



Interreg
España - Portugal

Programa Operativo de Desenvolvimento Regional



2014-2020
REGIÃO ALENTEJANA

coopaspan

Relatório

Estudos genéticos em *Lavandula* spp.
na região da Beira Interior

CBPBI- Centro de Biotecnologia da Beira Interior

IPCB-ESA- Instituto Politécnico de Castelo Branco

ACRÓNIMO DO PROJETO

Coop4PAM

TÍTULO DO PROJETO

Coop4PAM - Cooperar para crescer no sector das plantas aromáticas e medicinais

CÓDIGO DO PROJETO

0665_COOP4PAM_4_P

ÍNDICE

ENQUADRAMENTO	1
Objetivo	1
Materiais e Métodos	1
Resultados e discussão	3
Conclusões	6
Referencias bibliográficas	7

FIGURAS

Figura 1. Mapa ilustrativo dos diferentes locais de recolha de <i>Lavandula</i> spp.	2
Figura 2. Percentagens de variação molecular dentro e entre as populações de <i>Lavandula</i> spp.	5
Figura 3. Análise de componentes principais (PCA).	6

TABELAS

Tabela 1. Listagem de <i>Lavandula</i> spp. recolhidas nos diferentes locais da Beira Interior.	2
Tabela 2. Identificação e características dos marcadores moleculares SSR usados em <i>Lavandula</i> spp. (Adal et al. 2015).	3
Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética das populações de <i>Lavandula</i> .	4
Tabela 4. AMOVA.	4
Tabela 5. Resultados do F-Statistic	4

ENQUADRAMENTO

Em Portugal, crescem espontaneamente espécies de *Lavandula* da secção *Stoechas* Ging, das quais se destaca a presença de *Lavandula pedunculata*, *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* e *L. stoechas* subsp. *stoechas*. Estas espécies são consideradas Plantas Aromáticas e Medicinais (PAM) devido à produção de metabolitos secundários com propriedades terapêuticas e aromáticas. Devido ao seu elevado polimorfismo e capacidade de hibridação na natureza, torna-se importante o conhecimento e distinção entre as espécies e subespécies. Apesar de alguns dos constituintes químicos serem compartilhados entre estas espécies, a presença de outros e respetivas concentrações são exclusivas de cada uma e, por conseguinte, a sua aplicação e uso também deve ser diferenciado. De forma a contribuir para a diferenciação entre espécies e subespécies de *Lavandula* que crescem na região da Beira Baixa recorreu-se aos referenciais morfológicos de Portugal e Península Ibérica. Estes referenciais taxonómicos referem alguns parâmetros morfológicos que poderão ser diferenciadores entre espécies e subespécies, no entanto, a maioria dos parâmetros são redundantes e comuns, pelo que a análise morfológica externa da planta pode não ser suficiente para distinguir as subespécies. Considerando a evolução natural das espécies e polimorfismo, a integração de outros tipos de análises, como a análise dos constituintes químicos e estudos genéticos, tornam-se importantes para a diferenciação das subespécies. Com este trabalho pretendeu-se verificar a relação genética entre as plantas recolhidas em diferentes locais da Beira Interior. Com o uso de marcadores moleculares microssatélites (SSR) pretende-se clarificar a taxonomia e relações evolucionárias entre estas espécies.

Objetivo

Caraterização biomolecular de 120 amostras de *Lavandula* spp. utilizando seis microssatélites nucleares.

Materiais e Métodos

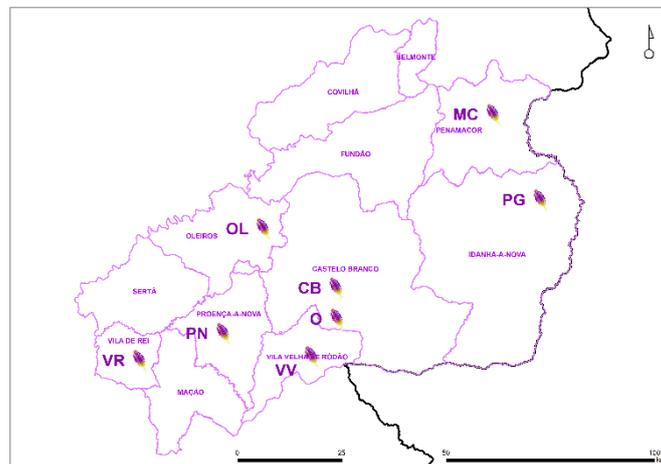
Recolha das amostras

Foram selecionados oito locais de recolha de plantas silvestres na região da Beira Interior. A recolha das plantas foi realizada no período de floração, de maio a julho de 2021. A Tabela 1 descreve os códigos correspondentes em cada proveniência e a espécie recolhida e identificada morfológicamente no local.

Tabela 1. Listagem de *Lavandula* spp. recolhidas nos diferentes locais da Beira Interior.

Código	Local	Coordenadas GPS	Espécie/subespécie
CB	Cebolais (Castelo Branco)	N 40' 12,285" W 7' 06,904"	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>
PG	Idanha-a-Nova	N 40 01,070" W 6 59,139"	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>
VR	Vila de Rei	N 40' 27,439" W 6' 38,638"	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>stoechas</i>
O	Ocreza (Castelo Branco)	N 39' 45,786" W 7' 33,533"	<i>L. pedunculata</i>
VV	Vila Velha de Rodão	N 39' 40,890" W 7' 37,831"	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>
PN	Proença-a-Nova	N 39' 43,974" W 7' 52,628"	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>
MC	Malcata	N 40' 12,285" W 7' 06,904"	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>
OL	Oleiros	N 39' 57,613" W 7' 45,841"	<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>

A Figura 1 apresenta a distribuição geográfica dos locais de recolha de plantas na região da Beira Interior. As plantas foram recolhidas de acordo com as Boas Práticas Agrícolas e de Recolha de Plantas Medicinais (WHO, 2003), assegurando a preservação de cada planta. Por local foram recolhidas entre 10 e 20 plantas, sendo que todas as plantas foram identificadas e georreferenciadas. Cada exemplar foi herborizado, fazendo parte da coleção do herbário do Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Figura 1. Mapa ilustrativo dos diferentes locais de recolha de *Lavandula* spp.

Extração e amplificação de DNA

O DNA foi extraído a partir de 100 mg de folhas de cada planta, aplicando o kit Isolate II Plant DNA (Bioline, London, United Kingdom), e foi isolado uma elevada concentração de DNA. O DNA genómico de cada indivíduo foi amplificado usando seis marcadores microssatélites (SSR) selecionados com base na bibliografia (Tabela 2). A amplificação dos três conjuntos de primers selecionados foram realizados em multiplex, tendo cada conjunto dois primers (LAF5+LAF9; LAF11+LAF18; LAF21+LAL4).

As reações PCR foram realizadas num volume total de 10 µL, contendo 50-60 ng de DNA, 0,2 U Supreme NZYTaQ 2x Colourless Master Mix® (Nzytech, Lisboa, Portugal), 2,5 mM MgCl₂ e 1,0 µM de cada primer. As amplificações foram realizadas num termociclador UNO96 Gradient (VWR®, Leuven, Belgium). O protocolo de PCR consistiu numa desnaturação inicial (4 min a 94°C), seguido de 24 ciclos de amplificação constituídos por uma desnaturação (30 segundos a 95°C), a fase de anelamento (1 min a 60°C) e polimerização (2 min a 72°C). Depois dos ciclos de amplificação, a fase final de extensão ocorreu durante 10 min a 72°C.

Tabela 2. Identificação e características dos marcadores moleculares SSR usados em *Lavandula* spp. (Adal et al. 2015).

Primer	Sequência 5'-3'	Tamanho (bp)	Temperatura de anelamento (°C)
LAF5	F: CAAATGACCCCATCAACAA R: GTATGATCCCATCCCGTGAG	225–320	59,75
LAF9	F: GAGCTGCGAGTGTGAGTCAG R: TTTACTTGGGGGACGTTGAG	140–200	59,92
LAF11	F: GCAATGTTGGAATGTGATGC R: AAGCGGCAATCTTGGTAGTG	180–380	59,94
LAF18	F: TTCACCCGGAATCTTTACCA R: CAAATTCCTGCAACCAATC	200–300	60,30
LAF21	F: GAGGAGGAGGAGGAAGTGCT R: ATACTCGGTGCCAGATCAC	140-400	59,95
LAL4	F: AAGTTTCCCTCTGCCTCCTC R: AGAGGCCGTAGCTGTCTTCA	160–365	59,82

Sequenciação Sanger - Análise de fragmentos

Todos os produtos de PCR foram diluídos em 20 µL de água ultrapura e uma alíquota de 2,5 µL da diluição foi misturada em 10 µL de formamida e 0,2 µL de LIZ-600 (tamanho padrão). A genotipagem foi assegurada por um equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a análise de fragmentos foi realizada usando o software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e os dados foram classificados manualmente.

Resultados e discussão

De acordo com os resultados dos parâmetros de diversidade genética apresentados na Tabela 3, pode-se observar que as populações de CB e PG são as mais diversas para todos os parâmetros, embora só estejam representadas por 10 indivíduos (*L. stoechas* subsp. *luisieri*). A população O (*L. pedunculata*) é a menos diversa e que tem excesso de

homozigóticos (maior H_o que H_e). O parâmetro o número de alelos privados a população OL considera-se a mais interessante. A população VV tem deficiência de homozigóticos, ou se amostraram plantas demasiado próximas ou é uma população degradada pois é a população menos diversa da subsp. *luisieri*. No geral, os parâmetros genéticos das populações indicam que não existe desvio no EHW (Equilíbrio de Hardy-Weinberg), pois o coeficiente de endogamia ($Fis=0,02$, ainda que não dif. de 0) é baixo e apresentam um valor elevado de alelos privados (0,98) indicando que todas as populações têm alelos privados.

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética das populações de *Lavandula*.

População	n	N_a	NP	N_e	H_o	H_e	Fis
CB	10	6,33	1,33	5,29	0,80	0,82	-0,02
PG	10	7,00	0,50	5,79	0,73	0,85	0,10
VR	20	5,67	0,67	3,60	0,78	0,66	-0,22
O	20	4,00	1,00	3,01	0,83	0,65	-0,31
VV	10	4,67	1,33	3,94	0,45	0,74	0,39
PN	20	6,17	0,67	4,59	0,72	0,78	0,01
MC	10	5,17	0,67	3,93	0,63	0,74	0,12
OL	20	7,00	1,67	5,34	0,80	0,82	0,00
Média		5,75	0,98	4,44	0,72	0,76	0,02
Desvio padrão		0,31		0,26	0,02	0,02	0,05

Legenda: n- número de indivíduos; N_a -número de alelos; NP-número de alelos privados; N_e -número efetivo de alelos; H_o -heterozigosidade observada; H_e - heterozigosidade esperada; Fis- Coeficiente de endogamia.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados da aplicação estatística AMOVA e F-Statistic. De acordo com os resultados, existe uma diferenciação genética apreciável, 18% da variação é devida à diferença entre espécies (Figura 2), o que pode indicar que o fluxo genético é reduzido entre populações.

Tabela 4. AMOVA.

Fonte de variação	gl	Componentes da variância	% da variância total	Fst	P
Populações					
Entre pops.	7	16,375	0,479	0,18	0,001
Dentro pops.	232	2,240	2,240	0,82	
Total	239		2,718		

Legenda: gl- graus de liberdade estatística; Fst-coeficiente de diferenciação genética.

Tabela 5. Resultados do F-Statistic.

F-Statistics	Value	P (rand >= data)
Fst	0,18	0,001
Fis	0,02	0,001
Fit	0,20	0,001
Nm	1,20	

Legenda: Fst-coeficiente de diferenciação genética; Fis-coeficiente de endogamia; Fit- índice geral de fixação; Nm- número de migrantes por geração.

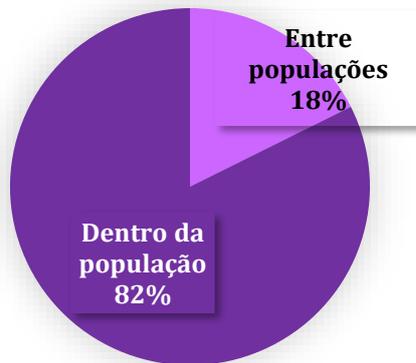


Figura 2. Percentagens de variação molecular dentro e entre as populações de *Lavandula* spp.

Com os resultados da análise de fragmentos foi possível efetuar uma Análise de Componentes Principais (PCA). A Figura 3 representa graficamente a PCA das populações de *Lavandula* spp. As duas componentes explicam 84% da variância.

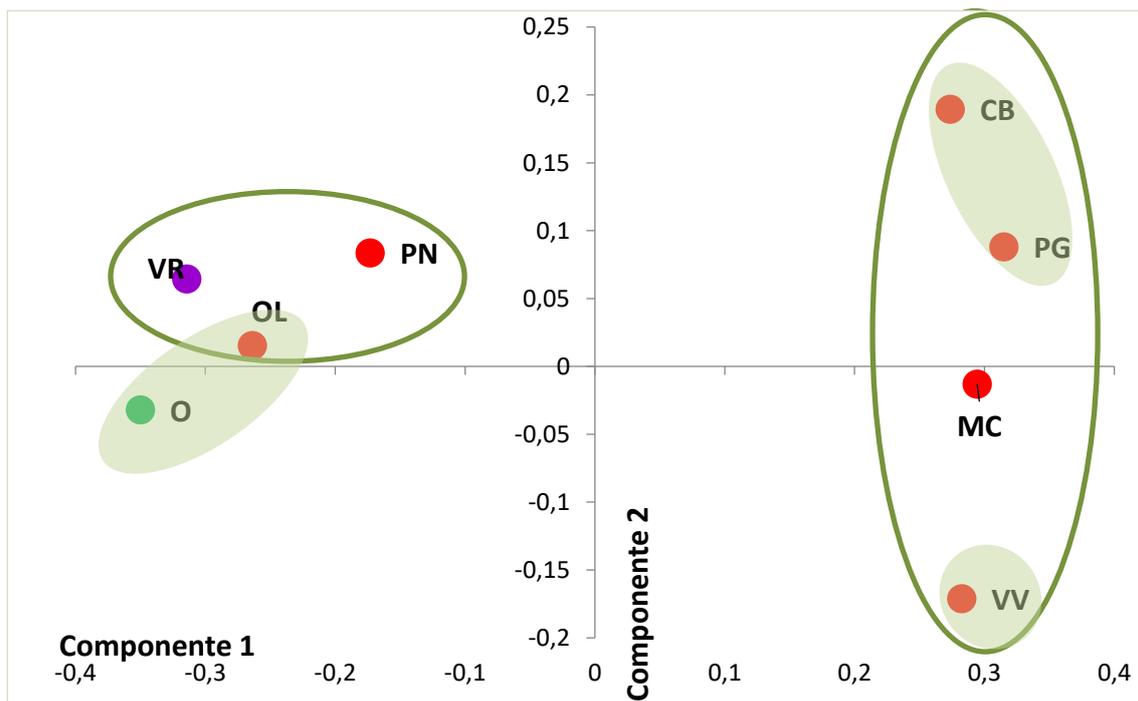


Figura 3. Análise de componentes principais (PCA).

De forma geral todas as populações estão distantes umas das outras, o que reflete a elevada diferenciação genética. A população O (*L. pedunculata*) está desviada de todas as outras, isolada no quadrante esquerdo inferior, sendo a população mais próxima a OL. A população VR recolhida como sendo subsp. *stoechas* surge no grupo de PN e OL, que em termos geográficos também se verificar essa proximidade, no entanto poderá indicar que se trata da subsp. *luisieri* e a identificação morfológica não foi corretamente diferenciadora. Outro aspeto que não podemos descurar é a possível hibridação entre as espécies de *Lavandula*,

nomeadamente entre subespécies. A hibridação entre subespécies simpátricas poderá causar dificuldade em distinguir as subespécies do ponto de vista morfológico. A população VV apesar de parecer criar um agrupamento com os locais MC, CB e PG posicionados do lado direito do gráfico, surge isolada no quadrante direito inferior, o que poderá indicar que se trata de uma população mais degradada. O agrupamento destas populações de *L. stoechas* subsp. *luisieri* pode também estar relacionado com a proximidade geográfica entre os locais. E o mesmo se poderá aplicar para o grupo de PN, VR e OL.

Na Figura 4 está representado o dendrograma usando o método de agrupamento UPGMA partir da matriz de identidade de Nei. Estes resultados corroboram com a PCA, com a formação de dois grupos. Destacando-se a elevada proximidade genética das populações CB e PG, e a notável separação de MC, e VV. No segundo grupo, verifica-se uma maior relação entre as populações de VR e PN, e mais distante, mas ainda próxima relação entre a população de O com a OL.

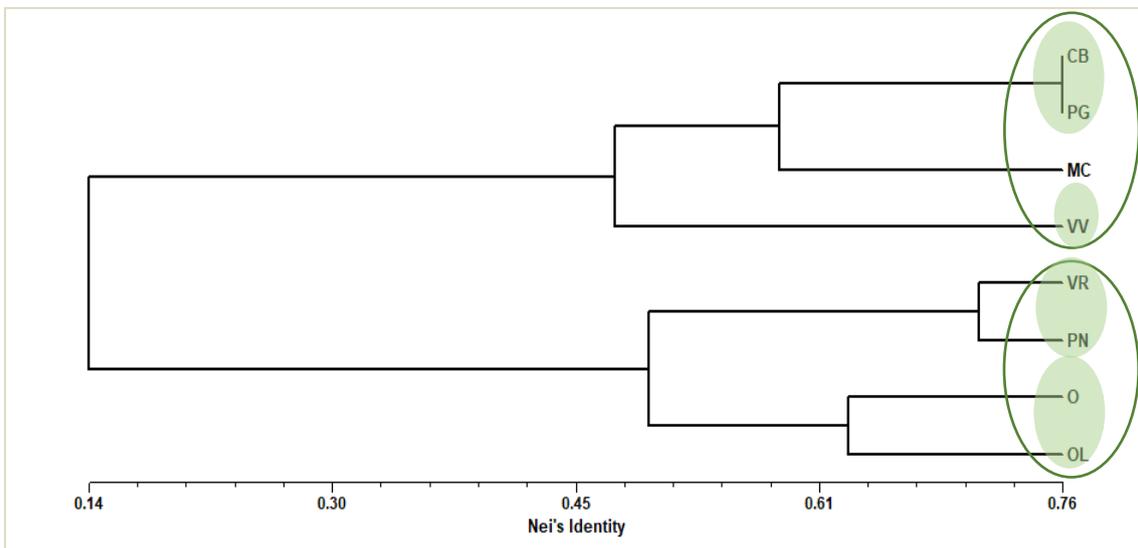


Figura 4. Dendrograma UPGMA.

Conclusões

De acordo com a amostragem de *Lavandula* spp., os resultados estatísticos demonstram que existe uma elevada diversidade genética dentro das populações ($H_e=0,76$) e uma diferenciação genética apreciável entre populações ($F_{st}=18\%$), o que poderá indicar o tipo de reprodução nestas espécies, fecundação cruzada e dispersão de sementes pelo vento. Todas as populações têm alelos privados e apreciável F_{st} , indicando um reduzido fluxo genético entre as populações ($N_m=1,2$) (n° de migrantes por geração). Na Análise de Componentes Principais, pode-se definir dois grupos de populações de *L. stoechas*, sendo que a população O encontra-se mais isolada do seu grupo, o mesmo se verificou na população de VV. A possibilidade de hibridação entre espécies e subespécies também pode influenciar as relações genéticas encontradas, sendo por isso um trabalho futuro a ser aplicado nestas populações.

Referencias bibliográficas

Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

World Health Organization (2003). WHO Guidelines on Good Agricultural and Collections Practices (GACP) for Medicinal Plants. WorldHealth Organization, Geneva.

Adal, A. M., Demissie, Z. A., & Mahmoud, S. S. (2015). Identification, validation and cross-species transferability of novel *Lavandula* EST-SSRs. *Planta*, 241, 987-1004.