



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE AZEVINHO
(*Ilex aquifolium* L.) ATRAVÉS DO
USO DE MARCADORES MOLECULARES - RAPDs**

ENG^a DE PRODUÇÃO FLORESTAL

Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Sofia Pereira de Melo Damas



CASTELO BRANCO

1997

Índice

Agradecimentos	vi
Resumo	vi
Abstract	vi
Lista de abreviaturas	vi
Lista de figuras	vi
Lista de tabelas	vi
1. - Introdução	2
2. - Caracterização da espécie	5
2.1. Características botânicas	5
2.2. Distribuição e características ecológicas	7
2.4. Importância económica	11
3. Diversidade genética	13
3.1. Aspectos gerais	13

3.2. Métodos para estudar a diversidade genética.....	14
3.2.1. Morfológicos.....	15
3.2.2. Genéticos.....	16
4. Abordagem molecular - metodologias.....	25
4.1. Os genes são feitos de DNA.....	25
4.2. Extracção de DNA.....	30
4.3. Estimativa da concentração, pureza e qualidade do DNA.....	31
4.4. A Reacção de Polimerase em Cadeia.....	32
4.4.1. Optimização do PCR.....	34
4.4.2. Componentes da reacção.....	34
4.5. Electroforese.....	37
4.5.1. Gel de Agarose.....	37
4.5.2. Aparelhos usados na electroforese em gel de agarose.....	38
4.5.3. Preparação do gel de agarose.....	40
4.5.4. Coloração do DNA em gel de agarose.....	41
4.5.5. Visualização e fotografia dos géis.....	41
5. Material e métodos.....	45
5.1. Material vegetal.....	45
5.2. Extracção de DNA.....	45
5.2.1. Material utilizado.....	46
5.2.2. Reagentes.....	46
5.2.3. Método de Extracção.....	47
5.3. Purificação de DNA.....	48
5.3.1. Material utilizado.....	48

5.3.2. Reagentes	49
5.3.3. Método de purificação	49
5.4. Amplificação termocíclica (PCR).....	50
5.4.1. Material utilizado.....	50
5.4.2. Método e Reagentes da Amplificação	50
5.5. Electroforese.....	51
5.5.1. Equipamentos.....	52
5.5.2. Reagentes	52
5.5.3. Método da electroforese.....	52
6. Resultados	54
7. Conclusões	58
8. Referências bibliográficas.....	60
Anexo 1.....	67

Resumo

O azevinho é uma espécie que se encontra em regressão no nosso país, devido à diminuição da floresta autóctone, à sua utilização para efeitos decorativos e à sua lenta regeneração por via seminal. É uma planta dióica cuja reprodução é posta em causa pelo desaparecimento das plantas femininas.

Com vista à análise da variabilidade genética de alguns génotipos de azevinho (*Ilex aquifolium* L.), procedeu-se ao estudo do polimorfismo de DNA amplificado por iniciadores (*primers*) aleatórios do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). O DNA foi isolado pelo método CTAB e posteriormente purificado.

Foram testados dois *primers* de dez nucleótidos para identificar polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente em onze génotipos de azevinho. Dos *primers* utilizados (OP-S3 e OP-R14) apenas o OP-S3 detectou polimorfismos, evidenciando três classes de polimorfismos.