunus salicina* Lindl.), em
 527 função das polinizações controladas, realizadas *in vivo*, após 120h, e
 528 mantidas em temperatura ambiente nas genitoras femininas ‘América’
 529 (A e C), ‘Gulf Blaze’ (B e D) e ‘Gulf Rubi’ (E). As barras representam
 530 o erro padrão da média.

ARTIGO 2

**IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS-S ASSOCIADOS À COMPATIBILIDADE
GAMETOFÍTICA EM AMEIXEIRA JAPONESA**

(De acordo com as normas da Revista Brasileira de Fruticultura)

1 **IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS-S ASSOCIADOS À COMPATIBILIDADE**
2 **GAMETOFÍTICA EM AMEIXEIRA JAPONESA**

3
4 DANIELA DE CONTI⁴, MARIA DO CARMO BASSOLS RASEIRA⁵, JOSÉ
5 ANTÔNIO PETERS⁶, VALMOR JOÃO BIANCHI⁶.

6
7
8 **RESUMO**

9 A autoincompatibilidade gametofítica é governada pelo locus-S, sendo encontrada em
10 várias espécies de *Prunus*, incluindo a ameixeira japonesa. O conhecimento dos alelos-
11 S presentes em cada cultivar de ameixeira japonesa é essencial para definir quais
12 cultivares são compatíveis sob aspecto reprodutivo, o qual contribui para uma maior
13 frutificação efetiva. O objetivo do trabalho foi identificar e caracterizar
14 molecularmente os alelos-S de 18 cultivares de ameixeira japonesa (*Prunus salicina*
15 Lindl) e verificar a compatibilidade entre os genótipos avaliados. Para identificar os
16 alelos-S, dois pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos foram utilizados para
17 amplificar os alelos via PCR nas seguintes cultivares: Pluma 7, Gulf Rubi, Blood
18 Plum, Wickson, América, Santa Rosa, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, Amarelinha,
19 The First, Harry Pieckstone, Santa Rita, Planta 16 (Rosa Mineira x América), Seleção
20 A26 (Burbank), Planta 21 (Seleção A26 x Estrela Púrpura), Planta 19 (América x
21 Amarelinha), Methley e Simka. As condições da PCR utilizadas, bem como as
22 combinações de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, permitiram a identificação
23 de alelos-S nas cv. de *P. salicina* estudadas, bem como a indicação dos polinizadores
24 mais compatíveis com algumas das principais cultivares utilizadas na produção
25 comercial de frutas no Brasil. Verificou-se que as cultivares América e Santa Rosa;
26 Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira, Estrela Púrpura e Planta 21 apresentaram
27 incompatibilidade total entre si, devido compartilharem os mesmo alelos.

⁴ Bióloga, Mestranda em Fisiologia Vegetal, PPGFV – Departamento de Botânica – Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas – RS, Bolsista CAPES, e-mail: danideconti@yahoo.com.br.

⁵ Engenheira Agrônoma, Dr., Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, email: bassols@cpect.embrapa.br.

⁶ Engenheiro Agrônomo, Prof. Dr. do Departamento de Botânica – Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas – RS, e-mail: valmorjb@yahoo.com; japeters1@hotmail.com.

28 **Termos para indexação:** *Prunus salicina* Lindl, autoincompatibilidade gametofítica,
29 PCR, alelos-S.

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59 **IDENTIFICATION OF THE ALLELES-S ASSOCIATED WITH**
60 **COMPATIBILITY GAMETOPHYTES PLUM IN JAPANESE**

61
62
63 **ABSTRACT**

64 The gametophytic self-incompatibility is genetically controlled by the S-loci which
65 occurring several *Prunus* species, including Japanese plum. Knowledge of the S-
66 genotypes in Japanese plum cultivars is essential to establishing productive orchards,
67 defining combinations of compatible cultivars. The objective of this work was to
68 identify and molecularly characterize the S- alleles of the 18 cultivars of Japanese
69 plum (*Prunus salicina* Lindl) and verify the compatibility between the genotypes. To
70 indentify S-alleles associated with self-incompatibility, two pairs of specific *primers*
71 were tested using PCR among cultivars Pluma 7, Gulf Rubi, Blood Plum, Wickson,
72 América, Santa Rosa, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, Amarelinha, The First, Harry
73 Pieckstone, Santa Rita, Planta 16 (Rosa Mineira x América), Seleção A26 (Burbank),
74 Planta 21 (Seleção A26 x Estrela Púrpura), Planta 19 (América x Amarelinha),
75 Methley e Simka. The conditions of PCR used as well as the combinations of primers
76 or primers, allowed the identification of alleles-S in cv. *P. salicina* studied, and an
77 indication of pollinators more compatible with some of the main varieties used in
78 commercial production of fruit in Brazil. América cultivars and Santa Rosa; Blood
79 Plum, Wickson, Rosa Mineira, Estrela Púrpura and Planta 21 presented total
80 incompatibility with each other due to share the same alleles.

81
82 **Index terms:** *Prunus salicina* Lindl, gametophytic self-incompatibility, PCR, S-
83 alleles.

84

85

86

87

88

INTRODUÇÃO

89

90

91 Dentre as espécies de clima temperado exploradas no Brasil, a ameixeira tem
92 sido uma das frutíferas de maior difusão nos últimos anos, devido, principalmente, ao
93 plantio de cultivares variedades introduzidas (MOTA et al., 2010). Porém, o volume
94 produzido da fruta é ainda insuficiente para atender a demanda interna. Em 2010, a
95 ameixeira ocupou o quarto lugar de fruta fresca mais importada, totalizando cerca de
96 24 mil toneladas (IBRAF, 2011).

97

98 A ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl) tem predomínio dentre as
99 espécies de ameixeira cultivadas no Brasil, pois diversas cultivares encontra condições
100 favoráveis para o seu cultivo (SEGANFREDO, 1995), sendo de menor exigência ao
frio e mais adaptada às condições de invernos do sul do país.

101

102 Mesmo com grande potencial de cultivo, alguns fatores têm limitado o aumento
103 da produção nacional de ameixas, dentre eles destaca-se a autoincompatibilidade
104 gametofítica, ou seja, a incapacidade de autopolinização de muitas cultivares
105 (RASEIRA, 2003). Assim, na formação de pomares de ameixeiras são necessárias
106 cultivares polinizadoras compatíveis, em que o pólen deverá efetivamente fecundar o
pistilo da cultivar produtora, caso contrário não haverá produção.

107

108 O mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica (AIG) encontrado nas
109 famílias Rosaceae, Solanaceae, Papaveraceae, dentre outras (GIBBS, 1986) é
110 determinado pela presença de um loco multialélico, contendo os denominados alelos-
111 S. Este mecanismo envolve a presença de uma ribonuclease, S-RNase como
112 componente do pistilo-S e uma proteína F-box (*SFB-S-haplotype-specific F-box*) como
113 componente do pólen-S. Em uma situação de incompatibilidade, a S-RNase do pistilo
114 degrada o RNA do pólen, evitando assim, o crescimento do tubo polínico (McCLURE,
2011; ZHANG et al., 2009).

115

116 Este sistema de AIG apresenta três tipos de interação de compatibilidade:
117 quando ambos os alelos são comuns, estes são considerados totalmente incompatíveis;
118 quando apenas um alelo é diferente, este é considerado parcialmente compatível;
119 porém, quando os quatro alelos são diferentes, estes são considerados totalmente
compatíveis (KAUFMANN et al., 1992).

120 Não dispensando os ensaios de polinização controlada a campo, a avaliação
121 molecular dos alelos-S, de cada cultivar, torna todo o processo de seleção de uma
122 polinizadora muito mais eficiente, pois permite selecionar precocemente cultivares
123 totalmente compatíveis, do ponto de vista genético-reprodutivo (MOTA; OLIVEIRA,
124 2005). A caracterização desses alelos-S, quando associada à tecnologia de
125 transformação genética de plantas, poderá potencializar os trabalhos de melhoramento
126 genético com o objetivo de obter cultivares autoférteis, na tentativa de melhorar a
127 frutificação efetiva e sua produtividade.

128 O objetivo desse trabalho foi caracterizar molecularmente os alelos-S
129 relacionados à incompatibilidade gametofítica, de cultivares de *P. salicina*, visando a
130 auxiliar melhoristas na escolha dos melhores genótipos para polinização cruzada em
131 programas de melhoramento e no manejo reprodutivo de pomares comerciais.

132

133

134

MATERIAL E MÉTODOS

135

136 O material utilizado para as análises constituiu-se de folhas jovens,
137 completamente expandidas e sadias, obtidas de ameixeira japonesa (*P. salicina*) das
138 cultivares Pluma 7, Gulf Rubi, Blood Plum, Wickson, América, Santa Rosa, Rosa
139 Mineira, Estrela Púrpura, Amarelinha, The First, Harry Pieckstone, Santa Rita, Planta
140 16 (Rosa Mineira x América), Seleção A26, Planta 21 (Seleção A26 x Estrela
141 Púrpura), Planta 19 (América x Amarelinha), Methley e Simka, coletadas na Embrapa
142 Clima Temperado-Pelotas/RS. O DNA foi extraído a partir de amostras contendo 75
143 mg de folhas, usando o método descrito por Doyle e Doyle (1991). Após, foi realizada
144 a quantificação do DNA em gel de agarose 0,8% e suas respectivas diluições para uma
145 concentração final de 5 ng μl^{-1} .

146

147 Para as reações de PCR, foram utilizados 20 ng de DNA de cada amostra; 2,5 μl
148 de 10x PCR buffer; 1,500 μM de MgCl_2 ; 0,4 μM de cada *primer* (Tab. 1); 150 μM de
149 cada dNTPs; 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água Milli-Q para um
volume final de 25 μL . Os *primers* utilizados foram as combinações Pru-C2/PCE-R

150 (YAMANE et al., 2001; TAO et al., 1999) e Pru-C2/Pru-C5 (TAO et al., 1999)
151 (Tab.1).

152 A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (PCR Sprint – Thermo
153 Electron Corporation) com o perfil térmico inicial de 94°C por 5 min, 54°C por 2 min,
154 e 72°C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 2 min 72°C por 3
155 min e com um ciclo final de 94°C por 1 min, 54°C por 2 min, 72°C por 10 min. Os
156 fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a
157 2%, a 5 V cm⁻¹, usando como padrão o marcador de massa molecular o DNA Ladder
158 100 pb (Ludwig).

159

160

161

161 RESULTADOS E DISCUSSÃO

162

163 A combinação de *primers* que apresentou melhores resultados de amplificação
164 foi a de Pru-C₂/Pru-C₅ (Fig.1), mostrando amplificação de alelos nas 18 cultivares
165 testadas. Cada cultivar apresentou dois alelos distintos, com exceção das cultivares
166 Gulf Rubi, Amarelinha, Harry Pieckstone, Planta 19 (América x Amarelinha) e
167 Methley que apresentaram a amplificação de apenas um alelo. A combinação dos
168 *primers* Pru-C₂/PCE-R (Fig.2) amplificaram os alelos em 13 cultivares testadas
169 (72,2%), sendo que destas, oito cultivares apresentaram dois alelos amplificados e
170 cinco obtiveram apenas um único alelo [‘Gulf Rubi’, ‘The First’, ‘Friar’, ‘Seleção
171 A26’, ‘Planta 21’ (Seleção A26 x Estrela Púrpura)].

172

173 Entre as combinações de *primers* testados, pode-se observar uma variação em
174 relação ao tamanho dos alelos obtidos entre as cultivares estudadas. Quando se utilizou
175 o *primer* Pru-C₂/Pru-C₅ oito diferentes alelos foram identificados entre as 18 cultivares
176 testadas. Estes alelos, conforme a visualização do resultado da amplificação obtiveram
177 um tamanho variando de aproximadamente 700 a 1900 pb (Tab. 2). Quando se utilizou
178 os pares de *primers* Pru-C₂/PCE-R, amplificou seis diferentes alelos, porém o tamanho
179 destes fragmentos foi menor do que os obtidos com a combinação de *primers*
anteriores, ficando em torno de 550 a 1500 pb (Tab.2). Esse menor tamanho dos alelos

180 se deve ao fato do primer PCE-R ancorar numa região intermediária entre Pru-C₂ e
181 Pru-C₅, conforme pode ser visualizado na figura 3.

182 Beppu et al. (2002) utilizando os *primers* Pru-C₂/PCE-R obtiveram a
183 amplificação de dois alelos em cada cultivar analisada, sendo que nove diferentes
184 alelos foram obtidos a partir das 17 cultivares avaliadas. Porém, quando estes autores
185 utilizaram os *primers* Pru-T₂/PCE-R, apenas uma cultivar apresentou a amplificação
186 de apenas um alelo, sendo que as demais apresentaram os dois alelos.

187 Em cultivares de damasqueiro japonês, Yaegaki et al. (2001) verificaram que a
188 combinação de *primers* Pru-C₂/Pru-C₅ proporcionou a amplificação dos dois alelos nas
189 seis cultivares estudadas. Porém, quando utilizou-se os *primers* Pru-C₂/Pru-C₄, a
190 amplificação de dois alelos foi observada em apenas três cultivares das seis analisadas.
191 De acordo com Kodad et al. (2008), a amplificação de apenas uma banda em algumas
192 cultivares quando utilizado *primers* para a região conservada (C₁-C₅) é comum em
193 amendoeira, o qual pode ser válido também para outras espécies sob análise.

194 Esta ausência de amplificação em algumas cultivares também foi observada no
195 presente trabalho, podendo estar relacionado, em alguns casos, significando a presença
196 de um alelo nulo para aquele loco gênico da cultivar avaliada, ou amplificação de
197 bandas de mesmo tamanho, ou seja, o loco está em homozigose (KODAD et al.,
198 2008). Segundo Callen et al. (1993) alelos nulos são observados com frequência em
199 locos de microssatélites sendo resultado de mutações, como por exemplo, substituição,
200 inserções e deleções em um ou ambas as regiões de anelamento dos *primers*.

201 Outra explicação da ausência de amplificação dos alelos-S pode estar
202 relacionada com a capacidade dos *primers* para amplificar os alelos-S presente nas
203 cultivares estudadas, isso implicaria na necessidade de desenvolver *primers*
204 específicos para reconhecer com precisão os alelos-S presentes em cada cultivar ou
205 genótipo (DONOSO et al., 2009). Entretanto, esta especificidade dos *primers* poderia
206 os tornar ineficientes para análise de outras cultivares, limitando-se a identificação de
207 poucas cultivares.

208 No presente trabalho quando utilizou-se o conjunto de *primers* IZ1 e IZ4,
209 apenas três cultivares apresentaram amplificação e de apenas um alelo em cada uma,
210 sendo que este fato se justifica quando se leva em consideração que estes *primers*

211 amplificam apenas seqüências exclusivas de um alelo-S específico (SAPIR et al.,
212 2004).

213 Os *primers* utilizados foram sintetizados de acordo com as informações
214 disponíveis na literatura, tendo como local de referência a região conservada entre
215 diferentes espécies de Rosaceas. Na figura 3, observa-se um esquema dessas regiões e
216 os locais de onde foram obtidos os *primers*. De acordo com Beppu et al. (2002), da
217 região conservada C₃ se obteve o *primer* PCE-R e, encontra-se entre as regiões
218 conservadas C₂ e C₅ das quais foram obtidos Pru-C₂ e Pru-C₅, respectivamente.

219 Os resultados de PCR dos dois conjuntos de *primers* utilizado para flanquear as
220 regiões (Pru-C₂/PCE-R e Pru-C₂/Pru-C₅) mostrou tamanhos de fragmentos diferentes,
221 porém um padrão semelhante de distribuição de bandas entre as cultivares (Tab.2,
222 Fig.1 e Fig.2). Variações semelhantes as obtidas no presente trabalho, com os referidos
223 conjuntos de *primers* foram obtidas por Beppu et al. (2002) e Mota et al. (2010).

224 Em relação à autoincompatibilidade entre as cultivares, com base na
225 amplificação com os dois diferentes pares de *primers* testados, pode-se obter a planta
226 mais adequada para ser usada como polinizadora. De acordo com a figura 1 e tabela 2,
227 na amplificação com os *primers* Pru-C₂/Pru-C₅, a cv. América apresentou alelos de
228 tamanho em torno de 1900 e 1500 pb, padrão semelhante à da cv. Santa Rosa. Já, as
229 cultivares Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira Estrela Púrpura e Planta 21
230 apresentaram alelos de tamanho em torno de 850 e 700 pb. Quando utilizou-se os
231 *primers* Pru-C₂/PCE-R (Fig. 2 e Tab. 2), as cultivares Blood Plum, Wickson, Rosa
232 Mineira apresentaram alelos em torno de 650-550 pb. Estas evidências sugerem que
233 estas sete cultivares apresentam autoincompatibilidade e, dentre as 18 testadas, são as
234 únicas com incompatibilidade total entre elas. Pesquisas realizadas por Mota et al.
235 (2010) com cultivares de ameixeira japonesa, também encontraram os mesmos perfis
236 eletroforéticos das cultivares Santa Rosa e América, confirmando a sua
237 autoincompatibilidade e os dados de amplificação obtidos no presente trabalho.

238 Verificou-se semi-compatibilidade (SC) entre algumas cultivares, as quais
239 tiveram amplificados dois alelos, porém apresentaram apenas um alelo em comum
240 (Tab. 3 e 4, Fig.1 e 2). Algumas cultivares também amplificaram dois alelos, mas
241 nenhum alelo em comum, mostrando-se dessa forma compatíveis (C) entre si. Já,

242 algumas cultivares, que amplificaram apenas um alelo, podem ser consideradas com
243 autoincompatibilidade parcial (AIP) como ocorreu com as cv. Gulf Rubi, Amarelinha,
244 Harry Pieckstone, Planta 19 e Methley na amplificação com os *primers* Pru-C₂/Pru-C₅
245 e com as cv. Gulf Rubi, The First, Friar, Seleção A26 e Planta 21 com os *primers* Pru-
246 C₂/PCE-R.

247 Embora o sequenciamento é uma estratégia adequada para comprovar a
248 identidade dos alelos-S, uma outra forma de confirmar a identidade dos alelos é pela
249 verificação da descendência, ou seja, confrontando o perfil eletroforético dos alelos de
250 cada cultivar com seus respectivos genitores.

251 Dentre as cultivares estudadas, pode-se confirmar a descendência dos alelos da
252 Planta 16 (Rosa Mineira x América) a qual herdou um alelo da cv. América (1900 pb)
253 e o outro alelo foi herdado da cv. Rosa Mineira (850 pb). A Planta 21 (Seleção A26 x
254 Estrela Púrpura) obteve a amplificação de dois alelos, sendo um destes herdado da cv.
255 Estrela Púrpura (700pb) e o outro foi herdado da ‘Seleção A26’ (850pb).

256 A cv. Harry Pickstone (Methley x Wickson) amplificou apenas um alelo sendo
257 este herdado da cv. Wickson, porém não se conseguiu a amplificação do segundo
258 alelo, derivado de Methley. A cv. Planta 19 (América x Amarelinha) também
259 amplificou apenas um alelo, estando este em homozigose, não apresentando nem um
260 dos alelos dos seus referidos genitores. Este fato por ter ocorrido devido a não
261 amplificação de um dos alelos da cv. América, ou então a possível contaminação com
262 pólen de outra cultivar na hora da polinização.

263 A análise dos alelos-S e da genealogia tem permitido a predição dos genótipos
264 S-RNase de cultivares, a identificação de possíveis relações genéticas e especulações
265 sobre a origem de alguns alelos S-RNases.

266 Com a identificação dos alelos-S foi possível estabelecer uma nova relação de
267 polinizadoras para as cultivares estudadas, sendo que algumas foram determinadas
268 através de métodos convencionais de polinização e testes de crescimento do tubo
269 polínico, ou seja, estudos morfológicos (Tab.5). Nesta nova relação somente foram
270 utilizadas as cultivares que mostraram compatibilidade completa.

271 Vale ressaltar que além dos dados de compatibilidade reprodutiva através de
272 análises moleculares, deve-se levar em consideração a variabilidade das condições

273 climáticas, principalmente em relação à temperatura e época de floração, sendo estes
274 pontos chave para uma ótima frutificação efetiva.

275 A identificação dos alelos S-RNase permitiu a atribuição das cultivares de
276 ameixeira japonesa aos seus correspondentes grupos de compatibilidade, sendo que
277 esta informação é valiosa para a seleção de genótipos para programas de
278 melhoramento genético e para seleção adequada de cultivares polinizadoras em
279 pomares comerciais, pois a seleção baseada somente com base na coincidência, parcial
280 ou total no período de floração não é suficiente para escolher com precisão as
281 melhores cultivares polinizadoras.

282

283

284

CONCLUSÕES

285

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

288 Os cruzamentos entre América e Santa Rosa; Blood Plum, Wickson, Rosa
289 Mineira, Estrela Púrpura e Planta 21 apresentaram incompatibilidade entre si.

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

292

293

294

AGRADECIMENTOS

295

296 Agradecemos o apoio financeiro fornecido pelo Conselho Nacional de
297 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CAPES).

298

299

300

REFERÊNCIAS

301

302 BEPPU, K.; YAMANE, H.; YAEGAKI, H.; YAMAGUCHI, M.; KATAOKA, I.;
303 TAO, R. Diversity of S-RNase genes and S-haplotypes in Japanese plum (*Prunus*

- 304 *salicina* Lindl.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, United
305 Kingdom, v.77, n.6, p.658-664, 2002.
- 306
- 307 CALLEN, D. F.; THOMPSON, A. D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H. A.; RICHARDS, H.
308 I.; MULLEY, J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of “null alleles” in
309 the“AC” microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, Chicago,
310 v.52, p.922-927, 1993.
- 311
- 312 DONOSO, J. M., AROS, D., MENESES, C., INFANTE, R. Identification of S-alleles
313 associated with self-incompatibility in apricots (*Prunus armeniaca* L.) using molecular
314 markers. **Journal of Food Agriculture and Environment**, Finlândia, v.47, p. 270-
315 273, 2009.
- 316
- 317 DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**,
318 Rochestes, v.1, p.13-15, 1991.
- 319
- 320 GIBBS, P. E. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have
321 the same sporophytic mechanism? **Plant Systematics and Evolution**, Springer:
322 Wien, v. 154, p. 285-323, 1986.
- 323
- 324 IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível:
325 <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp>. Acessado: 29 de dezembro de
326 2011.
- 327
- 328 KAUFMANN, H.; KIRCH, H.; WEMMER, T. Sporophytic and gametophytic
329 selfincompatibility. In: CRESTI, M.; TIEZZI, A. **Sexual plant reproduction**. Berlin:
330 Springer, p.115-125, 1992.
- 331
- 332 KODAD, A. O., SANCHEZ, N., SAIBO, M., OLIVEIR, A., SOCIAS R.,
333 COMPANY, I. Identification and characterization of new S-alleles associated with
334 self-incompatibility in almond. **Plant Breeding**, Berlin, v. 127, p. 632-638, 2008.

335

336 McCLURE, B., GARCI, C. F., ROMERO, C. Compatibility and incompatibility in S-
337 RNase-based systems. **Annals of Botany**, Oxford, v.108, p. 647–658, 2011.

338

339 MOTA, M.; OLIVEIRA, C. M. **Identificação de alelos S na pereira 'Rocha' e**
340 **determinação da compatibilidade entre cultivares**, 2005. Disponível:
341 <http://www.isa.utl.pt/files/pub/id/Mota_Oliveira_2005_ActaPortHort1.pdf>

342 Acessado: 14 de outubro, 2011.

343

344 MOTA, M. S., BIANCHI, V. J., CARVALHO, A. Z., BRAGA, E. J. B., PETERS, J.
345 A. Caracterização molecular dos alelos-S de incompatibilidade gametofítica em
346 *Prunus salicina* (Lindl.). **Revista Brasileira de Friticultura**, Jaboticabal, v.32, n.3, p.
347 798-807, 2010.

348

349 RASEIRA, M. C. B. Polinização. In: CASTRO, L. A. S. **Ameixa: produção**. Pelotas:
350 EMBRAPA Clima Temperado, 2003. p.30-33.

351

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

356

357 SEGANFREDO, R.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. Influência do ácido
358 indolbutírico e de épocas de coleta de estacas no enraizamento de cultivares de
359 ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.1,
360 n.1, p.40-42, 1995.

361

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

366

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

371

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

376

377 ZHANG, Y.; ZHAO, Z.; XUE, Y. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility.
378 **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.60, p.21-42, 2009.

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397 **TABELA 1-** Combinação de *primers* usados na amplificação de alelos-S, com suas
 398 respectivas seqüências de nucleotídeos e temperatura de anelamento.
 399 UFPel/Pelotas, 2011.

Designação do primer	Seqüência (5'-3')	Temperatura anelamento (°C)	Referência
Pru-C ₂ 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-C ₂ Pru-C ₅	CTA TGG CCA AGT AAT TAT TCA AAC C TAC CAC TTC ATG TAA CAA CTG AG	54	Tao et al., 1999.

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420 **TABELA 2-** Combinação de *primers* e tamanho aproximado (em pares de base) dos
 421 alelos-S amplificados em cultivares de ameixeira-japonesa (*Prunus*
 422 *salicina* Lindl). UFPel/Pelotas, 2011.

Cultivar	<i>Primers</i>	
	Forward: Pru-C ₂ Reverse: Pru-C ₅	Forward: Pru-C ₂ Reverse: PCE-R
Pluma 7	1900-1400	–
Gulf Rubi	1500	1400
Blood Plum	850-700	650-550
Wickson	850-700	650-550
América	1900-1500	–
Santa Rosa	1900-1500	–
Rosa Mineira	850-700	650-550
Estrela Púrpura	850-700	–
Amarelinha	850	1500-650
The First	1500-950	1200
Harry Pickstone	700	–
Santa Rita	1400-850	1200-650
Planta 16	1900-850	900-650
Friar	–	1400
Seleção A26	950-850	550
Planta 21	850-700	550
Planta 19	1700	1500-1400
Methley	1700	1500-1200
Simka	1400-1200	–

423

424

425

426

427

428

429 **TABELA 3-** Relação de compatibilidade gametofítica entre cultivares de ameixeira
 430 japonesa baseada nos alelos-S do loco Pru-C₂/Pru-C₅, amplificados por
 431 PCR. UFPel/Pelotas, 2011.

Cultivar	<i>Primers: Forward: Pru-C₂ Reverse: Pru-C₅</i>																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Pluma 7 (1)	AI	C	C	C	SC	SC	C	C	C	C	C	SC	SC	C	C	C	C	SC
Gulf Rubi (2)	AIP	C	C	SC	SC	C	C	C	SC	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Blood Plum (3)		AI	I	C	C	I	I	SC	C	SC	SC	SC	SC	I	C	C	C	C
Wickson (4)			AI	C	C	I	I	SC	C	SC	SC	SC	SC	I	C	C	C	C
América (5)				AI	I	C	C	C	SC	C	C	SC	C	C	C	C	C	C
Santa Rosa (6)					AI	C	C	C	SC	C	C	SC	C	C	C	C	C	C
Rosa Mineira (7)						AI	I	SC	C	SC	SC	SC	SC	I	C	C	C	C
Estrela Púrpura (8)							AI	SC	C	SC	SC	SC	SC	I	C	C	C	C
Amarelinha (9)								AIP	C	C	SC	SC	SC	SC	C	C	C	C
The First (10)									AI	C	C	SC	SC	C	C	C	C	C
Harry Pickstone (11)										AIP	C	C	C	SC	C	C	C	C
Santa Rita (12)											AI	SC	SC	SC	C	C	C	C
Planta 16 (13)												AI	SC	SC	C	C	C	C
Seleção A26 (14)													AI	SC	C	C	C	C
Planta 21 (15)														AI	C	C	C	C
Planta 19 (16)															AIP	SC	C	C
Methley (17)																	AIP	C
Simka (18)																		AI

432A I – Auto-incompatível; SC – Semi-compatível; C – Compatível; e I – Incompatível; AIP –

433 Autoincompatibilidade parcial.

434

435

436

437

438

439

440

441 **TABELA 4-** Relação de compatibilidade gametofítica entre cultivares de ameixeira
 442 japonesa baseada nos alelos-S do loco Pru-C₂/PCE-R, amplificados por
 443 PCR. UFPel/Pelotas, 2011.

Cultivar	Primers: Forward: Pru-C ₂ Reverse: PCE-R												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gulf Rubi (1)	AIP	C	C	C	C	C	C	C	SC	C	C	SC	C
Blood Plum (2)		AI	I	I	SC	C	SC	SC	C	SC	SC	C	C
Wickson (3)			AI	I	SC	C	SC	SC	C	SC	SC	C	C
Rosa Mineira (4)				AI	SC	C	SC	SC	C	SC	SC	C	C
Amarelinha (5)					AIP	C	SC	SC	C	C	C	SC	SC
The First (6)						AIP	SC	C	C	C	C	C	SC
Santa Rita (7)							AI	SC	C	C	C	C	SC
Planta 16 (8)								AI	C	C	C	C	C
Friar (9)									AIP	C	C	SC	C
Seleção A26 (10)										AIP	C	C	C
Planta 21 (11)											AIP	C	C
Planta 19 (12)												AI	SC
Methley (13)													AI

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

446

447

448 **TABELA 5-** Relação de cultivares de ameixeira japonesa e suas polinizadoras estabelecidas a partir das análises de compatibilidade
 449 dos alelos-S amplificados. UFPel/Pelotas, 2011.

Cultivares Produtoras	Cultivares Polinizadoras Tradicionais	Cultivares Polinizadoras (Indicadas a partir de dados moleculares)
Pluma 7	Blood Plum, Amarelinha	Gulf Rubi, Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, Amarelinha, The First, Harry Pieckstone, Seleção A26, Planta 21, Planta 19, Methley.
Gulf Rubi	–	Pluma 7, Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, Amarelinha, Harry Pieckstone, Santa Rita, Planta 16, Seleção A26, Planta 21, Methley, Simka.
Blood Plum	–	Pluma 7, Gulf Rubi, América, Santa Rosa, The First, Friar, Planta 19, Methley, Simka.
Wickson	–	Pluma 7, Gulf Rubi, América, Santa Rosa, The First, Friar, Planta 19, Methley, Simka.
América	Reubennel, Rosa Mineira	Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, Amarelinha, Harry Pieckstone, Santa Rita, Friar, Seleção A26, Planta 21, Planta 19, Methley, Simka.
Santa Rosa	Santa Rita, The First e Wickson	Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, Amarelinha, Harry Pieckstone, Santa Rita, Friar, Seleção A26, Planta 21, Planta 19, Methley, Simka.
Rosa Mineira	Relativa autofertilidade	Pluma 7, Gulf Rubi, América, Santa Rosa, The First, Friar, Planta 19, Methley, Simka.
Estrela Púrpura	–	Pluma 7, Gulf Rubi, América, Santa Rosa, The First, Friar, Planta 19, Methley, Simka.
Amarelinha	Blood Plum, Pluma 7 e Friar	Pluma 7, Gulf Rubi, América, Santa Rosa, The First, Harry Pieckstone, Friar, Planta 19, Methley, Simka.
The First	Santa Rita, Santa Rosa e Methley	Pluma 7, Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, Amarelinha, Harry Pieckstone, Santa Rita, Friar, Planta 21, Planta 16, Planta 19, Simka.
Harry Pieckstone	Wade, Wickson	Pluma 7, Gulf Rubi, América, Santa Rosa, Amarelinha, The First, Santa Rita, Planta 16, Seleção A26, Planta 19, Methley, Simka.
Santa Rita	Santa Rosa, Methley e The First	Gulf Rubi, América, Santa Rosa, The First, Harry Pieckstone, Friar, Planta 19, Methley.
Planta 16	–	Gulf Rubi, The First, Harry Pieckstone, Planta 19, Methley, Simka, Friar.
Friar	–	Blood Plum, Wickson, Rosa Mineira, Amarelinha, The First, Santa Rita, Planta 16, Seleção A26, Planta 21, Methley.
Seleção A26	–	Pluma 7, Gulf Rubi, América, Santa Rosa, Harry Pieckstone, Planta 19, Methley, Simka.
Planta 21	–	Pluma 7, Gulf Rubi, América, Santa Rosa, The First, Planta 19, Methley, Friar, Simka.
Planta 19	–	Pluma 7, Blood Plum, Wickson, América, Santa Rosa, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, The First, Harry Pieckstone, Santa Rita, Planta 16, Amarelinha, Seleção A26, Planta 21, Simka.
Methley	–	Pluma 7, Gulf Rubi, Blood Plum, Wickson, América, Santa Rosa, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, The First, Harry Pieckstone, Santa Rita, Planta 16, Seleção A26, Planta 21, Simka.
Simka	–	Gulf Rubi, Blood Plum, Wickson, América, Santa Rosa, Rosa Mineira, Estrela Púrpura, Amarelinha, The First, Harry Pieckstone, Planta 16, Seleção A26, Planta 21, Planta 19, Methley.

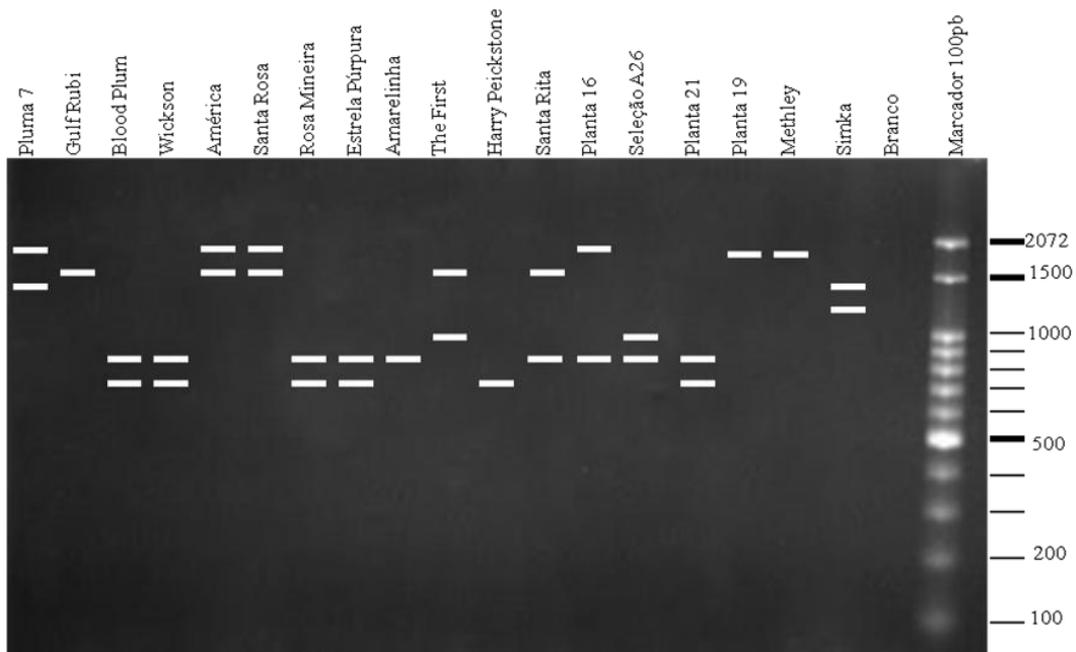


FIGURA 1- Padrões de amplificação de alelos-S obtidos com os iniciadores Pru-C₂/Pru-C₅ em 18 cultivares de ameixeira-japonesa (*Prunus salicina* Lindl). UFPel/Pelotas/RS, 2011.

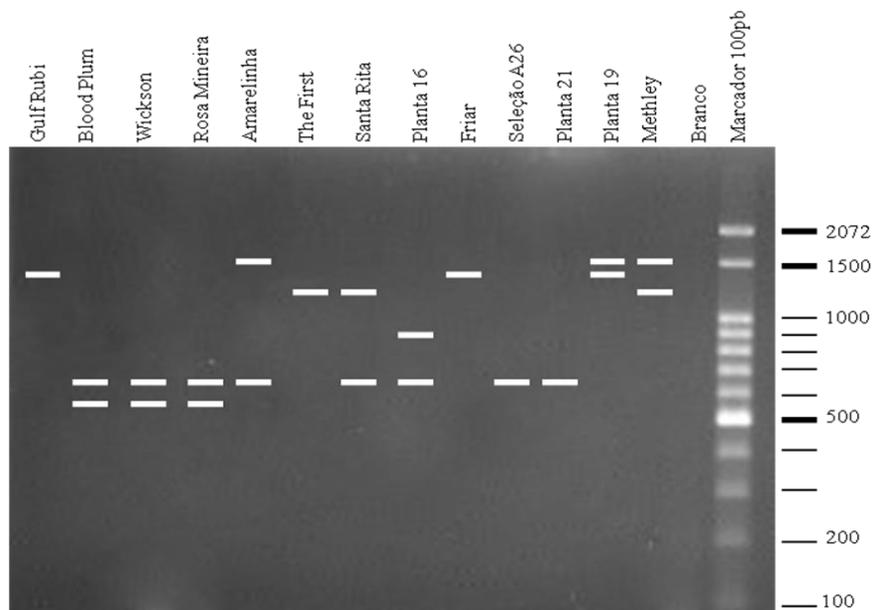


FIGURA 2- Padrões de amplificação de alelos-S obtidos com os iniciadores Pru-C₂/PCE-R em 13 cultivares de ameixeira-japonesa (*Prunus salicina* Lindl). UFPel/Pelotas/RS, 2011.

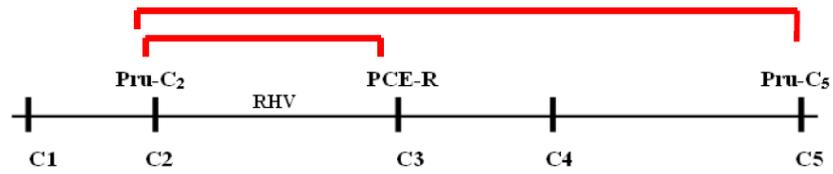


FIGURA 3-Representação esquemática das regiões conservadas para alelos-S em Rosáceas, C1, C2, C3, C4 e C5 conforme Beppu (2002). Localização dos *primers* utilizados nas análise de PCR, Pru-C₂, PCE-R e Pru-C₅ e, uma região hipervariável (RHV).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos estudos anatômico-fisiológico deste trabalho são de grande valia, tendo em vista a ausência de publicações atualizadas sobre a compatibilidade reprodutiva entre cultivares adaptadas a nossa região; servindo de subsídio para programas de melhoramento genético, uma vez que podem ser contrastados com informações de sequenciamento dos alelos-S de cada uma das cultivares, aprimorando, desta forma, o conhecimento a respeito da compatibilidade reprodutiva entre cultivares de ameixeira japonesa (*P. salicina*).

Os estudos fisiológicos confirmaram dados da caracterização molecular dos alelos-S de algumas cultivares dessa espécie, entretanto seria necessário caracterizar molecularmente os alelos de outras cultivares de interesse para a região, comparando com os resultados obtidos neste trabalho.

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.

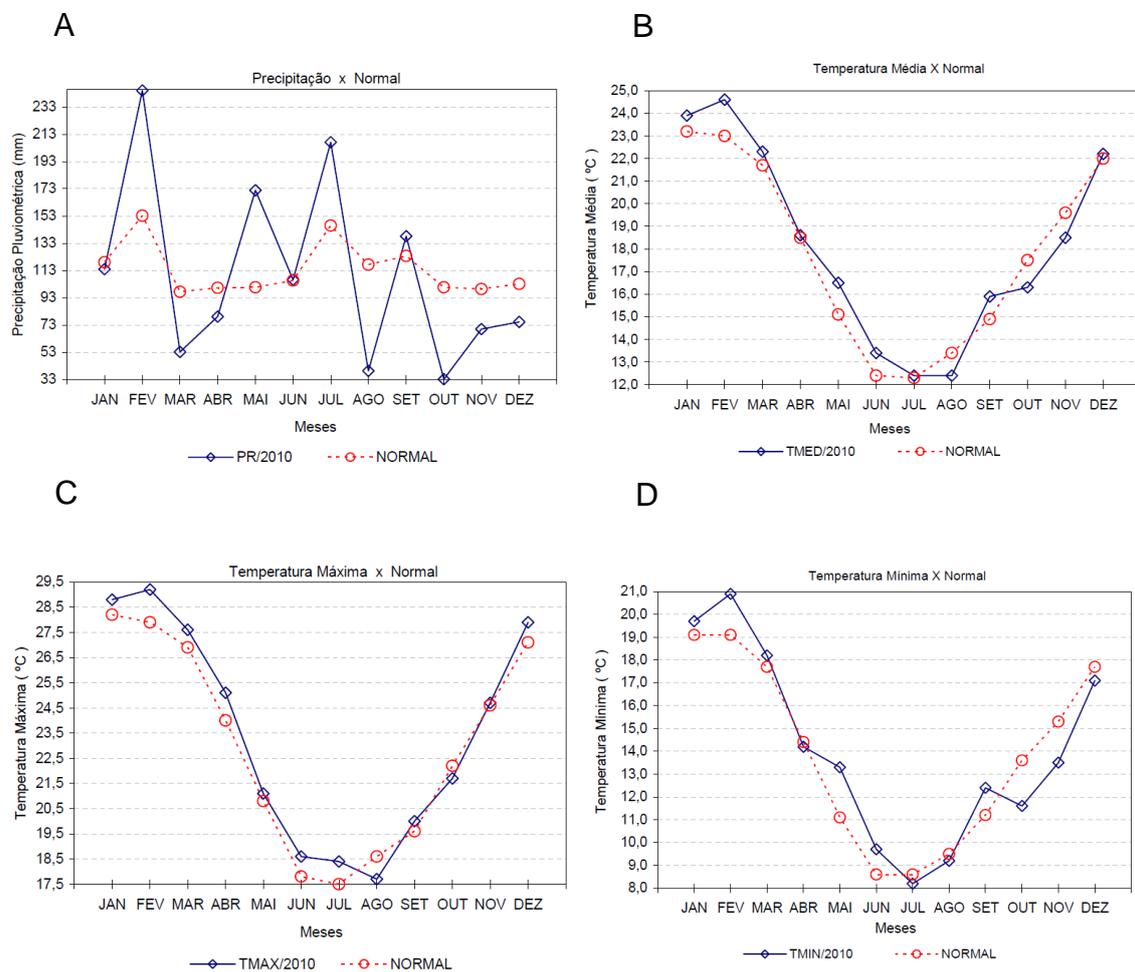
O conhecimento dos alelos-S permite a escolha satisfatória de cultivares polinizadoras mais compatíveis com as cultivares produtoras.

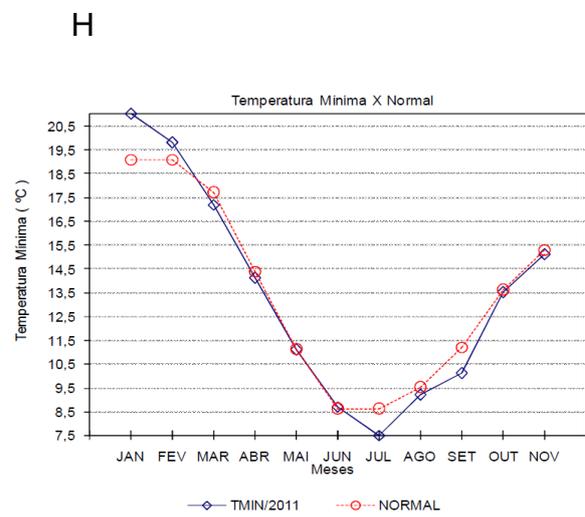
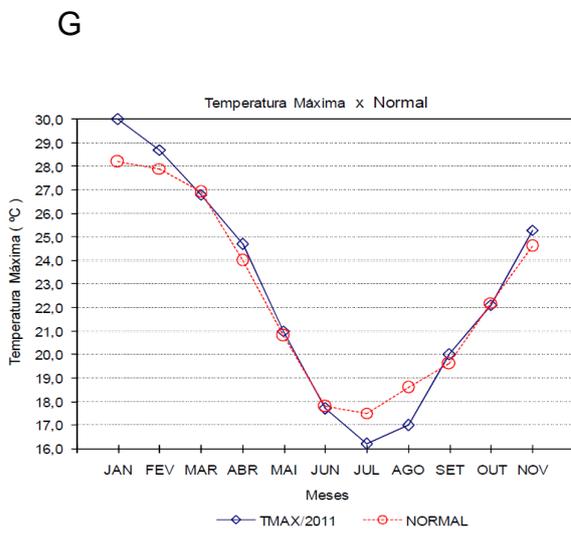
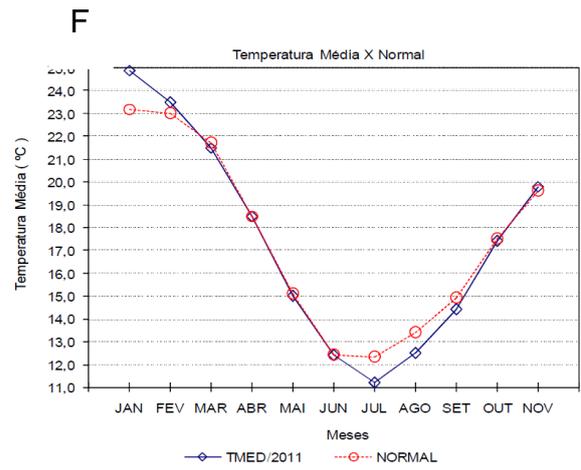
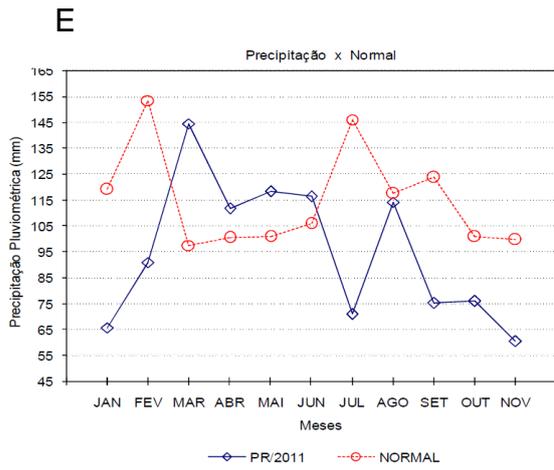
A identificação desses alelos é muito importante para reduzir perdas no campo, bem como para serem utilizados com o intuito de realizar transformação genética, para o silenciamento dos alelos-S de interesse, objetivando obter plantas autoférteis, o que facilitaria o manejo dos pomares, aumentando a produtividade e uniformizando a produção dos frutos.

ANEXO

Anexo A

Anexo A - Representação mensal da pluviosidade (mm) no período de janeiro a dezembro de 2010 (A) e 2011 (E). Distribuição das temperaturas, médias (B, F), máximas (C, G) e mínimas (D, H) mensalmente no período de janeiro a dezembro de 2010 e 2011 respectivamente. (FONTE: Estação Agroclimatológica de Pelotas)





Anexo B

Anexo B - Percentagem de germinação *in vitro* dos grãos de pólen de cultivares de ameixeira japonesa (*P. salicina* Lindl.), utilizados nos experimentos de polinização controlada realizada *in vivo* e no campo experimental da Embrapa Clima Temperada (CPACT) no ano de 2010 e 2011. Pelotas/RS, 2011.

Cultivar ♂	Viabilidade do grão de pólen (%)	
	2010	2011
América	10	Sem pólen
Amarelinha	1	13
Rosa Mineira	1	28
Pluma 7	0	0
Reubennel	Sem pólen	82
Gulf Blaze	14	28
Gulf Rubi	2	0