

## IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE S-RNASES DE CULTIVARES DE *Prunus salicina* Lindl

ANTÔNIO DUARTE PAGANO<sup>1</sup>; RAUNY OLIVEIRA DE SOUZA<sup>2</sup>; MARCO ANTÔNIO  
DALBÓ<sup>3</sup>; VALMOR JOÃO BIANCHI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – antonioduartepagano@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – rauny87@hotmail.com

<sup>3</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – dalbo@epagri.sc.gov.br

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – valmorjb@yahoo.com

### 1. INTRODUÇÃO

Muitos vegetais possuem o sistema autoincompatibilidade gametofítica (AIG) para prevenir a autopolinização, visando reduzir a endogamia e favorecer a variabilidade genética da espécie (SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002). A AIG é comum nas Rosaceae e caracteriza-se pela ação citotóxica de enzimas chamadas ribonucleases (RNases) secretadas nas papilas do estigma floral. A citotoxicidade das enzimas ocorre após serem absorvidas por vesículas das células do tubo polínico, causando degradação do RNA. Os danos ao gametófito masculino só ocorrem quando os alelos envolvidos na reprodução, e que codificam as RNases, são idênticos e estão presentes se expressando no androceu e gineceu de ambos genitores (WILLIAN et al., 2015).

Esses alelos são chamados de “*Sterility loci*” ou “Alelos-S”, constituído do s-haplótipo feminino (S-RNase) e do s-haplótipo masculino (S-FBox). A S-RNase é composta de regiões conservadas (C): C1, C2, C3, C4 e C5 e uma região hipervariável (Hva), capazes de codificar as ribonucleases e desempenhar as funções de citotoxicidade da proteína (USHIJIMA et al., 1998).

Os genes “S” são caracterizados por apresentar uma série alélica (S1, S2, S3, S4, Sn) e que podem ser encontrados em diversas espécies da família Rosaceae: *Prunus dulcis* (Mill) B. (LÓPEZ et al., 2004), *Prunus avium*, *Pyrus cimonis* L. e *Prunus salicina* L. (CARRASCO et al., 2012), conhecidas como amendoeira, cerejeira, pereira e ameixeira japonesa, respectivamente.

O estudo dos alelos “S” de cultivares de *P. salicina* L. tem importância do ponto de vista agrônomo para gerar subsídios ao melhoramento vegetal, selecionar genótipos autoférteis e/ou que apresentam alelos que restaurem a autofertilidade. Além disso, a identificação e caracterização dos alelos das cultivares através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) podem auxiliar no manejo reprodutivo dos pomares pela recomendação de genótipos que apresentem compatibilidade entre si. Ou seja, plantas com alelos diferentes poderão favorecer o *fruit set* nos pomares (FERNÁNDEZ I MARTÍ et al., 2011).

Portanto, objetivou-se no presente estudo a identificação e caracterização dos alelos “S” em cultivares de ameixeira japonesa, através de técnicas moleculares para analisar a compatibilidade reprodutiva dos genótipos.

### 2. METODOLOGIA

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fisiologia Molecular Vegetal do Departamento de Botânica da UFPEL em parceria com a Estação Experimental de Videira/EPAGRI em Videira – SC.

Foram utilizadas 4 cultivares e 1 seleção de *Prunus salicina* Lindl para análise dos alelos “S”. Coletou-se folhas maduras e sadias das cultivares Sanguínea, Golden King, Letícia, Rebelatto e da seleção EMBRAPA A28.

O DNA das cultivares foi extraído conforme método de DOYLE; DOYLE (1991). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue®, posteriormente submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação da integridade das bandas.

Para as reações de PCR foram utilizados 20 ng de DNA de cada amostra e reagentes do kit da PROMEGA® nas seguintes concentrações: GoTaq® (1,25U de Taq DNA polimerase), 1x PCR Buffer (Tris-HCl a 25 mM, pH 9,0); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTPs; 1,0 µM de cada *primer* nas combinações: [PRU-C2 (F)+PCE-R (R) (CP1)] e [PRU-C2 (F)+PRU-C5 (R) (CP2)] e água Milli-Q para um volume final de 25 µl.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em transluminador UV. As amostras foram purificadas com kit da Gene JET PCR Purification (Thermo Scientific®) e encaminhados para o sequenciamento no Laboratório de Genômica Estrutural da UFPEL. Os dados do sequenciamento foram tratados no programa Chromas®, posteriormente realizou-se o alinhamento com auxílio do software Clustal X2 (THOMPSON et al., 1997). As sequências foram comparadas com dados depositados no National Center for Biotechnology Information (NCBI) através da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) localizado no sítio <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da amplificação do DNA em PCR apresentaram diferenças consideráveis nos tamanhos dos alelos “S” entre cultivares. A combinação de *primers* CP1 apresentou 100% de amplificação do DNA das cultivares analisadas. O tamanho das bandas variou entre 400 e 1200 pares de base (pb), constatando-se a presença de somente um alelo amplificado por cultivar (Tabela 1). Quando se utilizou da combinação CP2, todas as cultivares tiveram amplificação de alelos, contudo o número de pares de bases foi maior entre as amostras testadas (650 a 1300 pb) se comparado ao CP1.

As diferenças dos tamanhos dos pares de bases entre os *primers* utilizados justificam-se pela posição em que foram desenhados nas regiões conservadas (C). Enquanto o PRU-C2+PCE-R amplifica entre C2 e C3, a combinação PRU-C2+PRU-C5 ancora entre C2 e C5, ou seja, esta última combinação amplifica um fragmento com maior número de nucleotídeos (USHIJIMA et al., 1998).

Os dados de amplificação possibilitaram inferir sobre a relação de compatibilidade reprodutiva entre cultivares, ou seja, ao observar a disposição dos alelos no gel (Figura 1), podemos inferir que alelos que apresentam mesmo tamanho, possivelmente sejam incompatíveis entre si. Sendo assim, para estas cultivares com alelos idênticos existe a necessidade de plantas polinizadoras que apresentem alelos “S” diferentes para favorecer a frutificação (DE CONTI et al., 2013). Porém, a confirmação efetiva das características dos alelos foi obtida através do sequenciamento.

Ao comparar os dados do sequenciamento, com as sequências já depositadas no NCBI, observou-se que houve a presença de três tipos de séries alélicas: “Si”, “Sh” e “Sc”. Os alelos das cultivares Sanguínea e Rebelatto apresentaram 99% e

96% de identidade com o alelo “Si” quando utilizado o CP1 e 95% e 97% de identidade com a CP2, respectivamente. ‘Golden King’ e ‘Letícia’ apresentaram 95% e 97% de identidade com o alelo “Sh” com CP1, 97% e 98% de identidade com CP2, respectivamente. Somente a seleção EMBRAPA A28 apresentou 99% e 100% de identidade com o alelo “Sc”, utilizando CP1 e CP2, respectivamente (Tabela 1).

A caracterização dos alelos “S” por sequenciamento demonstrou ser uma ferramenta importante para a detecção de possíveis alelos que restauram a autofertilidade ou ocorrência de uma semi-autoincompatibilidade em *P. salicina*, a exemplo da identificação do alelo “Sc” (SAPIR et al., 2007). Diferentemente, ao identificar os alelos “Si” e “Sh” em cultivares de ameixeira japonesa, HALASZ et al., (2007) observaram que estes estariam associados a autoincompatibilidade gametofítica. Contudo, alelos diferentes na polinização podem favorecer a fecundação e frutificação das cultivares. Entretanto, a sincronia floral entre plantas doadoras (polinizadoras) e receptoras de pólen, além de condições do clima, são fatores essenciais para o *fruit-set* da cultura.

Tabela 1. Alelos “S” identificados em cinco genótipos de *P. Salicina*, com duas combinações de primers, e porcentagem de identidade (ID) com acessos de alelos depositados no NCBI

Cultivar	CP1 (pb)	Alelo	ID %	Acesso ao BLASTN	CP2 (pb)	Alelo	ID %	Acesso ao BLASTN
1*	1200	Sc	99	DQ646489.1	1300	Sc	100	AB280791.1
2	400	Si	99	AB084149.1	700	Si	95	AB084149.1
3	500	Sh	95	DQ790374.1	750	Sh	97	AB084148.1
4	500	Sh	97	DQ790374.1	750	Sh	98	AB084148.1
5	420	Si	96	AB084149.1	700	Si	97	AB084149.1

\*1-EMBRAPA A28; 2-Sanguínea; 3-Golden King; 4-Letícia; 5-Rebelatto. Combinação de primers CP1 (Pru-c2+PCE-R) e CP2 (Pru-C2+Pru-C5).

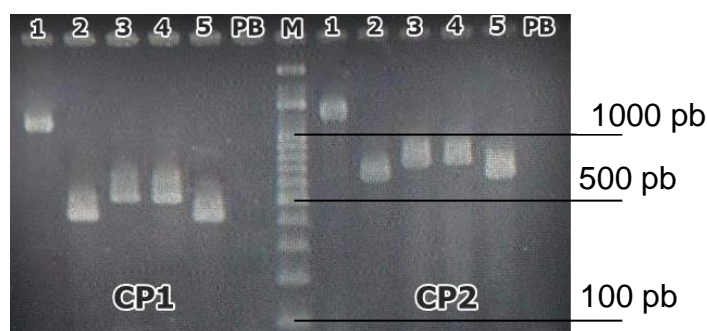


Figura 1. Perfil eletroforético dos alelos “S” de *Prunus salicina* (1-EMBRAPA A28, 2-Sanguínea, 3-Golden King; 4-Letícia; 5-Rebelatto), com as combinações de primers Pru-c2+PCE-R (CP1) e Pru-C2+PRU-C5 (CP2). PB: prova em branco; M: marcador DNA Ladder 100 pb.

#### 4. CONCLUSÕES

A PCR e o sequenciamento dos fragmentos amplificados permite identificar os s-haplótipos que codificam as RNases nos cinco genótipos de *P. salicina* avaliados, bem como a caracterização dos alelos “S” para subsidiar o manejo reprodutivo destes genótipos, gerando informações para auxiliar o melhoramento genético desta espécie frutífera.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARRASCO, B.; DÍAZ, C.; MOYA, M.; GEBAUER, M.; GONZÁLEZ, R.G. Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v.39, n.3, p.533-543, 2012.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, New York, v.1, n.2, p.13-15, 1991.
- DE CONTI, D.; RIBEIRO, M.F.; RASEIRA, M.C.B.; PETERS, J.A.; BIANCHI, V.J. Identificação por PCR dos alelos-S associados à compatibilidade gametofítica em ameixeira japonesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.10, p.1360-1367, 2013.
- FERNÁNDEZ I MARTÍ, À.; HOWAD, W.; TAO, R.; SEGURA, J.M.A.; ARÚS, P.; SOCIAS I COMPANY, R. Identification of quantitative trait loci associated with self-compatibility in a *Prunus* species. **Tree Genetics & Genomes**, Berlim, v.7, n. 2, p.629-639, 2011.
- HALÁSZ, J.; HEGEDUS, A.; NYÉKI, Z.S.J.; PEDRYC, A. DNA-based s-genotyping of Japanese plum and pluot cultivars to clarify incompatibility relationships. **HortScience**, Alexandria, v. 42, n.1, p.46–50, 2007.
- LÓPEZ, M.; MNEJJA, M.; ROVIRA, M.; COLLINS, G.; VARGAS, F.J.; ARÚS, P.; BATLLE, I. Self-incompatibility genotypes in almond re-evaluated by PCR, stylar ribonucleases, sequencing analysis and controlled pollinations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.109, n.2, p.954-964, 2004.
- SAPIR, G.; STERN, R.A.; GOLDWAY, M. SFBs of Japanese plum (*Prunus salicina*): cloning seven alleles and determining their linkage to the s-rnase gene. **HortScience**, Alexandria, v.42, n.7, p.1509-1512, 2007.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Self-Incompatibility. In *Plants. Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.6, p.1083-1090, 2002.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, n.24, p.4876-4882, 1997.
- USHIJIMA, K.; SASSA, H.; TAO R.; YAMANE, H.; DANDEKAR, A.M.; GRADZIEL, T.M.; HIRANO, H. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlim, v.260. n.2, p.261–268, 1998.
- WILLIAMS, J.S.; WU, L.; LI, S.; SUN, P.; KAO, T.H. Insight into S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*: recent findings and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v.5. n.6, p.41-47, 2015.