

Obtenção e identificação de genes relacionados com a produção e desenvolvimento da cortiça

Atendendo ao lugar de destaque que o sobreiro detém em Portugal e à importância económica da cortiça, o INIAV tem coordenado vários projetos de investigação, para aprofundar o conhecimento sobre a genética desta espécie, como contributo para a avaliação precoce da qualidade do tecido suberoso e seleção juvenil e atempada das árvores boas produtoras.

O sobreiro representa a segunda espécie dominante da floresta portuguesa, ocupando em área cerca de 737 000 ha, com uma contribuição muito relevante para a economia através da produção e transformação da cortiça. Portugal destaca-se como líder mundial do setor da cortiça, com uma média de cerca de 55% da produção mundial (cerca de 100 mil toneladas anuais), cerca de 60% do valor mundial na transformação e também com mais de 900 milhões de euros de exportação anual (ICNF, 2013; APCOR, 2016), o que, por si só, explica a razão do interesse que esta espécie nos merece. Atendendo a este lugar de relevo que o sobreiro detém e à importância económica da cortiça, o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) tem coordenado vários projetos de investigação, sempre convergentes no sentido de aprofundar e contribuir com conhecimento sobre a genética da espécie. Foram alcançadas várias metas importantes e adquirido conhecimento fundamental e básico, nomeadamente no âmbito da identificação da diversidade genética e da obtenção de sequências genómicas, com o objetivo de identificar marcadores moleculares que possam ser utilizados na avaliação precoce da qualidade do tecido suberoso e promover uma seleção juvenil e atempada das árvores boas produtoras.

Em 2009, a Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) financiou uma iniciativa a nível nacional, que ficou conhecida como o “Consórcio de ESTs de Sobreiro” e que incidiu na produção e caracterização de ESTs (Expressed Sequence Tags – Sequências Expressas), de diferentes tecidos e órgãos, em diferentes estádios de desenvolvimento e diferentes condições fisiológicas, para que se conseguisse obter o maior número de sequências. Esta abordagem, denominada transcriptómica, permite identificar os genes expressos e inferir sobre os seus níveis de expressão, durante o desenvolvi-

mento ou em resposta a condições ambientais variadas. No âmbito deste Consórcio, foi criada uma plataforma bioinformática onde estão todos os resultados obtidos nos doze projetos envolvidos, que pode ser consultada no endereço www.corkoakdb.org e que constitui atualmente o maior recurso genómico disponível. Com base nesses resultados foi feita uma análise conjunta que constitui a primeira publicação do consórcio (Pereira-Leal et al., 2014).



Figura 1 – Povoamento de híbridos *Quercus cerris* x *suber* com diferentes níveis de produção de cortiça (foto de Isabel Carrasquinho)

O projeto Sobreiro/0017 – Consórcio de ESTs de sobreiro focou-se na obtenção e identificação de sequências responsáveis pela produção e desenvolvimento da cortiça

Para a realização deste projeto foi selecionado o material vegetal da Mata Nacional do Vimeiro, localizada em Alcobaça. Neste campo experimental existem híbridos de *Quercus cerris* x *suber* e as suas descendências, com cerca de 40 anos de idade e que apresentam diferentes graus de produção de cortiça (Figura 1). Estes híbridos constituem o material vegetal de excelência para estudar os genes associados à formação da cortiça e, por isso, foram selecionados desse povoamento dois tipos de árvores: com e sem produção de cortiça.

Para a obtenção de ESTs é de fundamental

Filomena Nóbrega, Isabel Carrasquinho, Rita Costa . INIAV, I.P.



Ana Margarida Fortes . Instituto de Biossistemas e Ciências Integrativas (BioISI), FCUL

Rita Teixeira . Instituto Superior de Agronomia (ISA)

Tânia Almeida, Sónia Gonçalves . Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Baixo Alentejo e Litoral (CEBAL)

importância determinar quando e em que tecidos os genes de interesse são expressos. Por isso, é necessário considerar uma correta e adequada seleção e conhecimento do período de colheita do material vegetal. No referido projeto, baseámo-nos no saber já existente sobre a formação da cortiça. A cortiça é um tecido vegetal que se forma pela divisão celular de um meristema secundário, denominado felogene ou felogénio ou câmbio subero-felodérmico. Este meristema divide-se para o exterior para formar células que se vão diferenciando como células suberificadas e se vão acumulando para formar a cortiça ou súber, envolvendo o tronco, caules e ramos. O felogénio tem uma atividade sazonal que se desenvolve desde o início da primavera e se prolonga até ao início do outono, interrompendo-se no inverno (Graça e Pereira, 2004; Fortes et al., 2004; Silva et al., 2005).

O felogénio forma-se, aproximadamente, ao fim de poucas semanas de desenvolvimento dos caules jovens de sobreiro e o processo de deposição da suberina, principal constituinte químico da cortiça e da formação da parede celular suberificada, é rápido em caules jovens de sobreiro (Cardoso, 2011).

Para a obtenção dos ESTs, e com base neste conhecimento da formação do felogénio e da cortiça, em caules jovens de sobreiro, das árvores selecionadas foram colhidos ramos do ano, em 2 períodos de crescimento, um no início da primavera (maio) e o outro no início do outono (setembro/outubro) (Figura 2).



Figura 2 – Ramos do ano no início da primavera e no início do outono (fotos de Isabel Carrasquinho)

TABELA 1 – SUMÁRIO DOS RESULTADOS DA PIROSEQUENCIAMENTO OBTIDOS PARA AS BIBLIOTECAS NORMALIZADAS

Bibliotecas normalizadas	Pool 1	Pool 2
N.º de sequências (reads)	604 414	598 094
N.º total de bases (Mbp)	211 616 383	203 136 849
Tamanho médio (bp)	350	340

TABELA 2 – SUMÁRIO DOS RESULTADOS DA PIROSEQUENCIAMENTO OBTIDOS PARA AS BIBLIOTECAS NÃO NORMALIZADAS

Bibliotecas não normalizadas	Pool 1	Pool 2
N.º de sequências (reads)	675 965	543 584
N.º total de bases (Mbp)	262 549 977	191 305 649
Tamanho médio (bp)	389	352

Os ramos foram imediatamente congelados em azoto líquido e, posteriormente, conservados a -80 °C. Subsequentemente, o RNA total foi extraído, separadamente para cada amostra. Para a construção de bibliotecas de cDNA (conjunto de cópias de DNA que representam o conjunto de mRNAs), foram preparadas duas amostras compostas: a amostra 1 (Pool 1) com o RNA das árvores produtoras de cortiça e a amostra 2 (Pool 2) com o RNA das árvores sem produção de cortiça. Para se obter o maior número de ESTs, foram construídas duas bibliotecas normalizadas, para a deteção e identificação de transcritos raros, e duas bibliotecas não normalizadas que permitem indicar quantitativamente os níveis de expressão dos transcritos, mas que não permitem a deteção de transcritos de baixa abundância.

Resultados

A abordagem transcriptómica desenvolvida neste projeto gerou um total de 1 975 404 sequências (reads). Para as bibliotecas normalizadas e para o Pool 1 (árvores com produção de cortiça) obtiveram-se cerca de 211 milhões de pares de bases em cerca de 604 sequências com 350 bp de tamanho médio. Para o Pool 2 (árvores sem produção de cortiça) obtiveram-se cerca de 598 sequências

com tamanho médio de cerca de 340 bp (Tabela 1).

Para as bibliotecas não normalizadas e para o Pool 1 (árvores com produção de cortiça) obtiveram-se cerca de 262 milhões de pares de bases em cerca de 675 reads com 389 bp de tamanho médio. Para o Pool 2 (árvores sem produção de cortiça) obtiveram-se cerca de 543 reads com tamanho médio de cerca de 352 bp (Tabela 2).

A análise de expressão génica, que está em curso, possibilitará agora a identificação de genes e grupos funcionais de genes associados aos tecidos estudados neste projeto. Esses resultados poderão contribuir para o conhecimento de alguns mecanismos moleculares envolvidos na formação da cortiça e os genes encontrados podem ser candidatos para estudos de marcadores a serem utilizados na seleção precoce de árvores produtoras de boa cortiça. ☺

Bibliografia

- APCOR (2016). CORTIÇA EM NÚMEROS. Associação Portuguesa da Cortiça, Information Bureau.
 Cardoso, Maria Sofia Quinha (2011). Caracterização histológica e histoquímica das células suberosas em diferenciação das peridermes do sobreiro e da batata. Tese de mestrado. ISA, Lisboa
 Fortes, M.A.; Rosa, M.E.; Pereira, H. (2004). A Cortiça. IST Press. Lisboa. 259 pp.
 Graça, J.; Pereira, H. (2004). The periderm development in *Quercus suber*. IAWA Journal, Vol. 25 (3): 325 – 335.
 ICNF (2013). Inventário Florestal Nacional, IFN6. Resultados preliminares.
 Pereira-Leal, J.; Abreu, I.; Alabaça, C.; Almeida, M.; Almeida, P.; Almeida, T.; Amorim, I.; Araújo, S.; Azevedo, H.; Badia, A.; Batista, D.; Bohn, A.; Capote, T.; Carrasquinho, I.; Chaves, I.; Coelho, A.; Costa, M.; Costa, R.; Cravador, A.; Egas, C.; Faro, C.; Fortes, M.; Fortunato, A.; Gaspar, M.; Gonçalves, S.; Graça, J.; Horta, M.; Inácio, V.; Leitão, M.; Lino-Neto, T.; Marum, L.; Matos, J.; Mendonça, D.; Miguel, A.; Miguel, C.; Morais-Cecílio, L.; Neves, I.; Nóbrega, F.; Oliveira, M.; Oliveira, R.; Pais, M.S.; Paiva, J.; Paulo, O.; Pinheiro, M.; Raimundo, J.; Ramalho, J.; Ribeiro, A.; Ribeiro, T.; Rocheta, M.; Rodrigues, I.; Saibo, N.; Santos, T.; Santos, A.; Sá-Pereira, P.; Sebastiana, M.; Simões, F.; Sobral, R.; Tavares, R.; Teixeira, R.; Varela, C.; Veloso, M.; Ricardo, P. (2014). A comprehensive assessment of the transcriptome of cork oak (*Quercus suber*) through EST sequencing. BMC Genomics 15:371.

Reid, E.R.; Olsson, N.; Schlosser, J.; Peng, F.; Lund, S.T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. BMC Plant Biology 6:27.

Silva, S.P.; Sabino, M.A.; Fernandes, E.M.; Correlo, V.M.; Boesel, L.F.; Reis, R.L. (2005). Cork: properties, capabilities and applications, International Materials Reviews VOL 50 NO 6. DOI 10.1179/174328005X41168.



CONFERÊNCIAS

LOGÍSTICA & TRANSPORTES HOJE

L & T H

TRANSPORTE DE MERCADORIAS

the road as a service.

18 DE MAIO
Lux Lisboa Park Hotel

www.logisticaetransporteshoje.com

Organização

LOGÍSTICA & TRANSPORTES HOJE

iFE
 INTERNATIONAL FACULTY
 FOR EXECUTIVES
 GROUP
 By ABILWAYS