



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**Propagação *In Vitro* de Pinheiro Bravo
(*Pinus pinaster* Sol. Ex Ait.) e Análise
de Variação Somaclonal**

Engenharia Florestal

Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Tânia Sofia da Fontoura Morais



CASTELO BRANCO
2005

ÍNDICE

Anexos	VII
Índice de figuras	VIII
Índice de tabelas	X
Lista de abreviaturas	XI
Resumo	XII
Abstract	XIII

CAPÍTULO 1

1. Introdução geral	2
1.1. Caracterização botânica da espécie	2
1.2. Área de distribuição do Pinheiro bravo	4
1.3. Importância e enquadramento na floresta portuguesa	6
1.4. Aplicações biotecnológicas	8
1.5. Sistemas de cultura in vitro para a propagação de clones de coníferas	10
1.5.1. Multiplicação axilar	11
1.5.2. Regeneração adventícia	12
1.5.3. Embriogénese somática	14
1.5.3.1. Criopreservação	19
1.6. Técnicas de análise de variação genética	21
1.6.1. PCR (Polimerase Chain Reaction)	21
1.6.2. Microsatélites	23
1.6.3. Técnica SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism)	25
1.7. Objectivos	27

CAPÍTULO 2

2. Multiplicação axilar	29
2.1. Material e métodos	29
2.1.1 Material vegetal	29
2.1.2. Desinfecção e germinação	30
2.1.3. Indução e multiplicação	30
2.1.4. Enraizamento	31
2.2. Resultados e discussão	31

CAPÍTULO 3

3. Regeneração adventícia	35
3.1. Material e métodos	35
3.1.2. Enraizamento	37
3.2. Resultados e discussão	37

CAPÍTULO 4

4. Embriogénese Somática	42
4.1. Material e métodos	42
4.1.1. Recuperação das linhas embriogénicas criopreservadas e respectiva proliferação	43
4.1.2. Maturação dos embriões somáticos	44
4.1.3. Pós maturação	45
4.1.4. Germinação	45
4.1.5. Aclimatização	46
4.2. Resultados e discussão	47

CAPÍTULO 5

5. Técnicas de análise de variação genética	49
5.1. Material e métodos	49
5.1.1. Extracção de DNA genómico	49
5.1.2. Visualização e quantificação do DNA	50
5.1.3. Quantificação e pureza do DNA	50
5.2. Resultados	51
5.3. Microsatélites	52
5.3.1. Resultados	52
5.4. SSAP (<u>S</u> equence- <u>S</u> pecific <u>A</u> mplification <u>P</u> olymorphism)	53
5.4.1. Material e métodos	53
5.4.1.1. Isolamento de DNA genómico	53
5.4.1.2. SSAP (<u>S</u> equence- <u>S</u> pecific <u>A</u> mplification <u>P</u> olymorphism)	53
5.4.2. Resultados	54

CAPÍTULO 6

6. Considerações Finais	57
-------------------------	----

CAPÍTULO 7

7. Referências Bibliográficas	60
-------------------------------	----

Agradecimentos

Anexos

RESUMO

Foram estudados três sistemas de cultura *in vitro* para a propagação clonal de pinheiro bravo, multiplicação axilar, regeneração adventícia e embriogénese somática. Na cultura axilar e na regeneração adventícia, efectuaram-se todas as fases do processo, desde a indução ao enraizamento, enquanto que na embriogénese somática apenas não foi efectuada a indução de linha embriogénicas. Na multiplicação axilar, foram utilizadas três famílias de sementes (32, 68 e 82), onde foram testadas diferentes concentrações de BAP, 0,25mg/l e 0,5mg/l, tendo-se chegado à conclusão de que o número de rebentos obtido dependia significativamente da família e não da concentração de BAP. No caso da regeneração adventícia foram utilizadas quatro famílias (30, 32, 42 e 48), com as mesmas condições de cultura, concluindo-se neste caso que a família 48 foi a melhor em termos de número médio de rebentos obtidos.

De forma a avaliar comparativamente a eficiência destas duas técnicas de propagação analisaram-se os resultados obtidos para a família 32 utilizada em ambas as técnicas, chegando-se à conclusão de que neste caso a multiplicação axilar permitiu obter um maior número de rebentos por semente do que a regeneração adventícia. Quanto ao enraizamento, também foi testado em rebentos obtidos através das duas técnicas, mas este estudo ainda se encontra a decorrer no laboratório.

Foram também acompanhados alguns ensaios utilizando diferentes técnicas de análise de variação genética que estavam a decorrer no laboratório.

Palavras-chave: Multiplicação Axilar, Regeneração Adventícia, Embriogénese Somática, Rebentos, *Pinus pinaster*.