

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Alberto Nuno Gaspar Cardoso

**CONSERVAÇÃO, PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E
AVALIAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES PARA A CARACTERIZAÇÃO
GENÉTICA DE GERMOPLASMA DE *CYDONIA
OBLONGA* MILL.**

Dissertação no âmbito do mestrado de Biodiversidade e Biotecnologia de Plantas orientada pela Doutora Sandra Isabel Marques Correia e Professor Doutor Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

2022

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
Faculdade de Ciências e Tecnologias
Universidade de Coimbra

Conservação, propagação *in vitro* e avaliação de marcadores moleculares para a caracterização genética de germoplasma de *Cydonia oblonga* Mill.

Alberto Nuno Gaspar Cardoso

Dissertação no âmbito do mestrado de Biodiversidade e Biotecnologia de Plantas orientada pela Doutora Sandra Isabel Marques Correia e Professor Doutor Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer aos meus orientadores Doutora Sandra Correia e Professor Doutor Jorge Canhoto por tudo o que me ensinaram nestes dois anos, pela orientação científica e pela disponibilidade.

Ao Professor Doutor António Pereira Coutinho pela ajuda na recolha de informação sobre a taxonomia e história do marmeleiro. Nesta vertente a bibliografia é relativamente pouca e como tal toda a informação adicional ajudou.

Aos docentes e alunos de doutoramento do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida pela ajuda, em especial a aluna de doutoramento Elsa Baltazar e às técnicas do projeto CULTIVAR, Ana Pedrosa e Tércia Lopes pelo auxílio e conhecimento valioso que me deram ao longo destes dois anos.

À minha família pelo apoio e encorajamento que me deram toda a minha vida.

Ao meu pai António Alberto Cardoso e mãe Ana Paula dos Santos por tudo o que me deram no percurso que foi a minha vida até este ponto.

Índice

1. Resumo	6
2. Abstract	8
3. Contextualização	10
4. Introdução.....	11
4.1 <i>Cydonia oblonga</i>	11
4.2 Usos e importância económica	15
4.3 Diversidade e conservação.....	17
4.4 Objetivos	19
5. Materiais e Métodos	21
5.1 Material vegetal.....	21
5.2 Germinação de sementes.....	22
5.3 Estabelecimento <i>in vitro</i>	27
5.4 Análise estatística	28
5.5 Validação dos marcadores moleculares	29
6. Resultados e Discussão	32
6.1 Germinação de sementes.....	32
6.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	37
6.3 Marcadores moleculares.....	38
7. Conclusão e Perspetivas futuras	41
8. Bibliografia.....	43

1. Resumo

Com as alterações climáticas, na agricultura ter-se-á que adotar uma série de estratégias que atenuem ao máximo o efeito desta ameaça. Uma delas passa pela implementação de culturas alternativas que utilizem espécies mais resilientes perante condições extremas (*e.g.*, longos períodos de seca). *Cydonia oblonga* Mill. constitui um candidato atrativo devido às suas múltiplas aplicações: produção de fruta, produção de porta-enxertos para a propagação de pereiras e para fins medicinais.

Este trabalho realizou-se no âmbito do projeto Cultivar indo ao encontro de um dos seus objetivos que é o de conservação e valorização de variedades de valor económico endógenas da Região Centro. A produção de marmeleiro em Portugal Continental restringe-se aos pequenos produtores e, tendo como objetivo tornar esta espécie mais atrativa para produção, um dos problemas a enfrentar é a falta de diversidade que os produtores têm ao seu dispor de variedades adaptadas ao clima da região.

Para este efeito, nesta tese procurou-se desenvolver ferramentas que permitissem a criação de uma coleção de germoplasma das variedades atualmente utilizadas, que por sua vez, facilitará a concretização de programas de melhoramento. Mais especificamente avaliaram-se: (1) protocolos de germinação de sementes de marmeleiro, (2) protocolos de estabelecimento *in vitro*, e (3) um conjunto de marcadores moleculares, SSRs, capazes de identificar e caracterizar diferentes cultivares.

Os ensaios de germinação de sementes não só confirmaram a necessidade de baixas temperaturas para quebrar a dormência como também mostraram que o substrato mais adequado para o efeito é o de areia humedecida. Adicionalmente, verificou-se que as sementes da variedade “Galega” atingiam uma taxa de germinação considerável (77%) mais rapidamente quando colocadas a germinar na primavera (1º ensaio) comparativamente aquelas que foram colocadas no inverno (2º ensaio) que só atingiram uma taxa similar (76%) após 3 meses em estratificação.

Relativamente ao estabelecimento *in vitro*, dos protocolos de esterilização testados, nenhum se adequou ao material proveniente de estacas devido a elevada taxa de contaminação obtida (>90%). Quanto aos germinantes resultantes de sementes, o protocolo testado produziu uma taxa baixa de contaminação de 25%. No entanto, a amostra não foi grande o suficiente para a sua validação.

Os primers SSR amplificaram com sucesso DNA do germoplasma alvo de estudo, faltando apenas averiguar se permitem a distinção entre cultivares diferentes.

Palavras-chave: *Cydonia oblonga* Mill.; conservação; germinação; micropropagação; SSRs

2. Abstract

Climate change poses a threat to agricultural systems and thus creates a necessity for the adoption of strategies that may reduce its effects. One of these strategies consists in the transition to the production of species more resilient and therefore capable of handling extreme weather conditions (*e.g.*, severe drought). *Cydonia oblonga* Mill. is an attractive option due to its many uses such as fruit production, rootstock for the production of pear and its pharmacological potential.

This study was carried out under the framework of the project CULTIVAR by contributing to one of its main objectives, which is the conservation and valorization of endogenous genetic resources with economical value to the Center region of Portugal. In our country, quince production is undertaken almost solely by small producers and, since one of the final goals is to increase its value for production, one of the problems that needs to be tackled is the small diversity of varieties adapted to the region's climate available to the producers.

Accordingly, this study was focused on the development of a set of tools that facilitated the creation of a collection of germplasm, composed mainly by the varieties which are being used, which in turn would lead to the implementation of breeding programs. More especially, the development of: (1) protocols for the germination of quince seeds, (2) protocols for micropropagation and a (3) the use of molecular markers, SSRs, that would allow the identification and characterization of different varieties

Seed germination experiments not only confirmed the chilling requirement for dormancy breaking in quince seeds but also showed that stratification on wet sand was the best option of those tested. Additionally, it was found that seeds from the "Galega" variety reached a high germination rate (77%) in just 1 month in the first study that occurred in the spring. In comparison, the second study that occurred in the winter reached similar rates (76%) only after 3 months of stratification.

With respect to micropropagation, the sterilization protocols tested on shoot-tips obtained from young shoots proved to not be adequate for the materials tested, since the contamination rate was high (>90%). When shoot-tips from germinating seeds were tested for *in vitro* establishment, the levels of contamination were relatively low (25%).

However, the number of explants tested was too small to obtain solid conclusions. The testing of the chosen multiplication medium was strongly hampered by the lack of success of the sterilization protocols and thus no conclusions could be made at the time.

The primers used to find SSRs markers, were able to amplify the DNA. The next step would be ascertaining its capabilities in varieties identification.

Keywords : *Cydonia oblonga* Mill. ; conservation ; germination ; micropropagation ; SSRs

3. Contextualização

O trabalho realizado ao longo desta tese insere-se no Projeto Cultivar (<https://icultivar.pt/>) contribuindo os seus resultados para um dos objetivos, nomeadamente a conservação e a valorização de recursos genéticos endógenos da Região Centro. Um desses recursos é o marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), uma cultura que em Portugal é principalmente direcionada para a produção de fruta, mas que também é aplicada para a produção de porta-enxertos para a propagação tanto de pera como de maçã.

Para além do seu valor comercial, devido às qualidades anteriormente referidas, o fruto do marmeleiro possui diversas aplicações na medicina popular que, juntamente com o fato de estar adaptado ao clima de Portugal Continental, torna esta espécie uma candidata atrativa como cultura alternativa em determinadas regiões. A sua produção encontra-se atualmente restringida a pequenos produtores que têm identificado determinados obstáculos que condicionam a produtividade e que precisam de ser ultrapassados. A produção de frutos de excelente qualidade está limitada em parte por sistemas de produção de certa forma inadequados, como também devido ao leque limitado de cultivares disponíveis, que estejam adaptados às condições edafo-climáticas da região, para utilização por parte dos produtores.

Assim, é necessária uma caracterização morfológica, fisiológica e molecular efetiva dos cultivares atualmente a serem utilizados na produção que permita a identificação de parâmetros fisiológicos e genéticos com potencial de valorização. Para concretizar este objetivo será necessário o estabelecimento de uma coleção de germoplasma destas variedades de modo a facilitar o processo e, eventualmente, reunir as condições necessárias para obtenção de novas variedades através de programas de melhoramento. O trabalho realizado ao longo desta tese teve como objetivo dar os primeiros passos para o estabelecimento e caracterização desta coleção.

4. Introdução

4.1 Características gerais e distribuição geográfica

Cydonia oblonga Mill. é a única espécie do género *Cydonia*, pertencente à família Rosaceae da qual também fazem parte outras pomóideas como a macieira (*Malus* sp.) e a pereira (*Pyrus* sp.). O marmeleiro pode crescer como um arbusto ou então apresentar um porte arbóreo que pode atingir os 8 m. As folhas são ovadas a oblongas com uma largura de 5 cm a 10 cm de comprimento. Possui flores brancas, solitárias, com 4-5 cm de comprimento, cada uma com 5 pétalas, 20 ou mais estames, 5 estiletos e um ovário inferior com 5 lóculos, cada um com múltiplos óvulos. O fruto é um pomo de múltiplas sementes, fragante e cujo tamanho varia de variedade para variedade. A sua forma pode ir desde piriforme até maliforme, consoante a variedade em questão, sendo a polpa amarelada. A floração decorre desde meados de abril e durante a primavera, onde em certos casos podem aparecer flores em junho e a frutificação ocorre entre setembro-outubro. Todas as variedades são autopolinizáveis (Meech, 1888; Postman, 2009).



Figura 1 - Marmelos da variedade 'Galega'.

Existe a ideia generalizada de que o marmeleiro é uma árvore que, mesmo deixada ao abandono, sobrevive em qualquer lugar em que esta seja plantada e sem grandes cuidados de condução (Burbank, 1914). Esta crença é parcialmente verdadeira, já que o marmeleiro é, na verdade, uma espécie rústica. No entanto, mesmas espécies de grande rusticidade necessitam de cuidados agrícolas para potenciar a sua produtividade. Por exemplo, verifica-se que o marmeleiro tem uma grande adaptabilidade a diferentes tipos de solos, mas as melhores condições de cultura são em solos arenosos e ligeiramente

ácidos (Meech, 1888; Postman, 2009; Hunter & Dunster, 2015). Quanto às condições climáticas, o marmeleiro encontra-se adaptado a climas quentes e secos no verão, e consideravelmente frios no inverno, o que permite a esta espécie competir vantajosamente em climas agrestes como os que se verificam em grande parte das zonas interiores do nosso país. Tal como acontece em muitas espécies, o marmeleiro durante o inverno, entra num estado de dormência, reduzindo consideravelmente o seu metabolismo. Alterações na duração e/ou intensidade deste período de frio tem implicações no desenvolvimento na planta e neste caso mais em específico no marmeleiro (Hunter & Dunster, 2015).

A proximidade genética do marmeleiro com a macieira e a pereira é comprovada pela existência de híbridos intergenéricos. Um exemplo é \times *Pyronia veitchii* (Trab.) Guillaumin, um híbrido estéril obtido entre *Pyrus communis* L. e *Cydonia oblonga* Mill. em 1913 (Trabut, 1916). Nas últimas décadas, este híbrido tem sido utilizado por patologistas de árvores de fruto que utilizam a sua suscetibilidade na deteção de alguns vírus que atacam pomóideas (Menzel et al., 2002; Myrta et al., 2004). Um segundo exemplo é um híbrido entre marmeleiro e a pereira japonesa (*Pyrus pyrifolia*) obtido no Japão (Postman, 2009). Um outro caso de hibridização é um alegado híbrido do marmeleiro com a macieira, denominado de *Cydomalus*, considerado uma opção interessante como porta-enxerto no que toca à produção de maçã e de pera (Wertheim, 2002).

Dos oito centros de origem das espécies cultivadas de maior importância descritos por Vavilov, o marmeleiro encontra-se associado ao quarto centro de origem, que se localiza na região do Próximo Oriente. Esta região engloba o interior da Ásia Menor, Transcaucásia, Irão e os planaltos do Turquemenistão (Vavilov, 1951). Com base na presença de variedades selvagens, duas áreas mais restritas foram sugeridas: uma região a oeste do Mar Cáspio que vai desde o Daguestão a Talysh (Khoshbakht & Hammer, 2005) e uma região a norte do Irão (Zohary et al., 2012).



Figura 2 - Regiões propostas por Khoshbakht & Hammer (2005) e Zohary et al. (2012), a verde e a laranja, respetivamente, para a origem do marmeleiro selvagem.

A domesticação de certas espécies de árvores de fruto, entre as quais o marmeleiro, realizou-se entre 5000-3000 a.C. pelos agricultores neolíticos após terem tido algum sucesso com a domesticação dos cereais (Brunn, 1963). O marmeleiro, com o tempo ganhou popularidade e, pelo estudo de duas tábuas de fortificação de Persopolis PFa 1:3 e PFa 33, sabe-se que não só era conhecido na altura do império persa (550–330 a.C.) como também já possuía um certo prestígio, uma vez que era plantado em jardins reais (Halock, 1978; Briant, 2002). Mais tarde, a expansão do marmeleiro para a bacia do Mediterrâneo deu-se pela região oriental, parcialmente pelas incursões de Alexandre, o Grande (Janick, 2010). A orientação da expansão é suportada pelo facto de o nome do género *Cydonia* ter origem no nome de uma cidade antigamente denominada Kydonia ou Cydonia (agora Chania), localizada na ilha de Creta, um dos grandes produtores na altura (Hunter & Dunster, 2015). Com a introdução do marmeleiro, primeiramente na Grécia antiga e, ulteriormente, no Império Romano através das colónias gregas, este tornar-se-ia popular nas duas culturas e os seus usos e costumes associados eram similares entre ambas. Os árabes foram também em parte responsáveis pela sua propagação na região (Brunn, 1963).

Desde cedo, o seu potencial na área da medicina foi reconhecido, estando este descrito por autores clássicos como Plínio, o Ancião (Rackham, 1960; Rackham, 1961; Jones, 1966; Jones, 1969) e Columella (Forster & Heffner, 1954). O marmelo, nessa época, seria utilizado para tratar problemas ao nível do fígado, baço, úlceras, etc. Um exemplo é um remédio denominado de “Oporice”, do qual o marmelo era um dos componentes, e que era utilizado para tratar problemas do estômago e disenteria (Jones, 1966). O marmelo era de tal forma popular que tanto podia ser encontrado a adornar e a perfumar as divisões da casa de aristocratas romanos (Brunn, 1963), como ser utilizado em cerimónias solenes, como por exemplo casamentos. Neste último caso era costume atirar marmelos aos noivos à medida que estes seguiam para a sua nova casa e era frequente presentear a noiva com um marmelo, existindo a superstição de que este ato favorecia a sua fertilidade.

De acordo com Brunn (1963) a expansão do marmeleiro para o centro e noroeste da Europa ocorreu por volta do século XIII com as Cruzadas. Schneider (1900) e Hunter & Dunster (2015) salientam que Carlos Magno (742-814 AD) foi fundamental na popularização do marmeleiro na Alemanha. No entanto, Buttner (2001) refere que a introdução do mesmo na Europa Central ocorreu depois do século IX. Alguns dos costumes associados ao marmelo manter-se-iam durante a Idade Média. Por exemplo, era frequente, no final das refeições, o consumo de pratos com marmelos incorporados, não só pelo simples facto de serem deliciosos como também, juntamente com gengibre, serem preciosos auxiliares da digestão. Adicionalmente, era atribuído um poder afrodisíaco à marmelada e, por isso, era consumido com amêndoas para promover fertilidade.

A introdução do marmeleiro na América do Norte foi levada a cabo por colonos europeus em 1629. Mais uma vez, tornou-se popular e chegou ao ponto de, no espaço de umas décadas, a sua cultura rivalizar com as da macieira e pereira (Brunn, 1963). A sua expansão para a América do Sul deveu-se em parte das populações já estabelecidas a norte e em determinados casos o marmeleiro foi introduzido diretamente por colonos espanhóis e portugueses (Hunter & Dunster, 2015). A norte, o marmelo era utilizado para fazer tartes, manteiga entre outros cozinhados (Brunn, 1963), enquanto a sul, o clima mais quente levava a que os marmelos pudessem ser consumidos crus (Hunter & Dunster, 2015). No auge dos Descobrimentos, o marmeleiro viria a ser introduzido noutras regiões: África do Sul, Bombai, Austrália, Nova Zelândia e Japão pelos britânicos; México, Chile e outros países da América Latina pelos portugueses e espanhóis (Brunn, 1963).

Contrastando com a popularidade que o marmelo tem vindo a usufruir desde então, por volta do século XIX, começou a entrar em desuso (Hunter & Dunster, 2015). Esta tendência prolongou-se até ao início do século XX, cuja principal causa é atribuída ao facto do consumidor preferir frutas, como a maçã e a pera que pudessem ser usufruídas sem investir grandes quantidades de trabalho e tempo tal como acontece com o marmelo (Postman, 2009). O cultivo de marmeleiro diminuiu de tal forma que Janick (2010) agrupou-o juntamente com outros frutos que sofreram um processo de “reverse domestication” (frutos que eram amplamente cultivados, mas que posteriormente entraram em desuso). No final do século XX e inícios do século XXI, houve uma ressurgência na produção de marmelo, de tal forma, que num espaço de 20 anos (2000-20) quase que duplicou e em 2020 era de 696,861 toneladas segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO (<https://www.fao.org/faostat/en/#home>).

4.2 Usos e importância económica

O marmelo apresenta uma polpa rígida e um sabor adstringente o que torna pouco apelativo para consumo em fresco. No entanto, em regiões quentes da Ásia Central, Médio Oriente e América do Sul os frutos maduros apresentam características organolépticas que os tornam mais apelativos para o consumidor (Hunter & Dunster, 2015). Por melhoramento convencional, determinadas variedades foram criadas capazes de produzir frutos que são semelhantes à maçã e à pera em termos de consistência da polpa. Por exemplo, Plínio (Rackham, 1960) descreveu o marmelo Mulviano, uma variedade resultante da enxertia de duas outras variedades de marmeleiro que produzia frutos de sabor e paladar agradáveis para consumo em fresco. Outro exemplo de melhoramento, mais recente, surge no final do século XIX com as experiências de Lutherbank que, reconhecendo a negligência por parte dos horticultores de que o marmeleiro era alvo, procurou a criação de variedades que remediassem o problema do marmelo. 'Van Deman' e 'Child's quince' são exemplos do seu sucesso no que toca ao melhoramento do marmelo, mas a variedade 'Pineapple' destaca-se ao apresentar um fruto que, quando totalmente maduro, pode ser consumido cru (Burbank, 1914).

Para além do fruto, o marmeleiro tem um papel importante na produção de pera europeia (*Pyrus communis* L.), pois constitui umas das escolhas mais populares de porta-

enxerto para aquela espécie fruteira (Webster, 1997; Wertheim, 2002). A enxertia consiste na inserção de um enxerto, nomeadamente o genótipo que se pretende propagar, num porta-enxerto que fornece o sistema radicular. Esta técnica permite a obtenção de indivíduos fenotipicamente diferentes comparativamente a situações onde a planta é propagada por pé franco. Apesar de muitas interações enxerto-porta enxerto serem ainda fisiologicamente pouco claras, o facto é que certas combinações geram resultados interessantes em termos de produtividades (Webster, 1995; Martínez-Ballesta et al., 2019).

Apesar destes dados, a utilização do marmeleiro como porta-enxertos tem algumas limitações. Uma delas está relacionada com a incompatibilidade do marmeleiro com vários cultivares de pera europeia, muito populares em diversos países. Este problema pode ser resolvido em determinadas situações com recurso a um “interstock”, um pedaço de um terceiro cultivar compatível, tanto com o enxerto como o porta-enxerto. Outros problemas consistem em: pobre resistência ao frio; pobre ancoragem; tolerância a solos alcalinos. Esforços a nível mundial com o intuito de produzir novos cultivares que colmatem os problemas referidos anteriormente não têm encontrado muito sucesso, em parte porque os mesmos não conseguem competir em termos de performance com os já estabelecidos e também dado a reticência do mercado perante a introdução de novos cultivares. (Webster, 1996; 1997).

É do interesse de qualquer produtor economizar nos custos de produção enquanto procura maximizar o seu lucro. No caso da produção de pera, a modernização da mesma passa pela sua transição para sistemas de produção de elevada densidade ou HDP (“High Density Planting”). Neste tipo de sistemas recorre-se ao uso de porta enxertos ananizantes (dwarfing), os quais, como o nome indica, provocam a redução das dimensões a parte aérea resultante do enxerto. Isto permite uma colheita de frutos mais eficaz, que se traduzirá numa redução nos custos de mão-de-obra para o produtor. Além disso, verifica-se uma maior precocidade na produção e, em muitos casos, a qualidade dos frutos é superior (Maas, 2008). Ao contrário do caso da maçã, cuja produção têm ao seu dispor um leque variado de variedades de porta-enxerto para uma série de condições diferentes, a pera usufrui de uma seleção mais limitada (Webster, 1997).

O fruto contém pectina, agente gelificante responsável pelo uso do marmelo na preparação de marmeladas, geleias, etc. e contém vitamina C, sais minerais (fósforo, cálcio, potássio, sódio e nitrogénio). A presença de ácidos cafeicos (ex.: ácido 5-O-

cafeoilquínico) e de flavonoides (quercetrin, kaempferol e rutina) explica a atividade antioxidante tanto do fruto como das folhas. Propriedades medicinais exibidas por diferentes partes do marmeleiro e documentadas até agora estão indicadas na Tabela 1 (Al-Snafi, 2016; Ashraf et al., 2016).

Tabela 1 - Propriedades medicinais associadas a diferentes partes do marmeleiro

Fruto	Antibacteriano, antifúngico, antioxidante, anti-inflamatório, desordens do sistema gastrointestinal (ex. doença inflamatória intestinal ou DII), tratamento contra o cancro, efeito afrodisíaco
Folhas	Antibacteriano, antifúngico, antioxidante, anti-inflamatório, prevenção de aterosclerose, tratamento contra o cancro, atenuação de dano provocados por radiação UV, proteção de espermatogénese e de tecidos renais, tratamento de água industriais
Sementes	Antibacteriano, antifúngico, antioxidante, antidiarreico, sarar feridas, tratamento contra o cancro, tratamento de problemas respiratórios

4.3 Diversidade e conservação

As alterações climáticas ameaçam a integridade dos sistemas agrícolas atuais, através do aumento da frequência de eventos climáticos extremos como chuvas intensas ou ondas de calor elevado (Change, 2007). Tal como no resto do mundo, Portugal não é exceção, estando previsto um aumento até 2100 da temperatura máxima de verão de 3 °C na zona costeira e 7 °C no interior, juntamente com uma redução prevista de 20-40% de precipitação anual em Portugal Continental (Santos & Miranda, 2006). O impacto deste fenómeno irá ter repercussões na biodiversidade de tal magnitude que, tendo em conta a maioria dos modelos utilizados para prever o seu desenrolar, no pior dos casos poderemos vir a assistir ao sexto evento de extinção em massa do nosso planeta (Bellard et al., 2012).

Para os sistemas de produção irem ao encontro das necessidades de uma população crescente, a eficiência destes têm de continuar a aumentar, apesar da diminuição na produtividade nestes imposta pelas alterações climáticas. Uma das ferramentas para atingir esse objetivo são programas de melhoramento e a “matéria-prima” destes reside na variação genética de cada espécie. *Landraces* (variedades adaptadas a condições locais e que possuem valor cultural ou histórico) e *crop wild*

relatives (CWRs, espécies aparentadas com as que são cultivadas) são fontes dessa variação genética e que têm sido substituídos por culturas intensivas mais homogêneas no que toca à diversidade genética. Este sistema, a longo prazo, não é viável e preocupações sobre a conservação destes recursos genéticos já surgiam na segunda metade do século XX (Bennett, 1968).

Determinadas espécies atualmente pouco utilizadas estão a ser alvo de um interesse renovado, principalmente pelo seu elevado potencial de valorização. Seja para produção de fruta, como cultura alterna ou pela possibilidade de se encontrarem novos compostos naturais com propriedades medicinais, o interesse pela conservação de germoplasma destas espécies tem aumentado nas últimas décadas (Bellini & Giodarni, 2000). O marmeleiro insere-se neste grupo e já foi alvo de esforços dessa natureza e atualmente existe em várias coleções/bancos de germoplasma a nível mundial. Algumas dessas coleções encontram-se na Índia (Dhillon & Rana, 2004), Irão (Amiri, 2006; Abdollahi et al., 2013), Turquia (Sykes, 1972; Bayazit et al., 2011), Turquestão (Vitkovskii & Denisov, 1991), Ucrânia (Zaurov et al., 2005), Reino Unido (<http://www.nationalfruitcollection.org.uk/index.php>), Grécia (Ganoupoulos et al., 2011), Itália (Scaramuzzi, 1957) América (McGuinnis, 2007) e Portugal (<http://www3.uma.pt/isoplexis/>).

As coleções *ex situ* permitem a conservação da diversidade genética em locais fora do habitat natural da planta cujo germoplasma se pretende conservar. A grande maioria do germoplasma conservado neste tipo de coleções encontra-se sob a forma de sementes (FAO, 2010) e, para além de conservação, estas podem a certa altura ser utilizadas na reintrodução de espécies ameaçadas (Cochbrane et al., 2007) ou então para programas de melhoramento (Lamkey & Lee, 2006).

No caso do marmeleiro, tanto em coleções já estabelecidas como no início da criação de novas, têm sido empregues marcadores genéticos com o objetivo de se fazer a distinção dos diferentes cultivares possibilitando não só encontrar possíveis redundâncias no germoplasma (ex. criadas por identificação incorreta) como a criação de árvores fenológicas (Yamamoto, 2004; Bassil, 2015). Nesta espécie já foram utilizados marcadores do tipo: “Sequence-related amplified polymorphism” ou SRAPs (Pinar et al., 2016), “randomly amplified polymorphic DNA” ou RAPDs (Bayazit, 2011; Orhan et al., 2014; Sharma, et al., 2016), “Amplified Fragment Length Polymorphism” ou AFLPs (Manica-Berto et al., 2013; Topcu et al., 2015), “Inter Simple Sequence Repeats” ou

ISSRs (Ganopoulos et al., 2011; Sharma, H., Sharma, P., & Sharma, R., 2016) e “Simple Sequence Repeats” ou SSRs (Yamamoto et al., 2004; Dumanoglu et al., 2009; Halász et al., 2009; Bassil et al., 2011; Xuan, Spann & Neumuller, 2013; Yuksel et al., 2013; Khoramdel et al., 2013; Abdollahi et al., 2013; Bassil et al., 2015; Güney et al., 2019).

Os mais utilizados são os SSRs (Simple Sequence Repeats) ou microssatélites, pequenas sequências de DNA (1-6 pb) repetidas em tandem que podem ser encontradas em todos os genomas dos eucariotas. Coloca-se a hipótese que estas sequências repetitivas possuem um papel na regulação do genoma uma vez que algumas delas são elementos estruturais dos telómeros e centrómeros. O facto de determinados microssatélites servirem de local de ligação para proteínas nucleares (fatores de transcrição) e outros codificarem aminoácidos que fazem parte de fatores de transcrição reforça essa teoria (Weising et al., 2005). Uma característica destes microssatélites é que, dentro de uma população, frequentemente apresentam polimorfismo associado ao seu tamanho. Nomeadamente num mesmo *locus*, o número de repetições irá variar devido a mutações levando a que possam ser distinguidos por eletroforese e consequentemente, se realize a genotipagem de múltiplos indivíduos (Idrees & Irshad, 2014).

O processo em si envolve um par de primers de PCR, específicos para um determinado locus, que se irão ligar durante o PCR às sequências flanqueadoras dos microssatélites. De seguida, após a amplificação, os produtos de PCR ou bandas serão separados por eletroforese e finalmente visualizados por autoradiografia ou fluorometria. Uma das suas maiores desvantagens reside no facto de que para a sua utilização, é necessária informação sobre as sequências flanqueadoras referidas anteriormente (Weising et al., 2005). Uma alternativa é a utilização de marcadores empregues em outros *taxa* relacionados e, no caso do marmeleiro, Yamamoto (2004) foi o primeiro ao testar marcadores derivados tanto da macieira como da pereira na sua capacidade de identificar diferentes cultivares.

4.4 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi a criação de ferramentas que possibilitassem a conservação e a caracterização de germoplasma de cultivares de

marmeleiro atualmente utilizados em território nacional. Para a sua concretização foram estabelecidos objetivos mais específicos:

- Estabelecimento de protocolos de germinação de sementes de *C. oblonga*;
- Definição de protocolos para estabelecimento *in vitro* de germoplasma em boas condições fitossanitárias;
- Pesquisa e avaliação de um conjunto de SSRs para a realização de futuros ensaios de seleção varietal em *C. oblonga*.

5. Material e Métodos

5.1 Material vegetal

Todo o material vegetal utilizado nos ensaios foi recolhido de pomares georreferenciados da região da Beira Interior no âmbito do projeto Cultivar (<https://icultivar.pt/>). A sua localização encontra-se indicada na Figura 3. De cada variedade amostrada foram marcadas em campo aleatoriamente 5 árvores das quais se colheram os frutos e os ramos. As variedades das quais se recolheu material e a sua localização encontram-se sistematizadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Lista dos pomares georreferenciados, variedades presentes em cada um e os respetivas amostras colhidas.

Localização	Variedades
Quinta Branca (40.35793, -7.37699)	'Galega' (sementes – “Galega”; estacas – “G”) 'Portugal' (sementes – “QB PT” e “Portugal”; folhas – “QB1-5”)
Quinta das Naves (40.35793, -7.37699)	'Galega' (sementes – “QN GA”; folhas – “QN1-5”)
Quinta das Rasas (40.25147, -7.42574)	'Portugal' (sementes – “UNI PE”) 'Gigante de vranja' (sementes – “UNI MA”)
Enxabarda (40.10083, -7.62199)	'Champion' (sementes – “CV1”; estacas – “E”) 'Espanhola' (estacas – “M”) 'Gigante de vranja' (sementes – “CV3”; estacas – “P”)

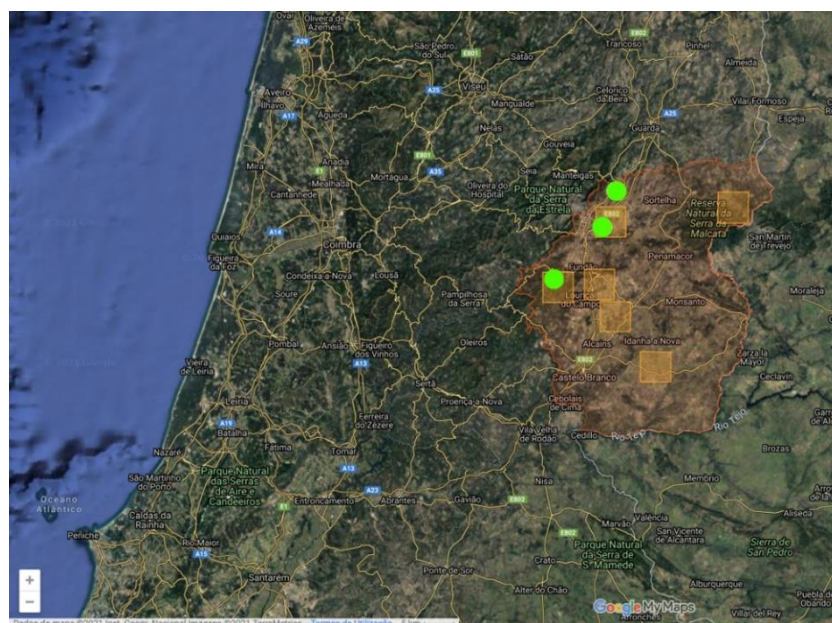


Figura 3 - Georreferência dos pomares de marmeleiros da região da Beira interior que participam no projeto Cultivar.

Cada um dos círculos a verde representa a sua localização de Norte para Sul: Quinta Branca e Quinta das Naves (40.35793, -7.37699); Quinta das Rasas (40.25147, -7.42574); Enxabarda (40.10083, -7.62199).

5.2 Germinação de sementes

Num ensaio preliminar, foram testadas 4 variedades: “QN GA” da Quinta das Naves; “QB PT” da Quinta Branca; “UNI MA” e “UNI PE” da Quinta das Rasas. A colheita dos frutos foi realizada em 2020 e foram armazenados no frio (a 4 °C) até à altura do seu processamento. Este processo consistiu na remoção das sementes dos frutos (Fig. 4A), a sua lavagem em água corrente, auxiliada com um passador de modo a remover poeiras e potenciais organismos que possam pôr em causa a sua integridade (Fig. 4B) e foram deixadas à temperatura ambiente e sem incidência de luz solar (Fig. 4C). Quando secas, as sementes foram armazenadas em envelopes de papel devidamente marcados que por sua vez foram guardados num local seco e escuro à temperatura ambiente (Fig. 4D).

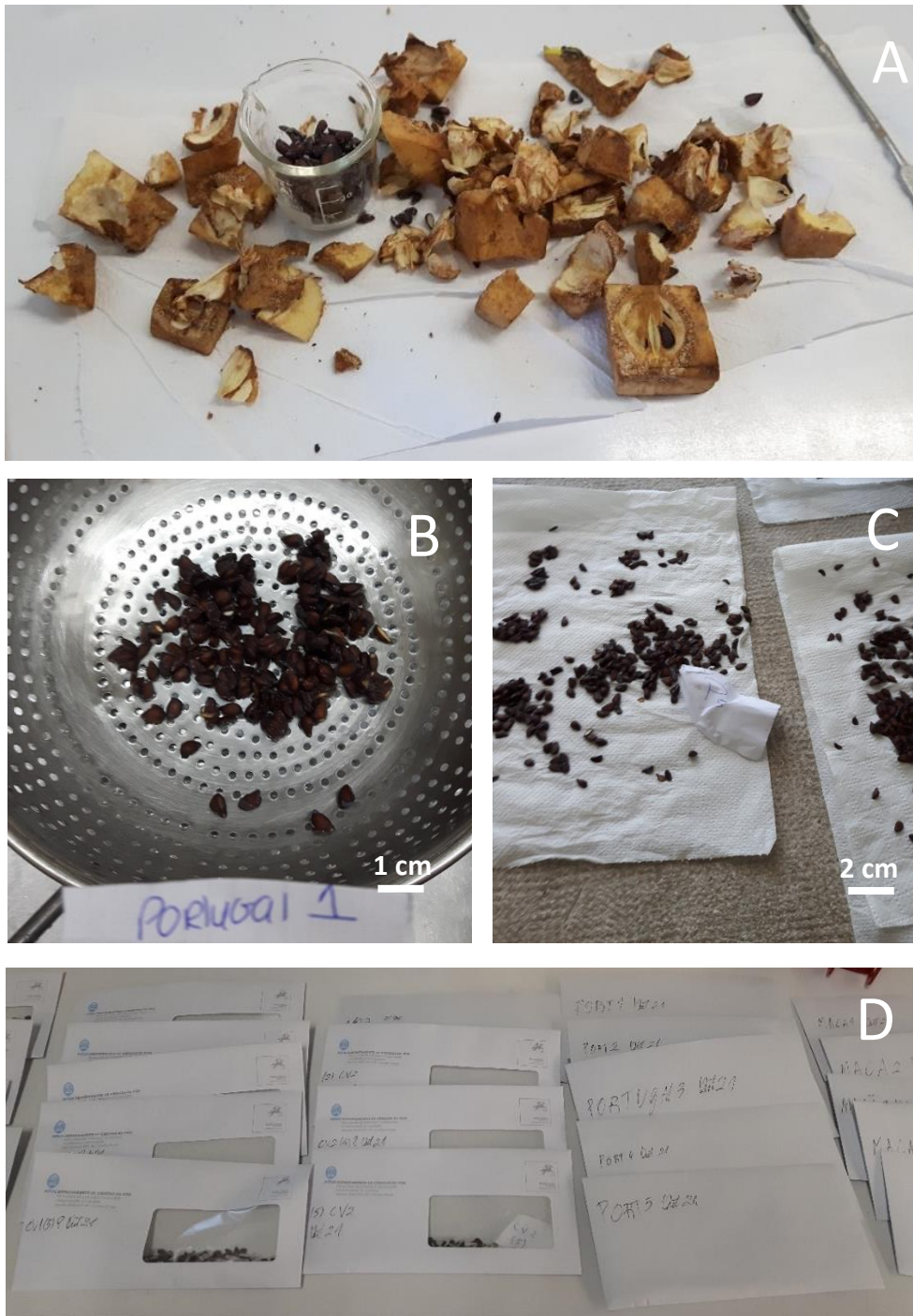


Figura 4 - Fases do processamento das sementes de marmeleiro: remoção dos frutos (A); lavagem (B); secagem (C); armazenamento (D).

Para este ensaio foram selecionadas aleatoriamente 100 sementes de cada variedade que primeiramente foram submersas em água destilada durante 24h e, de seguida, tratadas com uma solução 1% (p/v) de fungicida (Aliette® Bayer) durante 1 min. e, por último, distribuídas por frascos de vidro. Cada um destes frascos estava cheio até metade do seu volume (aproximadamente 20 ml) com areia da praia fluvial do Rebolim, Coimbra (40.1796, -8.4170) previamente autoclavada (Fig. 5A). A distribuição das sementes foi feita de forma que para cada variedade fossem feitas 5 réplicas/variedade, onde cada uma continha 20 sementes (Fig. 5B). Antes de prosseguirem para o frio as sementes foram humedecidas com aproximadamente 10 ml de água destilada previamente autoclavada. Os frascos foram colocados no escuro, a baixas temperaturas (4 °C), durante 3 meses, exceto quando atingiam taxas de germinação de >70%. Nestas situações o material vegetal era encaminhado para testagem de protocolos de propagação *in vitro*.

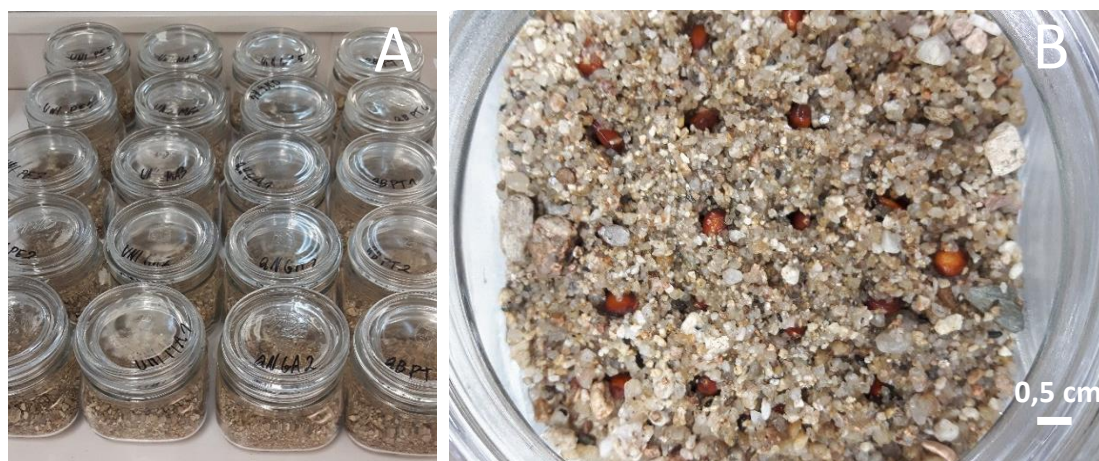


Figura 5 - Frascos de vidros com areia autoclavada (esquerda) e uma representação do interior de cada um desses frascos após a distribuição das sementes (20) pelos mesmos (direita).

Ao fim de 1, 2 e 3 meses foi calculada a taxa de germinação para cada réplica através da seguinte equação: taxa de germinação = nº de sementes germinadas/nº de sementes no total x 100%. As sementes foram consideradas como germinadas assim que se observasse a emergência da radícula (no mínimo 2-3 mm) (Fig. 6) ou quando os germinantes já apresentavam os cotilédones verdes (as primeiras folhas de uma planta de um ponto de vista funcional).



Figura 6 - Exemplo de uma semente em processo de germinação pela observação do grau de desenvolvimento da radícula.

Em paralelo foi realizado um teste de viabilidade com tetrazólio com o intuito de observar a viabilidade das sementes. Neste teste utiliza-se o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT), uma substância incolor que, pela atividade de desidrogenases, durante a glicólise e o ciclo de Krebs é metabolizado em Trifenilformazan. Este composto, por sua vez, apresenta uma cor vermelha e uma vez que não se consegue difundir pelas células, ao contrário do TCT, e assim é possível observar pela coloração vermelha as células metabolicamente ativas.

O protocolo foi baseado no descrito em (Neto, Krzyzanowski e Costa, 1998). Foram selecionadas aleatoriamente 25 sementes de cada variedade do ensaio de germinação que posteriormente foram submersas em H₂O destilada a 25 °C durante 24h. Após a sua hidratação, foram feitas incisões na testa de modo a facilitar a difusão do TCT, e de seguida foram tratadas com uma solução de 0.075% de TCT na qual se mantiveram durante 150 minutos a 35 °C. Por último, as sementes foram lavadas com água destilada e procedeu-se à sua observação com recurso a uma lupa. As sementes utilizadas como controlo tinham origem naquelas que estavam armazenadas nos envelopes de papel e que eram selecionadas e tratadas com TCT da mesma forma que as que vinham do ensaio de germinação.

Um segundo ensaio de germinação foi realizado mais tarde com sementes das variedades “Galega”, “Portugal”, “CV1” e “CV3” recolhidas em 2021. Tanto o seu processamento, como desinfeção, foram realizados da mesma forma que no primeiro ensaio exceto que desta vez foram utilizados recipientes de plástico com 50 ml de areia

e, da mesma proveniência e também previamente autoclavada, caixas de Petri com algodão e papel de filtro. Adicionalmente foi testada uma segunda temperatura de incubação (25 °C) e para cada uma das 3 variedades testadas o desenho experimental foi o seguinte:

- 5 réplicas em recipientes de plástico com areia com 20 sementes cada e incubadas a 4 °C;
- 5 réplicas em recipientes de plástico com areia com 20 sementes cada e incubadas a 25 °C;
- 5 réplicas em recipientes de caixas de Petri com algodão e papel de filtro, 20 sementes cada e incubadas a 4 °C;
- 5 réplicas em recipientes de caixas de Petri com algodão e papel de filtro, 20 sementes cada e incubadas a 25 °C.

A exceção foi a variedade “CV3”, uma vez que durante a imersão em água destilada as sementes libertaram uma grande quantidade de mucilagem que impossibilitou em grande parte o seu uso (Figura 7). Consequentemente, as sementes restantes chegaram apenas para os dois tratamentos em areia.



Figura 7 - Sementes da variedade “CV3” cobertas de mucilagem libertada após a sua imersão em água destilada durante 24h a 25 °C.

Após 1, 2 e 3 meses o número de sementes germinadas foi contabilizado pelos mesmos critérios referidos no primeiro ensaio.

5.3 Estabelecimento *in vitro*

Num ensaio inicial foram utilizadas plântulas da variedade “Galega” e “QN GA” obtidas no primeiro ensaio de germinação e que foram estabelecidas em meio MS Murashige e Skoog (1962) com a adição de 0,2 mg/L de benziladenina (BA), para a formação de rebentos adventícios (Gaspar et al., 1996). A introdução do material vegetal neste meio de estabelecimento fez-se através inoculação da parte apical seccionada (cerca de 3-4 cm) em tubos de ensaio com 12 ml do meio de cultura referido, pH 5,6-5,8 e gelificado (7 g/L de agar). Este material foi colocado em condições de 16h luz / 8h escuro a 24 °C durante um mês. Após esse mês, os rebentos foram transferidos para um meio de multiplicação descrito por Duron et al. (1989) composto por macronutrientes MS, micronutrientes de Leproivre (Quoirin et al., 1977) com a adição de 3% de sacarose, 0,6% de agar, 1 mg/l de BA, 0,5 mg/l de ácido giberélico (GA₃), 0.1 mg/l de ácido indolbutírico (IBA), 0,4 mg/l de Tiamina HCL e no qual foram subcultivados mensalmente.

Num segundo ensaio de estabelecimento *in vitro*, utilizaram-se plântulas da variedade “UNI PE”, que tal como no caso anterior, tiveram origem no primeiro ensaio de germinação, mas que foram transplantadas para um substrato composto por turfa e perlite (2:1) e mantidas em câmara climática (16h luz / 8h escuro, 24 °C, e humidade relativa de 70%) durante aproximadamente 1 mês (Fig. 8). Destas plantas foram obtidos rebentos cuja desinfeção foi realizada tal como descrito em Al Maari, et al. (1986). Quando os rebentos atingiram um tamanho de 6 – 9 cm a zona apical destes foi recolhida, esterilizada com etanol a 99% durante 30 segundos, submersa em lixívia comercial a 10% durante 20 minutos e, por último, procedeu-se a 3 lavagens com água destilada previamente autoclavada, antes de serem estabelecidos em tubos de ensaio com o meio de multiplicação referido anteriormente.

Por último, foi utilizado material vegetal proveniente de estacas obtidas de variedades seleccionadas em outubro de 2021. Foram colhidos ramos jovens de 4 variedades provenientes da Enxabarda (“E”, ”M” e ”P”) e da Quinta da Branca (“G”). O

procedimento seguido para o seu tratamento consistiu numa lavagem com detergente, com o intuito de remover poeiras e potenciais agentes patogénicos superficiais, seguida de uma submersão em etanol 100% durante 1 minuto, antes de serem colocadas numa câmara climática sobre condições controladas (16h luz / 8h escuro, 24 °C, e humidade relativa de 70%). O intuito deste último passo é levar a que os rebentos comecem a abrolhar até atingirem tamanho semelhante ao da Figura 8. Antes de serem estabelecidos em meio de multiplicação os rebentos foram numa primeira fase sujeitos a um processo de desinfeção que consiste em: submergir o material em fungicida Maconzan © Bayer a 1% durante 5 minutos; lixívia comercial a 100% durante 5 minutos com uma gota de Tween 20 e, por último o material foi lavado com uma solução de ácido ascórbico a 1% previamente autoclavada. Ao início, os explantes estabelecidos apresentavam taxas de contaminação consideráveis (> 90%) e por isso o passo de submersão em lixívia passou de 5 minutos para 30 e foi aplicado na segunda fase de estabelecimentos.



Figura 8 - Plântulas da variedade “UNI PE” após um 1 mês em substrato de turfa mais perlite (2:1) e exemplo de um gomo axilar a abrolhar.

5.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através de uma Anova de duas vias seguida por um teste de Tukey de comparações múltiplas e um teste t desemparelhado. Foram realizados com recurso ao GraphPad Prism versão 8.4.3 para Windows, GraphPad

Software, San Diego, Califórnia USA. Diferenças para $p < 0.05$ foram consideradas significativas.

5.5 Validação de marcadores moleculares

Para a testagem dos marcadores moleculares recolheram-se folhas jovens de árvores adultas selecionadas previamente nos diversos pomares georreferenciados. Recolheram-se amostras na Quinta da Branca ('Portugal' e 'Galega'), Enxabarda ('Espanhola', 'Champion' e 'Gigante de vranja'), Quinta das Naves ('Portugal' e 'Galega') e Quinta das Rasas ('Portugal' e 'Gigante de vranja'). Todas as amostras foram recolhidas em outubro de 2021 e processadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, na Universidade de Coimbra. Aqui as amostras foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ao momento de extração de DNA.

O processo de extração de DNA consistiu na maceração das folhas em azoto líquido, onde o material utilizado (almofariz, pilão e espátulas) foi previamente esterilizado e autoclavado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. A purificação foi levada a cabo seguindo o protocolo definido para o NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel) kit. Neste último foram realizadas modificações para certas amostras. Por último, o rendimento e qualidade do DNA obtido do processo de purificação foram medidos através de um espectrofotómetro NanoValue Plus™, sendo que as leituras foram realizadas a 260 nm.

O PCR foi realizado segundo a recomendação do kit NZY Taq II 2× Green Master Mix. O volume total da mistura de PCR era de 25 μl dos quais continham 12.5 μl de NZY Taq II 2× Green Mastermix, 1 μl de cada primer (forward e reverse), 9.5 μl de água e 1 μl de DNA, cuja concentração foi previamente normalizada para todas as amostras. Esta normalização consistiu em dividir a concentração de DNA de cada amostra pela menor concentração entre elas (28,2 ng/ μl), multiplicar o valor obtido por 10 obtendo-se assim a quantidade de cada amostra a adicionar a um volume de 10 μL , perfazendo o volume em falta com água ultra pura. A escolha dos marcadores moleculares SSRs teve por base uma bibliografia existente, estando representados na Tabela 3 as sequências utilizadas e as respetivas referências.

A amplificação de DNA foi realizada num termociclador BioRad utilizando as seguintes configurações: desnaturação inicial de 3 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguida por 25 ciclos

de 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 130 segundos a 55 °C para “annealing” e um passo para extensão de 30 segundos a 72 °C. Posteriormente uma extensão final foi levada a cabo a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos da reação de PCR foram separados por eletroforese em géis de agarose (2% p/v) em tampão TBE 1x, corado com Midori green DNA (3 µl/ 100 ml) e visualizado através do Gel Doc XR+ utilizando o programa Image Lab™Software (BioRad). Utilizou-se o marcador de peso molecular MZYDNA Ladder VI.

Tabela 3 – Conjunto de marcadores SSR utilizados para validação em amostras de marmeleiro

SRR	Sequência 5' - 3'	Tamanho dos fragmentos (pb)	Referências
CH04g09	F: TTG TCG CAC AAG CCA GTT TA R: GAA GAC TCA TGG GTG CCA TT	141–177	(Liebhard <i>et al.</i> , 2002) (Güney <i>et al.</i> , 2019)
MS06g03	F: CGG AGG GTG TGC TGC CGA AG R: GCC CAG CCC ATA TCT GCT	154–190	Idem
CH03d01	F: CGC ACC ACA AAT CCA ACT C R: AGA GTC AGA AGC ACA GCC TC	95–115	Idem
CH04e05	F: AGG CTA ACA GAA ATG TGG TTT G R: ATG GCT CCT ATT GCC ATC AT	226–234	(Liebhard <i>et al.</i> , 2002) (Yamamoto <i>et al.</i> , 2004) (Bassil <i>et al.</i> , 2015)
CH05a04	F: GAA GAC TCA TGG GTG CCA TT R: GCT TTT GTT TCA TTG AAT CCC C	159–189	(Bassil <i>et al.</i> , 2015)
CH04e03	F: TTG AAG ATG TTT GGC TGT GC R: TGC ATG TCT GTC TCC TCC AT	179–222	(Liebhard <i>et al.</i> , 2002) (Yamamoto <i>et al.</i> , 2004) (Bassil <i>et al.</i> , 2015) (Halász <i>et al.</i> , 2009)
CH01h10	F: TGC AAA GAT AGG TAG ATA TAT GCC A R: AGG AGG GAT TGT TTG TGC AC	94–114	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2004) (Bassil <i>et al.</i> , 2015) (Dumanoglu <i>et al.</i> , 2009) (Liebhard <i>et al.</i> , 2002) (Bassil <i>et al.</i> , 2015)
CH03d02	F: AAA CTT TCA CTT TCA CCC ACG R: ACT ACA TTT TTA GAT TTG TGC GTC	201–223	(Liebhard <i>et al.</i> , 2002) (Bassil <i>et al.</i> , 2015)
CH01f02	F: ACC ACA TTA GAG CAG TTG AGG R: CTG GTT TGT TTT CCT CCA GC	174–206	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2004) (Bassil N. <i>et al.</i> , 2011) (Dumanoglu <i>et al.</i> , 2009) (Liebhard <i>et al.</i> , 2002) (Yüksel <i>et al.</i> , 2013) (Bassil <i>et al.</i> , 2015)

6. Resultados e discussão

6.1 Germinação de sementes

Um primeiro ensaio preliminar foi realizado para avaliar a reprodutibilidade do trabalho de Campo-Dall'orto (1987), nomeadamente, se um período de 3 meses era estritamente necessário para obtenção da quebra da dormência total das variedades testadas. Num estudo mais recente, foi utilizado um período de estratificação com duração de 3 meses (em média 96 dias) e, uma vez que obtiveram taxas de germinação de 95-97% (Semin, 2022) seria de esperar algo semelhante durante o ensaio.



Figura 9 – Resultados da germinação para a variedade “QN GA” onde após 1 mês e 4 dias apresenta numeras plântulas já com hipocótilos verdes, funcionalmente as primeiras folhas, e uma radícula ou raiz primária (90% de taxa de germinação).

No primeiro mês a variedade “QN GA” foi a única a apresentar germinantes com uma média de 76,5% de germinação. Ao segundo mês, “UNI PE” foi a única em que as sementes começaram a germinar, atingindo uma média de 13,4%. Finalmente após 3 meses as restantes variedades já apresentavam germinantes. A variedades “UNI PE” após 2 meses e meio alcançou uma média de 78,4% enquanto no final do ensaio “QB PT” e “UNI MA” apresentavam médias de 32,5% e 20% respetivamente. No que toca à duração dos períodos de estratificação no frio, Campo-Dall'orto (1987) observou um fenómeno semelhante onde as sementes da variedade ‘Portugal’ requeriam menos tempo de estratificação para quebrar dormência comparativamente a ‘Smyrna’. É possível que diferentes variedades requeiram diferentes durações quanto ao período de estratificação no frio, à semelhança de que acontece para diferentes espécies (Hartmann et al., 2013).

Dentro do gênero *Malus* um exemplo é a espécie *Malus sieboldii*, onde Thomsen e Eriksen (2006) chegaram à conclusão de que 12 semanas eram o suficiente para quebrar dormência da maior parte das sementes enquanto, Taek e colaboradores (1989) utilizaram 15 semanas para estratificação ao frio das sementes.

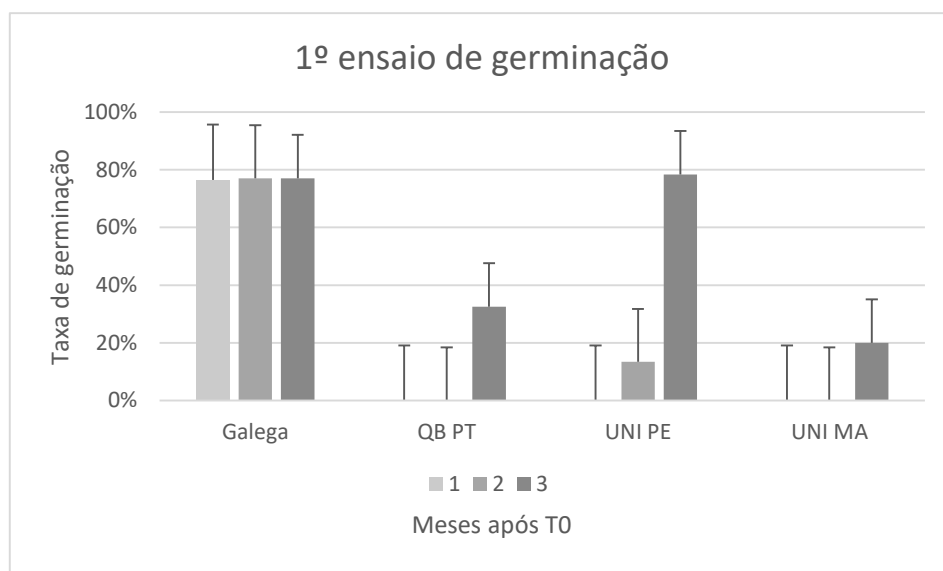


Figura 10 – Taxas de germinação das variedades “Galega”, “QB PT”, “UNI PE” e “UNI MA” após 1, 2 e 3 meses de incubação a 4 °C.

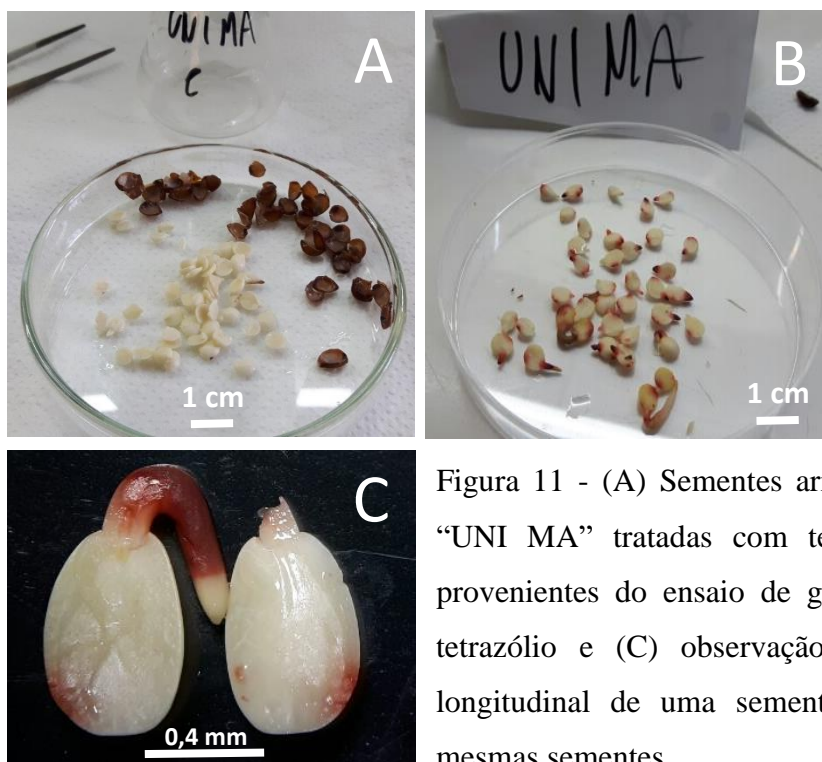


Figura 11 - (A) Sementes armazenadas da variedade “UNI MA” tratadas com tetrazólio. (B) Sementes provenientes do ensaio de germinação tratadas com tetrazólio e (C) observação à lupa de um corte longitudinal de uma semente representativa dessas mesmas sementes.

Quando o teste com tetrazólio foi realizado pela primeira vez, não houve diferenças observáveis entre o controle e as sementes aleatoriamente escolhidas de cada variedade. À exceção do avermelhado provocado pelas incisões durante o teste, não foram observadas regiões avermelhadas no embrião ou, caso a semente tenha completado o processo de germinação, ao longo da radícula. Apenas no segundo teste foi possível observar essas diferenças tal como está exemplificado na figura 11.

Determinadas sementes, quando se encontram em condições favoráveis ao seu metabolismo, como por exemplo temperaturas e níveis de oxigênio ideais, assim que são hidratadas, inicia-se o seu processo de germinação. Começa por alterações no metabolismo do embrião que consistem em determinados processos como transcrição e tradução de novos mRNAs (RNAs mensageiros), a reparação e multiplicação mitocondrial. O final deste processo é marcado por alongamento celular que conduz à emergência do embrião, frequentemente a radícula, mas que em determinados casos inexplicavelmente não ocorre e essas sementes são então consideradas como dormentes (Bewley et al., 2013). Ao longo do teste realizado foi possível observar alterações na atividade das sementes nas variedades “UNI MA” e “QB PT” entre os dois momentos de avaliação. Em certos casos, a presença de atividade celular era duplamente confirmada quer pela emergência da radícula quer pela coloração da mesma (Fig. 11C). Em situações em que a alteração estava restrita á coloração do embrião, não se podia aferir com certeza se na semente em questão a dormência tinha sido quebrada completamente. Em função destes resultados, o teste de tetrazólio torna-se um teste complementar útil em testes de germinação onde se procuram avaliar tratamentos cuja eficácia perante as sementes utilizadas seja desconhecida, permitindo saber se durante o ensaio se tornou metabolicamente ativa e eventualmente dar pistas da presença de dormência.

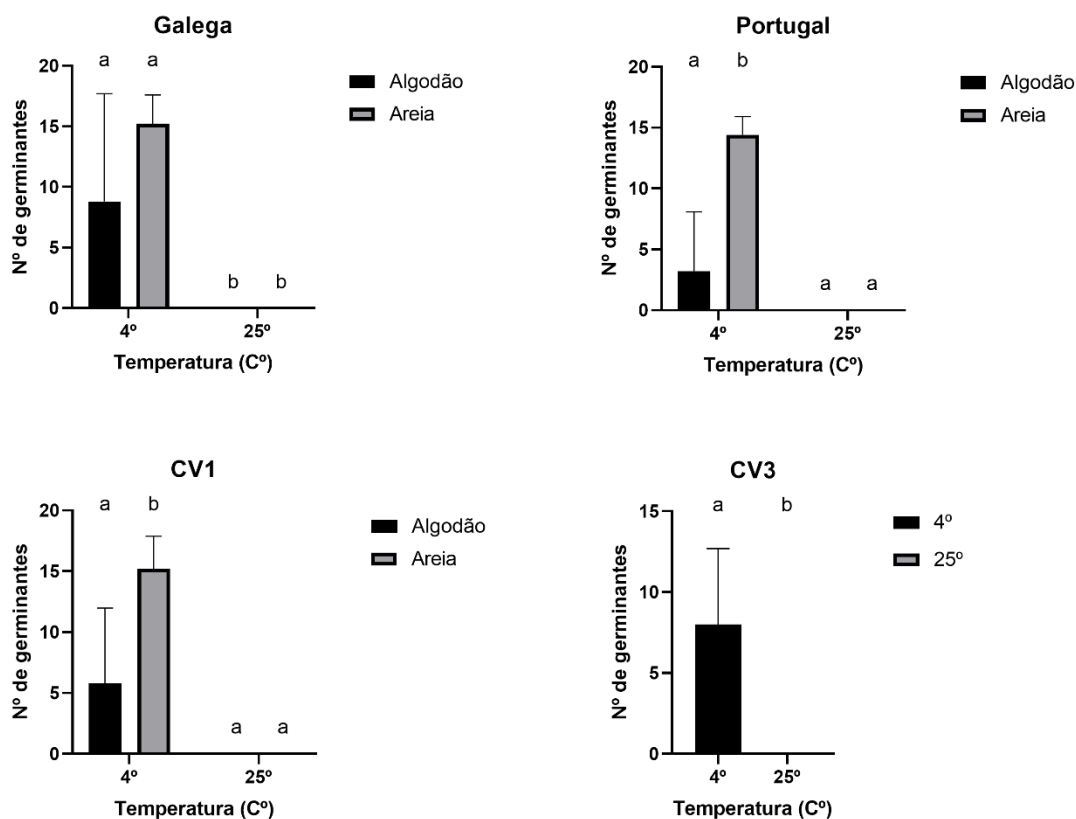


Figura 12 - Número de germinantes após 3 meses de estratificação. Diferentes letras representam diferenças significativas e foram obtidas a $p \leq 0.05$ pelo teste Tukey.

No segundo ensaio avaliou-se a necessidade de temperaturas baixas para a quebra de dormência, pela criação de tratamentos de temperaturas a 4 °C e a 25 °C, e outra opção de substrato pela utilização de algodão humedecido em certos tratamentos. Dos resultados obtidos observou-se (Fig. 12) primeiramente que para a variedade “Galega” nenhum germinante foi obtido em tratamentos com a temperatura de incubação de 25 °C. A situação inversa se observou nos tratamentos com uma temperatura de incubação de 4 °C onde apesar de não haver diferenças significativas entre os dois tipos de substrato (areia e algodão) a diferença perante os tratamentos com a temperatura a 25 °C já foi significativa. No caso da variedade “Portugal”, observou-se uma situação semelhante com a “Galega” exceto o facto de que só o tratamento com areia e temperatura de incubação de 4 °C é que apresentou um número significativamente de germinantes. O tratamento com algodão e temperatura de incubação de 4 °C apesar de ter apresentado germinantes, o seu número não foi significativamente diferente daquele apresentado por ambos os tratamentos com uma temperatura de incubação de 25 °C. A variedade “CV1”

apresentou uma situação muito semelhante à da de “Portugal”, exceto o facto de apresentar um menor número de germinantes no tratamento com algodão e uma temperatura de incubação de 4 °C. Por último, não foi possível observar o efeito do substrato, pela razão apresentada anteriormente, não obstante foi possível observar uma diferença significativa entre o número de germinantes com uma temperatura de incubação de 4 °C comparativamente a de 25 °C. Esta não apresentou germinantes na duração do ensaio.

Em primeiro lugar, uma vez que não houve germinantes nos tratamentos a 25 °C este fato vai ao encontro de Campo-Dall’orto, (1987) na medida em que baixas temperaturas são de facto necessárias à quebra da dormência das sementes. Existe também exemplos tanto na maçã, onde sementes de *Malus domestica* Borkh. não germinaram a 15 °C (Eichholtz et al., 1983) e sementes de *Malus sieboldii* não germinaram a temperaturas acima dos 9 °C (Thomsen & Eriksen, 2006).

Quanto ao efeito do substrato no número de germinantes (Fig. 12), tanto na variedade “Portugal” como na “CV1”, o número era estatisticamente superior no substrato de areia comparativamente ao estrado de algodão. A variedade “Galega” apresentou também um número superior no substrato de areia, mas não é estatisticamente significante e quanto a “CV3” nesta não foi possível averiguar diferenças entre substratos. Por último, nas variedades “Portugal” e “CV1” a realização da ANOVA de duas vias revelou que existe uma interação estatisticamente significante entre a temperatura e o tipo de substrato ($F(1,16) = 24,12$, $p = 0,0002$ e $F(1,16) = 9,73$, $p = 0,0066$ respetivamente). Nestas duas variedades existe um maior rigor quanto às condições de estratificação onde não só precisam ser submetidas a baixas temperaturas (4 °C) como também o processo de estratificação terá de ocorrer na areia humedecida. Em contraste, a variedade “Galega” alcança um número significativo de germinantes exigindo a baixas temperaturas independentemente dos dois substratos aqui testados. Atendendo a estes resultados, a estratificação na areia humedecida a 4 °C é o melhor processo para quebrar a dormência de sementes de marmeleiro.

Salienta-se que quando se compara o vigor da variedade “Galega” entre os dois ensaios, no primeiro as sementes começaram logo a germinar passado 1 mês enquanto no segundo ensaio só ao terceiro mês se observaram taxas de germinação comparáveis. Existe a possibilidade de que a altura do ano em que se realiza o ensaio de germinação influencie as taxas de germinação. Será interessante em ensaios futuros verificar a

influência deste fenómeno na variedade “Galega” assim como se ocorre noutras variedades.

6.2 Estabelecimento *in vitro*

Começando pela variedade “QN GA”, foram estabelecidos ao início 75 explantes e após 2 meses observou-se uma taxa de contaminação de 96%. Dado que o material na altura era relativamente jovem, levantou-se a questão da sua resiliência perante um processo de desinfeção e, por conseguinte, não foi aplicado nenhum. Da variedade “UNI PE” os 12 explantes utilizados desta vez foram desinfectados e após o primeiro mês observou-se uma taxa de contaminação mais reduzida, de apenas de 25%. Apesar da amostra ter sido reduzida, os resultados obtidos indicam um procedimento de desinfeção a utilizar com material proveniente da germinação de sementes. Quanto ao material das variedades “G”, “E”, “M” e “P” foram estabelecidos 58 explantes numa primeira fase e 52 explantes numa segunda, onde a única diferença entre estas duas era o protocolo de esterilização. Uma vez que a taxa de contaminação em todas as variedades foi elevada (>90%) e os explantes que sobreviveram não apresentaram qualquer desenvolvimento no meio onde foram estabelecidos, o protocolo de desinfeção verificou-se ser desadequado ao material vegetal de marmeleiro e no futuro terão de ser testados novos protocolos.

Relativamente aos meios de cultura utilizados, será apenas possível refletir sobre o seu efeito para a variedades “QN GA” e “UNI PE” uma vez que nas restantes as taxas de contaminação elevadas impossibilitaram a sua avaliação. Os explantes da variedade “QN GA” no meio de multiplicação apresentaram em média uma taxa de multiplicação aproximadamente de 53%. Tendo em conta que Duron et al. (1989) obtiveram 4-5 explantes novos por cada explante mensalmente no meio de cultura em questão, neste ensaio a taxa de multiplicação foi mais baixa do que se estava à espera.

No caso da variedade “UNI PE” esta apresentou uma média de apenas 4%. As baixas taxas de multiplicação podem ser explicadas em parte por casos onde os explantes apresentaram necrose apical, reduzindo assim o número efetivo de explantes que podiam ser multiplicados, e dependendo da espécie diferentes fatores estão em causa (Bairu et al., 2009). Singha et al. (1990) observaram que em marmeleiro com o aumento da concentração de Ca no meio, tanto necrose apical como vitrificação dos explantes

diminuíam até certa concentração, a partir da qual o crescimento destes começava a ser afetado negativamente. Em ensaios futuros, caso este problema se torne recorrente, uma das soluções que poderá ser testada são diferentes concentrações de cálcio.

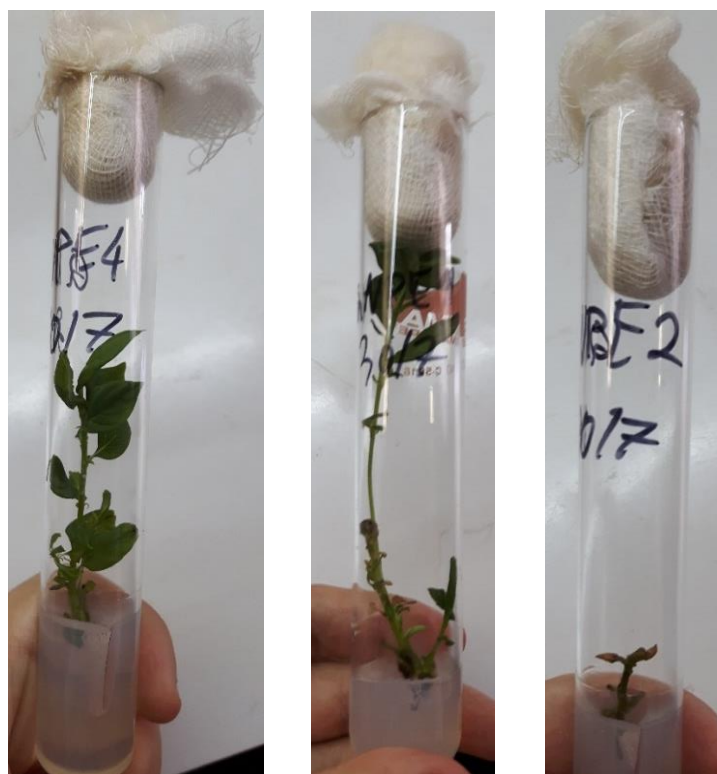


Figura 13 - Explantes da variedade “UNI PE” após 2 meses no meio de multiplicação.

6.3 Avaliação de marcadores moleculares

Tabela 4 - Avaliação da concentração e qualidade dos extratos de DNA de diferentes variedades. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5)

Variedades e locais de amostragem	DNA (ng/ μ L)	A260/280	A260/230
'Portugal' (Quinta branca)	38,72 \pm 9,10	1,94 \pm 0,12	1,93 \pm 0,46
'Portugal' (Quinta das Naves)	42,46 \pm 12,14	1,81 \pm 0,04	1,86 \pm 0,27
'Galega' (Quinta das Naves)	68,88 \pm 12,04	1,80 \pm 0,01	2,11 \pm 0,10
'Espanhola' (Enxabarda)	130,13 \pm 25,41	1,84 \pm 0,02	2,24 \pm 0,14
'Champion' (Enxabarda)	92,92 \pm 21,78	1,82 \pm 0,04	2,08 \pm 0,27
'Galega' (Orgais)	66,7 \pm 25,98	1,82 \pm 0,04	2,04 \pm 0,21
'Gigante de vranja' (Enxabarda)	102,72 \pm 40,18	1,80 \pm 0,03	2,06 \pm 0,19
'Gigante de vranja' (Unitom, Quinta das rasas)	97,00 \pm 27,81	1,9 \pm 0,08	1,46 \pm 0,28
'Portugal' (Quinta das Rasas)	88,00 \pm 31,60	1,9 \pm 0,08	1,23 \pm 0,36

O protocolo seguido para extração de DNA a partir de folhas de *C. oblonga* Mill. permitiu que se obtivesse DNA de qualidade (Tabela 4). Apesar da sua quantidade ser relativamente baixa, adequa-se à realização da análise através de PCR pela qual foi possível validar dos primers escolhidos. Em gel de agarose (Fig. 14) foi possível confirmar que os 9 pares de primers testados, correspondentes aos 9 SSRs selecionados da literatura, amplificam sequências presentes no genoma do marmeleiro dos cultivares com que se trabalhou.

Das cinco variedades aqui testadas, a maioria dos marcadores já tinha sido validado para a variedade 'Champion' e 'Portugal' (CH04e05, CH05a04, CH04e03, CH01h10, CH03d02 e CH01F02) à exceção da variedade Gigante de vranja que só o marcador CH04e03 foi o único a existir uma validação prévia. Para as variedades 'Galega' e 'Espanhola' não existe por enquanto na bibliografia amplificação de marcadores SSRs tanto quanto se saiba, sendo esta a primeira vez. Os marcadores CH04g09, MS06g03 e Ch03d01, apesar de na bibliografia não existir casos em que amplificam nestas cinco variedades, possuem uma situação onde amplificaram em diversos cultivares e acessões da Turquia (Güney et al., 2019). Este passo é bastante importante pois constitui a primeira instância em que são testados marcadores moleculares, mais especificamente SSRs, em germoplasma de marmeleiro nativo de Portugal Continental.

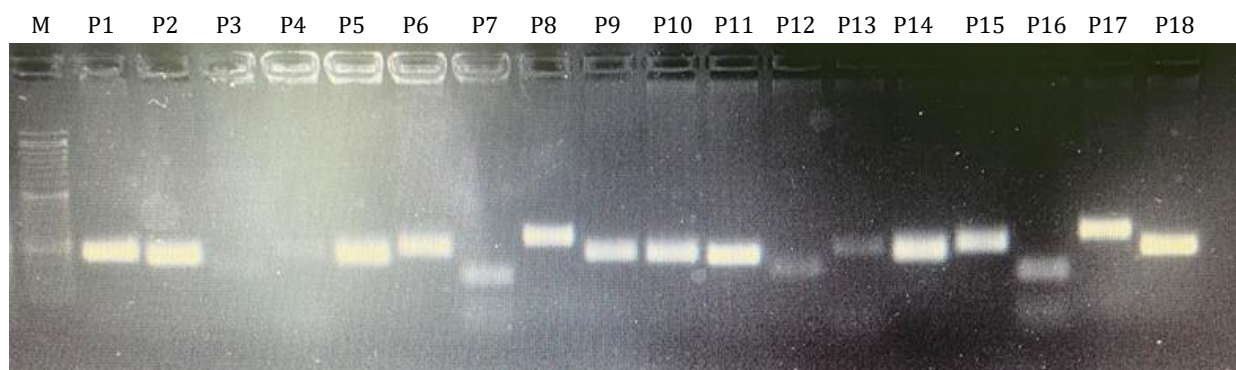


Figura 14 - Gel de agarose com a validação dos SSR descritos na literatura. M – DNA ladder de 1500 bp; Poço 1 a Poço 9 correspondem aos 9 perfis SSR diferentes: CH04g09, MS06g03, CH03d01, CH04e05, CH05a04, CH04e03, CH01h10, CH03d02 e CH01F02 respetivamente (amostra QB5 da variedade 'Portugal', Quinta da Branca); Poço 10 a 18 corresponde a 9 perfis SSR, os mesmos perfis referidos anteriormente (amostra QN4 da Variedade 'Portugal', Quinta das Naves). O gel de agarose foi visualizado e a imagem capturada através do GelDoc XR.

O próximo passo consistirá em avaliar a sua capacidade de distinguir as diferentes variedades e, tendo em conta ensaios preliminares, o protocolo utilizado para a sua validação não permite a distinção das diferentes variedades com estes marcadores. Esta capacidade é desejada pois permitirá verificar a proximidade genética entre diferentes variedades permitindo assim caracterizar a diversidade genética existente. Esta informação tem as mais diversas aplicações: conservação de diversidade genética; programas de melhoramento e até na manutenção de uma coleção de germoplasma através da deteção de redundâncias. (van Treuren & van Hintum, 2003; Coates & Byrnes, 2005).

Futuramente será testado um protocolo de amplificação dos SSRs descrito por Arruda et al. (2010) que recorre à utilização de 3 primers durante o PCR. São utilizados dois primers, “forward” e “reverse”, onde o “forward” é também designado por “chimera” devido à presença de uma sequência universal M13 (TGTAACAACGACGGCCAGT) no seu terminal 5'. Esta sequência é idêntica ao do terminal 3' primer que se encontra marcado por um fluoróforo que será adicionado só na parte final do PCR, de modo a não conjugar com outros alelos não específicos. O processo de PCR começará só com o “forward” quimérico, cujos produtos de PCR vão ter a sequência M13, e o “reverse” até às fases finais do processo onde depois é adicionado o terceiro primer que irá amplificar os produtos com a sequência M13. Os produtos de PCR obtido serão separados em gel de poliacrilamida desnaturante num analisador genético com sistema de eletroforese capilar, de forma a distinguir o tamanho dos diferentes fragmentos amplificados. Protocolos similares já foram aplicados para distinção de cultivares/acessões em soja (Diwan & Cregan, 1997), maçã (Gao et al., 2015) e pera (Cao et al., 2012) e espera-se com este método se consiga pela primeira vez em marmeleiro.

7. Conclusão e Perspetivas futuras

Os resultados obtidos ao longo desta tese demonstraram diversos graus de sucesso no que toca a alcançar os objetivos pretendidos

A bibliografia que propriamente incide sobre germinação de sementes de *C. oblonga* Mill. é bastante escassa e os resultados obtidos aqui irão colmatar essa lacuna. Por um lado, contribui para a replicabilidade do que vem escrito para a espécie, nomeadamente os resultados confirmam a exigência de baixas temperaturas e que diferentes cultivares possuem diferentes exigências no que toca à duração do período de quebra de dormência. De todos os cultivares estudados a variedade “Galega” destaca-se por ser aquela que requer um período mais curto e ao mesmo tempo apresenta um elevado número de germinantes. Este vigor aqui documentado poderá ser uma característica a ter em conta mais à frente na realização de programas de melhoramento. Quanto ao protocolo em si, será interessante no futuro estudar a influência da altura do ano nas sementes uma vez que se observou em “Galega” diferentes taxas de germinação entre os dois ensaios de germinação, estes que ocorreram em alturas do ano diferentes (abril no primeiro e novembro no segundo). Caso este efeito seja comprovado, um melhor conhecimento sobre a altura ideal para cada cultivar possibilitará um melhor aproveitamento das sementes e do espaço que estas ocupariam num armazenamento a 4 °C.

Protocolos sobre estabelecimento *in vitro* em marmeleiro são já mais numerosos, existindo assim uma base mais estabelecida para os ensaios realizados. Diferentes protocolos de desinfeção foram testados, mas nenhum produziu elevadas taxas de sobrevivência. Isto foi evidente especialmente no material proveniente de estacas onde se obtiveram explantes ou que contaminavam ou que ficavam inviáveis e não se desenvolviam. Aquele aplicado no caso de “UNI PE” apesar de ter produzido uma elevada taxa de sobrevivência, a amostra era consideravelmente pequena. Futuramente será da mais alta prioridade encontrar ou desenvolver um protocolo de esterilização para os diferentes tipos de material, sejam rebentos resultantes de sementes ou de estacas. O meio de multiplicação testado permite a preservação dos explantes, mas só com a presença de um protocolo de esterilização estabelecido será possível aferir realmente se este ou outros meios na bibliografia são indicados para o efeito.

Por último, a obtenção de um grupo de marcadores que permita a caracterização do germoplasma consistiu num importante resultado. Tendo já sido comprovado que todos os marcadores de facto amplificam no germoplasma com o qual se está a trabalhar, de tal forma que resta só otimizar as condições de PCR e avaliar os fragmentos amplificados num sistema de eletroforese capilar. O grande desafio que se segue consiste em saber se estes marcadores permitem distinguir as pequenas diferenças de pares de bases existentes nas sequências que amplificam. Isto permitirá então a capacidade de distinguir molecularmente os diferentes cultivares, constituindo uma ferramenta útil à gestão mais eficiente de uma futura coleção de germoplasma.

8. Bibliografia

- Abdollahi, H., Alipour, M., Khorramdel Azad, M., Ghasemi, A., Adli, M., Atashkar, D., Akbari, M. & Nasiri, J. (2013). Establishment and primary evaluation of quince germplasm collection from various regions of Iran. *Acta horticulturae*, 976, 199-206. doi: 10.17660/ActaHortic.2013.976.25
- Al Maarri, K., Arnaud, Y., & Miginiac, E. (1986). In vitro micropropagation of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 28, 315-321. doi: 10.1016/0304-4238(86)90105-6
- Al-Snafi, A. E. (2016). The medical importance of *Cydonia oblonga*-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6, 87-99.
- Amiri, M. E. (2006). The status of genetic resources of deciduous, tropical, and subtropical fruit species in Iran. In *XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Asian Plants with Unique Horticultural* 769, 159-167. doi: 10.17660/ActaHortic.2008.769.21
- Ashraf, M. U., Muhammad, G., Hussain, M. A., & Bukhari, S. N. (2016). *Cydonia oblonga* M., a medicinal plant rich in phytonutrients for pharmaceuticals. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 163. doi: 10.3389/fphar.2016.00163.
- Bairu, M. W., Stirk, W. A., & Van Staden, J. (2009). Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98, 239-248. doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9560-8>
- Bassil, N., Nyberg, A., Postman, J., & Kim, Y. K. (2014). Improved microsatellite markers for quince (*Cydonia oblonga*) genetic analysis. In *XII International Pear Symposium* 1094, 57-65. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1094.4
- Bassil, N. V., Postman, J. D., Hummer, K. E., Mota, J., Sugar, D., & Williams, R. (2010). Quince (*Cydonia oblonga*) genetic relationships determined using microsatellite markers. In *XI International Pear Symposium* 909, 75-83. doi: 10.17660/ActaHortic.2011.909.6
- Bayazit, S., Imrak, B., Küden, A., & Güngör, M. K. (2011). RAPD analysis of genetic relatedness among selected quince (*Cydonia oblonga* Mill.) accessions from different parts of Turkey. *Horticultural Science*, 38, 134-141. doi: 10.17221/97/2011-HORTSCI
- Bennett, E. (Ed.). 1968. Proceedings, FAO/IBP. Technical Conference on the Exploration, Utilisation and Conservation of Plant Genetic Resources. F.A.O. Rome.
- Bellini, E. and Giordani, E. 2000. Conservation of under-utilized fruit tree species in Europe. *Acta Hort.* 522, 165-173. doi: 10.17660/ActaHortic.2000.522.18
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., & Curchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology letters*, 15, 365-377. doi: 10.1111/j.1461-0248.2011.01736.x

- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., Nonogaki H. (2013). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. doi: 10.1007/978-1-4614-4693-4
- Burbank, L. (1914). *Luther Burbank: His methods and discoveries and their practical application* (Vol. 4). New York and London: Luther Burbank Press.
- Bretting, P. K. & Widrechner, M. P. (2010). Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews, Volume 13*, 13, 11.
- Briant, P. (2002). *From Cyrus to Alexander: a history of the Persian Empire*. Winona Lake, Indiana: Eisenbrauns
- Brunn, S. D. (1963). A cultural plant geography of the quince. *The Professional Geographer*, 15, 16-18. doi: 10.1111/j.0033-0124.1963.016_w.x
- Buttner R (2001) Cydonia. In: Hanelt P (ed) *Mansfelds encyclopedia of agricultural and horticultural crops*. Springer, Berlin, pp 458–460
- Campo Dall'Orto, F. A., Ojima, M., Ferraz, E. S. D. B., Igue, T., Martins, F. P., & Rigitano, O. (1987). Germinação das sementes de marmelo: meios e períodos de estratificação e processos de preparo. *Bragantia*, 46, 315-328. doi: 10.1590/S0006-87051987000200013
- Cao, Y., Tian, L., Gao, Y., & Liu, F. (2012). Genetic diversity of cultivated and wild Ussurian Pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) in China evaluated with M13-tailed SSR markers. *Genetic resources and crop evolution*, 59, 9-17. doi: 10.1007/s10722-011-9661-1
- Change, I. P. O. C. (2007). *Climate change 2007: The physical science basis*.
- Coetes, D.J. and Byrne, M. 2005. "Genetic variation in plant populations." In *Plant diversity and Evolutions- Genotypic and phenotypic variation in higher plants*, edited by R.J. Henry, ch. 9: 139-164. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI Publishing.
- Cochrane, J. A., Crawford, A. D., & Monks, L. T. (2007). The significance of ex situ seed conservation to reintroduction of threatened plants. *Australian Journal of Botany*, 55, 356-361. doi: 10.1071/BT06173
- Dhillon, B. S., & Rana, J. C. (2003). Temperate fruits genetic resources management in India-issues and strategies. In *VII International Symposium on Temperate Zone Fruits in the Tropics and Subtropics 662*, pp 139-146
- Diwan, N., & Cregan, P. B. (1997). Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theoretical and applied genetics*, 95, 723-733. doi: 10.1007/s001220050618
- Dumanoglu, H., Gunes, N. T., Aygun, A., San, B., Akpınar, A. E., & Bakir, M. (2009). Analysis of clonal variations in cultivated quince (*Cydonia oblonga* 'Kalecik') based on fruit characteristics and SSR markers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37, 113-120. doi: 10.1080/01140670909510256

- Duron, M., Decourtye, L., & Druart, P. (1989). Quince (*Cydonia oblonga* Mill.). In *Trees II*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 42-58
- Eichholtz, D. A., Robitaille, H. A., & Herrmann, K. M. (1983). Protein changes during the stratification of *Malus domestica* Borkh. seed. *Plant Physiology*, *72*, 750-753. doi: 10.1104/pp.72.3.750
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New phytologist*, *171*, 501-523. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x
- Forster, E. S., & Heffner, E. H. (1954). *Lucius Junius Moderatus Columella: On agriculture*. Vol. 2: de res rustica V-IX, William Heinemann LTD, London
- Ganopoulos, I., Merkouropoulos, G., Pantazis, S., Tshipouridis, C., & Tsaftaris, A. (2011). Assessing molecular and morpho-agronomical diversity and identification of ISSR markers associated with fruit traits in quince (*Cydonia oblonga*). *Genet Mol Res*, *10*, 2729-46. doi: 10.4238/2011.November.4.7
- Gao, Y., Liu, F., Wang, K., Wang, D., Gong, X., Liu, L., ... & Volk, G. M. (2015). Genetic diversity of *Malus* cultivars and wild relatives in the Chinese National Repository of Apple Germplasm Resources. *Tree genetics & genomes*, *11*, 1-9. doi: <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0913-7>
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *32*, 272-289. doi: doi.org/10.1007/BF02822700
- Güney, M., Kafkas, S., Koc, A., Aras, S., Keles, H., & Karci, H. (2019). Characterization of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) accessions by simple sequence repeat markers. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *43*, 69-79. doi: 10.3906/tar-1804-95
- Halász, J., Hoffman, V., Szabó, Z., Nyéki, J., Szabó, T., & Hegedűs, A. (2009). Characterization of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars using SSR markers developed for apple. *International Journal of Horticultural Science*, *15*, 7-10. doi: 10.31421/IJHS/15/4/833
- Hallock, R. T. (1978). *Selected fortification texts*. Cahiers de la DAFI.
- Hunter, J. M. & Dunster S. (2014) *Quinces: Growing and Cooking*. London, England: Prospect Books
- Idrees, M. & Irshad, M. (2014). Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *European academic research*, *2*, 1513-1540.
- Janick, J. (2005) *The Origins of Fruits, Fruit Growing, and Fruit Breeding*. In *Plant breeding reviews, volume 25*. Oxford, UK: Wiley & Sons, pp 255-320
- Jones, W. H. S. (1966). *Natural history in ten volumes: Volume VII. Libri XXIV-XXVII*.
- Jones, W. H. S. (1969). *Natural history in ten volumes: Volume VI. Libri XX-XXIII*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts

- Khoshbakht, K. & Hammer K. (2005). Savadkouh (Iran)—an evolutionary centre for fruit trees and shrubs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 641-651. doi: 10.1007/s10722-005-7467-8
- Khoramdel Azad, M., Nasiri, J., & Abdollahi, H. (2013). Genetic diversity of selected Iranian quinces using SSRs from apples and pears. *Biochemical genetics*, 51, 426-442. doi: 10.1007/s10528-013-9575-z
- Koornneef, M., Bentsink, L., & Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. *Current opinion in plant biology*, 5, 33-36. doi: 10.1016/S1369-5266(01)00219-9
- Lamkey, K. R., & Lee, M. (Eds.). (2006). Plant Breeding: The Arnel R. Hallauer International Symposium. Ames, IA: Blackwell Publishing
- Liebhart, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C. D., Tarchini, R., Van De Weg, E., & Gessler, C. (2002). Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Theor Appl Genet*, 106, 1497-1508. doi: 10.1023/A:1020525906332
- Maas, F. (2007). Evaluation of *Pyrus* and quince rootstocks for high density pear orchards. In *X International Pear Symposium 800*, pp. 599-610
- Manica-Berto, R., Pegoraro, C., Mistura, C. C., Bresolin, A. P. S., Rufato, A. D. R., & Fachinello, J. C. (2013). Similaridade genética entre cultivares de marmeleiro avaliadas por marcadores AFLP. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48, 568-571. doi: 10.1590/S0100-204X2013000500015
- Martínez-Ballesta, M. C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., & Carvajal, M. (2010). Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127, 112-118. doi: 10.1016/j.scienta.2010.08.002
- McGinnis, L. (2007). Quest for Quince: expanding the NCGR collection. *Agricultural Research*, 55, 20.
- Menzel, W., Jelkmann, W., & Maiss, E. (2001) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99, 81-92. doi: 10.1016/S0166-0934(01)00381-0
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*, 15, 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Stamo, B., Rwahnih, M. A., Savino, V., & Carraro, L. (2003). A preliminary account of the presence of pome fruit viruses in Albania. In *XIX International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases 657*, pp 55-58
- Orhan, E., Nardemir, G., Agar, G., & Ercisli, S. (2014). Genetic variation among quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes sampled from the Coruh valley in Turkey. *Genet. Mol. Res*, 13, 445-449. doi: 10.4238/2014.January.21.12

- Perry, T. O. (1971). Dormancy of Trees in Winter: Photoperiod is only one of the variables which interact to control leaf fall and other dormancy phenomena. *Science*, *171*, 29-36. doi: 10.1126/science.171.3966.29
- Postman, J. (2009). *Cydonia oblonga*: The Unappreciated Quince. *Arnoldia*, *67*, 2-9.
- Pinar, H., Kaymak, S., Ozogun, S., Aydın, U. Z. U. N., Mustafa, U. N. L. U., Bircan, M., ... & Orhan, E. (2016). Morphological and molecular characterization of major quince cultivars from Turkey. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *44*, 72-76. doi:10.15835/nbha44110228
- Quoirin, M. (1977). Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de meristemes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux. 1976-1977 et Rapports de Synthèse Stat Fruit et Maraich., 93-117.
- Rackham, H. (1960). Natural history in ten volumes: Volume IV. Libri XII, XVI.
- Rackham, H. (1961). Natural history in ten volumes: Volume V. Libri XVII, XIX.
- Santos, F. D. & Miranda, P. (Eds.). (2006). *Alterações Climáticas em Portugal: Cenários, impactos e Medidas de Adaptação*. Lisboa: Gradiva.
- Scaramuzzi, F. (1957). CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLE CULTIVAR DI COTOGNO DA FRUTTO. *Rivista Di Ortoflorofrutticoltura Italiana*, *41*, 575-615. <http://www.jstor.org/stable/42873465>
- Schneider A (1900) The quince (*Cydonia vulgaris*). *Bird All Nat* 7, 34-36
- Semin, I. (2022). Intensification techniques in the cultivation of seed rootstocks of VNIISPK breeding for the production of pear seedlings. *In BIO Web of Conferences* 47, 05002. doi: 10.1051/bioconf/20224705002
- Sharma, H., Sharma, P., & Sharma, R. (2018). Evaluation of Genetic Relatedness Among Temperate Pome Fruit Crops of Family Rosaceae Using Arbitrary Oligonucleotide Markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, *88*, 191-198. doi: 10.1007/s40011-016-0746-7
- Singha, S., Townsend, E. C., & Oberly, G. H. (1990). Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots in vitro. *Plant cell, tissue and organ culture*, *23*, 135-142.
- Sykes, J. T. (1972). A description of some quince cultivars from western Turkey. *Economic Botany*, *26*, 21-31. doi: 10.1007/BF02862258
- Thomsen, K. A., & Eriksen, E. N. (2006). Effect of temperatures during seed development and pretreatment on seed dormancy of *Malus sargentii* and *M. sieboldii*. *Seed Science and Technology*, *34*, 215-220. doi: 10.15258/sst.2006.34.1.25
- Trabut, L. (1916). PYRONIA: A Hybrid Between the Pear and Quince—Produces Abundance of Seedless Fruit of Some Value—Many New Combinations Might be Made Among the Relatives of the Pear. *Journal of Heredity* 7.9: 416-419.
- Topcu, H., Kafkas, S., Dogan, A., Akcay, M. E., & Ercisli, S. (2015). Genetic relatedness among quince (*Cydonia oblonga* Miller) accessions from Turkey using amplified

- fragment length polymorphisms. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88. doi: 10.5073/JABFQ.2015.088.028
- van Treuren, R., & van Hintum, T. J. (2003). Marker-assisted reduction of redundancy in germplasm collections: genetic and economic aspects. *Acta Horticulturae*, 139-150. doi: 10.17660/ActaHortic.2003.623.15
- Vitkovskii, V.L. and Denisov, V.P. (1991). N.I. Vavilov and expeditions to study fruit crops and grape in central Asia. *Sbornik Nauchnykh Trudov po Prikladnoi Botanike, Genetike i Selekcii* 140:97-111 (in Russian).
- W.W. Meech, A. M. (1888). *Quince Culture: An illustrated hand-book for the propagation and cultivation of the quince, with descriptions of its varieties, insect enemies, diseases and their remedies*. New York, NY: Orange Judd Company
- Webster, A. D. (1995). Rootstock and interstock effects on deciduous fruit tree vigour, precocity, and yield productivity. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 23, 373-382. doi: 10.1080/01140671.1995.9513913
- Webster, A. D. (1996). A review of fruit tree rootstock research and development. In *VI International Symposium on Integrated Canopy, Rootstock, Environmental Physiology in Orchard Systems* 451, 53-74. doi: 10.17660/ActaHortic.1997.451.3
- Webster, A. D. (1997). A brief review of pear rootstock development. In *VII International Symposium on Pear Growing* 475, 135-142. doi: 10.17660/ActaHortic.1998.475.16
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. CRC press.
- Wertheim, S. J. (2000). Rootstocks for European pear: a review. In *VIII International Symposium on Pear* 596, 299-309. doi: 10.17660/ActaHortic.2002.596.47
- Xuan, H., Spann, D., & Neumüller, M. (2013). Identifying quince (*Cydonia oblonga*) cultivars by means of apple and pear microsatellites. *Acta Hort*, 976, 305-310. doi: 10.17660/ActaHortic.2013.976.41
- Yamamoto, T., Kimura, T., Soejima, J., Sanada, T., Ban, Y., & Hayashi, T. (2004). Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breeding Science*, 54, 239-244. doi: 10.1270/jsbbs.54.239
- Yüksel, C., Mutaf, F., Demirtaş, İ., Öztürk, G., Pektaş, M., & Ergül, A. (2013). Characterization of Anatolian traditional quince cultivars, based on microsatellite markers. *Genet Mol Res*, 12, 5880-5888. doi: 10.4238/2013.November.22.16
- Zaurov, D. E., Mehlenbacher, S. A., Molnar, T. J., Goffreda, J. C. & Funk, C. R. (2005). Genetic resources of temperate and subtropical fruit and nut species at the Nikita Botanical Gardens. *HortScience*, 40, 5-9. doi: 10.21273/HORTSCI.40.1.5
- Zohary, D. Hopf, M. & Weiss, E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press.