



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ÁRVORES
“PLUS” DE *Pinus pinea* L. SELECIONADAS
PARA PRODUÇÃO DE FRUTO**

Engenharia Florestal

Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Clarisse Pires Carmona



CASTELO BRANCO

2006

Índice

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Agradecimentos..... | i |
| Abreviaturas..... | iii |
| Resumo..... | v |
| Abstract..... | vi |
| Índice..... | vii |
| Índice de figuras..... | viii |
| Índice de tabelas..... | xi |
| 1 – Introdução | 1 |
| 2 – Revisão Bibliográfica | 3 |
| 2.1– Enquadramento sistemático e caracterização botânica..... | 3 |
| 2.2 – Origem e regiões de difusão | 6 |
| 2.3 – Área de distribuição actual | 7 |
| 2.4 – Importância económica..... | 9 |
| 2.5 – Marcadores genéticos e moleculares | 10 |
| 2.5.1 – Isoenzimas (Marcadores bioquímicos)..... | 11 |
| 2.5.2 – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) | 12 |
| 2.5.3 – Técnica PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)..... | 13 |
| 2.5.4 – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)..... | 14 |
| 2.5.5 – Microssatélites | 15 |
| 2.5.6 – AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) | 16 |
| 2.5.7 – Outras Técnicas..... | 18 |
| 2.5.7.1 – Sequenciação propriamente dita..... | 18 |
| 2.5.7.2 – SNPs (Single-Nucleotide Polymorphisms)..... | 19 |
| 2.5.7.3 – Tecnologia de <i>Microarray</i> ou <i>DNA chip array</i> | 20 |
| 2.5.8 – Estudos de diversidade genética em <i>P. pinea</i> L..... | 20 |
| 3 – Material e Métodos | 22 |
| 3.1 – Material Vegetal | 22 |
| 3.2 – Isolamento de DNA | 23 |
| 3.2.1 – Separação do DNA total por electroforese | 23 |
| 3.3 – Microssatélites nucleares (nuSSR) | 24 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.1 – Amplificação dos microssatélites | 24 |
| 3.3.2 – Separação dos fragmentos por electroforese | 27 |
| 3.3.3 – Análise dos fragmentos..... | 27 |
| 3.4 – Genes e sequências de cpDNA | 27 |
| 3.4.1 – Amplificação e purificação dos genes do cpDNA..... | 28 |
| 3.4.2 – Sequenciação de genes e de sequências de cpDNA | 29 |
| 3.4.3 – Alinhamento de sequências | 30 |
| 4 – Resultados..... | 31 |
| 4.1 – Visualização da quantificação do DNA total..... | 31 |
| 4.2 – Microssatélites | 31 |
| 4.3 – Genes e sequências de cpDNA | 33 |
| 4.3.1 – Visualização da amplificação dos genes e sequências de cpDNA | 33 |
| 4.3.2 - Alinhamento de sequências..... | 33 |
| 5 – Discussão..... | 36 |
| 5.1 – Microssatélites | 36 |
| 5.2 – Genes e sequências de cpDNA | 37 |
| 5.3 – Evidências sobre a ausência de polimorfismo em <i>P. pinea</i> | 37 |
| 6 – Considerações finais | 40 |
| 7 – Bibliografia | 41 |
| Anexos | |

Resumo

A *Pinus pinea* L. é economicamente importante, em particular, para a região de Alcácer do Sal, devido à produção de pinhão. Para genotipar 49 árvores “plus” seleccionadas pela produção de fruto nessa região de produção, recolheram-se as agulhas, extraiu-se o DNA, e utilizou-se três microssatélites nucleares desenhados para *P. pinaster* (FRPP91, FRPP94 e A6F03). Em vinte dessas amostras, juntamente com três de *P. pinaster*, uma de *P. halepensis* e uma de *P. canariensis*, foram sequenciados dois genes (*matK*, *rbcL*), um intrão (*trnV*) e a região entre dois genes (*rpl20-rps18*), do DNA do cloroplasto. A transferência dos SSR FRPP91 e FRPP94 de *P. pinaster* para *P. pinea* não foi conseguida e só obtivemos um dos alelos referidos por Guevara *et al.* (2005) para o SSR A6F03. Verificou-se a existência de um único haplótipo nas amostras de *P. pinea*, para as diferentes regiões sequenciadas. Quando comparadas com as outras espécies utilizadas, o gene *matK* distinguiu em 6 pb a amostra de *P. canariensis* das restantes. O gene *rbcL* e o intrão *trnV* tinham o mesmo comprimento e sequência de nucleótidos nas amostras das várias espécies. A região *rpl20-rps18* discriminou as amostras de *P. pinea* das de *P. pinaster* e de *P. halepensis* em 15 pb e das de *P. canariensis* em 4 pb.

Palavras chave: Pinheiro manso, microssatélites, sequenciação, diferenciação molecular.