



RAYANE BARCELOS BISI

**REPRODUCTIVE COMPATIBILITY AND DIALLEL
ANALYSIS AMONG PEAR TREES IN THE TROPICS**

**LAVRAS - MG
2018**

RAYANE BARCELOS BISI

**REPRODUCTIVE COMPATIBILITY AND DIALLEL ANALYSIS AMONG PEAR
TREES IN THE TROPICS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de
concentração em Produção Vegetal, para a obtenção
do título de Doutor.

Orientador
Prof. Dr. Rafael Pio

**LAVRAS - MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Bisi, Rayane Barcelos.

Reproductive compatibility and diallel analysis among pear trees in the tropics / Rayane Barcelos Bisi. - 2018.

95 p.

Orientador(a): Rafael Pio.

.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Pyrus sp.* 2. Incompatibilidade Gametofítica. 3. Polinizador.
I. Pio, Rafael. . II. Título.

RAYANE BARCELOS BISI

**REPRODUCTIVE COMPATIBILITY AND DIALLEL ANALYSIS AMONG PEAR
TREES IN THE TROPICS**

**COMPATIBILIDADE REPRODUTIVA E ANÁLISE DIALÉLICA ENTRE
CULTIVARES DE PEREIRA NOS TRÓPICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 9 de julho de 2018.

Dra. Ester Alice Ferreira	EPAMIG
Dra. Marines Ferreira Pires Lira	UFLA
Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho	UFLA
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA

Prof. Dr. Rafael Pio
Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

*À minha família e amigos.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por te me guiado e concedido sabedoria durante todo o caminho até aqui.

À minha mãe Gicelda e às minhas irmãs Ananda e Juliana, mulheres guerreiras que foram sempre a base para me amparar e fortalecer, sou grata a elas por todo o incentivo, ensinamento, carinho e amor.

Ao meu pai Joel (*in memoriam*), por me ensinar os valores essenciais para trilhar um caminho de sucesso.

À minha família, em especial, à minha avó Geny, minha madrinha Vanusa, minha irmã Joelma, aos meus sobrinhos, também, aos meus cunhados e irmãos Igor, Alexandre e Driviston por me apoiarem sempre.

Ao meu namorado por toda paciência, carinho e companheirismo durante todo o doutorado e na execução deste trabalho. E também ao tio Cido e tia Regina, que me deram todo o apoio e carinho durante todo este percurso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Pio, por todo ensinamento, auxílio e amizade durante o mestrado e doutorado e na realização deste trabalho.

A todos os amigos do Pomar pela parceria, em todos os momentos, pelo grande empenho na elaboração dos experimentos e por compartilharem comigo seus conhecimentos, que foram essenciais para a elaboração deste projeto.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura, setor de Fruticultura, Arnaldo, Evaldo e Sr. Dedé pela ajuda na execução das atividades.

Às minhas amigas de Linhares, pois, mesmo distantes, sempre estiveram presentes.

Aos amigos de Lavras, que serviram de apoio nos momentos de dificuldade e compartilharam comigo momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Welison Andrade Pereira e aos Técnicos Lamartine e Gisela pela disponibilidade do Laboratório de Biologia Molecular e auxílio para a realização das análises.

Ao Prof. Dr. Lee Kalcsits e a todos os amigos do Tree Fruit Reseach and Extension Center – Washington State University pela troca de experiências, receptividade e pelos momentos compartilhados.

Aos membros da banca, Dra. Ester Alice Ferreira, Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho, Dra. Leila Aparecida Salles Pio e Dra. Marines Ferreira Pires pela disponibilidade.

Ao Departamento de Agricultura e ao Programa de Fitotecnia/Agronomia. Agradeço a todos os professores e servidores, principalmente, à Marli, secretária da Pós-Graduação, por sempre estar disposta a ajudar.

À Universidade Federal de Lavras, em especial, ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade da realização do doutorado em Fitotecnia.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

A todos, meus sinceros agradecimentos e minha eterna gratidão!

RESUMO

Nas últimas décadas, houve uma crescente exploração da pereira (*Pyrus* spp.) em regiões subtropicais e tropicais. Porém a baixa frutificação efetiva por incompatibilidade gametofítica e por escassez de materiais adaptados a essas condições climáticas são fatores limitantes na expansão dos cultivos nessas regiões. Com o intuito de auxiliar na seleção de genitores em programas de melhoramento genético de pereira e na escolha de cultivares polinizadoras, no planejamento de pomares em regiões subtropicais e tropicais, três estudos foram conduzidos. No primeiro estudo, objetivou-se identificar os possíveis polinizadores, para cultivares de pereira em regiões subtropicais, por meio da avaliação da receptividade estigmática, da porcentagem de germinação de grão de pólen e do número de grãos de pólen por antera e por flor de cultivares híbridas de pereira, Cascatense, Centenária, D'água e Primorosa, Seleta, Tenra e Triunfo. No segundo estudo, realizou-se a caracterização molecular dos alelos-S de cultivares de pereira e avaliou-se a frutificação efetiva proveniente do cruzamento entre essas cultivares em condições de campo. Os alelos-S das sete cultivares foram caracterizados por meio de PCR e, em condições de campo, foram realizadas autofecundações, partenocarpia e cruzamentos entre as sete cultivares. E, no terceiro, estimou-se a capacidade geral (CGC) e específica de combinação (CEC), em cruzamentos dialélicos, visando auxiliar na seleção de polinizadores em cultivares de pereiras híbridas (*Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia*), adaptadas ao clima subtropical. Fez-se a análise dialélica, seguindo o modelo 1 método I de Griffing, para estimar a CGC, CEC e ER, a partir dos genitores híbridos F₁ e híbridos F₁ recíprocos, obtidos das autofecundações e cruzamentos entre Cascatense, Centenária, D'água e Primorosa. As cultivares Seleta e Triunfo apresentam potencial como progenitoras femininas. A cultivar Cascatense e Primorosa apresentam alto potencial para serem utilizadas como polinizadoras. Os alelos-S, identificados neste estudo, são: Cascatense – S1S5, Centenária – S5, D'água – S5S8, Primorosa – S1S5, Seleta – S1S4, Tenra – S5 e Triunfo – S1S5. As cultivares D'água e Seleta são compatíveis, porém não apresentam potencial como polinizadoras. As cultivares Primorosa, Cascatense e Triunfo apresentam incompatibilidade. Centenária apresenta maior capacidade geral de combinação com as cultivares Cascatense, D'água e Primorosa. O cruzamento Primorosa x Centenária apresenta a maior capacidade específica de combinação, conferindo à Centenária um ótimo polinizador para a cultivar Primorosa com relação as qualidades físico-químicas dos frutos.

Palavras-chave: *Pyrus* sp. Incompatibilidade Gametofítica. Polinizador.

ABSTRACT

In recent decades, there has been increasing exploitation of pear (*Pyrus* spp.) in subtropical and tropical regions. However, the low fruit set due to gametophytic incompatibility and the excision of cultivars adapted to these climatic conditions, are limiting factors in the expansion of the pear tree in these regions. In order to assist the selection of parents in breeding programs for pear tree breeding and the selection of pollinator cultivars in orchard planning in subtropical and tropical regions, three studies were conducted. In the first study, the objective was to identify the possible pollinators for pear cultivars in subtropical regions, through the evaluation of the stigmatic receptivity, the percentage of pollen grain germination and the number of pollen grains per anther and flower of hybrid pear tree cultivars, Cascatense, Centenária, D'água e Primorosa, Seleta, Tenra e Triunfo. In the second study, the molecular characterization of the S-alleles of pear tree cultivars was carried out and the fruit set from the cross pollination among these cultivars under field conditions was evaluated. The S-alleles of the seven cultivars were characterized by PCR and under field conditions were self-pollination, parthenocarpy and cross-pollination among these cultivars. In the third one, the general (GCA) and specific (SCA) combining ability in diallel crosses to assist in the selection of pollenizers in hybrid pear tree cultivars (*Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia*) adapted to the subtropical climate. Diallel analysis was performed, following the Griffing model 1 method to estimate the GCA, SCA and ER from the parents, F1 hybrids and reciprocal F1 hybrids obtained from the self-pollination and crossings between Cascatense, Centenária, D'água and Primorosa. The cultivars Seleta and Triunfo have potential as female genitors. The cultivar Cascatense and Primorosa have high potential to be used as pollinators. The S-alleles identified in this study are: Cascatense - S1S5, Centenaria - S5, D'água - S5S8, Primorosa - S1S5, Seleta - S1S4, Tenra - S5 and Triunfo - S1S5. The cultivars D'água and Seleta are compatible. However, they have no potential as pollinators. The cultivars Primorosa, Cascatense and Triunfo have incompatibility. Centenaria has a greater general combining ability with Cascatense, D'Água and Primorosa cultivars. The Primorosa x Centenaria cross has the highest specific combining ability, conferring Centenaria a great pollinator for the cultivar Primorosa in relation to the physicochemical qualities of the fruits.

Keywords: *Pyrus* sp. Gametophytic Incompatibility. Pollinator.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Origem e Importância Econômica	12
2.2	Cultivares Híbridas de Pereira	14
2.2.1	Cascatense	14
2.2.2	Centenária	14
2.2.3	D'água	14
2.2.4	Primorosa	15
2.2.5	Seleta	15
2.2.6	Tenra	15
2.2.7	Triunfo	16
2.3	Biologia floral	16
2.4	Viabilidade do grão de pólen e desenvolvimento do tubo polínico	17
2.5	Receptividade Estigmática	18
2.6	Autoincompatibilidade	19
2.7	Autoincompatibilidade Gametofítica	20
2.8	Autoincompatibilidade Esporofítica (AIE)	21
2.9	Análise molecular do alelo-S	23
2.10	Polinização	25
2.11	Efeito Xênia	27
2.12	Análise dialélica	28
	REFERÊNCIAS	30
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	41
	ARTIGO 1 Determination of pollenizers for pear cultivars (<i>Pyrus communis</i> x <i>Pyrus pyrifolia</i>) in subtropical regions	41
	ARTIGO 2 Molecular characterization of the S-allele and compatibility between hybrid pear tree cultivars (<i>Pyrus communis</i> x <i>P. pyrifolia</i>) for subtropical regions	57
	ARTIGO 3 General and specific combining ability in the selection of pollenizer cultivars of hybrid pear trees (<i>Pyrus communis</i> x <i>P. pyrifolia</i>)	79

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A pereira (*Pyrus* sp.) é considerada a segunda fruta mais importada pelo mercado brasileiro e, nos últimos anos, a sua exploração, em regiões subtropicais do Brasil, apresentou expansão. Nesse sentido, a exploração dessa frutífera pode ser uma excelente fonte de renda para o agronegócio do país.

A principal região produtora é o Sul do país, cujo estado do Rio Grande do Sul destaca-se com mais de 50% da produção brasileira (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2018). Porém, já existem cultivares adaptadas às regiões de clima subtropical, como os estados de São Paulo e Minas Gerais. Algumas das cultivares adaptadas para o clima subtropical são as chamadas híbridas (*Pyrus communis* x *P. pyrifolia*), conhecidas como peras rústicas, que aliam a qualidade de frutos das peras europeias com a menor necessidade de horas-frio característica das peras de origem asiática. Grande parte das cultivares com potencial para regiões subtropicais foram desenvolvidas pelo Instituto Agrônômico em décadas passadas.

Algumas frutíferas de clima temperado, quando cultivadas em regiões com menor quantidade de frio que o exigido por elas, como geralmente ocorre nas regiões subtropicais do Brasil, podem produzir menor número de gemas florais e flores de menor tamanho e com estigmas deformados, anteras menores e baixa quantidade de grãos de pólen. Além disso, algumas cultivares, em temperaturas muito elevadas durante a primavera, podem induzir a produção de pólen estéril, diminuir a formação de grãos de pólen e a sua viabilidade (JACKSON, 2005).

As pereiras pertencem à Família *Rosaceae*, que apresenta um sistema de autoincompatibilidade; esta incompatibilidade é geneticamente controlada, sendo do tipo gametofítica, ocorrendo sempre que o pólen e o estigma apresentam o mesmo alelo-S (NETTANCOURT, 1977). A expressão deste sistema, geralmente, depende de polinizadores para que ocorra o pegamento de frutos e uma produção satisfatória em pomares comerciais. As cultivares polinizadoras devem ser compatíveis e florescerem no mesmo período ao daquela a ser polinizada, devem ainda conter pólen viáveis em quantidade e qualidade para garantir a produção de fruto (NAKASU; FAORO, 2003; RAMALHO; SANTOS; PINTO, 1996).

Apesar de existir algumas cultivares adaptadas a regiões de clima subtropical, a produção de peras nessas regiões ainda encontra problemas, para seu estabelecimento, pois

pouco ainda são os conhecimentos sobre o sistema reprodutivo dessas cultivares. Diante da necessidade de polinização cruzada, para a produção de frutos, o conhecimento da biologia floral dessas cultivares e a identificação da compatibilidade entre elas são fatores determinantes para o sucesso da produção.

Objetivou-se, com este estudo, avaliar a compatibilidade reprodutiva entre pereiras adaptadas a regiões subtropicais e estimar a capacidade de combinação entre essas cultivares por meio de cruzamentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem e Importância Econômica

A pereira pertence à família Rosaceae, subfamília Maloideae, anteriormente chamada de Pomoideae, Pomeae ou Pomaceae. Todas as espécies de *Pyrus* são autoestéreis, inter-férteis e diploides ($2n=34$, $n=17$) e existem algumas cultivares poliploides de *P. communis*. Acredita-se que o gênero *Pyrus* tenha se originado, durante o período Terciário (65 a 55 milhões de anos atrás), nas regiões montanhosas do oeste da China, onde um grande número de espécies do gênero Pomoideae e Prunoideae estão concentradas (SILVA et al., 2014).

Existem três tipos de peras: a europeia, a japonesa e a híbrida. A europeia (*Pyrus communis* L.), também chamada de pera manteigosa, é o tipo mais cultivado no mundo (NAKASU; FAORO, 2003). A japonesa, também chamada de pera asiática, oriental ou arenosa (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak., surgiu independentemente no Japão e na China (NAKASU; FAORO, 2003). A híbrida é o tipo de pera mais plantado no Brasil e é resultante dos cruzamentos entre europeias e orientais (NAKASU; FAORO, 2003); alguns exemplos de cultivares híbridas são: Carrick, Garber, Le Conte, Primorosa, Seleta, Smith, Triunfo e Cascatense (CHILDERS, 1986; NAKASU; FAORO, 2003).

A produção mundial de peras, no ano de 2016, foi de 27.345.930 de toneladas em área colhida de 1.584.956 hectares (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO, 2018). O maior produtor mundial de peras é a China, com produção de 19.388.063 toneladas e área colhida de 1.116.085 hectares, ou seja, 70,89% da produção mundial. O segundo maior produtor é a Argentina com 905.605 toneladas, seguida de Estados Unidos da América com 738.770 toneladas, Itália 701.928 toneladas, Turquia com 472.250 toneladas, África do Sul com 433.105 toneladas e Espanha com 366.131 toneladas. No mesmo ano, o Brasil produziu 14.905 toneladas em área total de 1.248 hectares, o que representa apenas 0,054% da produção, enquanto a Argentina, país vizinho, representa mais de 3% da produção mundial.

No Brasil, houve uma redução na área cultivada, quando se observam os anos de 2015 e 2016 e, conseqüentemente, uma redução também na produção. No ano de 2015, o Brasil colheu em 1.453 ha 21.160 toneladas de pera. Já no ano de 2016 a área colhida foi de 1.248 ha com produção de 14.905 toneladas. Esses dados mostram uma redução de quase 30% na produção de pera entre esses dois anos (IBGE, 2018). Os principais estados produtores de pera no Brasil são Rio Grande do Sul (7.838 t), Santa Catarina (5.2016 t), Paraná (1.213 t), São Paulo (285 t) e Minas Gerais (353 t), dados estes de 2016 (IBGE, 2018).

Embora houve crescimento nas importações, nos últimos anos, no ano de 2016, as importações brasileiras de pera diminuíram, com uma quantidade importada de, aproximadamente 146 mil toneladas, com um valor total em torno de U\$ 143 milhões. Em 2016, os maiores fornecedores de peras para o Brasil foram a Argentina e Portugal com cerca de 90% de todo volume importado (BRASIL, 2018). Esse grande volume de importação faz com que o Brasil seja um dos maiores importadores de pera do mundo, por exemplo, no ano de 2013, o país importou 189.696 toneladas, representando 7,5% do total das importações mundiais, que foram de 2.516.338 toneladas (FAO, 2018).

Apesar das várias tentativas de promoção ao desenvolvimento do cultivo e incentivo na produção de pera no Brasil, não se observa, em nenhum dos estados produtores, um crescimento acentuado e constante da produção. Com isso, a produção não é suficiente para atender o mercado interno (FIORAVANÇO, 2007).

O cultivo de pereiras no Brasil ainda é pequeno, em relação às outras frutas de clima temperado, representa apenas 0,65 % do total deste tipo de frutas produzido no país. Com alta demanda para abastecer o consumo interno, o país é um dos maiores importadores mundiais de peras (FACHINELLO et al., 2011; IBGE, 2018). Dentre as dificuldades da expansão do cultivo no país, pode-se citar a baixa qualidade de frutas de pereira cultivada no Brasil, principalmente, pela falta de cultivares adaptadas às condições climáticas das zonas de cultivo. Essa questão, referente à falta de cultivares adaptadas às condições climáticas-brasileiras, onera o baixo rendimento da produtividade de pereira no país (PIO, 2008). Apesar de a espécie ser de clima temperado, existem algumas cultivares adaptadas para o clima subtropical, e o cultivo da pereira em regiões com inverno ameno é possível pelas cultivares híbridas (*Pyrus communis* x *P. pyrifolia*), conhecidas como peras rústicas. Algumas dessas cultivares foram desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (BETTIOL NETO et al., 2014).

O cultivo da pereira é uma excelente alternativa para a diversificação da fruticultura brasileira e de produção sustentável, especialmente, para pequenos e médios produtores. Algumas iniciativas de produtores vêm demonstrando que é viável a produção de pera no Brasil, inclusive, alcançando rentabilidades superiores as obtidas com macieira. Produtores que investiram no cultivo de pereira têm tido bons retornos econômicos, mesmo com baixa produtividade, até mesmo por meio da utilização de cultivares da baixa qualidade. Isto se deve à pouca oferta de pera no mercado (BETTIOL NETO, 2013).

2.2 Cultivares Híbridas de Pereira

2.2.1 Cascatense

É uma cultivar híbrida de origem brasileira, selecionada pela Embrapa de Clima Temperado por meio do cruzamento entre as cultivares Packham's Triumph e Le Conte. Suas plantas apresentam vigor médio, com copas semiabertas. Apresentam frutos de tamanho médio (120g a 220g), com formato piriforme com epiderme fina, de coloração amarela-esverdeada a amarela, com pouco 'russeting' na área próxima ao pedúnculo. Polpa branca, parcialmente manteigosa, suculenta, de aroma moderado, com sabor que apresenta Brix médio de 13° (BETTIOL NETO; PIO, 2014).

2.2.2 Centenária

É uma cultivar brasileira, resultante do cruzamento realizado no Instituto Agronômico (IAC) entre Hood x Packham's Triumph e lançada em 1987, nas comemorações do centenário da Instituição. Apresenta moderada exigência de frio (cerca de 150 horas). Suas plantas se caracterizam pelo alto vigor, enfolhamento abundante de folhas pequenas e bem distribuídos, em uma copa bem formada, além da regularidade da produção. Os frutos dessa cultivar são médios (220 a 250 g), de formato oblongo piriforme a piriforme-achatados; película lisa e resistente, de coloração verde-clara e amarela e nuances resados em frutos bem maduros, com pontuações esparecidas em toda superfície (BETTIOL NETO; PIO, 2014).

2.2.3 D'água

As peras D'água, na verdade, são constituídas de diferentes materiais clonais selecionados localmente e, portanto, de diferentes origens, sem que se tenha uma cultivar definida. Dessa forma, existem diversas nomenclaturas em função da região onde esses clones apresentam características de produção e qualidade de frutificação que despertaram atenção dos produtores que os multiplicaram, ao longo dos anos, via enxertia ou estaquia, a exemplo das peras D'água de Valinhos e de São Roque. De forma geral, são plantas similares no hábito de crescimento ereto, são vigorosas e de abundante ramificação e folhagem, com coloração verde-brilhante e meio esmaecida, além de apresentarem elevada produção de frutos por planta. Os frutos, de tamanho médio, são oblongos-piriforme e, no estágio de vez, são firmes e possuem

polpa de coloração esbranquiçada, de sabor apenas regular, crocante apesar de bem sucosa, com tendência a farinar no decorrer da maturação. Os pedúnculos são compridos, grossos e com inserção saliente ao ápice (BETTIOL NETO; PIO, 2014).

2.2.4 Primorosa

De origem brasileira, é resultante do cruzamento realizado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) entre Hood x Packham's Triumph. A planta possui bom vigor e produtividade. Possui frutos de tamanho médio (180 a 220g), com formato ovoide piriforme e com pedúnculo longo. Apresenta película lisa, resistente e com verde-clara a amarelada, com pequenas pontuações claras de aspecto atraente e delicado. A polpa é de coloração branca, doce, tenra, succulenta e com pequenos grânulos arenosos, de sabor suave e de boa qualidade, com Brix próximo a 9° e baixa acidez. Possui razoável adaptação às condições subtropicais de inverno brando, recomendada para os cultivos no Sudeste brasileiro, principalmente, em regiões serranas. Necessita de cerca de 80 horas de frio para florescimento e posterior frutificação (BETTIOL NETO; PIO, 2014).

2.2.5 Seleta

Resulta do mesmo cruzamento da cultivar, Primorosa, entre Hood x Packham's Triumph, no programa de melhoramento genético de pereiras do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). É uma cultivar de produção precoce. Apresenta fruto de tamanho médio (150 a 200 g) e formato oblongo-piriforme, com película fina e lisa de coloração verde-clara e pontuações esparsas. A polpa é delicada, aromática e tenra, com sabor doce acidulado, apresentando Brix próximo a 10° e de boa qualidade. Apresenta excelente adaptação a condições de inverno ameno e alto desempenho em regiões frias, exigindo cerca de 80 horas de frio (BETTIOL NETO; PIO, 2014).

2.2.6 Tenra

Cultivar brasileira, desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), é resultante do cruzamento entre as cultivares Madame Sieboldt e Packham's Thiumph. Plantas medianamente vigorosas, rústicas e de produtividade regular, produz frutos pequenos a médios (150 a 180g), de formato globoso-piriforme, porém muito irregulares. Apresenta epiderme de

coloração verde-escura, espessa e resistente, com pontuações salientes. A polpa é firme, sendo pouco sulcosa e doce, com Brix médio de 9°. É adaptada à clima de regiões de inverno ameno, exigindo cerca de 80 horas de frio. Destaca-se como uma cultivar polinizadora (BETTIOL NETO; PIO, 2014).

2.2.7 Triunfo

Cultivar nacional, resulta do cruzamento realizado no Instituto Agronômico (IAC) entre Hood x Packham's Triumph e lançada em 1972. A planta é vigorosa, produtiva, de hábito ereto e apresenta rápido crescimento. Seus frutos são médios (180 a 250g) e de formato oblongo bem piriforme; a película é espessa, de cor verde-escura com pontuações nítidas e salientes; a polpa é bem firme, granulada e de sabor doce-acidulado. É uma cultivar exigente em tratos culturais e fitossanitários (BETTIOL NETO; PIO, 2014).

2.3 Biologia floral

A pereira possui gemas vegetativas e gemas mistas. As gemas mistas apresentam, na mesma estrutura, a parte vegetativa e floral (BETTIOL NETO; PIO, 2014). A pereira apresenta flores monoicas, característica muito comum em frutíferas de clima temperado, que geralmente são polinizadas por insetos (LEITE; SOUZA, 2003).

As flores são brancas e raramente rosadas. O cálice é composto de cinco sépalas e cinco pétalas. Apresentam de 20 a 30 estames com anteras comumente vermelhas (LAYNE; QUAMME, 1975). Os estiletos variam de dois a cinco e são livres, porém estreitamente unidos na base. Os ovários são ínferos, possuem cinco lóculos com dois óvulos por lóculo. Os frutos possuem no máximo um conjunto com dez sementes por fruta (BELL et al., 1996; LAYNE; QUAMME, 1975).

O órgão feminino da flor é designado como gineceu ou pistilo, o qual é formado geralmente pelo conjunto de cinco pistilos e o ovário. Cada pistilo é composto por um único estigma, um estilete e pelo ovário. O estigma é a região receptora dos grãos de pólen (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELO-GUERREIRO, 2006). O estilete suporta o estigma e é tubular e alongado. Os pistilos são livres em sua parte superior e unem-se na região basal, mas são sincárpicos, pois cada pistilo guarda a sua individualidade e forma dois lóculos individualizados. A sincarpia é uma vantagem evolutiva, pois distribui os grãos de pólen de forma mais homogênea e aumenta a seleção gametofítica de incompatibilidade, bem como

proporciona maior superfície de captura dos grãos de pólen (SHEFFIELD; SMITH; KEVAN, 2005).

O órgão masculino da flor é formado pelo conjunto de estames em número maior que o dobro das pétalas, com um filete (pedúnculo) simples e livre que se une ao conectivo na região dorsal da antera (dorsifixo). A antera é intorsa, pois é voltada para o centro da flor e apresenta deiscência longitudinal, cuja abertura também é voltada ao interior da flor. Essa antera é composta por duas tecas (diteca), local onde se situam os sacos polínicos e são formados os grãos de pólen. Os sacos polínicos se desenvolvem rapidamente, pouco antes da antese (JACKSON, 2005).

2.4 Viabilidade do grão de pólen e desenvolvimento do tubo polínico

Para dar suporte aos programas de melhoramento, o conhecimento das características florais das cultivares disponíveis é de suma importância, para a seleção dos progenitores a serem utilizados nas hibridações, assim como a viabilidade dos grãos de pólen. A análise da fertilidade dos grãos de pólen dos progenitores coletados em campo é condição preliminar indispensável para se iniciar os cruzamentos (CHAGAS et al., 2010).

Conforme Westwood (1982), algumas cultivares produzem grãos de pólen que são estéreis, apresentando baixa germinação. Em condições de campo, os grãos de pólen apresentam pouca longevidade e são viáveis apenas por algumas horas, pois são pouco resistentes às temperaturas moderadas, à alta umidade e à alta intensidade luminosa. Porém os grãos de pólen têm a viabilidade assegurada, durante vários anos, quando armazenados em baixas temperaturas e com baixa intensidade luminosa e de umidade.

Outro fator a ser considerado é a não coincidência de floração, que, muitas vezes, torna imprescindível o armazenamento do pólen colhido em um ano, para ser utilizado no ano seguinte. Sendo assim, antes da utilização do pólen, é aconselhável testar a sua viabilidade (EINHARDT et al., 2006). A análise da fertilidade do pólen é indispensável, para o melhoramento genético clássico, pois, desta maneira, obtém-se maior sucesso nos cruzamentos (FLANKLIN; LAWRENCE; FLANKLIN-TONG, 1995).

Em qualquer método de polinização, a viabilidade de pólen é considerada boa quando está entre 50% a 70%. No campo, o pólen é viável somente por algumas horas e apresenta um curto tempo de vida, pois está sob temperaturas moderadas, altas umidades e intensidade luminosa e, ainda, está sujeito a receber aplicações de fungicidas, o que reduz sua viabilidade. À medida que o pólen começa a envelhecer, a porcentagem de germinação e o comprimento

dos tubos polínicos começam a diminuir, embora o pólen pareça inviável, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que ele ainda é suficientemente bom, para assegurar uma moderada frutificação efetiva, não obstante apresente baixa percentagem de germinação (SCORZA; SHERMAN, 1995).

Existem diferentes métodos de se testar a viabilidade dos grãos de pólen: por meio de corantes, germinação *in vitro*, germinação *in vivo* e percentagem de frutificação efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste. Para cultivares de pereira, após a deposição do grão de pólen, a sua germinação no estigma da flor é maior quando submetido a temperaturas em torno de 20°C e alta umidade (LEITE; SOUZA, 2003).

2.5 Receptividade Estigmática

O estigma é necessário para fornecer um suporte adequado para hidratação do pólen, germinação e crescimento inicial do tubo polínico. Por esse fato ocorrer por um período limitado e em um momento preciso, durante o desenvolvimento da flor, a receptividade do estigma tem implicações no sucesso reprodutivo dos indivíduos (COWAN et al., 2000; HESLOP-HARRISON, 2000; KALISZ et al., 1999; WYATT, 1983). Além disso, está envolvido na produtividade de espécies dependentes da polinização, como plantas frutíferas, portanto é de importância agrícola (GONZÁLEZ et al., 1995; SANZOL; HERRERO, 2001).

A pereira apresenta estigmas úmidos (SANZOL et al., 2003). Neste tipo de estigma úmido, a sua receptividade implica a produção de exsudatos ricos em proteínas, aminoácidos livres, lipídios e carboidratos, que estabelecem um ambiente adequado para a hidratação do pólen, germinação e crescimento inicial do tubo polínico (MANSVELT; HATTINGH, 1987; WILLINGALE et al., 1986)

A adesão do pólen pode variar entre as espécies, como um resultado na variabilidade da morfologia floral, e/ou conteúdo de exsudatos presentes no estigma no momento da polinização. Porém, apesar da grande diversidade morfológica e composições bioquímica dos estigmas, à medida que as estruturas do pistilo amadurecem, maior será a adesão do estigma aos grãos de pólen presentes no ambiente (COSTA, 2011).

Com relação à hidratação polínica, em estigmas úmidos, a hidratação do pólen ocorre imediatamente após sua adesão ao estigma, em contrapartida, em estigmas secos, as células das papilas estigmáticas, após a adesão do pólen, são estimuladas a produzir exsudatos que posteriormente hidratarão o pólen (EDLUND et al., 2004).

É o tempo de maturação do estigma que determina o momento de germinação do pólen, ou seja, o pólen pode ser aderido ao pistilo, em diferentes momentos durante a polinização, porém o desenvolvimento do tubo polínico somente ocorrerá, quando o estigma se tornar receptivo (HERRERO; HORMAZA, 1996).

2.6 Autoincompatibilidade

A compatibilidade entre indivíduos é uma característica genética que se desenvolve em plantas com flores durante um longo período da evolução. O sistema de autoincompatibilidade desempenha um papel importante na manutenção da variação hereditária das plantas e pode ser encontrado em diversas espécies na natureza. Estima-se que mais de 75 famílias (LEWIS, 1979), 3000 espécies de plantas e metade das angiospermas possuam características de autoincompatibilidade. É uma característica do sistema reprodutivo de várias espécies cultivadas, tais como o maracujá, o cacau, o girassol, maçã entre outras incluindo a pereira (BREWBAKER, 1957; NETTANCOURT, 1997).

A autoincompatibilidade é a capacidade de uma flor rejeitar o seu próprio pólen e promover o cruzamento. Também pode ser definida como a incapacidade de uma planta fértil formar sementes quando fertilizada por seu próprio pólen (SCHIFINOWITTMAN; DALL'AGNOL, 2002).

A autoincompatibilidade tem um efeito significativo no melhoramento e cultivo de plantas (ZHANG; ZHAO; XUE, 2009), favorece a alogamia e a manutenção da variabilidade genética, nas populações naturais, sendo considerada como um fator determinante para o sucesso evolutivo das angiospermas (BREWBAKER, 1957; HESLOP-HARRISON, 1983). Decorrente de sua ampla distribuição entre as espécies vegetais, acredita-se que a autoincompatibilidade possa ter surgido antes da ocorrência de divergência evolutiva entre as espécies (WHITEHOUSE, 1951), assim como de maneira recorrente nos processos de especiação (BATEMAN, 1952). Segundo Charlesworth e Awadalla (1998), o gene S que governa a expressão dessa característica evoluiu, a partir de origens independentes, diversas vezes, na evolução das plantas com flores. Segundo Schifino-Wittmann e Dall'AgnoI (2002), a autoincompatibilidade também pode resultar em uma certa ineficiência reprodutiva.

O sistema de incompatibilidade teve pouca atenção no início, pois como a maior parte das espécies vegetais apresenta flores hermafroditas, considerava-se a autofertilização uma decorrência natural da constituição morfológica (RICHARDS, 1997). Nettancourt (1977) relata

que a primeira publicação sobre o assunto foi a de Kolreuter, em 1764, descrevendo a autoincompatibilidade em *Verbascum phoeniceum*.

Com a redescoberta dos trabalhos de Mendel, no início do século XX, houve um estímulo muito grande ao desenvolvimento de trabalhos com a autoincompatibilidade e sua relação com a genética, assim, na década de 20, surgiram os primeiros trabalhos sobre a herança multialélica da autoincompatibilidade gametofítica (RICHARDS, 1997). Então, o fenômeno passou a ser abordado de múltiplas formas. Atualmente grande importância está sendo dada ao estudo desse mecanismo, em virtude da relevância em estudos de polinização para composição varietal dos pomares e para fins de melhoramento genético de plantas.

Nas plantas angiospermas, existem dois tipos de autoincompatibilidade, a gametofítica em que a especificidade do pólen é gerada pelo alelo S do genoma haploide do grão de pólen e a esporofítica, em que a especificidade é gerada pelo genótipo diploide da planta adulta que deu origem ao grão de pólen (BUENO et al., 2006). A reação de autoincompatibilidade compreende desde o impedimento da germinação do pólen até o rompimento do tubo polínico (NETTANCOURT, 2000; HESLOP-HARRISON, 1983).

As pereiras pertencem à Família *Rosaceae*, que apresenta um sistema de autoincompatibilidade gametofítica (GSI) (NETTANCOURT, 1977). A expressão deste sistema, geralmente, depende de polinizadores para que ocorra o pegamento de frutos e uma produção satisfatória em pomares comerciais.

2.7 Autoincompatibilidade Gametofítica

No sistema de incompatibilidade gametofítica, o pólen pode germinar e penetrar o estigma, mas o tubo polínico não pode crescer completamente através do estilete, se o alelo S do grão de pólen é igual a um dos alelos presentes nas células do estilete, o que acontece sempre que ocorre autopolinização. Sendo codominantes, os dois alelos S das células do estilete estão ambos envolvidos na influência exercida no crescimento do tubo polínico (SCHIFINO-WITTMAN; DALL'AGNOL 2002).

Existem três níveis de compatibilidade entre cultivares com GSI (SAPIR et al., 2008). Se duas cultivares diferentes compartilharem os dois S haplótipos ($S_1S_2 \times S_1S_2$) elas serão incompatíveis; se elas partilharem um dos S-loci elas serão semicompatíveis ($S_1S_2 \times S_1S_3$) e, se elas diferirem em ambos, os S-loci serão totalmente compatíveis ($S_1S_2 \times S_3S_4$) (SAPIR et al., 2008).

Situações de mutações conferem aos sistemas de incompatibilidade gametofítica propriedades de autocompatibilidade. O pegamento de frutos em plantas autocompatíveis não depende de polinização cruzada e, por este motivo, são preferidas para fins agrícolas. Nestas plantas, não existe a preocupação da sincronização de floração entre a cultivar principal e a polinizadora e existe a possibilidade de estabelecer plantações “em bloco” de uma só cultivar (SAPIR et al., 2008). Dentro das prunoideas, os damasqueiros, as cerejeiras e as amendoeiras apresentam cultivares com autocompatibilidade (BOŠKOVIC; TOBUT, 1999; USHIJIMA et al., 2004 citado por SAPIR et al., 2008). Do ponto de vista agrônômico, uma cultivar com baixa taxa de autocompatibilidade deve ser considerada como uma cultivar autoincompatível, devendo existir uma cultivar polinizadora adjacente a esta (SAPIR et al., 2008).

2.8 Autoincompatibilidade Esporofítica (AIE)

Na AIE, a especificidade do pólen é determinada pelo genótipo diploide do esporófito, isto é, da planta mãe. Portanto o que determinará a ocorrência ou não de autoincompatibilidade não será o alelo que o pólen carrega, mas, sim, os alelos presentes no tecido diploide da planta (SCHIFINO-WITTMAN; DALL'AGNOL, 2002).

Por exemplo, nos seguintes cruzamentos, envolvendo progenitores com diversos genótipos para os alelos S, considerando S1 dominante em relação a S2 e S3 e S3 dominante em relação a S4: a) S1S2 (feminino) x S1S2 (masculino) - grãos de pólen portarão alelos S1 ou S2 mas expressarão sempre o S1, tubos polínicos não irão crescer, não haverá progênie; b) S1S2 (feminino) x S1S3 (masculino) - grãos de pólen portarão alelos S1 ou S3 mas expressarão sempre o S1, tubos polínicos não irão crescer, não haverá progênie; c) S1S2 (feminino) x S3S4 (masculino) - grãos de pólen portarão alelos S3 ou S4 mas expressarão sempre o S3, todos os tubos polínicos irão crescer, progênie será S1S3, S1S4, S2S3 e S2S4 (SCHIFINO-WITTMAN; DALL'AGNOL, 2002).

A reação de AIE ocorre no estigma, e as espécies que a apresentam são aquelas do tipo em que o pólen é liberado na forma trinucleada. A AIE ocorre com muita frequência na família Brassicaceae. Os alelos S têm como sítio de ação as células das papilas do estigma. A reação de incompatibilidade é rápida e precoce e a capacidade de discriminar entre o pólen da mesma planta e um pólen diferente é afetada pelo estágio de desenvolvimento do estigma. A síntese dos produtos dos alelos-S ocorre, supostamente, antes do fim da meiose (BRUGIÈRE et al., 2000; NETTANCOURT, 2000; NEWBIGIN et al., 1993).

A autoincompatibilidade esporofítica pode, às vezes, estar associada a polimorfismos florais. Quando isso ocorre, pode ser definida como homomórfica, quando não existem modificações florais resultantes entre as plantas, ou heteromórfica, quando há a modificação floral (SCHIFINO-WITTMAN; DALL'AGNOL, 2002). Estima-se que mais da metade das angiospermas apresentem mecanismos de autoincompatibilidade que não está associada a nenhum dimorfismo floral, mas que diferem entre si em relação ao seu mecanismo genético de controle.

Três diferentes mecanismos de autoincompatibilidade foram bem caracterizados:

- a) modelo Brassicaceae: sistema do tipo esporofítico (AIE) de expressão governada por um único gene multialélico altamente polimórfico que expressa um receptor de membrana e um fator de ligação determinando a especificidade entre as papilas estigmáticas e o grão de pólen (DOUGHTY et al., 1998);
- b) o Modelo Papaveraceae: o reconhecimento das proteínas expressas pelo gene S é realizado por um receptor transmembrana que desencadeia uma rota de transdução de sinais, mediada por um gradiente de ânions de cálcio bivalentes (Ca^{2+}), resultando na inibição do tubo polínico incompatível (WHEELER et al., 1999);
- c) o Modelo Solanacea, Rosacea e Rubiaceae: sistema de autoincompatibilidade gametofítica (AIG), presente no *Coffea canephora*, cuja reação de autoincompatibilidade é comandada por uma RNase (glicoproteína com função enzimática), expressa pelo gene S nos pistilos que degradam o RNA sintetizado pela célula vegetativa resultando na morte do tubo polínico (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

A pseudocompatibilidade considerada como condição não genética é influenciada pelas condições ambientais externas, como, por exemplo, temperatura ou por alguma condição interna relacionada com a idade da flor (EGEA; BURGOS, 1996). É interação entre fatores ambientais e fisiológicos que permitem a ocorrência de fertilização entre cultivares incompatíveis (LARSEN, 1983; WILLIAM; MAIER, 1977).

Quando as flores são autopolinizadas e produzem frutos sem sementes, o processo é designado como “partenocarpia estimulativa” (LEITE; SOUZA, 2003; MORIYA et al., 2005). E utiliza-se o termo “partenocarpia induzida” quando ela é estimulada pela temperatura, polinização e/ou substâncias de crescimento (SOLTÉSZ, 2003). O mesmo pode ser observado em flores de videira, em que a aplicação de pólen estéril estimula a secreção estigmática, a qual desencadeia reações no ovário que estimulam o desenvolvimento do fruto e evitam a formação

de tecido de abscisão na base do pedúnculo do frutinho, o qual irá crescer sem formar sementes viáveis (KOZMA 2003). Jackson (2005) verificou que a polinização, mesmo sem fertilização, estimula a atividade citoplasmática e bioquímica do pistilo e o desenvolvimento do ovário, aumentando então a viabilidade do saco embrionário. Um exemplo de “partenocarpia estimulativa” é citado por Tomimoto et al. (1996), em que o cruzamento entre diferentes cultivares com a mesma série alélica gerou alta fixação de frutos pela indução da partenocarpia, principalmente, em cultivares que possuem alto potencial de expressão desta característica.

Muito ainda precisa ser estudado em relação à genética e à reação da autoincompatibilidade gametofítica. Verifica-se que os tubos polínicos compatíveis apresentam estrutura normal, com deposição reticulada de calose, e os autocompatíveis desenvolvem um depósito irregular de calose, mas ainda não está claro o que é causa e o que é consequência (NETTANCOURT, 2000).

2.9 Análise molecular do alelo-S

A compatibilidade entre cultivares foi durante muito tempo exclusivamente determinada de forma empírica por meio de ensaios de campo. No entanto estes trabalhos são muito demorados e, por vezes, de difícil interpretação, por influência de fatores ambientais ou até de condições fisiológicas que tornam difícil a distinção entre semicompatibilidade (só 50 % dos grãos de pólen se desenvolvem) e compatibilidade total (100 % dos grãos de pólen podem germinar). Um método que permita avaliar antecipadamente a compatibilidade genética entre as diferentes cultivares de pereira apresenta assim grande interesse, à medida que permite selecionar previamente cultivares totalmente compatíveis, do ponto de vista genético, que serão mais promissoras (MOTA; TAVARES; OLIVEIRA, 2009).

Não dispensando os ensaios de campo, mas, sim, complementando-os, a avaliação molecular dos alelos S, codificadores das S-RNases que determinam o mecanismo de autoincompatibilidade, torna todo o processo de escolha de uma polinizadora muito mais eficiente, tendo sido já utilizado em diversas frutíferas (BROOHAERTS et al., 1995; ISHIMIZU et al., 1999; YAEGAKI et al., 2001).

A pereira apresenta um sistema de autoincompatibilidade gametofítica que é controlada por um único loco multialélico, denominado de loco-S. Este alelo é simbolizado pela letra S (MATTON et al., 1997), pois é proveniente do inglês *Self-incompatibility* que corresponde à autoincompatibilidade (ALLARD, 1971).

A incompatibilidade cruzada entre cultivares foi considerada pouco frequente no passado (CRANE; LEWIS, 1942; MODLIBOWSKA, 1945) e, como consequência, pouca atenção foi dada à determinação de genótipos *S* em contraste com outras espécies frutíferas. Acredita-se que o limitado número de pais utilizados em programas de melhoramento de pera causou um aumento na frequência de incompatibilidades cruzadas entre novas cultivares (SANZOL; HERRERO, 2002).

O crescimento do tubo polínico é inibido quando o alelo-*S* presente no pólen é similar a um dos dois alelos-*S* expressados no pistilo. Estes, por sua vez, codificam várias glicoproteínas com atividade *S*-RNases. Inicialmente marcadores isoenzimáticos e glicoproteínas-*S* foram utilizados para os estudos de incompatibilidade genética. Essas técnicas permitiram a identificação de grupos de alelos-*S* (BATLE et al., 1995; MANGANARIS; ALSTON, 1987; SASSA et al., 1994). Entretanto esses trabalhos eram bastante demorados e não forneceram resultados muito claros. Janssen et al. (1995) desenvolveram um método de genotipagem de alelos-*S*, utilizando a amplificação via reação de polimerase em cadeia (PCR), seguida de digestão por enzima de restrição. Este método é baseado na utilização de iniciadores específicos de alelos-*S*, os quais foram previamente sequenciados.

Nos últimos anos, um intenso esforço foi lançado, para a clonagem molecular e caracterização dos genes da *S*-RNase, em muitas espécies de frutas, incluindo maçã (BROOHAERTS et al., 1995), pera japonesa (SASSA et al., 1996), amêndoa (TAO et al., 1997), cereja (TAO et al., 1999) e pera europeia (ZUCCHERELLI et al., 2002). Os iniciadores específicos têm sido utilizados desde então, para discriminar fenótipos-*S* em cultivares de pereira e designar o alelo-*S* presente como ferramenta para seleção de polinizadoras compatíveis.

O desenvolvimento de iniciadores que detectem novos alelos-*S* leva a novos entendimentos sobre o sistema de autoincompatibilidade genética em pereira. A análise molecular permite estabelecer grupos de cultivares cujos cruzamentos entre si são incompatíveis, compatíveis (ambos alelos *S* diferem) e semi-incompatíveis (um alelo-*S* é comum) (JANSSENS et al., 1995).

O conhecimento destes alelos-*S* permite, também, a seleção correta de parentais compatíveis em programas de melhoramento genético. Além disso, o conhecimento sobre a constituição *S* de diferentes genótipos podem ampliar o espectro de germoplasma que é disponível para programas de melhoramento baseados em hibridação (MOTA et al., 2010). Este aspecto é cada vez mais importante, pois nota-se que a maioria das cultivares europeias derivam de programas de reprodução que incluíam, principalmente, "Williams" e / ou "Coscia" como

genótipos parentais (SANZOLE HERRERO, 2002), estreitando a diversidade genética que existe hoje em dia nos pomares.

Alguns mecanismos são utilizados para superar a autoincompatibilidade em plantas como mutações (SASSA et al., 1997), poliploidização (ENTANI et al., 1999), irradiação, hormônios (HASENSTEIN; ZAWADA, 2001), altas temperaturas, soluções salinas (CARAFA; CARRATÙ, 1997), aplicação de CO₂ (LEE et al., 2001), indução de estresse (TEZUKA et al., 1997) e a fertilização direta no ovário. Até mesmo a polinização forçada em fase de botão floral, ou a utilização de flores velhas ou pólen velhos, em que a autoincompatibilidade ainda não foi ativada ou está enfraquecida, favorecendo os cruzamentos (SCHIFINO-WITTMAN; DALL'AGNOL, 2002).

Há relatos de que temperaturas altas (20° a 25°C) (NYÉKI, 1996) ou amenas (15° a 20°C), durante a floração, podem induzir autofertilidade pela desativação ou inibição do locus “S” e, como consequência, não há produção suficiente de RNAses. Esta inativação possivelmente se deve à inserção de vários CH₃, na região promotora do receptor “L”, causando o bloqueio da transcrição do referido gene “S” (PANCALDI, 1995). Isso possibilita a autofecundação entre genótipos que possuem os dois alelos “S” da incompatibilidade gametofítica idênticos, com consequente formação de poucas sementes viáveis e baixa fixação de frutos (1 a 5%). Essas mesmas temperaturas podem aumentar a porcentagem de frutos partenocárpicos e, por isso, sem sementes (LOMBARD, 1990), o que pode causar confusão entre esses dois processos, caso não seja observada se há ou não formação de sementes viáveis. Visto que a maioria das regiões brasileiras em que a pereira é cultivada, é comum a ocorrência de temperaturas médias superiores a 16 °C durante a floração.

2.10 Polinização

Na produção de muitas culturas agrícolas mundiais, a polinização é um fator essencial. Em escala global, mais de 80% das espécies vegetais e mais de 75% das plantas agrícolas dependem de animais para polinização (CORBET et al., 1991; KEVAN; IMPERATRIZ - FONSECA, 2002). A polinização é definida como a transferência de pólen viável das anteras para o estigma, seja na mesma flor ou em flores diferentes. É uma etapa à qual se segue a fertilização, processo em que o grão de pólen germina no estigma e o tubo polínico cresce ao longo do estilete da flor.

A eficiência do processo de polinização depende de fatores relacionados à cultura a ser polinizada, como, por exemplo, estrutura e morfologia da flor, horário de liberação do pólen,

viabilidade e longevidade do pólen, período de receptividade do estigma, vida útil dos óvulos e concentração e conteúdo de açúcar total de seu néctar (FREITAS, 1997; HARDER; THOMSON, 1989). Estes fatores são válidos para outras espécies, mas muito importantes no caso das espécies com sistema de incompatibilidade gametofítica (CALZONI; SPERANZA; SPERANZA; BAGNI, 1979).

Onorati e Tacchini (1969) mencionam que na fruticultura é essencial definir se uma planta tem capacidade de originar frutos sem a necessidade de utilização de uma polinizadora. Se houver a necessidade de uma cultivar polinizadora, deve produzir pólen viável, coincidir o período de florescimento e ter compatibilidade do alelo S com as plantas produtoras (CERTAL et al., 1999; NEVES et al., 1997).

A pereira possui flores monoicas, característica comum em frutíferas de clima temperado. A polinização desta cultura é influenciada pela fertilização do óvulo pelo gameta masculino, o qual é afetado por fatores genéticos, nutricionais e ambientais, por exemplo, o agente polinizador, condições climáticas, períodos de florescimento das cultivares polinizadoras e, ainda, a distância que o pólen deverá percorrer entre a flor de origem e a flor de destino (LEITE; SOUZA, 2003). A incompatibilidade gametofítica é o fator que dificulta os cruzamentos em pereiras (CRANE; LEWIS, 1942).

No mesmo pomar, devem ser plantadas duas ou mais cultivares de pereira, pois necessitam de polinização cruzada, desta forma, é importante salientar que as polinizadoras devem ser compatíveis a apresentar período de floração coincidente (RASEIRA; PETRI, 2003). Algumas cultivares de pereiras europeias exibem a partenocarpia como uma rota alternativa à incompatibilidade, o que pode tornar a frutificação um parâmetro inadequado de avaliação da interação entre o grão de pólen e o pistilo (MORIYA et al., 2005).

Segundo Free (1970), os insetos polinizadores mais importantes são as abelhas solitárias, os abelhões e a abelha-doméstica. As abelhas solitárias têm a vantagem de transportar pólen sobre grandes áreas do seu corpo e levá-lo em condições mais secas, sendo, por isso, mais provável, este cair sobre os estigmas das flores que visitam. Os abelhões são insetos de grande dimensão, cujo corpo se apresenta coberto de pelos, facilitando a aderência do pólen e contato com o estigma da flor. A abelha-doméstica, apesar de polinizar algumas plantas de forma pouco eficiente, como é o caso das frutíferas, é considerada polinizador universal devido à grande diversidade de espécies vegetais que poliniza (KRUNIĆ; STANISAVLJEVIĆ, 2006).

Para haver a formação de sementes e frutos, faz-se necessário que, depois da polinização, um certo número de grãos de pólen que foi depositado no estigma da flor germine e fertilize o(s) óvulo(s) que constituem o ovário da flor, em um processo chamado de

fertilização. Conforme Freitas (1997), quanto maior for o número de grãos de pólen viáveis e compatíveis no estigma, maior será a competição entre eles para fecundar os óvulos e maior será a percentagem de fertilização. Para a obtenção de certa quantidade de frutos, a longevidade dos óvulos é bastante importante, pois, se a fecundação não ocorre em um período específico, mesmo que haja a polinização e o desenvolvimento do tubo polínico, o saco embrionário perde sua viabilidade (WILLIAMS, 1965). Quanto maior é o número de sementes por fruto maior ele será, pois há uma correlação linear quanto a esta característica (RECASENS, 1990; WHITE et al., 1990). Moriya et al. (2005), testando cinco cultivares de pereira europeia, detectaram que os frutos com sementes apresentaram maior peso e diâmetro, enquanto o comprimento foi praticamente semelhante aos frutos sem sementes.

A frutificação efetiva pode estar associada a fatores genéticos de incompatibilidade entre cruzamentos ou associada a fatores ambientais, como variações climáticas, com alternância de frio e calor após a polinização que afetam o crescimento e a penetração do tubo polínico (SOLTÉSZ et al., 1997; WILLIAM; MAIER 1977). Petri e Pasqual (1981) e Schramm (1985), também, verificaram que cruzamentos com baixa frutificação estavam associados a fatores climáticos, como baixas temperaturas após a floração, carência em número de horas de frio no período de dormência ou deficiência de caráter fisiológico.

2.11 Efeito Xênia

Xênia é considerado o efeito do pólen no embrião e endosperma, alterando características genéticas e proporcionando mudanças qualitativas e quantitativas, enquanto metaxênia é o efeito nos tecidos maternos, para onde o embrião e endosperma modificados podem enviar substâncias que alteram qualitativa e quantitativamente os frutos, em outras palavras, os efeitos do provedor de pólen expressos no fruto da cultivar polinizada (BODOR et al., 2008). Esses fenômenos têm sido explorados em algumas espécies, principalmente, em frutíferas, em que diferentes fontes de pólen podem ter efeitos qualitativos e quantitativos nos frutos e sementes, proporcionando uma melhoria em suas qualidades (KETCHIE et al., 1996; MIZRAHI et al., 2004).

Os resultados de xênia podem ser interpretados como uma manifestação precoce da heterose, a qual aumenta a habilidade do endosperma, modificado geneticamente por polinização cruzada, em acumular os fotoassimilados, determinando assim o peso final do grão. Quanto maior a diferença genética entre a planta receptora e a planta doadora de pólen, maiores são as chances desse fenômeno ocorrer (DENNEY, 1992).

Mais tarde, xênia foi definida como os efeitos diretos do pólen no tamanho, forma, cor, tempo de desenvolvimento e composições químicas de sementes e frutos. Tais diferenças podem ser encontradas no embrião, endosperma e tecidos maternos em algumas espécies, portanto xênia foi considerado cobrindo a metaxênia (DENNEY, 1992).

Logo após o fenômeno ter sido descrito, Nebel e Trump (1932) relataram Xênia e Metaxênia em macieira. Eles cruzaram McIntosh com Yellow Bellflower e Red Astrachan. Os frutos colhidos dos dois cruzamentos foram caracterizados com diferenças significativas na qualidade, no número de sementes, no formato de frutos e sementes e, posteriormente, no peso dos frutos (NEBEL; TRUMP, 1932). O Xênia não só tem sido utilizado em estudos genéticos e fisiológicos, mas também no melhoramento de plantas e na produção de culturas (DENNEY, 1992). A hipótese mais simples por trás desse fenômeno é que o pai afeta expressivamente a formação de zigotos, em plantas superiores, auxiliando na liberação de hormônios de crescimento que causam o crescimento de partes externas do embrião e do endosperma das sementes. Da mesma forma, Swingle (1926) argumentou que o pai é considerado para acelerar o desenvolvimento dos tecidos da fruta levando à maturidade precoce (NEBEL, 1936).

Xênia não foi proposta apenas em maçãs, mas seu uso é difundido em outras culturas, como a polinização cruzada, para aumentar a produção total de milho (WEINGARTNER et al., 2002), aumentando a porosidade e reduzindo o peso de sementes em tomate (PIOTTO et al., 2013), aumentando a porcentagem de bagas, número de sementes por bagas e a qualidade das bagas de uva (SABIR, 2014) e, subsequentemente, aumentando o rendimento de bagas, nozes pecan, pistache e abacate (ROBBERTSE et al., 1996; SEDGLEY; GRIFFIN, 1989). Usman et al. (2013) relataram xênia e metaxênia em goiaba. Eles propuseram que o pai do pólen aumentou os vários aspectos da qualidade dos frutos, incluindo diâmetro do fruto, concentração de sólidos solúveis (SSC), acidez titulável, ácido ascórbico e composição total e não reduzida do açúcar (USMAN et al., 2013). Portanto xênia e metaxênia podem ser determinantes críticos da qualidade e comercialização dos frutos.

2.12 Análise dialélica

Os cruzamentos dialélicos são frequentemente utilizados no melhoramento genético, em que são inter cruzados n genitores dois a dois. Por meio dos cruzamentos dialélicos, é possível conhecer o controle genético dos caracteres, o que auxilia na condução e na seleção das populações segregantes (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992). O dialelo também fornece ao melhorista informações em relação ao comportamento dos genitores entre si e suas

combinações híbridas. A partir dos cruzamentos dialélicos, é possível estimar a capacidade geral de combinação (CGC) e a capacidade específica de combinação (CEC).

A CGC está relacionada a efeitos aditivos, o seu conhecimento é importante em programas de melhoramento para a indicação e seleção de genitores (MAKANDA et al., 2010). A CEC é conferida aos efeitos gênicos não aditivos, que caracterizam a diferença das combinações híbridas, em relação ao comportamento médio dos genitores (FERREIRA et al., 2002), o que contribui para a indicação da melhor combinação híbrida. Além desses dois parâmetros, uma informação importante está inserida nos cruzamentos recíprocos dos híbridos (REC), que indica qual o genótipo pode ser utilizado como genitor masculino ou como genitor feminino, em uma combinação híbrida, de acordo com o seu desempenho como doador ou como receptor de pólen.

O efeito REC é dividido em efeito materno, quando os genes são provenientes do núcleo do genitor utilizado como mãe e efeito extracromossômico, quando os genes são provenientes da mitocôndria e dos cloroplastos (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2008). A metodologia (método I) desenvolvida por Griffing (1956) que permite estimar a CGC, CEC e o efeito REC é considerada importante, pois corresponde à avaliação das n^2 combinações (genitores, híbridos e recíprocos), obtidas nos cruzamentos, sendo possível detectar variações genéticas a partir do comportamento do híbrido F1 e do seu recíproco (GRIFFING, 1956).

REFERÊNCIAS

- ALLARD, R. W. Sistema de controle da polinização em plantas cultivadas. *In*: ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Rio de Janeiro: USAID/E. Blücher, 1971. p.189-203.
- APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 438 p.
- BATEMAN, A. J. Self-incompatibility systems in angiosperms. Theory. **Heredity**, London, v. 6, p. 285-310, 1952.
- BATLE, I. et al. The use of the isoenzimic marker gene Got-1 in the recognition of incompatibility S alleles in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, p. 303-306, 1995.
- BELL, R. L. et al. Pears. *In*: JANICK, J.; MOORE, J. N. **Fruit breeding, tree and tropical fruits**. West Lafayette: Purdue University, 1996. v. 1, p. 441-514.
- BETTIOL NETO, J. E. **Desempenho produtivo e características agronômicas de cultivares de marmeleiro e pereira em Jundiá – SP**. 2013. 96 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- BETTIOL NETO, J. E. et al. Production and postharvest quality of pear tree cultivars in subtropical conditions at eastern of São Paulo state, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1740-1746, 2014.
- BETTIOL NETO, J. E.; PIO, R. Cultivo da pereira *In*: PIO, R. **Cultivo de fruteiras de clima temperado em regiões subtropicais e tropicais**. Lavras: UFLA, 2014. cap. 4, p. 123-157.
- BODOR, P. et al. Metaxenia in apples cv. 'Rewena', 'Relinda', 'Baujade' as influenced by scab resistant pollinizers. **International Journal of Horticultural Science**, Budapest, v. 14, n. 3, p. 11-14, 2008.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Comércio Exterior. **Balança comercial brasileira**. Brasília, 2018.
- BREWBAKER, J. L. Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. **The Journal of Heredity**, London, v. 8, p. 271-277, 1957.

BROOThAERTS, W. et al. DNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 27, p. 499-511, 1995.

BRUGIÈRE, N. et al. Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* selfincompatibility. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p. 432-438, 2000.

BUENO, L. C. S. et al. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 319.

CALZONI, G. L.; SPERANZA, A.; BAGNI, N. In vitro germination of apple pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n. 10, v. 1, p. 49-55, 1979.

CARAFa, A. M.; CARRATU, G. Stigma treatment with saline solutions: a new method to overcome self-incompatibility in *Brassica oleracea* L. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 72, p. 531-535, 1997.

CERTAL, A. C. et al. S-Rnases in apple are expressed in the pistil along the pollen tube growth path. **Sexual Plant Reproduction**, Heidelberg, v. 12, p. 94-98, 1999.

CHAGAS, E. A. et al. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 231- 266, 2010.

CHARLESWORTH, D.; AWADALLA, P. Flowering plants self-incompatibility: the molecular population genetics of *Brassica* S-loci. **Heredity**, London, v. 81, p. 1-9, 1998.

CHILDERS, N. F. Cultivo del peral y del membrillero. In: _____. **Fruticultura moderna**. Madrid: Hemisferio Sur, 1986. p. 330-363.

CORBET, S. A. et al. Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European Community. **Bee World**, Bucks, v. 72, n. 2, p. 47-59, 1991.

COSTA, M. F. B. **Interação pólen-pistilo em espécies neotropicais de *Indigofera* L. (Leguminosae, Papilionoidea) sob enfoque morfológico**. 2011. 59 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

COWAN, A. A. et al. Effect of pollen competition and stigmatic receptivity on seed set in white clover (*Trifolium repens* L.). **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 13, p. 37-42, 2000.

CRANE, M. B.; LEWIS, D. Genetical studies in pears III. Incompatibility and sterility. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 43, p. 31-44, 1942.

DENNEY, J. O. Xenia includes metaxenia. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 7, p. 722-728, 1992.

DOUGHTY, J. et al. PCP-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1333-1347, 1998.

EDLUND, A. F. et al. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. **The plant cell**, Rockville, v. 16, p. 84-97, 2004.

EGEA, J.; BURGOS, L. Detecting cross-incompatibility of there north American apricot cultivars and establishing the first incompatibility group in apricot. **Journal American Society Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 121, n. 6, p. 1002-1005, 1996.

EINHARDT, P. M. et al. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

ENTANI, T. et al. Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* Vilm. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 1882-1888, 1999.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, Especial, p. 109-120, 2011.

FIORAVANÇO, J. C. A cultura da pereira no Brasil: Situação econômica e entraves para o seu crescimento. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 52-60, 2007.

FLANKLIN, F. H. C.; LAWRENCE, M. J.; FLANKLIN-TONG, V. E. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. **International Review of Cytology**, New York, v. 158, p. 1-62, 1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAOSTAT**: production-crops. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 8 maio 2018.

FREITAS, B. M. Changes with time in the germinability of cashew (*Anacardium occidentale*) pollen grains found on different body areas of its pollinator bees. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 289-294, 1997.

GRIFFING, B. R. U. C. E. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 9, n. 4, p. 463-493, 1956.

HARDER, L. D.; THOMSON, J. D. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants. **American Naturalist**, Chicago, v. 133, p. 323-344, 1989.

HASENSTEIN, K. H.; ZAWADA, M. S. Auxin modification of the incompatibility response in *Theobroma cacao*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, p. 113-118, 2001.

HERRERO, M.; HORMAZA, J. I. Pistil controlling pollen tube growth. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, n. 9, p. 343-347, 1996.

HESLOP-HARRISON, Y. Control gates and micro-ecology: the pollenstigma interaction in perspective. **Annals of Botany**, London, v. 85, p. 5-13, 2000.

HESLOP-HARRISON, J. Self-incompatibility: phenomenology and physiology. **Proceedings of the Royal Society of London B**, London, v. 218, p. 371-395, 1983.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal - PAM**. 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 8 maio 2018.

ISHIMIZU, T. et al. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 961-967, 1999.

JACKSON, J. E. **Biology of apples and pears**. Cambridge: Cambridge University, 2005. 488 p.

JANSSENS, G. A. et al. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. **Theor. Journal of Applied Genetics**, Cham, v. 91, p. 691-698, 1995.

KALISZ, S. et al. The mechanism of delayed selfing in *Collinsiaverna* (Scrophulariaceae). **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 86, p. 1239-1247, 1999.

KETCHIE, D. O. et al. Viability of different pear pollen and the effect on fruit set of 'Anjou' pear (*Pyrus communis* L.). **Fruit Varieties Journal**, Urbana, v. 50, n. 2, p. 118-124, 1996.

KEVAN, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (eds). **Pollinating bees**: the conservation link between Agriculture and Nature. Brasília: Ministry of Environment, 2002. 313 p.

KOZMA, P. et al. **Floral biology, pollination and fertilisation in temperate zone fruit and grape**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2003. 621 p.

KRUNIĆ, M. D.; STANISAVLJEVIĆ, L. Ž. **The Biology of european orchard bee *Osmia cornuta***. Beograd: Faculty of Biology University of Belgrade, 2006.

LARSEN, K. Incompatibility, pseudo-compatibility and preferential fertilization in *Beta vulgaris* L. In: MULCAHY, D. L.; OTTAVIANO, E. **Pollen**: biology and implications for plant breeding. New York: Elsevier, 1983. p. 205-210.

LAYNE, R. E. C.; QUAMME, H. A. Pears. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University, 1975. p. 38.

LEE, S. H. et al. Controlling selfincompatibility by CO₂ gas treatment in *Brassica campestris*: structural alteration of papillae cell and differential gene expression by increased CO₂ gas. **Molecules and cells**, Seoul, v. 11, p. 186-191, 2001.

LEITE, D. L.; SOUZA, C. M. Polinização. In: CENTELALA-QUEZADA, A.; NAKASU, B. H.;HERTER, F. G. (Ed.). **Pêra produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 23-28.

LEWIS, D. **Sexual incompatibility in plants**. London: E. Arnold, 1979. 59 p.

LOMBARD, P. B. Principales cultivares y nuevas variedades de peras en USA. **Revista de Fruticultura**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 241-256, 1990.

MAKANDA, I. et al. Combining ability and cultivar superiority of sorghum germplasm for grain yield across tropical low-and mid-altitude environments. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 116, n. 1/2, p. 75-85, 2010.

MANGANARIS, A. G.; ALSTON, F. H. Inheritance and linkage relationships of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in apple. 1. The gene Got-1, a maker for the S incompatibility locus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 74, p. 154-161, 1987.

MANSVELT, E. L.; HATTINGH, A. H. M. J. Scanning electron microscopy of pear blossom invasion by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, p. 2523–2529, 1987.

MATTON, D. P. et al. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allelespecific pollen recognition. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 10, p. 1757-1766, 1997.

MIZRAHI, Y. et al. Metaxenia in the vine cacti *Hylocereus polyrhizus* and *Selenicere spp.* **Annals of Botany**, London, v. 93, n. 4, p. 469-472, 2004.

MODLIBOWSKA, I. Pollen tube growth and embryo-sac development in apples and pears. **Journal Pomol's**, [S. l.], v. 21, p. 57-89, 1945.

MORIYA, Y. et al. Parthenocarpy and self- and cross-incompatibility in ten european pear cultivars. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 74, n. 6, p. 424-430, 2005.

MOTA, M. S. et al. Caracterização molecular dos alelos-S de incompatibilidade gametofítica em *Prunus salicina* Lindl. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 798-807, 2010.

MOTA, M.; TAVARES, L.; OLIVEIRA, C. M. Identificação de alelos S em diferentes cultivares de pereira e avaliação da sua compatibilidade gametofítica com a'Rocha'. **Actas Portuguesas de Horticultura**, Lisboa, n. 11, p. 29-35, 2009.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares. In: _____. **Frutas do Brasil-46: pêra produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 29-36.

NEBEL, B. R. Metaxenia in apples. **Journal of Heredity**, London, v. 27, n. 9, p. 345-350, 1936.

NEBEL, B. R.; TRUMP, I. J. Xenia and Metaxenia in apples: II. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 18, n. 5, p. 356-359, May 1932.

NETTANCOURT, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. Berlin: Springer, 2000. 320 p.

NETTANCOURT, D. **Incompatibility in angiosperms**. Berlin: Springer, 1977. 230 p.

NETTANCOURT, D. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 10, p. 185-199, 1997.

NEVES, T. S. et al. Efeito de diferentes concentrações de carboidratos e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de cubiuzeiro e cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 19, n. 2, 1997.

NEWBIGIN, E. et al. Gametophytic self-incompatibility systems. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1315-1324, 1993.

NYÉKI, J. Fertilization conditions. In: NYÉKI, J.; SOLTÉSZ, M. **Floral biology of temperates zone fruit trees and small fruits**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1996. p 185-256.

ONORATI, I. A.; TACCHINI, E. M. L. W. Autopolinización en cultivares de *Pyrus communis* L. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, Buenos Aires, v. 1, n. 21, p. 1315-1324, 1969.

PANCALDI, M. Aspects of the genetics of the gametophytic incompatibility in the sterility of fruit plants. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofrutticoltura**, Bologna, v. 58, p. 70-75, 1995.

PETRI, J.; PASQUAL, M. **Polinização da macieira no alto do Rio do Peixe, Santa Catarina**. Florianópolis: EMPASC, 1981. 40 p. (Boletim Técnico, 1).

PIOTTO, F. A. et al. Interspecific xenia and metaxenia in seeds and fruits of tomato. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 2, p. 102-107, 2013.

QUEZADA, A. C.; NAKASU, B. H. Classificação botânica, origem e evolução. In: QUEZADA, A. C.; NAKASU, B. H.; HERTER, F. G. (Ed.). **Pêra produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 20-22.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1996. p. 131-146.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 4. ed. Lavras: UFLA, 2008. 460 p.

RECASENS, I. Fisiología del crecimiento: manzanas y peras. **Revista de Fruticultura**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 230-240, 1990.

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**. London: Chapman & Hall, 1997. 529 p.

ROBBERTSE, P. J. et al. Hass [avocado] yield and fruit size as influenced by pollination and pollen donor-a joint progress report. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, [S. l.], v. 19, p. 63-67, 1996.

SABIR, A. Xenia and metaxenia in grapes: differences in berry and seed characteristics of maternal grape cv. 'Narince' (*Vitis vinifera* L.) as influenced by different pollen sources. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 17, p. 567-573, 2014.

SANZOL, J. et al. Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (*Pyrus communis*; Rosaceae) flower. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 90, n. 1, p. 78-84, 2003.

SANZOL, J.; HERRERO, M. Identification of self-incompatibility alleles in pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. *Euphytica* (in press). **Euphytica**, Wageningen, v. 128, n. 3, p. 325-331, 2002.

SANZOL, J.; HERRERO, M. The effective pollination period in fruit trees. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 90, p. 1-17, 2001.

SAPIR, G. et al. Full compatibility is superior to semi-compatibility for fruit set in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars. **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 116, n. 4, p. 394-398, 2008.

SASSA, H. et al. Identification of selfcompatibility-related glycoproteins in styles of apple (*Malus x domestica*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 201-205, 1994.

SASSA, H. et al. Self-Incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 250, p. 547-557, 1996.

SASSA, H. et al. Style-specific selfcompatible mutation caused by deletion of the S-Rnase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 223-227, 1997.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL AGNOL, M. Self-incompatibility in plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 1083-1090, 2002.

SCHRAMM, C. C. **Compatibilidade e incompatibilidade gametofítica entre as principais cultivares de macieiras (*Malus domestica*, Borkh.) em Pelotas**. 1985. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1985.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: J. Sons, 1995. p. 325-440.

SEDGLEY, M.; GRIFFIN, A. R. **Sexual reproduction of tree crops**. New York: Academic, 1989.

SHEFFIELD, C. S.; SMITH, R. F.; KEVAN, P. G. Perfect syncarpy in Apple (*Malus x domestica* 'Summerland McIntosh') and its implication for pollination, seed distribution and fruit production (Rosaceae: maloideae). **Annals of Botany**, London, n. 9, p. 583-591, 2005.

SOLTÉSZ, M. Apple [*Malus sylvestris* (L.) Mill.] In: KOZMA, P.; NYÉKI, J.; SOLTÉSZ, M.; SZABÓ, Z. **Floral biology, pollination in temperate zone fruit species and greape**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2003. p. 237-316.

SOLTÉSZ, M. Lows of bloom phenology by apple. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 437, p. 451-456, 1997.

SWINGLE, W. T. Metaxenia or the influence of the male parent on the tissues of the mother plant outside of the embryo and endosperm, especially as exemplified in the date palm. In: **THIRD PAN PACIFIC SCIENCE CONGRESS**, 1., 1926, Tokyo. Proceedings... Tokyo: National Research Council of Japan, 1926. p. 1164-1165.

TAO, R. et al. Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 38, p. 304-311, 1997.

TAO, R. et al. Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, p. 224-233, 1999.

TEZUKA, T. et al. A connection between the self-incompatibility mechanism and the stress response in lily. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 38, p. 107-112, 1997.

TOMIMOTO, Y. et al. Analysis of selfincompatibility-related ribonucleases (S-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 66, p. 159-167, 1996.

USMAN, M. et al. Pollen parent enhances fruit size and quality in intervarietal crosses in guava (*Psidium guajava*). **International Journal of Agriculture and Biology**, Lahore, v. 15, n. 1, p. 125-129, 2013.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486 p

WEINGARTNER, U. et al. Combining cytoplasmic male sterility and xenia increases grain yield of maize hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 1848-1856, 2002.

WESTWOOD, M. N. **Fruticultura de zonas templadas**. Madri: Mundi Prensa, 1982. 438 p.

WHEELER, M. J. et al. The intracellular events triggered by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*. **Protoplasma**, Wien, v. 208, p. 99-106, 1999.

WHITE, A. G. et al. **Nashi, Asian pear in New Zealand**. Wellengton: Publizing, 1990. 84 p.

WHITEHOUSE, H. L. K. Multiple-allelomorph incompatibility of pollen and style in the evolution of the angiosperms. **Annals of Botany**, London, v. 14, p. 198-216, 1951.

WILLIAM, R. R.; MAIER, M. Pseudo-compatibility after-pollination of the Cox's Orange Pippim. **Journal of Horticultural Science**, London, n. 52, p. 475-483, 1977.

WILLIAMS, R. R. The effect of summer nitrogen application on the quality of apple blossom. **Journal of Horticultural Science**, London, n. 40, p. 31-41, 1965.

WILLINGALE, J. et al. Post-pollination stigmatic constriction, the basis for ergot resistance in selected lines of pearl millet. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 536-539, 1986.

WYATT, R. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. In: REAL, L. (Ed.). **Pollination biology**. Orlando: Academic, 1983. p. 51-95.

YAEGAKI, H. et al. Molecular characterization of S-RNase genes and S genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v.13, p. 251-257, 2001.

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.

ZUCCHERELLI, S. et al. S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 15, p. 153-158, 2002.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Determination of pollenizers for pear cultivars (*Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia*) in subtropical regions

Artigo formatado de acordo com a revista Bragantia

Resumo: A pereira é uma fruteira de clima temperado, mas devido ao cruzamento entre *Pyrus communis* x *P. pyrifolia*, originou-se cultivares híbridas adaptadas a regiões subtropicais, por agregarem a qualidade das pereiras europeias (*P. communis*) com a baixa necessidade de frio hibernal das pereiras asiáticas (*P. pyrifolia*). Porém, a baixa frutificação efetiva é um dos fatores limitantes para a expansão dos cultivos em regiões subtropicais. Não há indicações de plantas polinizadoras para essas cultivares em regiões subtropicais e essa certamente é a razão para a baixa frutificação efetiva. Objetivou-se com este estudo identificar possíveis cultivares polinizadoras de pereira em regiões subtropicais, por meio da avaliação da receptividade estigmática, da porcentagem de germinação e quantificação de grãos de pólen. Foram utilizadas sete cultivares híbridas de pereira: Cascatense, Centenária, D'água, Primorosa, Seleta, Tenra e Triunfo. Coletou-se flores de cada cultivar por estágio florais (E, E2, F, F2 e G) e com imersão em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, foi avaliada a receptividade estigmática. Coletaram-se flores em estágio de balão para a quantificação de anteras, grãos de pólen por antera e por flor e também para a germinação de grãos de pólen em meio de cultura. Notou-se que os estigmas estavam 100% receptivos para todas as cultivares no estágio F2 e G, ou seja, após a antese. A cultivar Cascatense apresentou elevada quantidade de anteras, grãos de pólen por antera e por flor, já as cultivares Seleta e Tenra apresentaram baixo número de grãos de pólen por antera e por flor. A diferença no número de grãos de pólen por flor, possivelmente pode ser explicado, pois, as frutíferas de clima temperado apresentam necessidade de frio hibernal. As maiores porcentagens de germinação de grãos de pólen foram obtidas pela cultivar Cascatense (72,75%), seguida da cultivar Primorosa (59,90%). As cultivares Seleta e Triunfo apresentam alta receptividade estigmática em um período maior do florescimento apresentando potencial como progenitoras femininas. A cultivar Cascatense apresenta maior porcentagem de germinação e maior número de antera por flor, grãos de pólen por antera e grãos de pólen por

flor. É uma cultivar com alto potencial para ser utilizada como polinizadora, tanto em programas de melhoramento genético de pereira como em pomares comerciais.

Palavras-chave: Receptividade estigmática, cultivares polinizadoras, melhoramento genético.

Abstract: The pear tree is originally a temperate-climate fruit tree. The cross *Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia* generated hybrid cultivars adapted to subtropical regions, which combined the quality of the European pear tree (*P. communis*) with the low chill hours required by the Asian pear tree (*P. pyrifolia*). However, the low effective fruiting is a limiting factor for the expansion of pear tree crops in subtropical regions. To date, no pollinizer plants have been indicated for these cultivars in subtropical regions, and this is certainly the reason for the low effective fruiting. This work aimed to identify possible pollenizer pear tree cultivars in subtropical regions by evaluating the stigmatic receptivity, the germination percentage, and the number of pollen grains. Seven hybrid pear cultivars were used: Cascatense, Centenária, D'água, Primorosa, Seleta, Tenra, and Triunfo. Flowers of each cultivar at each floral stage were collected (E, E2, F, F2, and G). The stigmatic receptivity was evaluated by immersing the material in 3% hydrogen peroxide (H₂O₂). Flowers were collected at the balloon stage for the quantification of anthers, pollen grains per anther and per flower, and pollen grains germination in the culture medium. Stigmas were 100% receptive for all cultivars at the F2 and G stages, *i.e.*, after anthesis. Cultivar Cascatense presented a large number of anthers and pollen grains per anther and per flower. Conversely, cultivars Seleta and Tenra showed a small number of pollen grains per anther and per flower. The difference in the number of pollen grains per flower might be explained by the fact that temperate fruits require high chill hours. The highest pollen grain germination percentage was detected for Cascatense (72.75%), followed by Primorosa (59.90%). Cultivars Seleta and Triunfo presented high stigmatic receptivity for a longer period during the flowering stage, showing to be a potential female parent. Cultivar Cascatense had a higher germination percentage and a larger number of anthers per flower, pollen grains per anther, and pollen grains per flower. Cascatense has a high potential to be used as a pollenizer, both in pear tree breeding programs and commercial orchards.

Keywords: Stigmatic receptivity, pollenizer cultivars, plant breeding.

1. Introduction

Despite being a temperate-climate fruit tree, some pear tree hybrid cultivars obtained from the cross *Pyrus communis* x *P. pyrifolia* are adapted to subtropical regions, where the climate is characterized by mild winter and higher temperatures in the summer, compared to temperate regions (Curi et al. 2017). The cultivation of these hybrid cultivars in subtropical regions was made possible by the combination of the quality of the European pear tree (*P. communis*) with the low chill hours required by the Asian pear tree (*P. pyrifolia*) (Chagas et al. 2008).

The low effective fruiting is a limiting factor for the expansion of pear tree crops in subtropical regions (Bettioli Neto et al. 2014). No pollenizer plants have been indicated for these hybrid cultivars in these regions, and this is certainly the reason for the low effective fruiting, which is related to the pollination process. The absence of the ovule fertilization in pear tree flowers, in both temperate and subtropical regions, results in a small number of fruits set per plant, which consequently reduces fruit yield. Fewer seeds are formed under insufficient pollination condition. Therefore, for the ovary to develop, the fruit must use phytohormones produced in other parts of the plant since the few seeds cannot synthesize enough of the substance (Tavares et al. 2002).

For the pear tree to overcome the gametophytic incompatibility and provide adequate fertilization, consequently increasing the effective fruiting, pollen grains of genotypes compatible with the "S" allele series must be transferred by pollinator insects (Sezerino and Orth, 2015). Due to the self-incompatibility in pear cultivars, pollenizer plants are used; however, they must be compatible and provide a large number of pollen grains to the main cultivar (Nakasu and Faoro, 2003). The flowering stages of the pollenizer cultivar and the recipient cultivar must be synchronized. Moreover, the pollenizer must produce viable pollen in adequate quantity and quality to guarantee fruit production (Bettioli Neto et al. 2014).

The stigmas receptivity is fundamental to determine the best period of pollen deposition on the flower. For successful pear fertilization, the pollen grain must present high viability and germination rate (Brito et al. 2010).

The *in vitro* pollen germination test is essential for breeding programs as they allow verifying pollen viability (Ramos et al. 2008). Also, pollen grain viability and germination are crucial factors to fruit set, and they influence yield (Irenaeus and Mitra, 2014).

Therefore, this study aimed to identify possible pear tree pollenizer cultivars in subtropical regions by evaluating the stigmatic receptivity, the germination percentage, and the number of pollen grains.

2 Material and Methods

The plant material was collected in Lavras, Brazil (lat. 21°14'S; long. 45°00'W; alt 841 m asl.), from 2015 to 2016. The climate of the experimental site is classified as Cwa (subtropical climate, with cold and dry winter and hot and humid summer) (Souza et al. 2017). Seven *Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia* hybrid cultivars were evaluated: Cascatense, Centenária, D'água, Primorosa, Seleta, Tenra, and Triunfo (Table 1).

Table 1 - List of cultivars with their respective identification, genealogy, and origin.

Identification	Cultivar	Genealogy	Origin
1	Cascatense	Packham's Thiumph x Le Conte	IAC - Brazil
2	Centenária	Hood x Packham's Triumph	IAC - Brazil
3	D'água	Unknown	Unknown
4	Primorosa	Hood x Packham's Triumph	Embrapa - Brazil
5	Tenra	Madame Sieboldt x Packham's Triumph	IAC - Brazil
6	Triunfo	Hood x Packham's Triumph	IAC - Brazil
7	Seleta	Hood x Packham's Triumph	IAC - Brazil

Seedlings were grafted onto a *Pyrus calleryana* rootstock and taken to the field in October 2010. Plants were spaced at 3.0 x 4.0 meters (833 plants ha⁻¹) and conducted in a modified central leader system. The management practices were standard, especially fertilization and phytosanitary control, using chemical products recommended for the crop.

2.1 Stigmatic receptivity

Stigmatic receptivity was verified by the viscous and wetting aspect of the stigma (Almeida, 1986) and tested with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) (Kearns and Inouye, 1993). Flowers were collected at different floral development stages. Four flowers of each cultivar at each floral stage were collected (E, E2, F, F2, and G - Figure 1). The material was randomly divided into four replications and ten flowers per replication.

Drops of 3% hydrogen peroxide were applied to the stigmas of the collected flowers. Those that presented bubble formation were considered as receptive. The percentage of receptive stigmas was evaluated at each floral stage by counting the number of stigmas that presented bubble formation. At each floral stage, the number of receptive stigmas was multiplied by 100 and then divided by the total number of stigmas evaluated—in this case, ten stigmas. Data were subject to analysis of variance, and the groups of means were compared by the Scott-Knott's test at 5% probability.

Figure 1 - Pear tree flower stages.



2.2 Number of anthers per flower and pollen grains per anther and per flower

The number of anthers per flower was determined by counting the anthers of ten floral buds collected from each cultivar at the pre-anthesis stage. Afterward, ten anthers were randomly separated, and each set of anthers was then stored in open microtubes at controlled temperature (27 °C) for 24 hours, in the absence of light, for the dehiscence and release of pollen grains (Nogueira et al. 2015). After 24h, a 1,000 µl lactic acid solution was added to the tubes. After 48 hours, a 10 µl sample of each Eppendorf was placed on Neubauer slides for the counting of the number of pollen grains, using an optical microscope (100x).

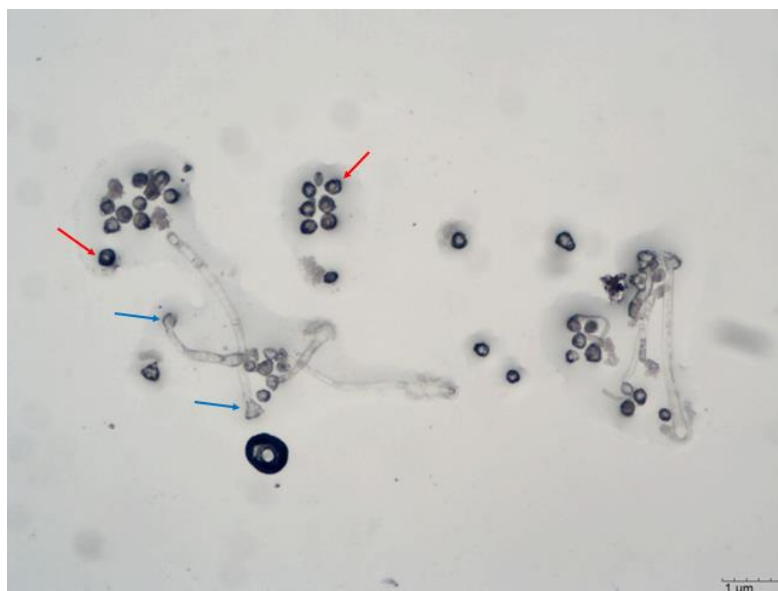
This experiment was conducted with five replications, each one consisting of 16 readings of the Neubauer slide. The amount of pollen grains per anther was calculated by multiplying the mean number of pollen grains of each sample by the volume of lactic acid in the solution (1,000 µl) and dividing that value by the product between the volume of lactic acid in the sample (10 µl) and the number of anthers of each microtube (ten). The number of pollen grains per flower was calculated by multiplying the mean number of pollen grains per anther by the mean number of anthers per flower. Data were subject to analysis of variance, and the groups of means were compared by the Scott-Knott's test at 5% probability.

2.3 Percentage of pollen grain germination

Ten flowers of each cultivar were collected at the balloon stage to quantify the pollen grains germination. Anthers were removed using a tweezers and stored in uncovered Petri dishes, at a controlled temperature (27 °C) for 12 hours to enable the anthesis, complete dehiscence, and release of pollen grains, based on the methodology of Zambon et al. (2014). Using a fine-bristle brush, the pollen was distributed on the surface of the Petri dishes containing 20 ml of the previously established culture medium (containing 90 g.L⁻¹ sucrose, 700 mg L⁻¹ boric acid, 145 mg L⁻¹ calcium nitrate, pH of 5.2, and 10 g L⁻¹ agar), as determined by Nogueira et al. (2016). Subsequently, the Petri dishes were covered and stored in the absence of light for 24 hours. Each block consisted of four Petri dishes.

Pollen grains were visualized in a monocular microscope (10x) to quantify the germinated pollen grains. The pollen grain whose pollen tube length exceeded twice its diameter was considered as germinated, according to Figueiredo et al. (2013) (Figure 2).

Figure 2. Germination of pollen grains of cultivar Seleta in the culture medium. Germinated pollen grains (blue arrow) and ungerminated pollen grains (red arrow).



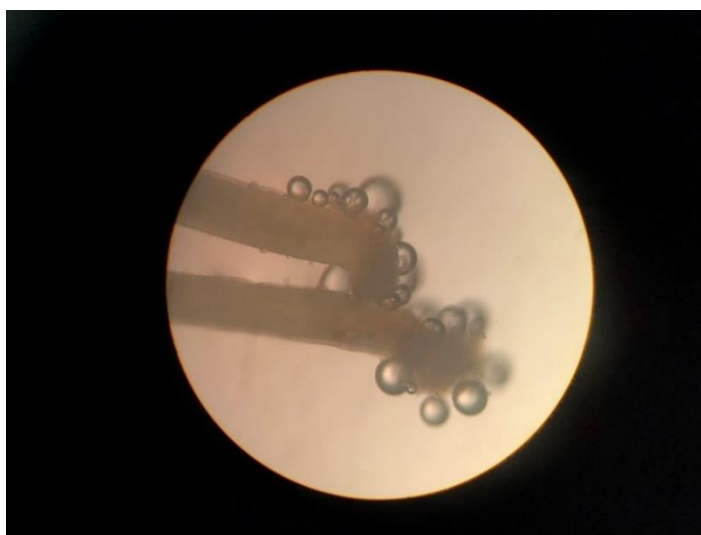
Four blocks per cultivar with five fields of view were used, where each Petri dish represented one block. Data were subject to analysis of variance, and groups of means were compared by the Scott-Knott's test at 5% probability.

3 Results and Discussion

3.1 Stigmatic receptivity

Using 3% hydrogen peroxide, bubble formation was detected in the stigmatic cavity, indicating the activity of the peroxide enzyme (Figure 3), both at pre-anthesis flowers stage and completely opened flowers. The presence of this enzyme indicates the stigma receptivity (Kearns and Inouye, 1993).

Figure 3. Bubble formation in the stigmatic cavity in the presence of 3% hydrogen peroxide.



The pear tree presents a wet stigma, and its receptivity implies the production of exudates rich in proteins, free amino acids, lipids, and carbohydrates, which establish an adequate environment for the hydration and germination of the pollen grain and initial growth of the pollen tube (Sanzol et al. 2003).

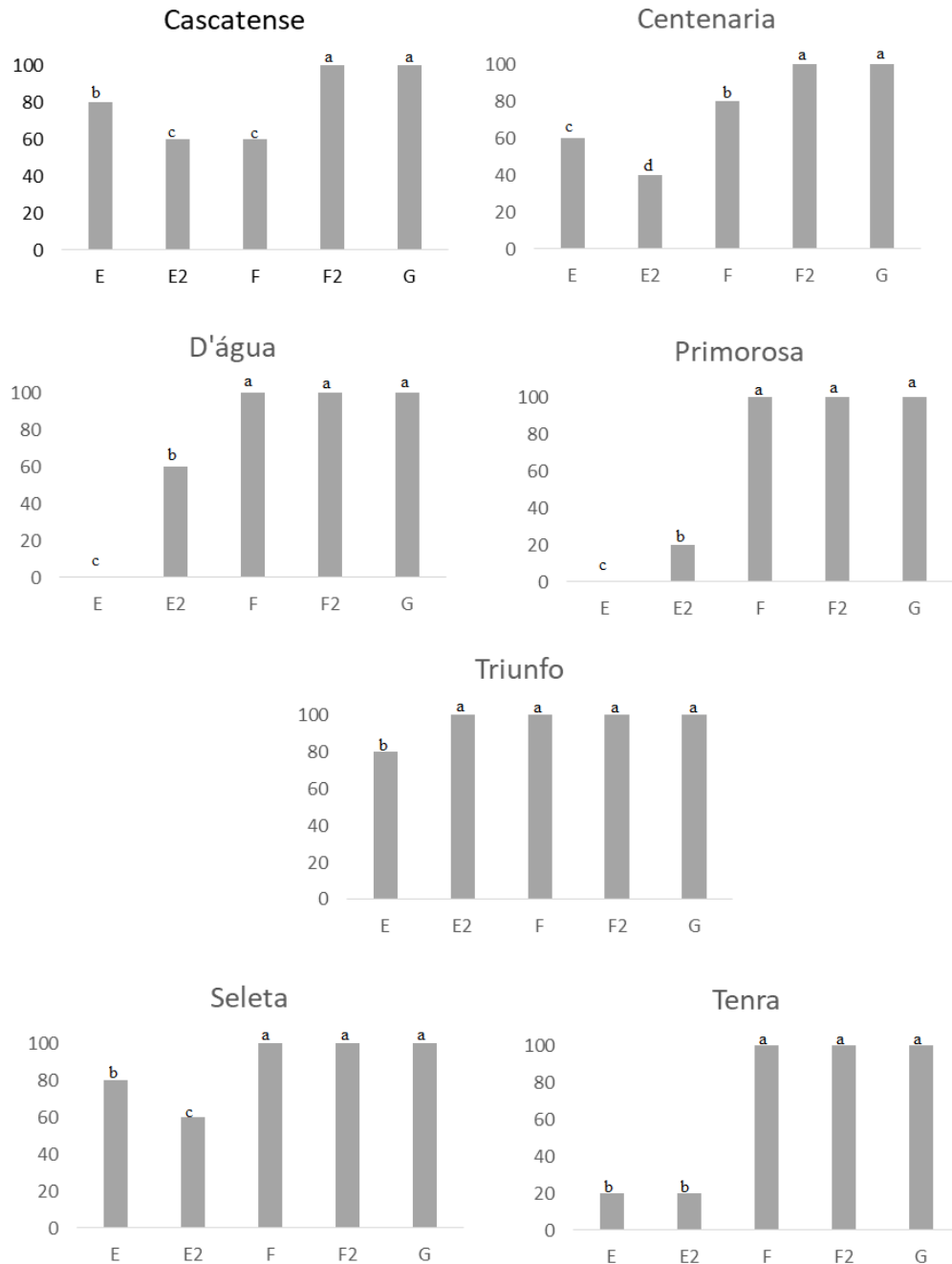
Figure 4 shows that in all cultivars studied, the stigmas were 100% receptive at the F2 and G stages, after anthesis. For cultivars D'água, Primorosa, Seleta, Tenra, and Triunfo, stigmas were 100% receptive at the F stage when the flower was at the balloon stage (pre-anthesis). This result demonstrates that for these cultivars, the manual pollination carried out in breeding programs can be performed before the flower opening, *i.e.*, at the pre-anthesis stage. Cultivar Triunfo presented 100% receptive stigmas from the E2 stage (Figure 4).

Sanzol et al. (2003) studied pollen grain behavior after late pollination and identified three different stigmatic stages: immature, mature, and degenerated. Only the mature stigma is considered as receptive. According to the authors, the mechanisms by which the stigma loses

receptivity are still incipient. However, it is believed that the beginning of the stigmatic receptivity and stigma degeneration are more probable to occur as a result of alterations in the secretion, rather than physical changes on the receptive surface.

D'água and Primorosa presented a shorter period of stigmatic receptivity, reaching 0% receptivity at the E stage. In the present study, the shortest period of the stigmatic receptivity of the cultivars might have occurred due to the high temperatures of the subtropical region where the studies were carried out. Steinacher and Wagner (2010) affirm that the period of stigmatic receptivity is hereditary but subject to phenotypic plasticity. Studies on cherry trees have shown that this period can be shortened under high-temperature conditions and extended under low-temperature conditions (Hedhly et al. 2003).

Figure 4. Stigmatic receptivity of flowers of different pear cultivars at different phenological stages.



* means followed by the same letter do not differ from each other by the Scott-Knott's test at 5% probability.

For successful pollination, the pollen transferred to the receptive stigma must germinate, leading to fertilization. In many cases, fertilization may also occur when the pollen grain is deposited before the stigmatic receptivity period, provided that it remains viable to germinate as soon as the flower becomes receptive (Ramos et al. 2002). Under stress conditions, the

stigmatic receptivity period may be affected due to a decrease in the amount of exudates (Srinivasan et al., 1999).

3.2 Number of anthers per flower and pollen grains per anther and per flower

Statistical analyses revealed a significant difference between cultivars regarding the number of anthers per flower, pollen grains per anther, and pollen grains per flower (Table 2). Accuracy estimates indicate the precision with which the experiments were conducted and the existence of variability. Appropriate accuracy values are close to the unit or 100% (Resende and Duarte, 2007). In the present study, for all evaluated traits, the accuracy was higher than 95%, confirming the accuracy of the evaluated data.

Table 2. Mean number of anthers per flower, mean number of pollen grains per anther and per flower in different pear tree cultivars.

Cultivar	N. of anthers per flower	N. of pollen grains per anther	N. of pollen grains per flower
Cascatense	22.0 a	1.127.50 a	24.805.00 a
Centenaria	19.2 b	860.00 a	16.512.00 b
Dagua	19.4 b	780.00 a	15.132.00 b
Primorosa	14.4 c	795.00 a	11.448.00 b
Tenra	19.8 b	11.00 b	217.80 c
Triunfo	21.6 a	3.50 b	43.20 c
Seleta	16.4 c	2.00 b	57.40 c
Accuracy	95	95	96

Means followed by the same letter in the column belong to the same group by the Scott-Knott's test at 5% probability.

Cascatense presented the largest number of anther per flower, pollen grains per anther, and pollen grains per flower, simultaneously, showing potential to be used as a pollenizer. Triunfo presented a large number of anthers per flower but a very small number of pollen grains per anther, resulting in a low quantity of pollen grains per flower. Pear trees require cross-pollination due to the gametophytic incompatibility. The production of large amounts of pollen grains is a desirable trait since it increases the probability of cross-pollination (Sezerino and Orth, 2015).

Cultivars Centenaria, D'água, Primorosa, Tenra, and Seleta presented less than 20 anthers per flower. This result may be related to a trait inherited from one of their parents. Nogueira et al. (2015), working with cultivar Packham's Triumph, detected 12 anthers per flower. Cultivars Seleta and Tenra presented a small number of pollen grains per anther and per flower. This result may be related to the lower adaptation of these cultivars to high-temperature

regions. Nava et al. (2009) studied peach trees and verified a decrease in the production of pollen grains per anther due to high temperatures and water stress, which may have influenced the floral organogenesis and microsporogenesis stages.

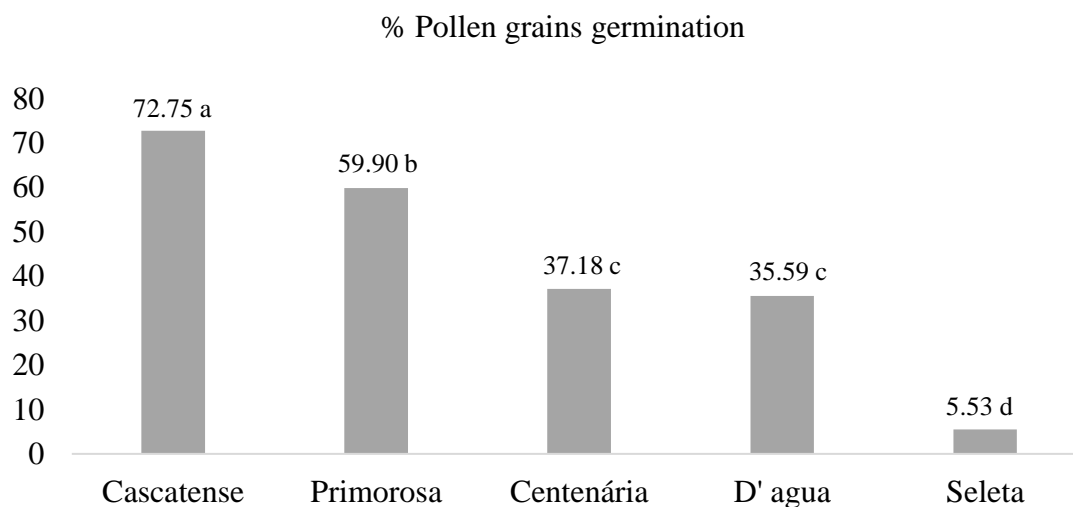
The difference in the number of pollen grains per flower might be related to the fact that temperate-climate fruit trees require high chill hours. Therefore, when these cultivars are cultivated in regions with low chill hours, they can produce smaller flowers, smaller anthers, and fewer pollen grains than those cultivated under high chill hours conditions (Nogueira et al. 2016).

Also, according to Irenaeus and Mitra (2014), the decrease in the number of pollen grains at high temperature might be due to anther indehiscence, polyamine synthesis inhibition, and carbohydrate metabolism reduction. Conversely, other reports suggest that, at higher temperatures, the decrease in the number of pollen grains is due to higher accumulation of sucrose and starch. This phenomenon is as a result of reduced use and degradation of starch rather than the pollen grain biosynthesis before anthesis.

3.3 Percentage of pollen grains germination

Statistical analysis of the results revealed a significant difference between the pear tree cultivars in relation to the percentage of pollen grains germination. The means clustering test separated cultivars into four distinct clusters, considering the percentage of pollen grains germination. The highest percentages of pollen grains germination were verified for Cascatense (72.75%), followed by Primorosa (59.90%) (Figure 4). The percentage of pollen grains germination of Tenra and Triunfo was not detected; both presented low pollen grains germination, and not enough pollen was obtained for the tests. Therefore, these cultivars are not recommended as pollenizers.

Figure 4 - Percentage of pollen grains germination of different pear tree cultivars.



* means followed by the same letter do not differ from each other by the Scott-Knott's test at 5% probability.

For a cultivar to be indicated as a pollenizer, it must have adequate germination and produce a large number of pollen grains. The success of seed formation usually depends on the pollen grain viability (He et al. 2017). When the pollination process and/or pollen quality is deficient, the ovule fertilization is impaired, leading to seeds abortion or malformation. This phenomenon will result in a larger number of empty locule in the pericarp (Nava et al. 2009).

Tatari et al. (2017) reported 78% and 88% of grain germination of different pear tree cultivars in Iran. In general, their results were superior to those of the present work. However, several factors, either genetic and/or environmental, can influence the percentage of pollen germination. In addition, temperature stress is considered the most severe effects if it occurs during pollen maturation (Zinn et al. 2010).

Considering that the winter temperatures in subtropical regions are higher, this fact might have been the reason for the low percentage of pollen grains germination of cultivar Seleta (Figure 4). It should be mentioned that the effect of temperature on the pollen grain germination depends on the cultivar and the optimal temperature for pollen grain germination. Moreover, the development of the pollen tube varies according to the species and cultivar (Mert, 2009; Loupassaki et al. 1997).

Temperature stress may limit fertilization by inhibiting the development of male and female gametophytes, the pollen grain germination, and the pollen tube growth (Hedhly 2011). Thus, studies on the effect of temperature stress on the reproductive process of different cultivars may be crucial in the choice of the appropriate cultivar for a determined region, according to the microclimate, and in the understanding of the correlation between low fruiting

and extreme temperature incidence before and during the flowering period (Irenaeus and Mitra, 2014).

Pollen grains production and germination can be suggested as a good criterion to determine plants response to the high temperatures. These parameters can also be used as a selection criterion of pollinizer cultivars in breeding programs of heat-tolerant genotypes (Irenaeus and Mitra, 2014).

4 Conclusions

Cultivars Seleta and Triunfo presented high stigmatic receptivity for a more extended period of the flowering stage, presenting potential to be used as female parents.

Cultivar Cascatense showed a higher percentage of germination and a larger number of anthers per flower, pollen grains per anther, and pollen grains per flower. This cultivar has high potential to be used as a pollinizer, both in breeding programs for pear trees and commercial orchards.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and National Council for Scientific and Technological Development – CNPq.

5 References

Almeida, E. C. (1986) Biologia floral e mecanismos de reprodução em *Crotaria mucrota*. **Ceres**, 33 (190), 528-40.

Bettioli Neto, J. E., Chagas, E. A., Sanches, J., Pio, R., Antoniali, S. and Cia, P. (2014). Production and postharvest quality of pear tree cultivars in subtropical conditions at eastern of São Paulo state, Brazil. **Ciência Rural**, 44 (10), 1740-1746.

Brito, A. C., Souza, J. D., Rebouças, T. N. H., and Amaral, C. L. F. (2010). Propriedades do pólen e do estigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência

de cruzamentos em programas de melhoramento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 12 (2), 208-214.

Chagas, E. A., Campo Dall'Orto, F. A., Ojima, M., Barbosa, W., & Pio, R. (2008). Pear 'IAC Princesinha': new european type cultivar for subtropical climate. **Acta Horticulturae**, 800, 507-510.

Curi, P. N., Bisi, R. B., Salgado, D. L., Barbosa, C. M. A., Pio, R., and Souza, V. R. de (2017). Hybrid cultivars of pear in subtropics regions: processing ability in the form of jelly. **Ciencia Rural**, 47 (11), 1-7.

Figueiredo, M. A., Pio, R., Silva, T. C., and Silva, K. N. (2013). Características florais e carpométricas e germinação in vitro de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48 (7), 731-740.

Hedhly A. (2011). Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. **Environmental and Experimental Botany**, 74, 9-16.

Hedhly, A., Hormaza, J. I., and Herrero, M. (2003). The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Plant Cell Environ.**, 26, 1673-1680.

He, G., Hu, F., Ming, J., Liu, C., and Yuan, S. (2017). Pollen viability and stigma receptivity in *Lilium* during anthesis. **Euphytica**, 213 (10), 231.

Irenaeus, T., and Mitra, S. K. (2014). Understanding the pollen and ovule characters and fruit set of fruit crops in relation to temperature and genotype—a review. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, 87, 157-167.

Kearns, C. A., and Inouye, D. W. (1993). **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 579 p.

Loupassaki, M., Vasilakakis, M., and Androulakis, I. (1997). Effect of pre incubation humidity and temperature treatment on the in vitro germination of avocado pollen grains. **Euphytica**, 94, 247-251.

Mert, C. (2009). Temperature responses of pollen germination in walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 3, 37-43.

Nakasu, B. H., and Faoro, I. D. (2003). Cultivares. Frutas do Brasil. **Pêra Produção**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.29-36.

Nava, G. A., Dalmago, G. A., Bergamaschi, H., Painz, R., Santos, R. P. dos, and Marodin, G. A. B. (2009). Effect of high temperatures in the pre-blooming and blooming periods on ovule formation, pollen grains and yield of ‘Granada’ peach. **Scientia Horticulturae**, 122 (1), 37-44.

Nogueira, P. V., Silva, D. F., Pio, R., Silva, P. A. O., Bisi, R. B., and Balbi, R. V. (2015). Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. **Bragantia**, 74 (1), 9-15.

Nogueira, P. V., Coutinho, G., Pio, R., Silva, D. F. D., and Zambon, C. R. (2016). Establishment of growth medium and quantification of pollen grains and germination of pear tree cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, 47 (2), 380-386.

Ramos, J. D., Pasqual, M., Salles, L. A., Chagas, E. A., and Pio, R. (2008). Stigma receptivity and in vitro citrus pollen grains germination protocol and adjustment. **Interciência**, 33 (1), 51-55.

Resende, M. D. V. de, and Duarte, J. B. (2007). Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 37(3), 182-194.

Sanzol, J., Rallo, P., and Herrero, M. (2003). Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (*Pyrus communis*; *Rosaceae*) flower. **American Journal of Botany**, 90 (1), 78-84.

Sezerino, A. A., and Orth, A. I. (2015). Polinização da pereira-portuguesa em bom retiro-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 37 (4), 943-951.

Souza, F. B. M., Pio, R., Barbosa, J. P. R. A. D., Reighard, G. L., Tadeu, M. H., and Curi, P. (2017). Adaptability and stability of reproductive and vegetative phases of peach trees in subtropical climate. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 39 (4), 427-435.

Srinivasan, A., Saxena, N. P., and Johanson, C. (1999). Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genetic variation in gamete development and function. **Field Crops Research**, 60, 209- 222.

Steinacher, G., and Wagner, J. (2010). Flower longevity and of pistil receptivity in high mountain plants. **Flora**, 205 (6), 376-387.

Tatari, M., Ghasemi, A., Mousavi, A., & Bahrami, H (2017). Study on pollination and selection of the most suitable pollinizers for commercial pear cultivars (*Pyrus communis* L.) in Iran. **Journal of Horticultural Research**, 25 (2), 49-57.

Tavares, J. C., Fachinello, J. C., da Silva, J. B., & Herter, F. G. (2002). Fitorreguladores no aumento da frutificação efetiva e partenocarpia em peras cv. Garber. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24 (3), 629-630.

Zambon, C. R., da Silva, L. F. D. O., Pio, R., de Figueiredo, M. A., & Silva, K. N. (2014). Estabelecimento de meio de cultura e quantificação da germinação de grãos de pólen de cultivares de marmeleiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 36 (2), 400-407.

Zinn, K. E., Tunc-Ozdemir, M., and Harper, J. F. (2010). Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany**, 61, 1959-1968.

Ramos, J.D., Chalfun, N. N., Pasqual, M., and Rufini, J. C. (2002). Produção de mudas de plantas frutíferas por semente. **Informe Agropecuário**, 23 (216), 64-72

ARTIGO 2

Molecular characterization of the S-allele and compatibility between hybrid pear tree cultivars (*Pyrus communis* x *P. pyrifolia*) for subtropical regions

Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Trees

Resumo: A pereira é uma fruteira de clima temperado, mas devido ao cruzamento entre *Pyrus communis* x *P. pyrifolia*, originaram-se cultivares híbridas adaptadas a regiões subtropicais, por agregarem a qualidade das pereiras europeias (*P. communis*) com a baixa necessidade de frio hibernal das pereiras asiáticas (*P. pyrifolia*). A maioria das cultivares de peras apresenta autoincompatibilidade gametofítica, em que as plantas rejeitam seu próprio pólen, dependendo assim da polinização cruzada. A determinação de relações de compatibilidade entre pereiras pode ser útil na seleção de progenitores em programas de melhoramento e no plantio de cultivares intercompatíveis. Objetivou-se no presente estudo caracterizar moleculamente os alelos-S em cultivares de pereira híbridas adaptadas aos climas subtropicais e avaliar a frutificação efetiva proveniente do cruzamento entre essas cultivares. Sete cultivares foram avaliadas: Cascatense, Centenária, D'água, Primorosa, Seleta, Tenra e Triunfo. A fenologia foi avaliada desde o início da poda e foram computados os tempos transcorridos para as fenofases da floração e, ao final, analisou-se a sobreposição do período de floração das cultivares. Os alelos-S foram caracterizados por meio de PCR, utilizando primers específicos para os alelos previamente conhecidos. Os cruzamentos controlados foram realizados em dois anos de cultivo, em que foram feitas a autopolinização espontânea, a partenocarpia e a polinização cruzada entre as cultivares. Durante os dois anos de pesquisa, a sobreposição de todo o período de floração entre as cultivares foi superior a 50%. Quatro diferentes alelos-S foram constatados nas sete cultivares avaliadas, tendo os produtos gerados pela PCR tamanhos variando entre 650 a 1300 pb. Com base nos resultados das polinizações em campo, as cultivares Cascatense, Centenaria, D'água, Primorosa e Tenra apresentaram autoincompatibilidade. Quando o método de partenocarpia foi avaliado, as cultivares Cascatense, Centenária e Tenra apresentaram fixação de frutos acima de 20%. Com relação a fixação de frutos, observou-se que o cruzamento entre as cultivares Tenra x Primorosa, Seleta x Primorosa, Cascatense x Centenaria, Seleta x Cascatense, Triunfo x Centenaria, Triunfo x Primorosa e Seleta x D' água apresentaram porcentagens de fixação de frutos igual ou superior a 50%. As cultivares híbridas de pereira apresentam alta frequência dos alelos S1 e S5. Em condições de campo, a cultivar Primorosa

apresenta alto potencial como polinizadora de D'água, Seleta, Tenra e Triunfo. As cultivares que apresentam maior fixação de frutos são compatíveis e semi-compatíveis. A cultivar D'água amplifica os alelos S5S8 e Seleta S1S4 conferindo a elas compatibilidade total. As cultivares Primorosa, Cascatense e Triunfo amplificam o alelo S1 e S5, conferindo a elas interincompatibilidade.

Palavras-chave: *Pyrus* sp., autoincompatibilidade, alelo-S, Rosaceae.

Abstract: The pear tree is a temperate-climate fruit species. However, the cross *Pyrus communis* x *P. pyrifolia* originated hybrid cultivars adapted to subtropical regions. These hybrids combine the quality of the European pear tree (*P. communis*) with the low chill hours demanded by the Asian pear tree (*P. pyrifolia*). Most pear cultivars show gametophytic self-incompatibility, causing the plants to reject their own pollen. Therefore, they depend on cross-pollination. The determination of compatibility relationships between pear trees can be useful in the selection of parents for breeding programs and cultivation of intercompatible cultivars. This work aimed to characterize S-alleles in hybrid pear cultivars adapted to subtropical climates and evaluate the effective fruiting from the cross between these cultivars. Seven cultivars were evaluated: Cascatense, Centenária, D'água, Primorosa, Seleta, Tenra, and Triunfo. Phenology was assessed from the beginning of pruning. The time elapsed between each flowering phenophase was recorded. Afterward, the overlap of flowering periods was analyzed. S-alleles were characterized by PCR, using primers specific for previously known alleles. Controlled crosses were carried out in two seasons, and consisted of the spontaneous self-pollination, parthenocarpy, and cross-pollination between cultivars. During the two years of research, the overlap of the entire flowering period between cultivars was higher than 50%. Four different S-alleles were found in the seven cultivars evaluated. PCR products ranged from 650 to 1300 bp. Results of the in-field pollination revealed that cultivars Cascatense, Centenaria, D'água, Primorosa, and Tenra are self-incompatible. When the parthenocarpy method was evaluated, Cascatense, Centenária, and Tenra showed fruit set higher than 20%. The crosses Tenra x Primorosa, Seleta x Primorosa, Cascatense x Centenaria, Seleta x Cascatense, Triunfo x Centenaria, Triunfo x Primorosa, and Seleta x D'água showed fruit set percentages equal to or higher than 50%. Pear tree hybrid cultivars present high frequency of the S1 and S5 alleles. Under field conditions, cultivar Primorosa presents high potential as a pollinizer for D'água, Seleta, Tenra, and Triunfo. Cultivars with higher fruit set are compatible and semi-compatible. Cultivars D'água and Seleta amplify the S5S8 and S1S4 alleles,

respectively, conferring compatibility between these cultivars. Primorosa, Cascatense, and Triunfo amplify the alleles S1 and S5, conferring interincompatibility to these cultivars.

Keywords: *Pyrus* sp., self-incompatibility, S-allele, Rosaceae.

1. INTRODUCTION

The pear tree (*Pyrus* spp.) is a temperate-climate fruit species, and its cultivation in subtropical regions was made possible by the hybrid cultivars obtained from the cross *P. communis* x *P. pyrifolia* (Curi et al. 2017). This cross combines the quality of European pear trees (*P. communis*) with the low chill hours required by the Asian pear tree (*P. pyrifolia*) (Chagas et al. 2008).

Low fruit set is one of the limiting factors for the expansion of pear tree crops in subtropical regions (Bettiolo Neto et al. 2014). The fact that no pollenizer cultivars have been indicated for these hybrids in subtropical regions might be the reason for the low effective fruiting.

Most pear tree cultivars present gametophytic self-incompatibility, causing the plant to reject its own pollen. Therefore, they depend on cross-pollination for fruit production (Franklin-Tong and Franklin 2003). In general, the use of two to three pear cultivars with a coincident flowering period is recommended for commercial crops. Thus, identifying compatibility between cultivars is of economic importance since partial compatibility may reduce yield (Goldway et al. 1999; Tatari et al. 2017).

Several methods can be applied to the study on the compatibility/incompatibility between cultivars and the determination of suitable pollenizers (Ortega and Dicenta 2004). Field-controlled pollination allows estimating the performance of several cultivars in the orchard and is indicated to determine appropriate pollenizer groups (Mahmoudi et al. 2007). However, the use of this method alone in the determination of the incompatibility between cultivars may mislead the evaluation due to the environmental and physiological effects that hinder differentiation between fully compatible and semi-compatible crosses. Therefore, using another method to increase the reliability of the evaluation is crucial, such as the analysis of genes encoding for S-RNase to identify the S-locus, which can define the compatibility level between cultivars, complementing and corroborating the results observed in the field (Jacquemart 2007).

Self-incompatibility based on S-RNase occurs in Rosaceae species. Compatibility is controlled by the polymorphic S-locus, which encodes at least two genes. S-RNases determine the specificity of pollen rejection in the pistil, and the F-locus and F-box proteins fulfill this function in the pollen. S-RNase is believed to function as specific S cytotoxins, as well as recognition proteins. Thus, the incompatibility is a consequence of the cytotoxic activity of the S-RNase. Conversely, S-RNase cytotoxicity does not occur in compatible pollen tubes (McClure et al. 2011).

Pear breeding programs are carried out in cold regions, and they sought to develop cultivars adapted to these climatic conditions, with high yield performance, and which fit in the fresh fruit chain. However, pear trees exploitation in subtropical (Bettioli Neto et al. 2014) and tropical regions (Oliveira et al., 2015) has increased. In this sense, breeding programs for cultivars adapted to regions with high temperatures must be intensified.

This study aimed to characterize S-alleles in hybrid pear cultivars (*Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia*) adapted to subtropical climates and evaluate the effective fruiting from the cross between these cultivars.

2 MATERIAL AND METHODS

The experiments were conducted in Lavras, MG, Brazil (lat. 21°14'S; long. 45°00'W; alt 841 m asl.), in the 2015 and 2016 seasons. The climate of the region is classified as Cwa (subtropical climate, with cold and dry winter and hot and humid summer) (Souza et al. 2017). This study used seven *Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia* cultivars: Cascatense, Centenária, D'água, Primorosa, Seleta, Tenra, and Triunfo (Table 1).

Table 1. List of cultivars with their respective identification, genealogy, and origin.

Identification	Cultivar	Genealogy	Origin
1	Cascatense	Packham's Thiumph x Le Conte	IAC - Brazil
2	Centenária	Hood x Packham's Triumph	IAC - Brazil
3	D'água	Unknown	Unknown
4	Primorosa	Hood x Packham's Triumph	Embrapa - Brazil
5	Tenra	Madame Sieboldt' x Packham's Triumph	IAC - Brazil
6	Triunfo	Hood x Packham's Triumph	IAC - Brazil
7	Seleta	Hood x Packham's Triumph	IAC - Brazil

Seedlings were grafted onto a *Pyrus calleryana* rootstock and transplanted to the field in October 2010, at a planting spacing of 3.0 x 4.0 meters (833 plants ha⁻¹). Plants were conducted in a modified central leader system. The management practices of the orchard were

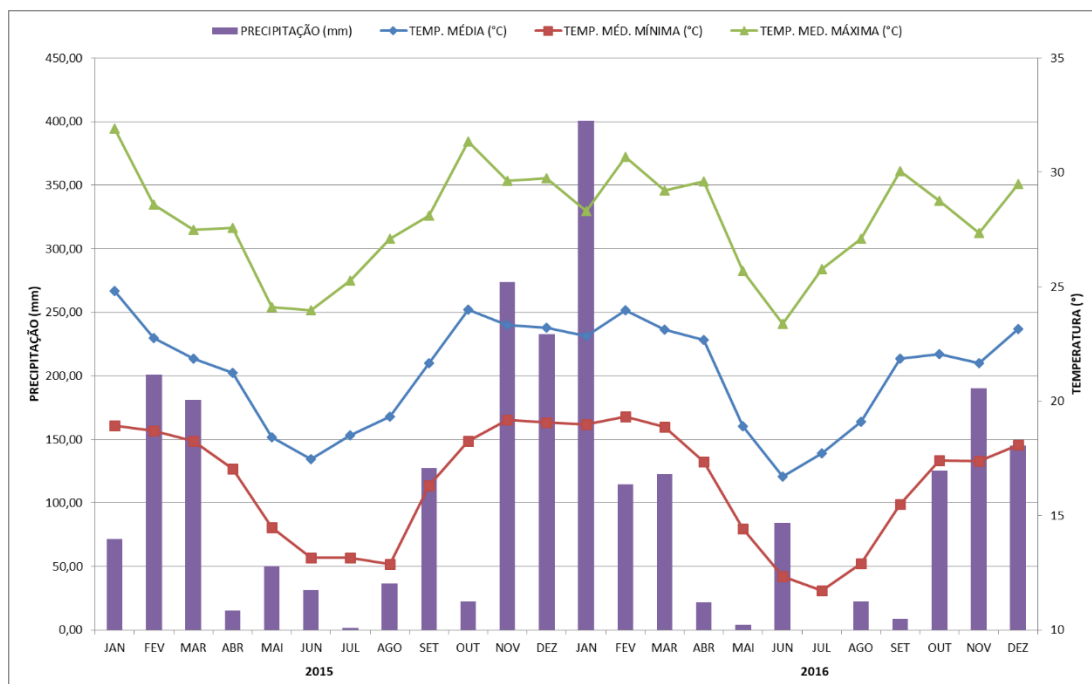
standard, mainly regarding pollination and phytosanitary control, and consisted of using chemicals recommended for the crop.

Phenological stages and field crosses were evaluated in the Fruiticulture Sector of UFLA, in seven different pear cultivars (Table 1). The phenological stages were evaluated in 2015 and 2016, and the crosses were analyzed in the 2015/2016 and 2016/2017 seasons.

2.1 Climatic variables and flowering phenology

The time elapsed between the phenophases of each cultivar was recorded from the beginning of pruning. The beginning, the end, and the duration of the flowering were verified. In the end, the overlap of the flowering periods was analyzed. These data were correlated with climatic variables during the experimental period and used to compare the flowering period between cultivars. Figure 1 shows the climatic data for the period.

Figure 1. Climatic data from January/2015 to December/2016.



2.2 Molecular Analysis

For the molecular analysis of the cultivars (Table 1), completely expanded, healthy, young leaves from adult plants were collected in 2016, in the field, for DNA extraction. Samples were identified and stored in styrofoam boxes containing ice until storage in an ultra-freezer.

The DNA extraction protocol was adapted from Doyle and Doyle (1987). Initially, 2 grams of leaf tissue was macerated in liquid nitrogen. Then, 10 ml of CTAB extraction buffer [2% CTAB, 100 mM TRIS (pH 8.0), 1.4 M NaCl, and 1% polyvinylpyrrolidone (PVP)] was added to each sample, the suspension was transferred to a 50 mL falcon tube, and the set was incubated in a water bath at 65 °C for 30 minutes. During this period, the macerated material was homogenized every 10 minutes. The first DNA extraction was performed by adding chloroform: isoamyl alcohol at a ratio of 24:1 to a volume of 10 ml. The centrifuge tube was gently shaken to homogenize the suspension. At this stage, the organic and aqueous phases were separated by centrifugation at 10,000 rpm for 5 minutes. The supernatant was collected, and the remainder was discarded. Afterward, the nucleic acids were precipitated in a mixture of 30 ml of 95% alcohol:7.5M ammonium acetate (6: 1), for 24 hours, in a freezer (-20 °C). After precipitation, the nucleic acids were transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged again. The supernatant was discarded, and the pellet was placed at room temperature for drying. Then, the nucleic acids were hydrated in TE buffer (1mM TRIS and 0.1mM EDTA). In the second extraction, phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) was added. The organic and aqueous phases were separated by centrifugation at 14000 rpm for 5 minutes. The supernatant was transferred to a 2 ml microtube. In a new tube, chloroform: isoamyl alcohol was added to the aqueous phase, at a ratio of 24:1, followed by centrifugation. The supernatant was collected and transferred to a new 2 ml microtube and precipitated by adding three volumes of a mixture of 3M sodium acetate: 95% ethanol (1:20), for at least one hour, in the freezer (-20 °C). After DNA precipitation and drying, the material was hydrated in TE buffer and quantified in a UV-Vis Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, Rockland, DE). The quantified material was diluted in pure water to the concentration of 10 ng/μL and then used in the PCR.

2.3 PCR and gel electrophoresis

PCRs were adapted from Sanzol et al. (2006), using the primers shown in Table 2. Each reaction was composed of 50 ng genomic DNA, 0.2 mM dNTPs, 50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 0.6 μM of each primer, 2 mM MgCl₂, 1U of Taq polymerase (Invitrogen), and ultrapure water to complete the 25 μL total volume. Primers MPyC1F and MPyC5R were used to amplify S-RNase products associated with the S1, S3, S4, and S5 alleles and amplify the S1 and S2 alleles using the reverse primer PycomS2R were used as reported by Sanzol et al. (2006). Primers PycomC1F and PycomS2R (5'-GTA ATG GTT CTT GTC TAT TAT TGT GG-3')

were also used to amplify other alleles, as described by Sanzol and Robbins (2006). The sequences are demonstrated in Table 2.

Table 2. Primers used for the determination of S-alleles in pear tree cultivars (*Pyrus* sp.), with their respective nucleotide sequences.

Primers	Sequences (5'→3')	Direction	Ta (°C)	Reference
MPyC1F	attattwtcaatttacgcakcartatcag	Forward	52°C	Sanzol et al. (2006)
MPyC5R	caaakasyrayctcracyaattcmg	Reverse		
PycomC1F	atttcaatttacgcagcaatcagc	Forward	54°C	(Sanzol e Robbins, 2006)
PycomS2R	gtaatggttctgtctattattgtgg	Reverse		
MPyC1F	attattwtcaatttacgcakcartatcag	Forward	50°C	Sanzol et al. (2006)
PycomS2R	gtaatggttctgtctattattgtgg	Reverse		

Amplifications were performed in a thermocycler (Applied Biosystems 2720, USA), programmed for a denaturation cycle of 2 minutes at 94 °C, followed by 36 cycles of 30 sec at 94 °C, 1 minute of annealing (Ta °C = Table 2), 2 minutes at 72 °C, a final extension at 72 °C, for 10 minutes, ending at 4 °C. Amplified DNA fragments were subject to electrophoresis on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml), and immersed in 1x TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) for 3 hours, at 80 W. The molecular weight marker was 100pb DNA Ladder (Ludwig Biotec).

2.4 Controlled crosses

Controlled crosses were carried out in the 2015/2016 and 2016/2017 seasons. Due to the different flower stages in the same umbel, flowers were thinned by selecting only five flowers, at the balloon stage, per umbel. Different treatments were performed in each of the seven cultivars before anthesis:

- 1) Spontaneous self-pollination, where five flowers of each umbel were bagged;
- 2) Parthenocarpy, where five flowers of each umbel were emasculated and bagged;
- 3) Manual cross-pollination between cultivars, where flowers were emasculated and pollinated by each of the other cultivars and then bagged.

Figure 2. Conduction of the experiment at different stages of the pear flower, cultivar Cascatense. A- Inflorescence with pre-anthesis flowers. B. Flower at anthesis – wet stigma (red arrow) and anthers (black arrow) (Flowers at anthesis were removed). C- Flowers emasculation. D- Emasculated flowers, only with the pistil. E- Petri dishes with pollen for pollination - pollen (black arrow). F- Emasculated and pollinated flowers wrapped in organza. G- Fruits at the beginning of the development stage. H- Fruits at the final development stage. Photos: Rayane Barcelos Bisi, UFLA, Lavras-MG, 2018.



Each treatment had seven replications with five flowers per experimental plot.

Effective fruiting was evaluated at 30 days after treatment installation. During the harvest, the number of fruits of each treatment was counted again. Field data cannot distinguish between completely compatible and semi-compatible crosses since, in some cases, parthenocarpy may occur. Therefore, fruits with non-viable seeds were not considered for fruit set.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Climatic variables and flowering phenology

The flowering period of the cultivars varied between seasons, resulting in slight differences between plants and within each growing season. The beginning of the flowering period was delayed when compared with the previous productive cycle (Figure 3). This phenomenon may be directly related to environmental factors, as observed in Figure 1. In 2015, greater rainfall occurred in February and March; in 2016, a considerable amount of rainfall occurred in June. Moreover, based on the average temperatures of the two years, the lower temperatures, followed by the increase in the temperature in 2015, were anticipated when compared with those recorded in 2016. Together, these factors may have influenced the early flowering in 2015. Castro et al. (2016), in a study on apple trees, also observed that the full bloom period of some cultivars was delayed in the years of low chill hours. The same was observed in the present study in 2016.

Figure 3. Flowering period of cultivars in 2015 and 2016.

Cultivars	June		July		Aug		Sep		Oct		Nov		Dec	
	1*	2**	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
2015														
Cascatense														
Centenária														
D'água														
Primorosa														
Seleta														
Tenra														
Triunfo														
2016														
Cascatense														
Centenária														
D'água														
Primorosa														
Seleta														
Tenra														
Triunfo														

* 1 indicates the first fortnight of the month.
 ** 2 indicates the second fortnight of the month.

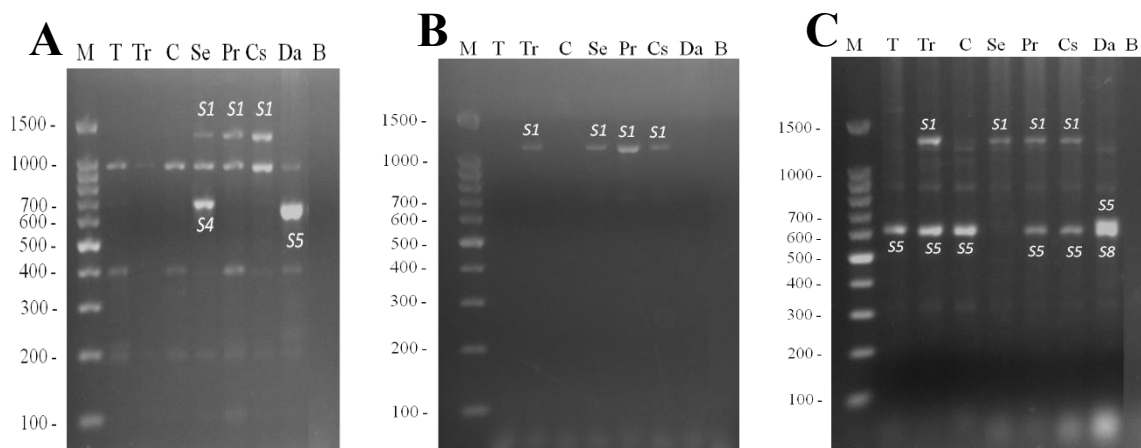
During the two years of research, the overlap of the entire flowering period between cultivars was higher than 50%. The flowering progression was not uniform between cultivars, and at least two flowering peaks were observed in each cultivar during the flowering period (data not shown). In mild-winter regions, the chill hours and the temperature during the flowering period are the main factors affecting (directly or indirectly) the performance of pollination and fruiting (Soltesz 2003).

3.2 Molecular analysis

The combination of the MPyC1F/MPyC5R primers (Figure 4A) allowed the amplification of three distinct alleles (S1, S4, and S5), and four of the seven cultivars studied had at least one of these three alleles. When these primers were used, the PCR amplification products indicated that cultivars Seleta, Primorosa, and Cascatense had the 1300 bp fragment associated with the S1 allele, while cultivar Seleta also presented the 750 bp product associated with the S4 allele. Cultivar D'água presented the S5 allele associated with the 650 bp product. The primer pair MPyC1F/PycomS2R (Figure 4B) allowed detecting the S1 allele, with 1150 bp, in four of the cultivars evaluated (Triunfo, Seleta, Primorosa, and Cascatense). The combination of the PycomC1F/PycomS2R primers (Figure 4C) indicated three different S-alleles (S1, S5, and S8). The size of these alleles, according to the visualization of the

amplification result, ranged from 650 to 1300 bp. The S1 allele, with a 1300 bp fragment, was detected in Triunfo, Seleta, Primorosa, and Cascatense. The S5 allele, with a 650 bp fragment, was found in Cascatense, Centenaria, D'água, Primorosa, Tenra, and Triunfo. The S8 allele, characterized by a 675 bp product, was only detected in cultivar D'agua.

Figure 4. PCR amplification of S-alleles obtained from the primers combinations: (A) MPyC1F/MPyC5R; (B) MPyC1F/PycomS2R; and (C) PycomC1F/PycomS2R M = 100 bp molecular marker, T = Tenra, Tr = Triunfo, C = Centenária, Se = Seleta, Pr = Primorosa, Cs = Cascatense, Da = D'Água, B = White.



Four different S-alleles were detected in the seven cultivars evaluated. Their PCR products ranged from 650 to 1300 bp. In general, when using these primers, a high frequency of the S5 and S1 alleles was detected; the former was present in six cultivars, and the latter was found in four cultivars.

According to Crane and Lewis (1942), in the past, the gametophytic incompatibility between pear tree cultivars was unusual, and therefore, the expression of the S-alleles was little investigated when comparing with other fruit trees. However, Sanzol and Herrero (2002) believe that the limited number of parents used in pear tree breeding programs could have increased the frequency of incompatibility between new cultivars.

Sanzol et al. (2006) also explained the high frequency of the S1 and S5 alleles. The authors confirmed in a breeding program of European pear trees that cultivars Williams (S1S2), Coscia (S3S4), and Doyenne du Comice (S4S5) are predominantly used as parents, and as a result, the S1 and S5 alleles are expected to be represented at higher frequencies.

The presence of the S1 allele in hybrid pear trees can be explained by the genealogy of these cultivars since all of them have a common parent, Packham's Triumph. Sanzol and Robinns (2008) observed the expression of S1 and S3 alleles in this cultivar. The S-allele of the other parents is unknown.

Only cultivars Seleta (S1S4) and D'água (S5S8) presented inter-compatibility (Figure 3). All the other hybrids studied showed at least one S-allele in common, conferring partial or total incompatibility to these plants. This phenomenon may hinder the selection of pollinizer cultivars for these regions and compromise the fruit set and yield of these genotypes.

Mota et al. (2010) stated that the analysis of S-alleles, based on the PCR reaction, has a high potential to be used in the identification of groups of self-incompatible cultivars. The knowledge of S-alleles responsible for gametophytic incompatibility and the identification of an S-allele that can suppress this incompatibility will allow the controlled transfer of these alleles between cultivars with flowering synchrony. This fact will increase the efficiency of breeding programs in obtaining new cultivars and facilitate the reproductive management of orchards, aiming to improve pollination and fruit set.

Cultivars Cascatense, Primorosa, and Triunfo presented the same PCR products when the three different primers were used. These results suggest that the three cultivars are incompatible. In fact, among the seven cultivars evaluated, these were the only ones that showed total incompatibility between each other.

Centenária and Tenra presented only the amplification product corresponding to the S5 allele. Yamane et al. (2001), in a study with cherry trees, almond trees, and apricot trees genotypes, also observed variations in the number of alleles between loci and the absence of PCR products in some cultivars. This result, in some cases, is justified by the occurrence of only one allele or null alleles for that locus. Null alleles are described in several microsatellite systems and are the result of mutations, such as substitution, insertions, and deletions in one or both annealing regions of the primers in the homologous sequence of template DNA (Callen et al. 1993).

According to the amplification patterns of the S-alleles in the studied cultivars, Cascatense, Primorosa, and Triunfo presented incompatibility between each other. Cultivars D'água and Seleta were compatible. All the other cultivars were semi-compatible with each other (Table 3).

Table 3. Compatibility between seven different pear cultivars, based on the S-alleles.

S-allele	Cultivars	Cascatense	Centenária	D'água	Primorosa	Seleta	Tenra	Triunfo
S1xS5	Cascatense	AI						
S5	Centenária	SC	AI					
S5xS8	D'água	SC	SC	AI				
S1xS5	Primorosa	I	SC	SC	AI			
S1xS4	Seleta	SC	SC	C	I	AI		
S5	Tenra	SC	SC	SC	SC	SC	AI	
S1xS5	Triunfo	I	SC	SC	I	SC	SC	AI

C: Compatible; SC: Semi-compatible Cross; SI: self-incompatible cross; I: Incompatible Cross.

3.3 Controlled crosses

Based on the results of field pollinations (Table 4), cultivars Cascatense, Centenaria, D'água, Primorosa, and Tenra showed self-incompatibility. All the fruits harvested presented unviable seeds. These fruits were considered as parthenocarpic, and therefore, were not counted as self-pollinated fruits. Conversely, the self-pollinated cultivars Seleta and Triunfo showed fruits with viable seeds, and their fruit set was 17.33% and 14%, respectively (Table 5). This is an interesting characteristic for crops that present self-incompatibility. No pollenizers are required when using cultivars with self-incompatibility break-down. This self-compatibility may be related to environmental factors or mutations; however, when more than 30% of the flowers are pollinated, the cultivar is considered as self-compatible (Ishimizu et al. 1998).

Table 4. Percentage of fruit set obtained from self-pollination, crosses, and parthenocarpy of seven pear tree cultivars.

Pollenizer \ Receptor	Cascatense	Centenaria	D'água	Primorosa	Seleta	Tenra	Triunfo	Parthenocarpy
Cascatense	0.00	60.00	24.00	8.00	np	np	np	28.00
Centenaria	46.67	0.00	42.00	42.67	np	np	np	26.67
D'água	14	14.00	0.00	36.00	np	np	np	1.33
Primorosa	0	18.67	26.67	0.00	np	np	np	2.67
Seleta	57.33	44.00	50.00	60.00	17.33	np	np	14.67
Tenra	44	0.00	38.67	69.33	np	0.00	np	21.33
Triunfo	23.33	56.00	12.00	53.33	np	np	14.00	16.00

np = non-pollinated (no pollination was performed due to the lack of pollenizer cultivars)

Table 5. Data of fruit set percentage and viable seeds percentage from the self-pollination of seven pear tree cultivars.

Self-pollination	% Fruit set	% Viable seeds
Cascatense	18.00	0.00
Centenaria	36.67	0.00
D'água	0.00	0.00
Primorosa	17.33	0.00
Seleta	17.33	16.00
Tenra	10.67	0.00
Triunfo	14.00	8.00

The fruit set of the self-pollination of Seleta and Triunfo may be related to the concentration of S-RNases in the style of their flowers. The high total value of S-RNases in the style controlled by the two alleles prevents the pollen tube growth, as well as the effective fruiting, justifying the occurrence of cultivars with different self-incompatibility levels (Zhang and Hiratsuka 1999; Hiratsuka and Zhang 2002).

Also, high (20°-25°C) or low (15°-20°C) temperatures during the flowering stage may induce self-pollination by the deactivation or inhibition of the S-locus, causing insufficient production of RNases (Nyéki 1996). This phenomenon is possibly due to the insertion of several CH3 in the region that promotes the L receptor, consequently blocking the transcription of the S gene (Pancaldi 1995). This fact allows self-pollination between genotypes that have the two identical S-alleles of gametophytic incompatibility, with consequent formation of few viable seeds and low fruit set (1 to 5%). These temperatures can also increase the percentage of parthenocarpic fruits, *i.e.*, without seeds (Lombard, 1990). These circumstances can cause confusion between the two processes if the formation or non-formation of viable seeds is not observed since most of the Brazilian regions where pear tree is cultivated, average temperatures higher than 16°C are commonly recorded during the flowering stage.

According to Sassa (2016), locus S products are not sufficient to determine the self-incompatibility in Rosaceae species, and other factors not linked to S-loci can also influence self-incompatibility. Some of these factors have already been identified in other species, such as the mutation of part of the pollen in sweet cherry (Cachi and Wünsch 2011). Therefore, further studies are still required to elucidate self-compatibility in Rosaceae species.

When the flowers are self-pollinated and produce seedless fruits, the process is designated as stimulative parthenocarpy (Moriya et al. 2005). According to Crane and Lewis (1942), sterility and self-incompatibility, which prevent self-pollination of pear flowers, may be hindered by stimulative parthenocarpy.

Regarding the fruit set data (Table 5), cultivar Centenária, despite being self-incompatible (0% of viable seeds), presented fruit set higher than 30%. Kozma et al. (2003) argue that the application of sterile pollen stimulates the stigmatic secretion, which triggers

reactions in the ovary, stimulating fruit development and preventing the formation of the abscission tissue at the base of the fruit peduncle, which will grow without developing viable seeds. Jackson (2005) found that pollination, even without fertilization, stimulates the cytoplasmic and biochemical activity of the pistil and the development of the ovary, and thus increases the viability of the embryo sac. Tomioto et al. (1996) reported an example of stimulative parthenocarpy, in which the cross between different cultivars with the same allelic series generated high fruit set due to the induction of the stimulative parthenocarpy, mainly in cultivars with high potential to express this trait.

When the parthenocarpy method was evaluated, Cascatense, Centenária, and Tenra showed a fruit set higher than 20%; Seleta and Triunfo showed a fruit set higher than 10%; and D'água and Primorosa had a fruit set lower than 5%. According to Jalili Marandi (2002), when 5 to 8% of pear tree flowers are converted into fruits, the yield is considered as economically acceptable. The process of parthenocarpy is desirable in several fruit trees that show incompatibility since it may reduce many problems associated with pollination, such as the need for manual pollination or pollinator insects. However, it usually requires physical or chemical stimuli for fruits development and formation (Nishitani et al. 2012).

The crosses Tenra x Primorosa (69.3%), Seleta x Primorosa (60%), Cascatense x Centenaria (60%), Seleta x Cascatense (57.3%), Triunfo x Centenaria (56%), Triunfo x Primorosa (53.3%), and Seleta x D'água (50%) presented fruit set percentages equal to or higher than 50%. The cross Tenra x Primorosa stood out for showing the highest fruit set.

Cultivars Seleta and D'água were compatible in relation to the S-alleles series; they also presented high fruit set in the crosses carried out in the field. Semi-compatible cultivars also presented high fruit set. The fact that fully compatible cultivars do not have 100% of fruit set can be explained by other aspects involved in this process, such as the availability and viability of the pollen grains of the pollenizer cultivar.

Cultivar Primorosa, when used as the receptor, presented low fruit set (lower than 30%) regardless of the pollenizer. However, when used as a pollenizer for Seleta, Tenra, and Triunfo, cultivar Primorosa presented the best fruit set performance between the evaluated crosses of each one of these cultivars, despite being semi-compatible, according to the S-allele (Table 3).

Cascatense, when pollinated by Primorosa, presented only 8% of fruit set. The reciprocal cross showed 0% of fruit set and was considered as incompatible. This result corroborates those of the PCR analyses since both presented the S1 and S5 alleles.

Cultivar Triunfo, when pollinated by Cascatense, showed 23% of fruit set, being considered as incompatible. When pollinated by Primorosa, cultivar Triunfo had high fruit set

(53%), mainly because these cultivars presented incompatibility when the S-alleles were molecularly identified as S1 and S5.

Sanzol et al. (2006) stated that physiological and environmental factors might influence cultivars compatibility. Wojciechowski and Wojciech (2009), working with pear cultivars in different environments, observed that some crosses were incompatible in the laboratory and greenhouse, but compatible in the field. Hiratsuka and Tomita (1989) observed reduced expression of self-incompatibility in pear trees under high-temperature conditions and also at different flower development stages. The present results suggest that the high fruit set of the cross Triunfo x Primorosa occurred due to the relatively higher temperatures at the experiment site.

Future experiments with crosses of cultivar Triunfo under controlled environments are necessary to detect if the incompatibility break-down is related to extrinsic or intrinsic factors since even the self-incompatibility was broken-down. If the phenomenon is related to the higher temperature, the cultivar would be promising for mild winter regions. However, if it is due to intrinsic factors, such as mutation cases of the S-allele, the cultivar would be advantageous for pear tree breeding programs that seek self-compatible cultivars. Although self-compatibility is beneficial to genetic diversity, it is unfavorable to agriculture. Thus, self-compatible mutants have been exploited for use in agricultural production, particularly in self-incompatible commercial fruit species (Mase et al. 2014).

Cultivar Centenária presented fruit set from 42 to 46%; and its fruit set percentage did not significantly vary in function of the pollenizer. D'água showed low fruit set when pollinated by Cascatense and Centenária (14%), and a fruit set of 36% when pollinated by Primorosa. Cultivar Tenra showed very high fruit set when pollinated by Primorosa, despite being semi-compatible.

In general, when cultivar Seleta was used as a receptor, it presented a high fruit set percentage in the crosses, varying from 44 to 60%. This result shows that the high fruit set dramatically influences the mother plant. In addition to the gametophytic incompatibility between cultivars, other factors inherent to the plants also influence fruit set. The flowering period is one of the main events during the productive cycle of fruit tree species since the fruiting is defined at this stage. During this period, environmental and physiological factors interact with each other, which will define the next fruiting and production stages.

The choice of pollenizer plants is based mainly on the coincidence of flowering, which does not always result in satisfactory yields due to incompatibility between cultivars. In addition to the physiological aspects evaluated, this strategy, associated with the molecular

characterization data of the S-alleles, facilitates the understanding of the reproductive system and the choice of more compatible genotypes, both for use in breeding programs and the establishment of orchards of this species (Bandeira et al. 2011).

Figure 5. Fruits from the cross: A – Tenra x Primorosa; B – Seleta x Primorosa; C – Cascatense x Primorosa; and D – Seleta x Cascatense.

4 CONCLUSIONS

Pear tree hybrid cultivars present high frequency of the S1 and S5 alleles.

Under field conditions, cultivar Primorosa presents high potential as a pollinizer for



cultivars D'água, Seleta, Tenra, and Triunfo.

Cultivars with higher fruit set are compatible and semi-compatible.

Cultivar D'água amplifies the S5S8 alleles, and Seleta amplifies the S1S4 alleles, conferring full compatibility to these plants.

Cultivars Primorosa, Cascatense, and Triunfo amplify the S1 and S5 alleles, conferring interincompatibility to these plants.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and National Council for Scientific and Technological Development – CNPq.

5 REFERENCES

Bandeira JM, Thurow LB, Peters JA, Raseira MCB, and Bianchi VJ (2011) Caracterização fisiológica da compatibilidade reprodutiva de ameixeira japonesa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46: 860-867.

Bettiol Neto JE, Chagas EAC, Sanches J, Pio R, Antoniali S, and Cia P (2014) Produção e qualidade pós-colheita de cultivares de pereira nas condições subtropicais da região leste paulista. *Ciência Rural* 44(10).

Cachi AM and Wünsch A (2011) Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.) *Journal of Experimental Botany* 62:1847-1856.

Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, and Sutherland GR (1993) Incidence and origin of " null" alleles in the (AC) n microsatellite markers. *American journal of human genetics* 52(5): 922.

Castro DC, Cerino MC, Gariglio N, and Radice S (2016) Study of reproductive behaviour in low-chill apples in warmer zones of Argentina. *Scientia Horticulturae* 199:124-132.

Crane MB and Lewis D (1942) Genetical studies in pears, III Incompatibility and sterility. *Journal of Genetics* 43: 31-43.

Chagas EA, Campo Dall'Orto FA, Ojima M, Barbosa W, and Pio R (2007) Pear 'IAC Princesinha': New European type cultivar for subtropical climate. In X International Pear Symposium 800 pp 507-510.

Curi PN, Bisi RB, Salgado DL, Barbosa CMDA, Pio R, and Souza VRD (2017) Hybrid cultivars of pear in subtropics regions: processing ability in the form of jelly. *Ciência Rural* 47(11).

- Franklin-Tong NV and Franklin FC (2003) Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science* 8: 598-600.
- Goldway M, Shai O, Yehuda H, Matityahu A, and Stern RA (1999) Jonathan'apple is a lower-potency pollenizer of Topred'than Golden Delicious' due to partial S-allele incompatibility. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74(3): 381-385.
- Hiratsuka S and Tomita A (1989) Incompatible pollen tube growth and protein composition in styles of Japanese pear following high temperature treatments. *Euphytica* 43: 191-196.
- Hiratsuka S and Zhang SL (2002) Relationships between fruit set, pollen-tube growth, and S-RNase concentration in the self-incompatible Japanese pear. *Scientia Horticulturae* 95: 309-318.
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanishi T, and Sakiyama F (1998) Identification and partial amino acid sequences of seven S-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J. Biochemical* 120: 326-334.
- Jackson JE (2005) *Biology of apples and pears*. Cambridge: Cambridge University Press, pp 488.
- Jacquemart AL (2007) Methods for determining compatibility and pollinator efficiency in temperate fruit species. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 1(1): 26-38.
- Jalili Marandi R (2002) *Pomology*. Publication of Jahad Daneshgahi, Oromiyeh, Iran, pp 289.
- Kozma P, Nyéki J, Soltész M, and Szabó Z (2003) *Floral biology, pollination and fertilisation in temperate zone fruit and grape*. Budapest: Akadémiai Kiadó, pp 621.
- Mahmoudi M, Arzani K, and Bouzari N (2007) Pollination, pollen tube growth and determination of suitable pollinizer for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar Ghermez Rezaeieh. *Seed and Plant Improvement Journal* 23: 571-585.

Mase N, Sawamura Y, Yamamoto T, Takada N, Nishio S, Saito T, and Iketani H (2014) A segmental duplication encompassing S-haplotype triggers pollen-part self-compatibility in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Molecular breeding* 33(1): 117-128.

McClure B, Cruz-García F, and Romero C (2011) Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals of Botany* 108(4): 647-658.

Moriya Y, Takai Y, Okada K, Ito D, Shiozaki Y, Nakanishi T, and Takasaki T (2005) Parthenocarpy and self- and cross-incompatibility in ten european pear cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 74(6): 424-430.

Mota MS, Bianchi VJ, Carvalho AD, Braga EJB, and Peters JA (2010) Caracterização molecular dos alelos-S de incompatibilidade gametofítica em *Prunus salicina* Lindl. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32: 798-807.

Nishitani C, Yamaguchi-Nakamura A, Hosaka F, Terakami S, Shimizu T, Yano K, and Yamamoto T (2012) Parthenocarpic genetic resources and gene expression related to parthenocarpy among four species in pear (*Pyrus* spp.). *Scientia Horticulturae* 136: 101-109.

Nyéki J (1996) Fertilization conditions. In: Nyéki J and Soltész M. *Floral biology of temperates zone fruit trees and small fruits*. Budapest: Akadémiai Kiadó pp 185-256.

Oliveira IVM, Matos S, Salustriano RR, and Lopes PRC (2015) Avaliação fenológica da pereira "Triunfo" cultivada em clima semiárido no Nordeste do Brasil na safra de 2012. *Revista Brasileira de Fruticultura* 37(1): 261-266.

Ortega E and Dicenta F (2004) Suitability of four different methods to identify self-compatible seedlings in an almond breeding programme. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79(5): 747-753.

Sanzol J and Herrero M (2002) Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Euphytica* 128: 325-331.

Sanzol J and Robbins TP (2008) Combined analysis of S-alleles in European pear by pollinations and PCR-based S-genotyping; correlation between S-phenotypes and S-RNase genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133(2): 213-224.

Sanzol J, Sutherland BG, and Robbins TP (2006) Identification and characterization of genomic DNA sequences of the S-ribonuclease gene associated with self-incompatibility alleles S1 to S5 in European pear. *Plant Breeding* 125(5): 513-518.

Sassa H (2016) Molecular mechanism of the S-RNase-based gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae. *Breeding Science* 66(1): 116-121.

Soltész M. (2003) Apple [*Malus sylvestris* (L.) Mill.] In: Kozma P, Nyéki J, Soltész M, and Szabó Z. *Floral biology, pollination in temperate zone fruit species and greape*. Budapest: Akadémiai Kiadó pp 237-316.

Souza FBM, Pio R, Barbosa JPRAD, Reighard GL, Tadeu MH, and Curi, PN (2017) Adaptability and stability of reproductive and vegetative phases of peach trees in subtropical climate. *Acta Scientiarum Agronomy* 39(4): 427-435.

Tatari M, Ghasemi A, Mousavi A, and Bahrami H (2017) Study on pollination and selection of the most suitable pollinizers for commercial pear cultivars (*Pyrus communis* L.) in Iran. *Journal of Horticultural Research* 25(2): 49-57.

Tomimoto Y, Nakazaki T, Iekashi H, Ueno H, and Hayashi R (1996) Analysis of selfincompatibility-related ribonucleases (S-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*. *Scientia Horticulturae* 66: 159-167.

Wojciechowski ANDRZEJ and Antkowiak WOJCIECH (2009) Selection of pollinators for particular pear cultivars (*Pyrus comminis* L.) based on the observation of the pollen tubes. *Herba Polonica Journal* 55(3): 257-265.

Yamane H, Ikeda K, Ushijima K, Sassa H, and Tao R (2003) Self-incompatibility (S) locus region of the mutated S 6-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional

pollen S allele and a non-functional pistil S allele. *Journal of Experimental Botany* 54: 2431-2437.

Zhang SL and Hiratsuka S (1999) Variations in S-protein levels in styles of Japanese pears and the expression of self-incompatibility. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science* 68: 911-918.

ARTIGO 3

General and specific combining ability in the selection of pollenizer cultivars of hybrid pear trees (*Pyrus communis* x *P. pyrifolia*)

Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Plant Breeding

Abstract: The pear tree is a temperate-climate fruit tree. However, some hybrid cultivars are adapted to subtropical regions that require low chill hours. The pear tree presents gametophytic incompatibility. For commercial pear tree crops, besides the flowering synchrony and gametophytic compatibility, the metaxenia effect, which influences fruit quality, should also be considered when choosing the pollenizer cultivar. This study aimed to estimate the general combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA) in diallel crosses to assist in the selection of pollenizers in hybrid pear tree cultivars (*Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia*) adapted to the subtropical climate. Self-pollination and cross-pollination between four pear cultivars (Cascatense, Centenária, D'água, and Primorosa) were carried out in the 2015 and 2016 seasons. The variables fruit set percentage, viable seeds percentage, fruit mass, fruit length, fruit diameter, °Brix, and pH were evaluated. Afterward, a diallel analysis was performed, following the method 1, model 1 of Griffing, to estimate the GCA, SCA, and RE from the parents, F₁ hybrids, and reciprocal F₁ hybrids obtained in the crosses. Results revealed that Centenaria was the only cultivar that showed a positive additive effect for all the variables studied. The highest GCA estimates detected in the traits evaluated in cultivar Centenária are associated with its high SCA. The cross Primorosa x Centenária showed a high positive effect for all the evaluated traits. Conversely, their reciprocal had a negative effect on all the variables. These results suggest the existence of a pollenizer effect on the variables of the hybrid pear cultivars. Centenária presented the highest general combining ability for all traits. Primorosa x Centenária showed the highest specific combining ability.

Keywords: *Pyrus* sp, metaxenia, combining ability, Rosaceae.

1. INTRODUCTION

The pear tree (*Pyrus* spp.) is a temperate-climate fruit species. The cultivation of this fruit tree in subtropical regions was made possible due to the production of hybrid cultivars obtained from the cross *P. communis* x *P. pyrifolia* (Curi et al., 2017). This cross combines the quality of the European pear trees (*P. communis*) with the low chill hours required by the Asian pear trees (*P. pyrifolia*) (Chagas et al., 2008).

Low fruit set is one of the limiting factors for the expansion of pear tree crops in subtropical regions (Bettiolo Neto & Pio, 2014). No pollenizer plants have been indicated for these hybrid cultivars in subtropical regions, and this is certainly the reason for its low effective fruiting.

Most of the pear cultivars are considered self-incompatible. They reject their own pollen and depend on cross-pollination for fruit set (Franklin-Tong & Franklin, 2003). Therefore, compatibility among cultivars in commercial crops is crucial since partial compatibility may reduce pear yield (Goldway et al., 1999).

For being an allogamous species, the existence of the pollenizer effect on the physical-chemical quality of pear fruits must be observed. Some authors have reported the xenia effect in some plant species, *i.e.*, the effect of the pollen genotype on fruit development and characteristics. This phenomenon can affect the size and mass of the embryo and seed, as well as the fruit color, the chemical composition, and even the maturation time (Oliveira et al., 1983; Freytag, 1979; Swingle, 1928; Thone, 1926). The xenia effect has been described in some fruit trees, such as almond tree (*Prunus amygdalus*) (Ortega et al., 2006), apple tree (*Malus domestica*) (Kumar et al., 2005), cherry tree (*Prunus avium*) (Stancevic, 1971), and pear tree (*Pyrus* spp.) (Zisovich et al., 2005). The term metaxenia has been previously used to describe the direct effect of pollen grains on fruit tissues (Atawia et al., 2016).

At least two compatible cultivars should be used in commercial pear tree crops. Cultivars must present flowering synchrony, gametophytic compatibility, and fruit quality. If possible, the metaxenia effect should also be considered (Bodor et al., 2012; Goldway et al., 2012; Garratt et al., 2014).

Diallelic crosses systems are important alternatives for genotype evaluations since they provide essential information that assists breeders in the selection, such as the general and specific combining ability, genetic variances, and the reciprocal effect, depending on the method and model used (Griffing, 1956).

This work aimed to estimate the general combining ability (GCA) and the specific combining ability (SCA) in diallel crosses, aiming at the selection of pollenizers in hybrid pear (*Pyrus communis* x *Pyrus pyrifolia*) cultivars adapted to the subtropical climate.

Material and Methods

2.1. Plant material and study area

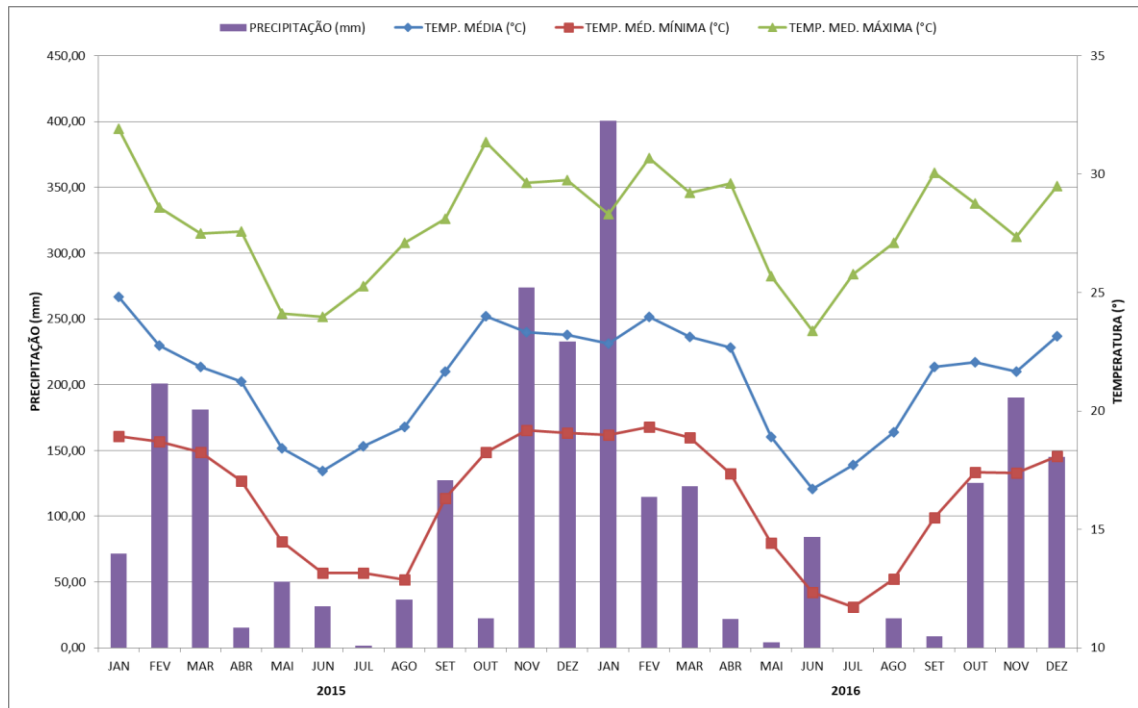
Four low-chill pear cultivars grafted onto *Pyrus calleryana* rootstock were used in this work (table 1): Cascatense (Embrapa), Centenária (IAC 9-47), D'água, and Primorosa (IAC 9-3). Cultivars Centenária and Primorosa were originated in a breeding program developed by the Instituto Agronômico de Campinas (IAC) (BETTIOL NETO; PIO, 2014). Cultivar Cascatense was originated in a breeding program held by the Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA) (BETTIOL NETO; PIO, 2014). Both IAC and EMBRAPA are Brazilian government research institutions.

Table 1. List of cultivars with their respective identification, genealogy, and origin.

Identification	Cultivar	Genealogy	Origin
A	Cascatense	Packham's Thiumph x Le Conte	IAC - Brazil
B	Centenária	Hood x Packham's Triumph	IAC - Brazil
C	D'água	Unknown	Unknown
D	Primorosa	Hood x Packham's Triumph	Embrapa - Brazil

All trees have been cultivated since 2010, at the experimental orchard of the Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil (21°14'S, 45°00'W), in a typical subtropical climate, in the 2015 and 2016 seasons. According to the Köppen classification, the climate of the region is Cwa (subtropical climate) (21°14'S, 45°00'W and approx. 918 m asl.), *i.e.*, high altitude tropical climate characterized by dry winter and hot and humid summer (ALVAREZ et al. 2013). The average annual temperature in the 2015 and 2016 seasons was 21.5 °C, with an average minimum temperature of 15.6 °C and an average maximum temperature of 27.4 °C (Fig. 1). The sum of the rainfall was 1,419.20 mm in 2015 and 1,193.20 mm in 2016.

Figura 1. Climate data from January 2015 to December 2016, Lavras, Minas Gerais, Brazil.



All cultural and phytosanitary treatments were carried out based on the recommendation for the crop.

2.3. Pollination treatments

Different sets of inflorescences of each cultivar were randomly assigned to one of the following treatments: (1) spontaneous self-pollination (flowers were isolated with organza bags at the balloon growth stage); and (2) cross-pollination (flowers were emasculated by cutting off the anthers at the balloon growth stage and subsequently hand-pollinated using pollen from another cultivar). Afterward, the material was isolated with organza bags. The crosses are shown in Table 2.

The experimental unit was an inflorescence containing five flowers. The experiment was carried out during the 2015 and 2016 seasons, with five replications per treatment in each cultivar. To minimize the experimental error, previously opened flowers were removed from selected inflorescences. Fruit set was recorded at 30 days after pollination.

Table 2. List of cultivars with their respective identification, genealogy, and origin.

Identification	Treatment	Female Cultivar	Male Cultivar
1	Self-Pollination	Cascatense	Cascatense
2	Cross-Pollination	Cascatense	Centenária
3	Cross-Pollination	Cascatense	D'água
4	Cross-Pollination	Cascatense	Primorosa
5	Cross-Pollination	Centenária	Cascatense
6	Self-Pollination	Centenária	Centenária
7	Cross-Pollination	Centenária	D'água
8	Cross-Pollination	Centenária	Primorosa
9	Cross-Pollination	D'água	Cascatense
10	Cross-Pollination	D'água	Centenária
11	Self-Pollination	D'água	D'água
12	Cross-Pollination	D'água	Primorosa
13	Cross-Pollination	Primorosa	Cascatense
14	Cross-Pollination	Primorosa	Centenária
15	Cross-Pollination	Primorosa	D'água
16	Self-Pollination	Primorosa	Primorosa

2.1 Obtaining diallel crosses

Sixteen hybrid combinations (F_1 s, reciprocals, and parents) were obtained to compose a complete diallel involving four parents: Cascatense, Centenária, D'água, and Primorosa. Crosses were performed in a complete diallel between the four pear tree cultivars, including self-pollination and reciprocal. At 30 days after pollination, the fruit set percentage was evaluated by dividing the number of fruit by the number of flowers pollinated and multiplying by 100.

2.4. Post-Harvest

At the point of physiological maturity, post-harvest was measured for five replications containing four fruits each, randomly selected from each treatment. The following traits were evaluated: i) fruit mass, determined in grams (g); ii) fruit length and larger diameter of fruits, measured in mm; iii) number of viable seeds per fruit, considering as viable the seeds that were not flattened (Moriya et al., 2005); iv) soluble solids content ($^{\circ}$ Brix), measured by a handheld digital refractometer (Palete PR-101); and v) pH, determined by a Methorohm Automatic Titrator.

2.5. Statistical design and data analysis

A diallel analysis was performed, following the method 1, model 1 of Griffing (1956), which estimates the general combining ability (GCA), the specific combining ability (SCA), and the reciprocal effect (RE) from the parents, F₁ hybrids, and reciprocal F₁ hybrids obtained in the crosses, which decomposes the mean Y_{ij} of the hybrid combination (i ≠ j) or of the parent (i = j) in the following effects:

$$Y_{ij} = m + \hat{g}_i + \hat{g}_j + \hat{S}_{ij} + r_{ij} + \hat{e}_{ij}$$

In which m is the mean effect of all treatments; \hat{g}_i is the effect of the general combining ability of parent i, and corresponds to the deviation of its average performance in hybrid combinations; \hat{g}_j is the effect of the general combining ability of the parent of order j; \hat{S}_{ij} is the effect of the specific combining ability of the Y_{ij} cross and means that its performance is higher or lower than expected, based on the average behavior of the parents involved; r_{ij} is the effect of the specific combining ability, manifested in the reciprocal cross, involving parents i and j; \hat{e}_{ij} is the mean experimental error associated with the means of the diallelic table.

All analyses were performed using the Genes software (Cruz, 2006).

3. Results and Discussion

Accuracy estimates reflect the precision with which the experiments were performed, as well as the existence of variability. Appropriate accuracy values are close to the unit or 100% (Resende and Duarte, 2007). In the present study, for all evaluated traits, the accuracy was higher than 90%, showing the accuracy of the evaluated data (Table 3).

Table 3: Summary of the analysis of variance for fruit set percentage (% FS), viable seed percentage (% VS), fruit mass (FM), fruit length (FL), fruit diameter (FD), °Brix, and pH of different pear cultivars.

DF	Mean squares
----	--------------

Source of variation		%FS	%VS	FM	FL	FD	°Brix	pH
Parent	3	353.19	56.78	414.14	31.78	7.57	1.45	0.05
Cross	15	1494.86**	3882.53**	20467.93**	3442.90**	2518.34**	76.87**	9.86**
Residue	45	283.05	167.18	1518.57	75.19	26.65	0.66	0.03
Accuracy		0.90	0.97	0.96	0.98	0.99	0.99	0.99

** significant at 1% probability.

The results of the ANOVA of the fruit data from the self-pollination, cross-pollination, and reciprocal indicated the existence of a significant difference at 1% probability among the treatments for all evaluated variables, suggesting the presence of genetic variability among the genotypes used.

Diallelic analysis revealed significance for the general combining ability (GCA), specific combining ability (SCA), and reciprocal effect (RE) at 1% probability by the F test for all evaluated variables (Table 4), except for fruit length, whose GCA was significant at 5% probability. These results evidenced the presence of the additive, non-additive, and maternal effects in the genetic control of the traits studied. Regarding the significance of RE, these estimates infer that the cytoplasmic effect and the nuclear genes of the genotype used as a mother influence all the evaluated traits.

Table 4: Diallelic analysis for fruit set percentage (% FS), viable seeds percentage (% VS), fruit mass (FM), fruit length (FL), fruit diameter (FD), °Brix, and pH of different pear cultivars. Federal University of Lavras, Lavras-MG, 2018.

Source of variation	Mean Square							
	DF	%FS	%VS	FM	FL	FD	°Brix	pH
Crosses	15	1196.66**	3105.85**	16377.73**	2755.04**	2013.62**	61.56**	7.87**
GCA	3	1837.85**	7780.56**	15009.07**	257.37*	378.0**	7.02**	0.8**
SCA	6	893.15**	1421.14**	8109.46**	2283.13**	1806.23**	72.60**	8.65**
Reciprocal	6	1179.58**	2453.20**	25330.34**	4475.8**	3038.82**	77.79**	10.62**
Mean residue	60	283.05**	167.18**	1518.57**	75.19**	26.65**	0.66**	0.03**

** significant at 1% probability

* significant at 5% probability

3.1. General Combining Ability

Estimates of the general combining ability (g_i) effects provide information on the concentration of predominantly additive genes in their effects, which has been advantageous in the indication of parents to be used in intrapopulation breeding programs.

The general combining ability effects of the studied parents are presented in table 5.

Table 5. Estimates of the general combining ability (g) effects for fruit set percentage (% FS), viable seeds percentage (% VS), fruit mass (FM), fruit length (FL), fruit diameter (FD), °Brix, and pH.

Identification	Parent	%FS	%VS	FM	FL	FD	°Brix	pH
A	Cascatense	-2.55	-22.713	-19.062	-0.081	-3.288	0.388	0.088
B	Centenária	10.8	12.6	29.663	3.956	4.438	0.313	0.087
C	D'água	-6.875	6.413	2.038	-2.631	0.888	-0.063	-0.238
D	Primorosa	-1.375	3.7	-12.638	-1.244	-2.038	-0.638	0.063

Cultivar Centenária was the only one that showed a positive effect for fruit set percentage, which allows recommending this cultivar for crosses aimed at promoting this trait.

Primorosa showed a negative effect on fruit set; however, the value was very close to zero. According to Cruz & Regazzi (2004), obtaining a very low positive or negative g_i estimate indicates that the GCA of the parent, based on their crosses, does not differ from the general mean. However, when g_i estimates are high (positive or negative), the parent in question is much superior or inferior to the other parents of the diallel.

Centenária, D'água, and Primorosa showed an additive effect for viable seeds percentage. Nevertheless, D'Água and Primorosa showed a negative effect on fruit set percentage, *i.e.*, these cultivars possibly have low gametophytic compatibility with the studied cultivars. This result shows that, despite having a low combination effect with the other cultivars, when compatible, they have high ovules fertilization, implying therefore in fruits with more acceptable shapes for commercialization. Cascatense had the greatest negative effect on viable seeds percentage, which may be related to the gametophytic incompatibility of this cultivar with the others.

Cascatense presented a negative effect for viable seeds percentage, fruit mass, fruit length, and fruit diameter.

The result indicates that these variables are directly related; when the fertilization of the egg is high, and the seeds are formed, the former release hormones that influence fruit growth. Therefore, the low viable seeds formation leads to low fruit growth and poor fruit formation.

When fertilization is inadequate, the tissue of the receptacle adjacent to the locule where the viable seed development did not occur deforms due to the absence of phytohormones and

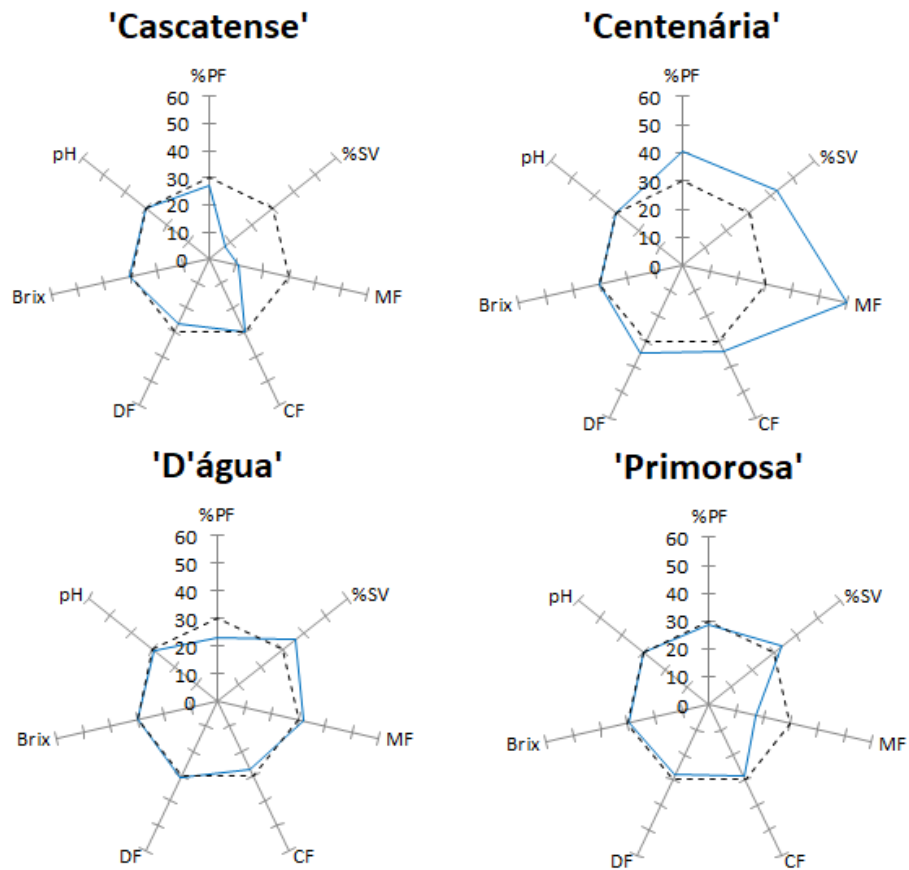
growth factors, compromising the fruit volume and quality. Fruit size, shape, and cold storage are related to the pollination and the number of viable seeds (Luz et al., 2012).

Centenária was the only cultivar with a positive additive effect for all the variables studied. This result indicates that the cultivar has high potential to be used as a parent. According to Cruz et al. (1987), the viability and success of breeding programs lie on the existence of additive and non-additive effects.

High values of °Brix are ideal. Conversely, the lower the pH, the more acid is the fruit. °Brix is related to the presence of organic acids and the amount of sugars in the fruit. In general, fruits with high °Brix content are sweeter and consequently more appreciated by consumers (Silva et al., 2002).

Figure 2 shows that cultivar Centenária presented the best performance. Considering the chemical characteristics of the evaluated fruits, all the cultivars were very close to the means. Parents with higher GCA estimates, positive or negative, are potentially favorable regarding their contributions to breeding programs, depending on the interest in increasing or decreasing the trait (Oliveira et al., 2004).

Figure 2. Graphic representation of the estimates of general combining ability (\hat{g}) effects for fruit set percentage (% FS), viable seeds percentage (% VS), fruit mass (FM), fruit diameter (FD), °Brix, and pH of cultivars Cascatense, Centenária, D'água, and Primorosa. Federal University of Lavras, Lavras-MG, 2018.



3.2 Specific Combining Ability

The effect of SCA is interpreted as the deviation of a hybrid from what would be expected based on the GCA of its parents. Thus, low absolute s_{ij} values indicate that F_1 hybrids, among the parents in question, behaved as expected, based on the GCA. Meanwhile, high absolute s_{ij} values indicate that the behavior of a particular cross is relatively better or worse than that expected, based on the GCA of the parents. Finally, s_{ij} estimates evidence the importance of genes with non-additive effects.

Table 6 presents the s_{ij} estimates, and Table 7 shows the reciprocal effects. The effects of s_{ij} are useful to determine the best hybrid combinations, but they do not specify which parent should be used as a female or male parent in the cross. Reciprocal crosses are used to know whether a given trait is controlled only by nuclear genes or not. In these crosses, a particular parent is sometimes used as a male parent and sometimes used as a female parent. According to Ramalho et al. (2008), if the heritability of a trait is controlled by nuclear genes, results of the crosses should be the same as that of their reciprocal. However, if results differ, the differences are due to the cytoplasmic effects and nuclear genes of the female parent.

Table 6 - Estimates of the specific combining ability (s) effects for the traits fruit set percentage (% FS), viable seed percentage (% VS), fruit mass (FM), fruit length (FL), (FD) fruit diameter, °Brix, and pH. Federal University of Lavras, Lavras-MG, 2018.

Parents	%FS	%VS	FM	FL	FD	°Brix	pH
s_{1x1}	-2.2	-*	16.95	10.36	7.26	1.85	0.33
s_{1x2}	14.8	-3.1	4.57	2.92	6.63	1.25	0.68
s_{1x3}	-11.88	-10.91	-52.15	-25.64	-23.41	-4.73	-1.45
s_{1x4}	-0.73	-1.2	30.63	12.37	9.51	1.60	0.45
s_{2x2}	-0.2	-*	17.40	11.98	7.41	1.23	0.53
s_{2x3}	-0.88	4.88	12.98	8.97	7.16	1.80	0.45
s_{2x4}	-13.73	-18.16	-34.95	-23.87	-21.21	-4.28	-1.65
s_{3x3}	-**	-*	-**	-**	-**	-**	-**
s_{3x4}	10.3	-3.83	1.43	4.61	4.34	1.25	0.53
s_{4x4}	4.15	-*	2.90	6.88	7.36	1.43	0.68

* No viable seeds were produced.

** No fruits were produced to evaluate the variable in question.

Table 7. Estimates of reciprocal effects (r) for fruit set percentage (% FS), viable seed percentage (% VS), fruit mass (FM), fruit length (FL), fruit diameter (FD), °Brix, and pH. Federal University of Lavras, Lavras-MG, 2018.

Parent	%FS	%VS	FM	FL	FD	°Brix	pH
r_{1x2}	11.65	17.00	-27.85	-1.70	-5.30	0.50	-0.35
r_{1x3}	4.00	3.00	61.50	36.65	29.60	5.45	1.90
r_{1x4}	3.35	-	-5.71	-1.55	-1.90	0.90	-0.10
r_{2x3}	14.35	16.30	35.34	6.10	3.10	-0.10	0.40
r_{2x4}	21.00	28.35	112.73	43.85	36.66	5.25	2.00
r_{3x4}	8.65	-19.30	-21.10	-6.95	-4.70	0.10	-0.25

The crosses s_{1x1} , s_{1x2} , s_{1x3} , and s_{1x4} , which used the same receptor (Cascatense), presented the effect of the pollenizer cultivar for all the variables. For fruit set, the best pollenizer was cultivar Centenária since it was the only one that presented positive effect for this variable. Despite having a negative effect, Primorosa presented a value very close to zero when used as a pollenizer, indicating that the cultivar is close to the mean. Moreover, the pollenizer cultivar greatly influences fruit mass, length, and diameter. When D'agua was used as the pollenizer, it exerted a negative effect on the evaluated variables, *i.e.*, fruits pollinated by this cultivar presented reduced size when compared with those pollinated by the other pollenizer cultivars. Moreover, for the chemical characteristics evaluated (°Brix and pH), except for D'agua, all cultivars showed a positive effect close to zero.

The specific combining ability effects measure the non-additive gene effects. Hybrid combinations with more favorable specific combining ability estimates involving at least one

parent presenting the most favorable general combining ability effect are desirable (Bordallo et al., 2005, Aguiar et al., 2004, Melo, Von Pinho & Ferreira, 2001).

Considering the trait fruit set, when ‘Centenária’ was used as the receptor (r^1x2 , s^2x2 , s^2x3 , and s^2x4), the only cultivar that had a positive effect as a pollenizer was ‘Cascatense.’ When self-pollinated or cross-pollinated by Primorosa, despite the negative effect, their values were close to the mean. Cascatense had a positive effect on viable seeds percentage; however, when the cultivar was used as a pollenizer, it resulted in a negative effect on fruit mass, length, and diameter.

Cultivar D’água’ presented self-incompatibility, which led to no fruit set. Therefore, the other traits were not evaluated. When D’água was used as the receptor, all the pollenizers had a positive effect on fruit set, mass, length, and diameter. Also, Cascatense resulted in the greatest effect in all the fruit physical-chemical characteristics evaluated.

Cultivar Primorosa, when used as a receptor, had a negative effect on fruit set only when pollinated by Cascatense. Conversely, it showed a positive effect when pollinated by Centenária. It presented a negative effect on fruit mass, length, and diameter when pollinated by D’água.

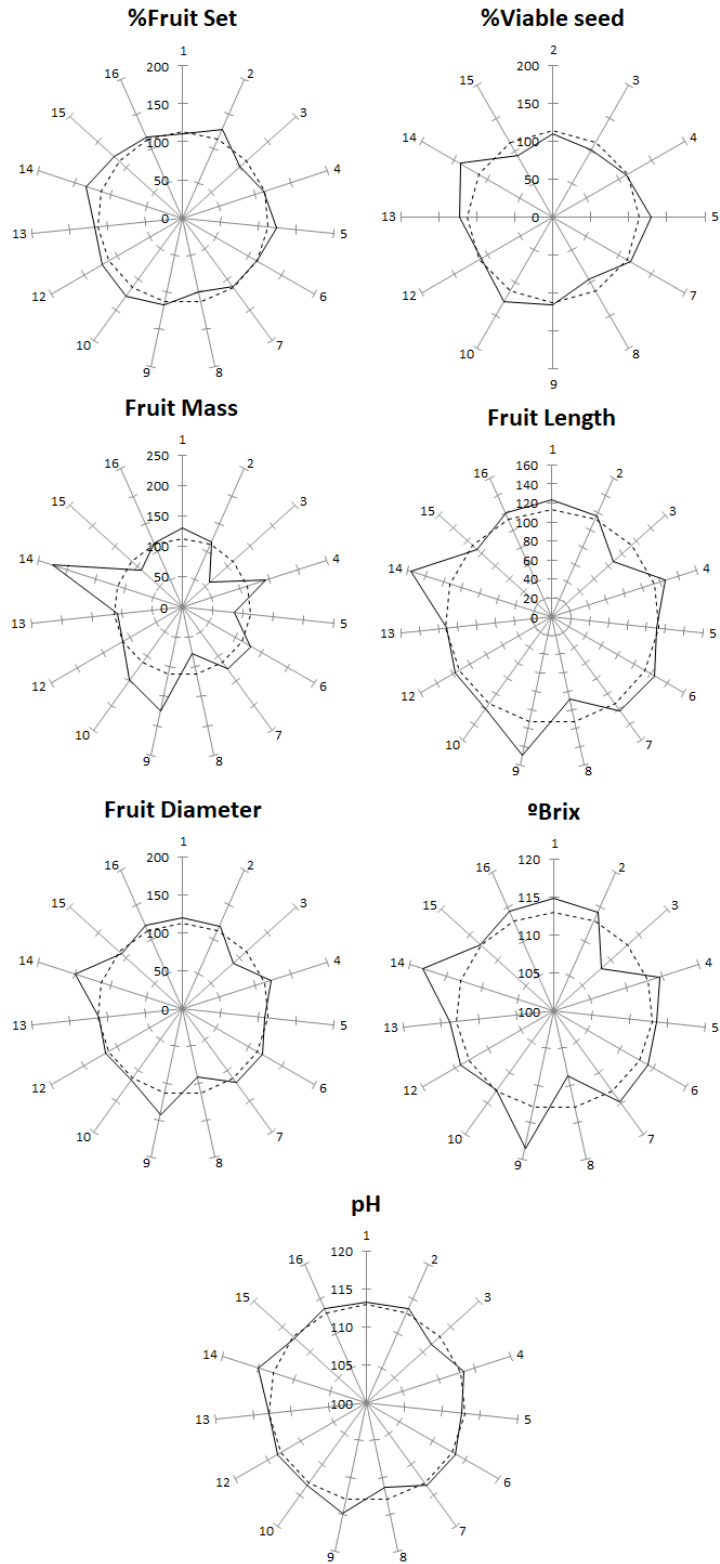
In general, the cross Primorosa (receptor) x Centenária (pollenizer) presented the greatest positive effect on all evaluated traits. Conversely, its reciprocal showed a negative effect on all variables studied.

The SCA data are also represented in figure 3. For all the variables evaluated, cross 13 had the greatest positive effects. It should be mentioned that the receptor cultivar from treatments 1 to 4 is Cascatense; from 5 to 8 is Centenária; from 9 to 11 is D’água; and from 12 to 15 is Primorosa. Thus, the pollenizer effect is accentuated mainly on fruit set percentage, viable seeds percentage, and fruit physical quality.

Treatment 13 (Primorosa x Centenária) stood out for all the studied variables. Conversely, its reciprocal, treatment 8, presented a high negative effect, together with Treatment 3 (Cascatense x D’água).

The highest GCA estimates of cultivar Centenária for the evaluated traits are associated with the highest SCA estimates of this cultivar, as observed in the combinations 2, 6, 7, and 10.

Figure 3. Graphical representation of the estimates of the specific combining ability (g) effects for the traits fruit set percentage (% FS), viable seeds percentage (% VS), fruit mass (FM), fruit diameter (FD), °Brix, and pH of the self-pollination and cross-pollination between cultivars Cascatense, Centenária, D’água, and Primorosa. Federal University of Lavras, Lavras-MG, 2018.



4 CONCLUSION

Pollenizer effect occurs for the variables evaluated in the hybrid pear cultivars. Centenária presented the highest general combining ability for all traits evaluated. The cross Primorosa x Centenária showed the highest specific combining ability.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and National Council for Scientific and Technological Development – CNPq.

5 REFERENCES

- Aguiar, C. G.de, Scapim, C. A., Pinto, R. J. B., do Amaral Júnior, A. T., Silvério, L., & de Bastos Andrade, C. A. (2004). Análise dialéctica de linhagens de milho na safrinha. *Ciência Rural*, 34(6), 1731-1737.
- Atawia, A. R., EL-Latif, F. A., EL-Gioushy, S. F., & Emam, H. E. (2016). Effect of three pollinators on fruit set and fruit characteristics of picaul olive cultivar. *Egypt. J. Plant Breed.* 20(1):61-72
- Bettiol Neto, J. E. & Pio, R. (2014). *Cultivo da pereira* In: Pio, R. Cultivo de Fruteiras de clima temperado em regiões subtropicais e tropicais. 1. ed. Lavras: UFLA, cap. 4, p. 123-157, 2014.
- Bodor, P., Gaál, M., & Tóth, M. (2008). Metaxenia in apples cv.'Rewena', 'Relinda', 'Baujade' as influenced by scab resistant pollinizers. *International Journal of Horticultural Science*, 14 (3), 11-14.
- Bordallo, P. D. N., Pereira, M. G., Amaral Júnior, A. D., & Gabriel, A. P. C. (2005). Análise dialéctica de genótipos de milho doce e comum para caracteres agronômicos e proteína total. *Horticultura Brasileira*, 23(1), 123-127.
- Chagas, E. A., Campo Dall'Orto, F. A., Ojima, M., Barbosa, W., & Pio, R. (2008). Pear 'IAC Princesinha': new european type cultivar for subtropical climate. *Acta Horticulturae*, 800, 507-510.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J., & Carneiro, P. C. S. (1997). *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*(Vol. 2). Ed. UFV.
- Cruz, C. D., Sediyaama, C. S., & Sediyaama, T. (1987). Capacidade combinatória e efeitos recíprocos de alguns caracteres em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Revista Ceres*, 34, 432-439.
- Dantas, A. A. A., Carvalho, L. D., & Ferreira, E. (2007). Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(6), 1862-1866.

- El-Kosary, S., & Shaban, A. E. (2004). Effect of pollen source on pollen tube growth, fruit set and fruit properties of some mango cultivars. *Egypt J. Appl. Sci*, 19(7A), 245-246.
- Franklin-Tong, N. V., & Franklin, F. C. H. (2003). Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in plant science*, 8(12), 598-605.
- Freytag, G. F. (1979). Metaxenia effects on pod size development in the common bean. *Journal of Heredity*, 70(6), 444-446.
- Garratt, M. P. D., Truslove, C. L., Coston, D. J., Evans, R. L., Moss, E. D., Dodson, C., & Potts, S. G. (2014). Pollination deficits in UK apple orchards. *Journal of Pollination Ecology*, 12(2), 9-14.
- Goldway, M., Shai, O., Yehuda, H., Matityahu, A., & Stern, R. A. (1999). Jonathan'apple is a lower-potency pollenizer of Topred'than Golden Delicious' due to partial S-allele incompatibility. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74(3), 381-385.
- Goldway, M., Stern, R., Zisovich, A., Raz, A., Sapir, G., Schnieder, D., & Nyska, R. (2012). The self-incompatibility fertilization system in Rosaceae: agricultural and genetic aspects. *Acta Horticulturae*, (967), 77.
- Griffing, B. R. U. C. E. (1956). Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian journal of biological sciences*, 9(4), 463-493.
- Kumar, R., R. L. Sharma & K. Kumar (2005). Results of experiments on metaxenia in apple. *Acta Horticulturae*, 696, 43- 48.
- Luz, A. R., Rufato, A. de R., Marcon Filho, J. L., & Muniz, J. N. (2012). *Floração e polinização*. In: L. Rufato, A. A. Kretschmar, & A. Bogo. A cultura da Pereira. Florianópolis: DIOESC, Série Fruticultura, p. 38- 53.
- Melo, W. M. C., Von Pinho, R. G., & Ferreira, D. F. (2001). Capacidade combinatória genética em híbridos comerciais de milho. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 25(4), 82.
- Moriya, Y., Takai, Y., Okada, K., Ito, D., Shiozaki, Y., Nakanishi, T., & Takasaki, T. (2005). Parthenocarpy and self-and cross-incompatibility in ten European pear cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 74(6), 424-430.
- Oliveira, D., Pion, S., & Paradis, R. O. (1983). *Agents pollinisateurs et productivité du framboisier "Newburg" (Rubus idaeus L), au Québec*. In: V' symposium international sur la pollinisation. (Tasei JN, ed). Les Colloques de l'INRA, no. 21; 311-316.
- Oliveira, J. P., Chaves, L. J., Batista Duarte, J., Madureira Brasil, E., Ferreira Junior, L. T., & de Oliveira Ribeiro, K. (2004). Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade protéica e seus cruzamentos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 34(1), 45-51.
- Ortega, E., Martinez-Garcia, P. J., & Dicenta, F. (2006). Pollination control in olive orchards. *Olivea* cf (86): 35-37. *Hort. Abst*, 72, 2231.

Ramalho, M. A. P., Santos, J. B., Pinto, C. A. B. P. (2008). *Genética na Agropecuária*. 4. ed. Lavras: UFLA, 460 p.

Resende, M. D. V. de, & Duarte, J. B. (2007). Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 37(3), 182-194.

Silva, P. S. L., Sá, W. R., Mariguele, K. H., Barbosa, A. P. R., & Oliveira, O. F. (2002). Distribuição do teor de sólidos solúveis totais em frutos de algumas espécies de clima temperado. *Revista Caatinga, Mossoró*, 15(1), 19-23.

Stancevic A. S. (1971). Metaxenia in sweet cherries. Effects of pollinators on maturation time in some sweet cherries cultivars. *Jugosl Vocarstvo J Jugosl Pomol.*, 5(15), 11-17

Swingle, W. T. (1928). Metaxenia in the date palm: possibly a hormone action by the embryo or endosperm. *Journal of Heredity*, 19(6), 257-268.

Thone, F. (1926). Plant physiology at the Ithaca Congress. *Plant physiology*, 1(4), 293-305.

Zisovich, A., Stern, R., Shafir, S., & Goldway, M. (2005). Fertilisation efficiency of semi-and fully-compatible European pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80(1), 143-146.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As cultivares Seleta e Triunfo apresentam potencial como progenitoras femininas.

A cultivar Cascatense e Primorosa apresentam alto potencial para serem utilizadas como polinizadoras.

Os alelos-S identificados neste estudo são: Cascatense – S1S5, Centenaria – S5, D'água – S5S8, Primorosa – S1S5, Seleta – S1S4, Tenra – S5 e Triunfo – S1S5.

As cultivares D'água e Seleta são compatíveis. Porém não apresentam potencial como polinizadoras.

As cultivares Primorosa, Cascatense e Triunfo apresentam incompatibilidade.

Centenaria apresenta maior capacidade geral de combinação com as cultivares Cascatense, D'água e Primorosa. O cruzamento Primorosa x Centenaria apresenta a maior capacidade específica de combinação, conferindo a Centenária um ótimo polinizador para a cultivar Primorosa com relação as qualidades físico-químicas dos frutos.