



**9º CFN
CONGRESSO
FLORESTAL
NACIONAL**

**Sustentabilidade da floresta portuguesa:
valorizar para superar desafios**

**10 - 14 de outubro de 2022
Funchal. Madeira.**

Caracterização molecular e bioquímica de germoplasma de medronheiro

**Maria Margarida Ribeiro, Tatiana Diamantino, Libânia Oliveira,
Sandrine Ressurreição, Jorge Varejão, Joaquim Pinto, Diogo Reis,
Maria Vidal, Filomena Gomes**

mataide@ipcb.pt



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária



Motivação

- 1) **Espécie autóctone**
- 2) **Tolerante ao stresse hídrico**
- 3) **Plasticidade quanto ao tipo de solos**
- 4) **Resistência ativa ao fogo**
- 5) **Domesticação em curso**
- 6) **Produtores → apostam em plantações com plantas melhoradas**





Melhoramento genético e conservação do medronheiro



Prospecção e colheita de plantas em diferentes proveniências

Conter elevada diversidade genética

Domesticação



15 genótipos instalados num pomar produtor de sementes

202 acessos

Marcadores moleculares

Teor de açúcares

Fingerprinting

Totais e redutores



Objetivos do trabalho

Objetivos

**Caracterizar os acessos
sobre o conteúdo em
açúcares totais e açúcares
redutores**

**Estabelecer um impressão
digital molecular única
para os 202 acessos**

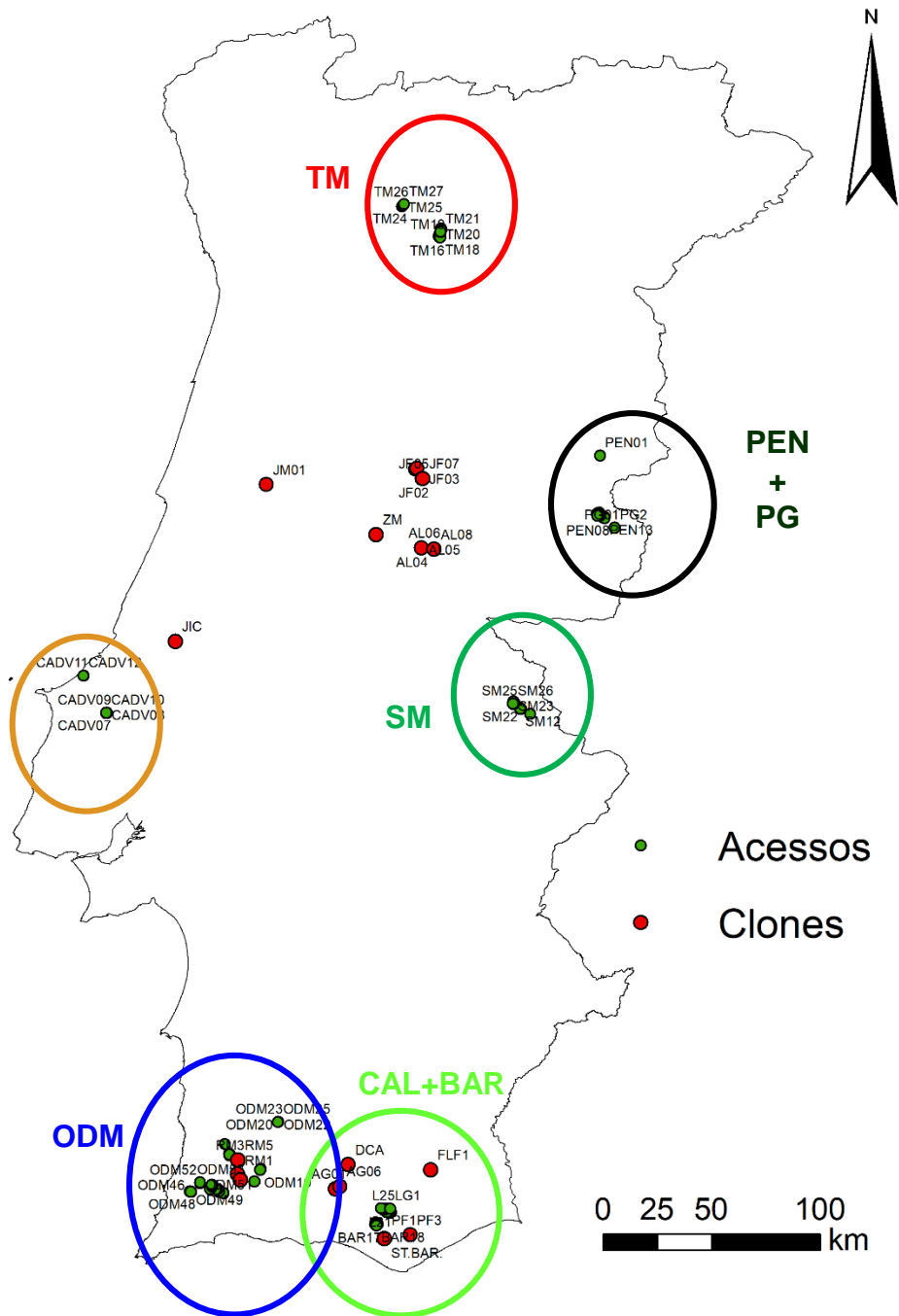
**Pomar de sementes
certificado → 15 genótipos
+
Conservação *ex-situ*
+
Certificação dos acessos**

Material e métodos

- ✓ **202 acessos** selecionados em diferentes regiões de Portugal
- ✓ Folhas e frutos amostrados em cada acesso ~ **ADN extraído**
- ✓ Genotipagem com 9 microssatélites **nucleares**
- ✓ Maceração dos frutos
- ✓ Caracterização dos açúcares **redutores** (glucose, frutose e maltose) e **totais** (+ sacarose) da polpa dos frutos por HPLC



Regiões de prospeção e localização dos acessos



TM – Trás-os-Montes

PEN – Penamacor

PG – Penha Garcia

CADV – Cadaval

ODM – Odemira

CAL – Serra do Caldeirão

BAR – Barrocal

● Acessos

● Clones

0 25 50 100
km

Extração do ADN e genotipagem

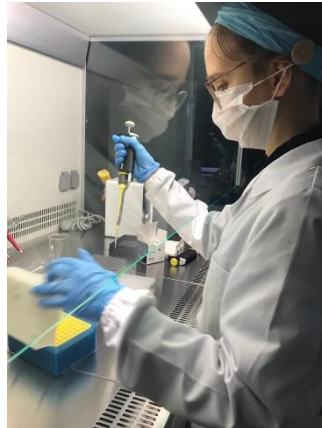
Amostra de folhas



Maceração



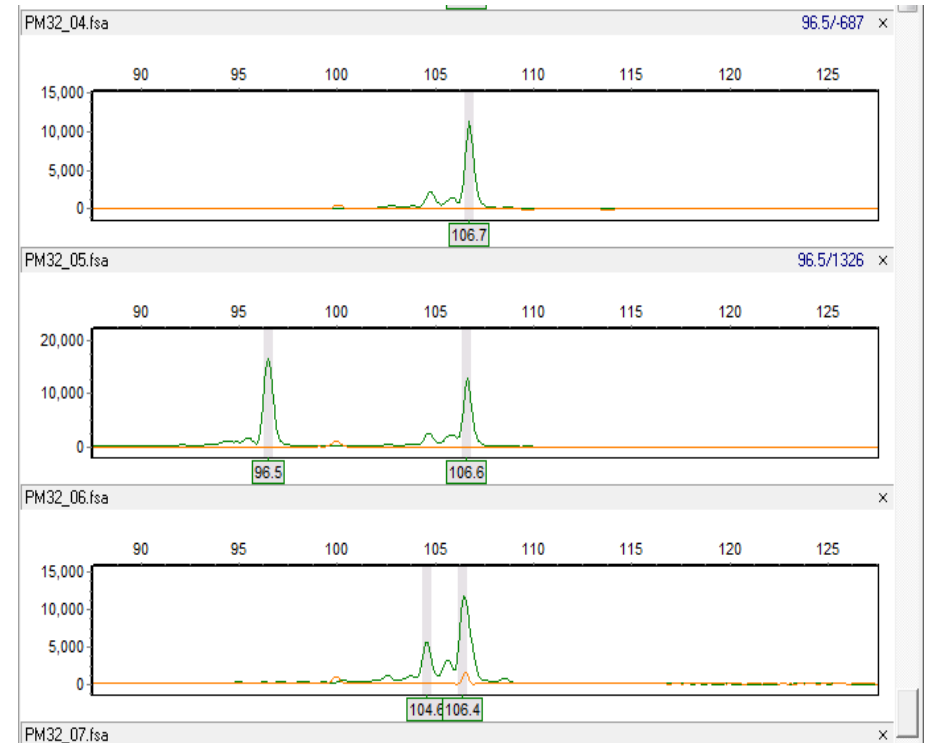
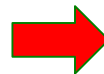
Preparação do produto PCR para o sequenciador automático



Extração do ADN a partir de folhas e genotipagem com 9 microssatélites nucleares (nuSSR)



Análise de fragmentos no sequenciador automático: ABI 3130



Açúcares redutores e totais → HPLC

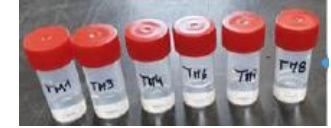
Preparação da amostra →
extração da polpa →
200 g de fruto



Pesagem e diluição



Filtragem com filtro de
membrana 0,45 µm



Injeção das amostras no HPLC



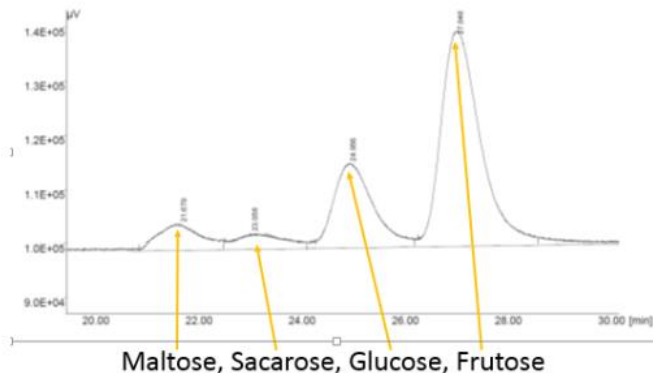
E

Três repetições por
acesso

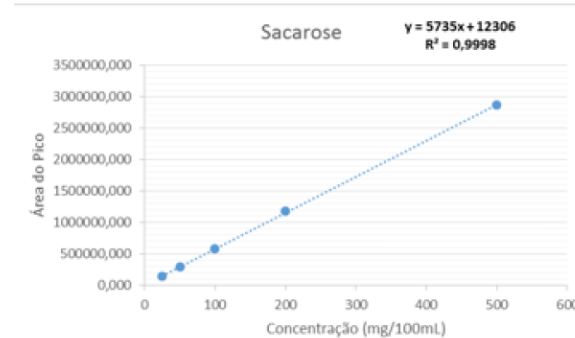
D



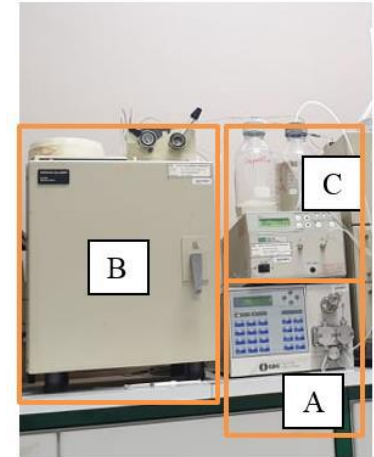
Cromatograma



Cromatograma do acesso ODM 12



Para quantificação das amostras
- Injeção no HPLC de soluções padrão dos
açúcares (Sigma –Aldrich)
- Cálculo das equações e retas de calibração



HPLC:

(A) - bomba de alta pressão LC1110 (GBC, Austrália); (B) - forno LC-100 (Perkin-Elmer, USA); (C) - detector 830-RI Jasco, Japão

Primers dos microssatélites nucleares

Primer	Sequencia 5' - 3'	Tamanho (pb)	Motivo repetido	T. <i>annelling</i> (°C)
M2-CA421F	F- TCA AAT TCA AAG CTC AAA ATC AA R- GTT TAA GGA TGA TCC CGA AGC TCT	150-210	(CT)25	62
AU57	F- TTG GTT ATG GAC ACC CTG TCT R- GTT TCT TCA TCC TAA ATG CTG ATC TTG ACC	135-139	(AAAG)6	60
AU1427	F- GAA ATA TAA GCC CAA AAT CAGC R- GTT TCT TGC AGA AAC CTA TGC TCA TC	112-122	(AG)7	60
AU69656	F- ATT GAG CGA CAG AAC TAGT R- GTT TCT TCT GTA ACT CAT GCA CGAA	114-120	(AG)9	58
AU59	F- ACG TTC ACG GAG ATA GCA GA R- GTT TCT TAG CAG AGT GAA CAA AGG GAGA	123-129	(TC)10	58
AU392	F- CAT GCC AAC TAA CAC GGCT R- GTT TCT TTT ATA GCT GAT GGC ATG ATGG	114-124	(TC)13	58
AU81604	F - AAT TTG ATC GAA CTT CAC AC R- TAC TTA TCC AAA CTC TGA AGG	100-135	(AG)8	58
AU32030	F- ATT TGA GGT ATC CAC AAC ATG R- GCA GTA TTC GCC ATC TAA G	110-200	(GT)6	57
AU93953	F- TGG TAA ACA GTA TTA AGG ACA G R- GTA GGT TTT GCC CTAC AG	110-150	(AG)6	57

Diversidade genética por *locus*

Locus	Na	Ne	Ho	He	F
M2-CA421F	46	14.43	0.86	0.93	0.08
AU57	12	4.02	0.57	0.75	0.24
AU1427	16	3.84	0.55	0.74	0.26
AU69656	14	4.13	0.34	0.76	0.56
AU59	12	4.16	0.29	0.76	0.62
AU392	12	2.38	0.77	0.58	-0.32
AU81604	17	5.99	0.41	0.84	0.51
AU32030	32	13.02	0.84	0.93	0.09
AU93953	33	7.17	0.62	0.86	0.28
Mean	21.56	6.57	0.58	0.79	0.26
SE	4.12	1.43	0.07	0.04	0.10

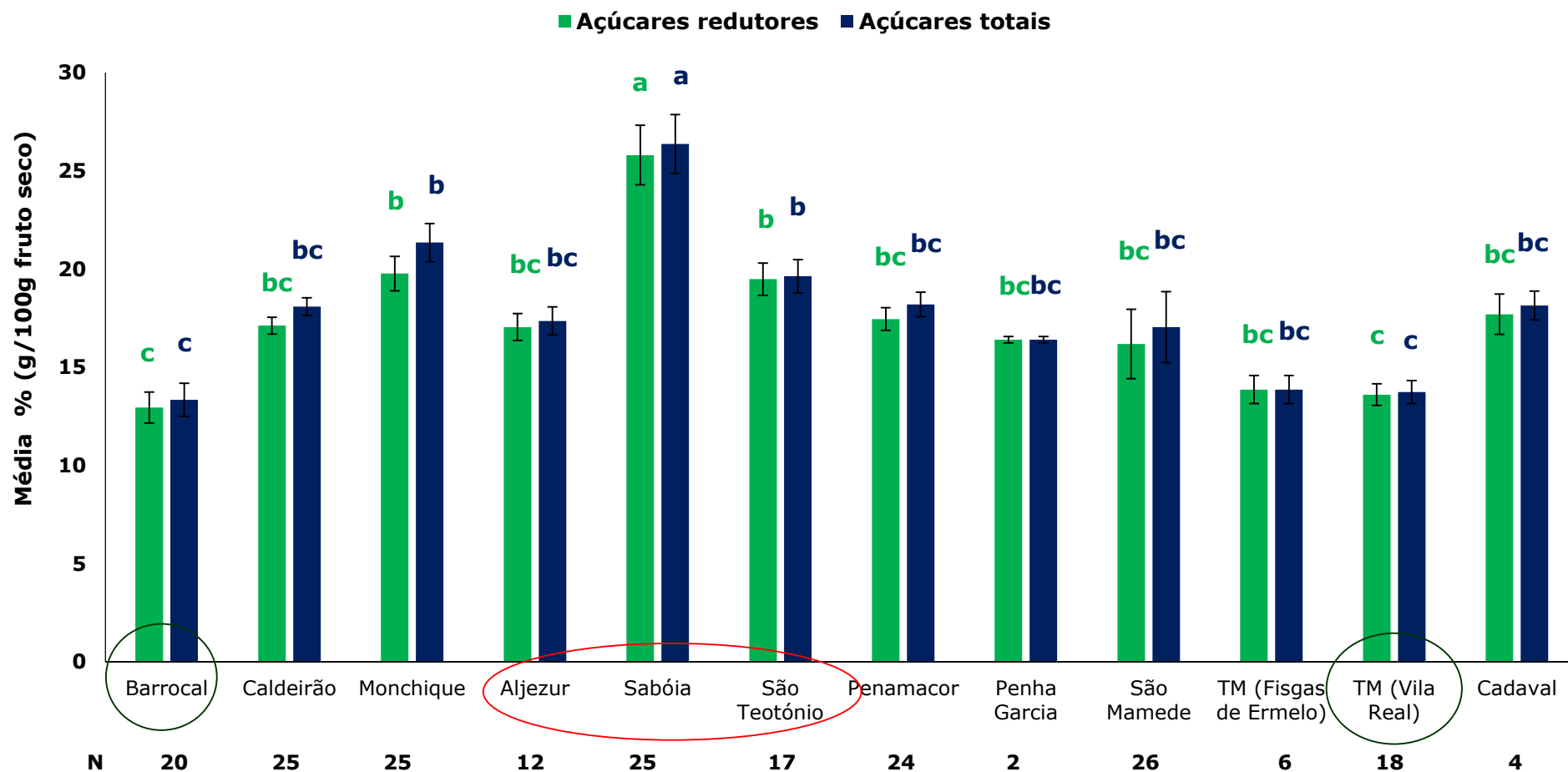
Na = número de alelos, Ne = efectivo no. de alelos, Ho = diversidade genética observada, He = diversidade genética esperada, e F = índice de fixação

Lista de pares com o mesmo genótipo multilocus exceto num *locus*



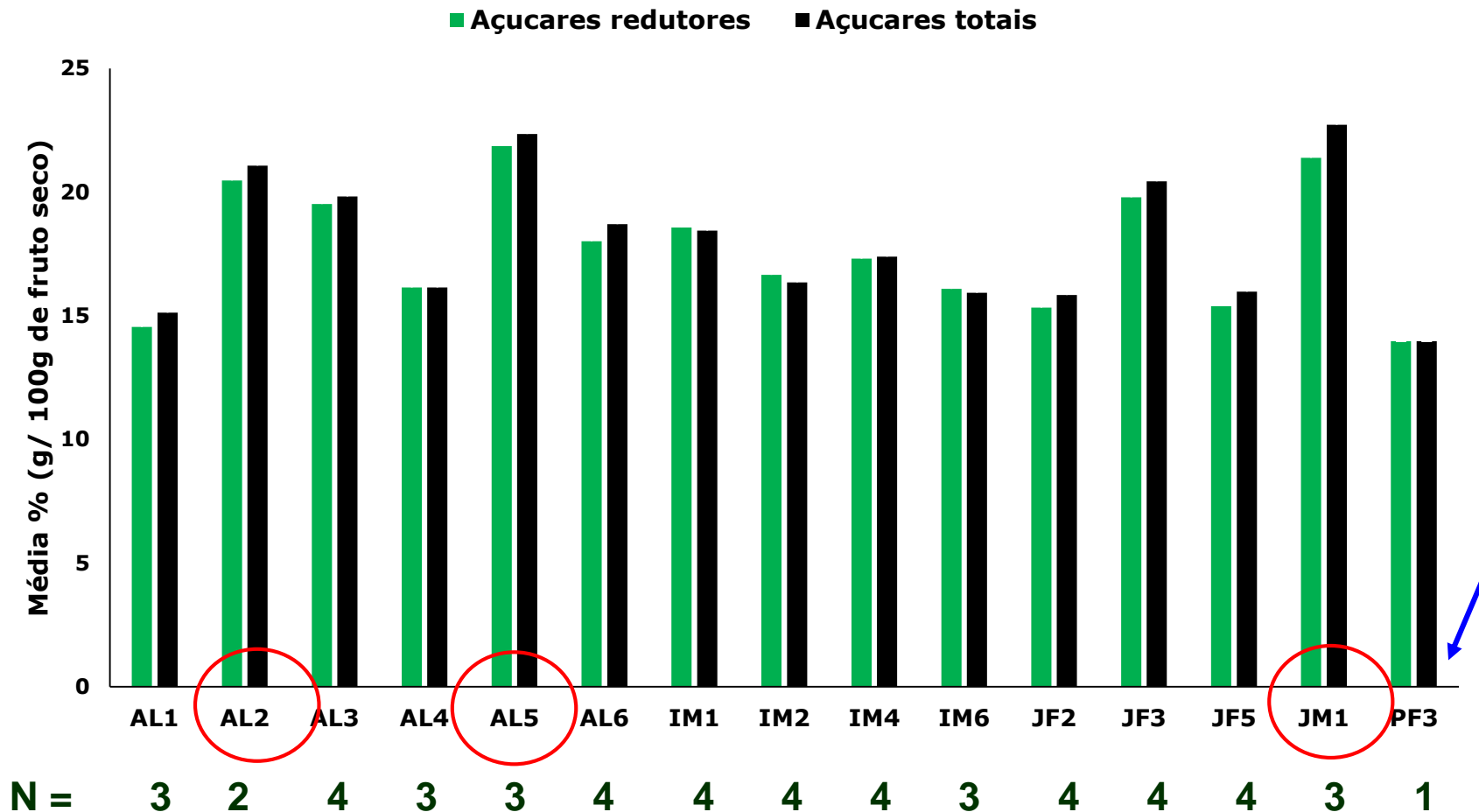
Acesso	M2-CA421F		AU57		AU1427		AU69656		AU59		AU392		AU81604		AU32030		AU93953	
CADV09	94	154	92	120	91	113	90	90	106	108	93	103	109	125	120	122	109	109
CADV10	98	152	92	120	91	113	90	90	106	108	93	103	109	125	120	122	109	109
L05	86	148	120	120	93	93	90	90	108	108	103	103	107	125	116	122	109	149
L07	86	148	120	120	91	91	90	90	108	108	103	103	107	125	116	122	109	149
MON01	132	132	116	116	91	119	90	94	110	110	93	103	111	115	110	202	109	189
MON03	132	132	116	116	91	117	90	94	110	110	93	103	111	115	110	202	109	189
MON10	88	88	116	116	91	91	90	90	106	106	93	103	109	127	196	202	123	189
MON12	88	88	116	116	93	101	90	90	106	106	93	103	109	127	196	202	123	189
SM11	88	154	120	120	93	101	90	90	108	108	93	103	111	111	216	222	129	209
SM12	88	154	120	120	93	93	90	90	108	108	93	103	111	111	216	222	129	209
SM21	106	106	116	124	89	93	74	92	108	108	93	103	109	109	110	120	109	109
SM22	214	266	116	124	89	93	74	92	108	108	93	103	109	109	110	120	109	109
AL06	142	154	92	112	91	91	92	92	108	108	93	103	111	111	120	122	109	109
ST.BAR.	98	154	92	112	91	91	92	92	108	108	93	103	111	111	120	122	109	109

Açúcares redutores e totais/região de prospeção



Letras diferentes mostram a existência de diferenças significativas

Açúcares redutores e totais/genótipos instalados no pomar produtor de sementes (2015)



Conclusões

- Excesso de homozigóticos em todos os *loci*, exceto um → **He=0.79** > **Ho=0.58**. Mistura de genótipos de diferentes origens, com diferentes composições alélicas → o pressuposto de EHW não se verifica.
- Todos os acessos **têm uma impressão digital (*fingerprinting*) única**, mas 7 pares → só são distinguidos por um só locus.
- A diversidade genética observada (**Ho**) no germoplasma é superior ao da variabilidade da espécie em Portugal (dados não publicados) → mistura de genótipos recolhidos em diferentes locais do país.
- Em **Saboia (na proveniência de ODM)** → valores mais elevados em açucares redutores (AR=25.8%) e totais de (AT=26.4 %) → seleção feita com o apoio de proprietários e produtores de aguardente.
- Os valores inferiores de AR e AT (<15%) foram observados em **nas proveniência de TM e BAR**. Em TM → teores elevados de humidade, precipitação e menores temperaturas médias e em BAR → solos com argila provenientes de calcário e região com o maior índice xerotérmico
- Valores mais elevados (AT e AR) → **AL5** e **JM1** e menores no genótipo e mais baixos em **PF3**.

Obrigada pela vossa atenção!

Questões?

Financiamento: CEF (UIDB/00239/2020) e CERNAS (UIDB/00681/2020) (FCT), projeto Conservação e Melhoramento do Medronheiro, 784-042742, PDR2020, Operação 7.8.4 e programa CULTIVAR CENTRO-01-0145-FEDER-000020.

Cofinanciado por:

