



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO COM PÓLEN ESTRANHO
NUM POMAR DE SEMENTES CLONAL DE PINHEIRO
BRAVO UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES**

Engenharia Florestal

Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Lúcia do Carmo Miranda Fernandes

—◆—
CASTELO BRANCO
2003

ÍNDICE

Agradecimentos	<i>ii</i>
Abreviaturas	<i>iv</i>
Resumo e palavras chave	<i>v</i>
Abstract and Key Words	<i>vi</i>

1. Introdução	1
1.1 Pinheiro bravo	2
1.1.2 A importância do pinheiro bravo	2
1.1.3 Origem, taxonomia e área de distribuição	3
1.1.4 Caracterização edafo-climática	5
1.1.5 Características morfológicas e reprodutivas	6
1.2 Abordagem molecular da variabilidade genética	8
1.2.1 Perspectiva histórica	8
1.2.2 Origem da variabilidade genética	9
1.2.3 A importância da utilização de marcadores moleculares	11
1.2.4 Marcadores moleculares baseados no princípio PCR	12
1.2.4.1 PCR (Polimerase Chain Reaction)	12
1.2.4.2 Microsatélites e a sua importância	13
1.3 Pomares de sementes	17
2. Objectivos	19
3. Material e Métodos	20
3.1 Pomar de sementes do Escaroupim	20
3.2 Recolha do material vegetal	20
3.3 Metodologia	22
3.3.1 Extracção de DNA a partir de embriões	22
3.3.2 Extracção de DNA total a partir de agulhas	23
3.3.3 Quantificação e visualização de DNA	24
3.3.4 Amplificação de microsatélites nucleares (nuSSR)	24
3.3.5 Análise de fragmentos	26

3.3.6 Análise de resultados	26
3.3.6.1 Análise de paternidade	26
3.3.6.2 Sistema de cruzamento	29
3. Resultados	30
4.1 Visualização de DNA extraído	30
4.2 Visualização da amplificação com microsátélites nucleares (nuSSR)	30
4.3 Resultados da análise de fragmentos	31
4.4 Resultados da análise de paternidade	31
4.5 Resultados do sistema de cruzamento	37
5. Discussão	40
6. Considerações finais	43
7. Referências bibliográficas	44
8. Anexos	51

RESUMO

O pinheiro bravo (*Pinus pinaster* Ait.) é uma espécie de extrema importância em Portugal, ocupando cerca de 1/3 da área florestada. A quantificação da contaminação de pólen de um pomar de sementes é fundamental para se avaliar o decréscimo no ganho genético esperado devido à contaminação com pólen estranho a partir de povoamentos circundantes. O presente trabalho teve como principal objectivo estimar a contaminação de pólen com um determinado grau de confiança. No pomar de sementes clonal da Mata do Escaroupim, que compreende 728 rametos, utilizaram-se 3 *loci* de nuSSR (microsatélites nucleares) para procedermos à análise de paternidade e de contaminação de pólen. Recolheram-se 206 sementes de 21 árvores, 7 em cada um dos três *plots* localizados em função da direcção dos ventos dominantes e as agulhas de cada um dos 60 clones. Os 3 *loci* revelaram ser suficientes para distinguir todos menos 2 pares dos 60 clones presentes no pomar, por apresentarem o mesmo genótipo. As estimativas mínima e máxima de contaminação de pólen no pomar foram 46%, e 56%, respectivamente. Estes valores podem ser explicados pela presença de uma população de *P. pinaster* a uma distância inferior a 2 Km e à existência de regeneração natural de pinheiro bravo na zona de isolamento do pomar. A contaminação de pólen observada foi mais elevada nas *plots* 1 e 3 do que na *plot* interior (nº 2). Neste estudo verificou-se que só 20% dos clones contribuíram para a geração seguinte; este facto poderá ter como consequência uma redução da variabilidade genética nas sementes. No entanto, este estudo foi baseado numa amostragem assimétrica do pomar (3 *plots*), o que poderá ter enviesado os resultados e, o número de clones que efectivamente contribuíram para a geração seguinte, poderá ser maior. A taxa de polinização cruzada multilocus foi muito elevada - 90,2 -. A estimativa mínima de consanguinidade biparental foi de 21,2%, valor que pode considerar-se não muito elevado se tivermos em atenção o número de sementes amostradas e o tamanho do pomar.

Palavras chave: pinheiro bravo, pomar de sementes clonal, contaminação de pólen, microsatélites nucleares (nuSSR), análise de paternidade.