



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

**Identificação de Cultivares de Ervilha Proteagínosa
(*Pisum Sativum L.*) com utilização de marcadores moleculares
do tipo Microssatélites**

Nuno Filipe Domingues Henriques

**Trabalho de Fim de Curso
Engenharia Biológica e Alimentar**

**Trabalho Efectuado sob a orientação do
Professor Carlos Manuel Gaspar dos Reis**

Outubro 2011

Agradecimentos

Agradeço ao professor Carlos Manuel Gaspar dos Reis pelo apoio dado durante todo o procedimento experimental, pelos conhecimentos que adquiri bem como pela disponibilização do material de estudo para a realização deste relatório de estágio.

Agradeço ainda aos meus pais e irmã pelo apoio dado durante todo o meu percurso académico.

Agradeço também a técnica de laboratório engenheira Graça Diogo pelo trabalho laboratorial realizado na extração de DNA da ervilha proteagínosa.

O presente estudo foi realizado no âmbito do projecto 0186_AGROCELE_3_E, Programa Operacional de Cooperação Transfronteiriça Espanha - Portugal (POCTEP), em Colaboração com o Instituto Tecnológico Agrário de Castilla y León (ITACyL) e financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Identificação de cultivares de ervilha proteagínosa (*Pisum sativum* L.) com utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélites

Resumo

Neste trabalho pretendeu-se fazer a identificação de 20 cultivares de ervilha proteagínosa (*Pisum sativum* L.), inscritas no catálogo comunitário de variedades, através de marcadores moleculares do tipo microssatélites. Após extracção de DNA, foram analisados 7 diferentes *loci*. Após amplificação por PCR, os fragmentos resultantes foram separados em gel de agarose MS-8 a 3,5% (w/v) em tampão TBE, 90 V/h, com coloração com brometo de etídio. Os géis foram analisados pela presença/ ausência de bandas e construção de tabela com código binário. Para cada *locus* foi calculado o valor PIC. Os dados foram processados com o software estatístico NTSYS-pc, com utilização do módulo SIMQUAL e coeficiente de similaridade de Jaccard, seguido de análise de cluster UPGMA.

Um dos *loci* estudados era monomórfico. Da análise de 6 *loci* polimórficos foi possível fazer a distinção de quase todas as cultivares estudadas. Os *loci* mais informativos foram AB53 e AD61. O dendrograma UPGMA revela dois grupos principais. No segundo grupo, a cultivar Grisel aparece isolada, geneticamente afastada das restantes. Verificou-se um baixo número de *loci* heterozigóticos o que é consentâneo com a natureza autogâmica da espécie.

Palavras chave: extracção de DNA; microssatélites; PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase); electroforese.

Identification of proteaginous pea cultivars (*Pisum sativum* L.) using microsatellites molecular markers

Abstract

In this work we intended to identify 20 cultivars of proteaginous pea (*Pisum sativum* L.), registered in the Community Catalog of Varieties, by microsatellites molecular markers. After DNA extraction, seven different *loci* were analyzed. PCR amplifications were conducted and the resulting fragments were separated on an 3,5% MS-8 agarose gel in TBE buffer, at 90V/h. Staining was conducted with ethidium bromide. The gels were analyzed for the presence/absence of bands and a table with binary code was made. For each *locus* PIC value was calculated. The data were processed with the statistical software NTSYS-pc, using the SIMQUAL module and Jaccard similarity coefficient, followed by UPGMA cluster analysis.

With the analysis of six polymorphic *loci* was possible to distinguish almost all of cultivars. The most informative *loci* were AD61 and AB53. The UPGMA dendrogram shows two main groups. In the second group, the cultivar Grisel appears isolated and genetically distant from the rest. There was a low number of heterozygous *loci* wich is consistent with the nature of self pollinated species.

Keywords: DNA extraction, microsatellites, PCR (Polymerase Chain Reaction); electrophoresis.