

**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
**MESTRADO EM MELHORAMENTO DE PLANTAS**

**ANÁLISE DE VARIABILIDADE  
GENÉTICA DO SOBREIRO COM  
VISTA AO MELHORAMENTO E À  
CONSERVAÇÃO DOS  
RECURSOS GENÉTICOS**

CARLA MARIA FERREIRA DO NASCIMENTO

**ÉVORA**  
**1998**



“A Universidade de Évora não se responsabiliza pelas doutrinas expressas neste relatório, sendo as mesmas da exclusiva responsabilidade da autora.”

*Dedico esta tese aos  
Meus Queridos  
Pais e Filhos,  
João Eduardo, Dionisia, João e Eduardo  
Pelo seu Amor e Apoio*

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, deseja a autora expressar o seu mais profundo agradecimento ao Dr. José Matos (INETI), seu orientador pelo apoio, incentivo, sugestões, orientação, ajuda prestada na definição do caminho a seguir, pela revisão do texto e pela camaradagem desde sempre demonstrada.

Manifesta o seu reconhecimento ao Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, por todos os meios postos à sua disposição para a realização deste estudo, em especial à Dr<sup>a</sup> Alda Clemente, pela sua disponibilidade.

À Dr<sup>a</sup> Ângela Xufre, quer a autora agradecer a disponibilidade e incansável colaboração, em termos laboratoriais e de análise de resultados.

Agradece a excelente cooperação prestada por seu pai e filho, respectivamente, João Eduardo na dactilografia do manuscrito e sugestões dadas para a sua elaboração e João Miguel na ajuda em termos de pesquisa bibliográfica.

Para todos aqueles cujo nome não foi mencionado (familiares, amigos e colegas) e que de uma ou de outra forma contribuíram para a realização deste trabalho, quer a autora expressar os seus mais sinceros agradecimentos.

Por último, mas não menos importante e sempre presentes, os maiores agradecimentos da autora aos seus filhos João Miguel e Eduardo Jorge pelo amor com que suportaram a separação, não só nos meses em que esteve ausente, mas também nos seguintes em que, mesmo em casa, deles se separou para escrever esta tese.

## ÍNDICE

Resumo .....	7
Índice de Figuras .....	8
Índice de Abreviaturas.....	10
I- INTRODUÇÃO.....	12
1- O Sobreiro.....	12
1.1-O Sobreiro desde a Antiguidade .....	12
1.2- Aspectos Botânicos do Sobreiro .....	13
1.3- Distribuição Geográfica .....	15
1.4- Sobreiro: Solos e Climats .....	15
1.5- Reprodução do Sobreiro.....	16
1.6- Sobreiro: Genética e Aplicações ao Melhoramento.....	17
2- Marcadores Moleculares para Análise Genética .....	21
2.1- Conceitos Gerais .....	21
2.2- Marcadores Isoenzimáticos .....	23
2.3- Fragmentos de Restrição de Comprimento Polimórfico - RFLP.....	26
2.4- Repetições em Tandem em Número Variável - VNTRs.....	29
2.5- Repetições de Sequências Simples - SSRs.....	31
2.6- Fragmentos Amplificados de Comprimento Polimórfico - AFLP.....	33
2.7- Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente - RAPD.....	37
2.7.1- Conceitos Gerais .....	37
2.7.2- Base Genética dos Marcadores RAPD.....	38
2.7.3- Detecção dos Marcadores RAPD.....	38

2.7.4- Vantagens dos Marcadores RAPD.....	39
2.7.5- Limitações dos Marcadores RAPD.....	39
2.7.6- Utilização de Marcadores RAPD na Análise da Variabilidade e no Melhoramento Genético .....	40
 3- Objectivos do Trabalho .....	 48
 II- MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....	 49
1- Matcriciais e Métodos.....	49
1.1- Material Vegetal.....	49
1.2- Reagentes.....	49
1.3- Equipamento .....	50
1.4- Métodos .....	51
1.4.1- Isolamento de DNA a Partir das Folhas de <i>Quercus suber</i> L. ....	51
1.4.2- Determinação da Pureza e Concentração do DNA .....	55
1.4.3- Amplificação Aleatória de Fragmentos por PCR (RAPD).....	55
1.4.4- Electroforese em Gel de Agarose .....	56
1.4.5- Análise/Tratamento das Imagens dos Produtos de Amplificação.....	58
1.4.6- Tratamento Estatístico dos Resultados.....	58
 III- RESULTADOS .....	 60
1- Isolamento de DNA a Partir das Folhas de <i>Quercus suber</i> .....	60
2- Análise da Variabilidade Intra-Populacional.....	62
2.1- Análise das Diferentes Populações com o “Primer” AB1-05 .....	62
2.2- Análise das Diferentes Populações com o “Primer” AB1-10 .....	71
2.3- Análise das Diferentes Populações com o “Primer” AB1-18 .....	79
2.4- Análise das Populações Individuais com o Conjunto dos “Primers” .....	88
3- Análise da Variabilidade Inter-Populacional.....	92

IV- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	99
V- ANEXO 1: COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	104
VI- ANEXO 2: REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	106
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112



## RESUMO

O presente trabalho realizado no âmbito da dissertação do Mestrado em Melhoramento de Plantas Autogâmicas, pretendeu analisar a variabilidade genética intra e inter populacional do sobreiro (*Quercus suber L.*). Deste modo, foram efectuados estudos comparativos de DNA isolado a partir de folhas de árvores com diferentes proveniências e que apresentavam diferentes características fenotípicas.

A análise comparativa foi efectuada utilizando marcadores de RAPD.

**Palavras Chave:** Sobreiro, RAPD, Polimorfismo, Variabilidade, Melhoramento.

## Índice de Figuras

Fig. 1- Aspecto geral da planta, folhas e glande do sobreiro	14
Fig. 2- Protocolo de extracção do DNA utilizando o “DNeasy Plant Mini Kit”	52
Fig. 3- Fotografia ilustrativa dos fragmentos de DNA característicos do marcador de múltiplos de 100pb	57
Fig. 4- Perfil de fragmentos de DNA	58
Fig. 5- DNA genómico de folhas de sobreiro analisado por electroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídio	61
Fig. 6- Perfis de amplificação do DNA de diferentes indivíduos a testar, com o “primer” AB1-05	62
Fig. 7- Representação esquemática do tamanho dos fragmentos de amplificação da população V-01	63
Fig. 8- Representação esquemática do tamanho dos fragmentos de amplificação da população VI-02	64
Fig. 9- Matriz binária obtida para a população V-01 com o “primer” AB1-05	65
Fig. 10- Matriz binária obtida para a população VI-02 com o “primer” AB1-05	66
Fig. 11- Dendrograma isolado da população V-01 com o “primer” AB1-05	67
Fig. 12- Dendrograma isolado da população V-02 com o “primer” AB1-05	68
Fig. 13- Dendrograma isolado da população VI-02 com o “primer” AB1-05	69
Fig. 14- Dendrograma isolado da população VI-03 com o “primer” AB1-05	69
Fig. 15- Perfis de amplificação do DNA de diferentes indivíduos a testar, com o “primer” AB1-10	71
Fig. 16- Representação esquemática do tamanho dos fragmentos de amplificação da população VI-03 para o “primer” AB1-10	72
Fig. 17- Matriz binária obtida para a população VI-03 com o “primer” AB1-10	73
Fig. 18- Dendrograma isolado da população V-01 com o “primer” AB1-10	74
Fig. 19- Dendrograma isolado da população V-02 com o “primer” AB1-10	75
Fig. 20- Dendrograma isolado da população VI-02 com o “primer” AB1-10	76

Fig. 21- Dendrograma isolado da população VI-03 com o “primer” AB1-10	77
Fig. 22- Padrões de DNA amplificados de diferentes indivíduos a testar, com o “primer” AB1-18	79
Fig. 23- Representação esquemática do tamanho dos fragmentos de amplificação da população V-02 para o “primer” AB1-18	80
Fig. 24- Matriz binária obtida para a população V-02 com o “primer” AB1-18	81
Fig. 25- Dendrograma isolado da população V-01 com o “primer” AB1-18	82
Fig. 26- Dendrograma isolado da população V-02 com o “primer” AB1-18	83
Fig. 27- Dendrograma isolado da população VI-02 com o “primer” AB1-18	84
Fig. 28- Dendrograma isolado da população VI-03 com o “primer” AB1-18	85
Fig. 29- Dendrograma da população V-01 com o conjunto de “primers”	88
Fig. 30- Dendrograma da população V-02 com o conjunto de “primers”	89
Fig. 31- Dendrograma da população VI-02 com o conjunto de “primers”	90
Fig. 32- Dendrograma da população VI-03 com o conjunto de “primers”	91
Fig. 33- Dendrograma obtido para uma amostra aleatória de 30 indivíduos das 4 populações com o “primer” AB1-05	93
Fig. 34- Dendrograma obtido para uma amostra aleatória de 30 indivíduos das 4 populações com o “primer” AB1-10	94
Fig. 35- Dendrograma obtido para uma amostra aleatória de 30 indivíduos das 4 populações com o “primer” AB1-18	95
Fig. 36- Dendrograma correspondente à totalidade das bandas e a todos os “primers”	98
Fig. 37- O ciclo de PCR	109

## Índice de Abreviaturas

A - Adenina

Abs<sub>260</sub> - Absorvância a 260nm

Abs<sub>280</sub> - Absorvância a 280nm

AFLP - Amplificação de Fragmentos de Comprimento Polimórfico

C - Citosina

cDNA - DNA complementar

dATP - Trifosfato de desoxiadenosina

dCTP - Trifosfato de desoxicitosina

dGTP - Trifosfato de desoxiguanina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleótidos trifosfato

dTTP - Trifosfato de desoxitimina

EDTA - Ácido etilenodiamino-tetracético

G - Guanina

mRNA - RNA mensageiro

pb - Pares de bases

PCR - Reacção em cadeia da polimerase

RAPD - Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente

RFLPs - Fragmentos de Restrição de Comprimento Polimórfico

RNA - Ácido ribonucleico

RNase - Ribonuclease

rpm - Rotações por minuto

SSR - "Single Sequence Repeats" - Repetições de sequências simples

T - Timina

TBE - Tampão tris-borato-EDTA

TEMED - N,N,N',N',-Tetrametiletlenodiamina

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

U.V - Ultra violeta

VNTRs -“Variable Number of Tandem Repeats” - Repetições em tandem em número variável

# I- Introdução

## I- O Sobreiro

### I.1- O Sobreiro desde a Antiguidade

A primeira descrição do sobreiro (*Quercus suber* L.) foi realizada por Plínio (AD 77) e mencionava a sua capacidade de renovação da casca sempre que a mesma era retirada (Ashby, 1989; Gil, 1998).

O sobreiro é uma árvore que data da Era Terciária (Oliveira, 1991, Natividade, 1950) do Período Oligocénico (Natividade, 1950).

De acordo com Natividade (1950), é provável que o centro principal de difusão do sobreiro estivesse localizado na região actualmente ocupada pelo Mar Tirreno, tendo posteriormente migrado para Ocidente.

As modificações sofridas pelo clima terrestre ao longo do tempo (glaciações e pós-glaciações) conduziram a uma redução da área ocupada pelo sobreiro (Natividade, 1950; Alves, 1982), a qual foi agravada pela acção humana.

A protecção legal ao sobreiro é muito antiga, tendo Portugal sido o pioneiro e principal legislador nesse campo (Vieira, 1988).

No reinado de D. Dinis apareceram as determinações para a protecção ao sobreiro, punindo as queimadas, varejamento de frutos e cortes de árvores (Rodrigues, 1992). Posteriormente, em 1488 (reinado de D. João II) foi proibido o corte dos sobreiros (Pinto, 1992 cit. Gil, 1998).

De acordo com uma lei de 1602 (reinado de D. Filipe) era proibido cortar os sobreiros ou extrair a sua cortiça (Vieira, 1988). No entanto, as iniciativas levadas a cabo no sentido de evitar o seu desaparecimento não foram proveitosas e no espaço de um século grande parte dos montados desapareceu.

No século XVI, devido ao aumento populacional e ao largo incremento da utilização da madeira de sobreiro nos estaleiros, a desarborização começou a ser tida como um problema nacional (Natividade, 1950).

A partir do século XVIII, iniciou-se a exploração do montado associado à agricultura sob coberto e à alimentação do gado (Gil, 1988). É também neste século que o sobreiral, nomeadamente o Alentejano, passou de floresta a montado (espaços mais abertos onde se pratica exploração agro-silvopastoril) (Nogueira, 1977 cit. Gil, 1998).

No início do século XX, a crescente procura da cortiça levou à sua exploração em termos de aproveitamento máximo das suas capacidades produtivas, à protecção da regeneração espontânea e ao repovoamento de áreas anteriormente ocupadas pelo sobreiro (Gil, 1998).

Em Portugal, no período entre 1900-1950, a área ocupada pelo sobreiro duplicou, acompanhando a progressiva valorização da cortiça. Na última década, embora não existam alterações alarmantes, muitos dos sobreiros ardidos foram substituídos por eucaliptal. No entanto, também se tem verificado um aumento da área ocupada por esta espécie em zonas em que a cultura agrícola foi abandonada e a regeneração natural devidamente protegida (Rodrigues, 1992).

## 1.2- Aspectos Botânicos do Sobreiro

O Sobreiro (*Quercus suber* L.) é uma dicotiledónia da família Fagaceae, Género *Quercus*. Entre as características que o distinguem dos restantes carvalhos, há a salientar:

- o considerável desenvolvimento que pode atingir o revestimento suberoso do tronco e dos ramos;
- a faculdade de regenerar uma nova assentada de células geradoras de cortiça quando se despojam aqueles órgãos do revestimento protector;
- a homogeneidade e pureza do tecido suberoso e as suas notáveis propriedades físicas, químicas e mecânicas (Natividade, 1950; Gil, 1988).

O sobreiro é um mesofanerófito de 10-15 metros, de copa ampla e pouco densa (Franco, 1971; Fabião, 1996), folhas persistentes, tronco revestido por um ritidoma espesso, fendido e suberoso (Franco, 1971; Fabião, 1996), frequentemente tortuoso (Fabião, 1996). A

tortuosidade das ramificações é devida ao facto do prolongamento dos ramos nem sempre se fazer pelo gomo da extremidade, porque este morre e é substituído na sua função pelos olhos laterais que se encontram nas imediações (Natividade, 1950).

As folhas são claras e aveludadas enquanto novas (Gil,1998), tornando-se posteriormente verde escuras e brilhantes na página superior e acinzentadas na inferior, em regra com indumento (Fabião,1996; Mitchell,1985; Fischesser,1980; Franco, 1971). De acordo com Fabião (1996), têm forma ovada, por vezes um pouco alongada, e margens inteiras ou muito pouco recortadas (e nesse caso, com recorte serrado ou dentado incipiente).

A Figura 1 mostra o aspecto geral da planta, folhas e glandes do sobreiro:



Fig. 1- Aspecto geral da planta, folhas e glandes do sobreiro

Fonte: Fabião (1996)

A glande de cor acastanhada (Goes, 1991 cit. Gil, 1998) é ovóide-oblonga (Mitchell, 1985), com pedúnculo curto (Fabião, 1996), requerendo o seu desenvolvimento cerca de um ano (Goes, 1991 cit. Gil, 1998).

Em Portugal, a floração ocorre entre Abril e Junho (Natividade, 1950; Goes, 1991 cit. Gil, 1998), podendo no entanto prolongar-se (Goes, 1991 cit. Gil, 1998).

O sobreiro inicia a sua frutificação quando atinge a maturidade, ou seja por volta dos 15-20 anos, estando a frutificação anual dependente das condições climáticas anteriores (Gil, 1998).

A idade máxima de um sobreiro são 300-400 anos (Fischesser, 1980), sendo o seu poder germinativo de 70% (Alves, 1980).



### 1.3- Distribuição Geográfica do Sobreiro

Nos anos 80, a distribuição suberícola estava circunscrita à região que envolve todo o Mar Mediterrâneo, litoral do norte de África e sul da Península Ibérica (Alves, 1980). De acordo com Suber 2000 cit. Gil (1998), o desenvolvimento dos sobreiros está associado ao clima do sudoeste e noroeste extremo africano, que apresenta valores de humidade atmosférica elevados durante o verão. Pode dizer-se que nesta região prefere as oscilações entre o paralelo 44 e o paralelo 36, podendo chegar a 33 (Marrocos) de latitude Norte. Deste modo, o montado de sobreiro é um bosque tipicamente mediterrâneo que se estende:

- Desde os maciços franceses até Oulmés e Khénifra em Marrocos;
- Da Secília e Sul de Itália até Sagres.

Em Portugal, embora exista no Norte, Litoral Centro e Norte, tem o seu centro principal a sul do Tejo, zonas Litoral e Central, vales do Douro e afluentes (Alves, 1980). Estende-se ainda para uma mancha no nordeste espanhol (Gil, 1988).

O sobreiro é a segunda espécie em área, correspondendo os montados de sobreiro a cerca de 20% da superfície florestal total (Fabião, 1996; DGF, 1993).

No conjunto dos países produtores de cortiça, a área ocupada pelos montados de sobreiro é de 2 330 000ha, situando-se 58% no sudoeste da Europa e 42% do Maghreb (Bendahmar, 1988 cit. Gil, 1998).

### 1.4 - Sobreiro: Solos e Climas

A distribuição do sobreiro é heterogénea e difusa, não obedecendo às fronteiras usuais da fitogeografia (Gil, 1998).

O clima típico é o de transição entre o de características atlânticas e o de características mediterrâneas, sem grandes oscilações térmicas anuais, com verões prolongados e humidade atmosférica relativamente elevada (Gil, 1998; Fabião, 1996; Fischesser, 1980; Normandine, 1986).

O sobreiro adapta-se bem a uma gama alargada de solos, exigindo condições que proporcionem livre expansão radicular, destacando-se um grau de arejamento elevado, boa e regular drenagem interna, não existência de compactação dentro do limite de exploração das

raízes, preferindo solos ácidos, não tolerando solos salinos (Diniz, 1994), calcários (Alves, 1982; Fabião, 1996; Fischesser, 1980; Normandine, 1986) nem os muito compactados (Fabião, 1996) e suportando mal o excesso de humidade quando retida persistentemente no solo (Diniz, 1994).

### 1.5 - Reprodução do Sobreiro

O processo reprodutivo do sobreiro é bastante complexo mas muito mal conhecido. Para além da floração primaveril normal, a espécie apresenta florações de carácter marcadamente irregular. São possíveis florações atípicas de um só sexo (Corti, 1955; Natividade, 1950; Varela, 1994), mas também há abrolhamentos outonais com flores hermafroditas e com dois sexos (Machado, 1938). A ocorrência dos três tipos de flores foi detectada durante a floração primaveril (Varela, 1994; Varela & Valdivieso, 1995).

A época de recolha de semente ocorre de Setembro a Janeiro (Alves, 1982).

O período em que as sementes do sobreiro conservam a sua capacidade de germinação, tem uma duração de cerca de seis meses (Costa, 1980; Fabião, 1996), devendo as sementes ser colhidas no solo, logo após a sua queda para evitar a perda da capacidade germinativa. Os primeiros e os últimos frutos não devem ser aproveitados, por serem de pior qualidade (Costa, 1980).

As sementes são de conservação difícil, pelo que a sementeira se deve processar antes da Primavera que se segue à colheita. Se não existir o perigo de excesso de humidade e temperaturas baixas na região, deve optar-se pela sementeira imediata (Costa, 1980). As glandes devem ser conservadas em ambientes não muito húmidos e à temperatura ambiente (Gil, 1998).

A protecção aos novos sobreiros obtidos por regeneração natural é suficiente para conseguir em muitos locais o povoamento desejado, nomeadamente em grande parte da área europeia com aptidão para o sobreiro, excepto em regiões sub-áridas e onde o solo se encontra num estado de degradação avançado (Natividade, 1954 cit. Gil, 1998). Aliás, de acordo com Carvalho (1990), a regeneração natural esteve na origem da maioria dos actuais montados portugueses, sendo um processo pouco dispendioso. No entanto, a introdução de novas

técnicas de cultivo da terra, a utilização intensa da terra e a mecanização, entre outros, fazem com que a regeneração natural do sobreiro seja cada vez em menor número.

#### 1.6- Sobreiro: Genética e Aplicações ao Melhoramento

De acordo com Poehlman (1978), o melhoramento das plantas é a arte e a ciência que permitem mudar e melhorar a hereditariedade das plantas. Por outras palavras, é a evolução orientada pela vontade do Homem (Vavilov 1949-50).

O melhoramento genético das plantas tem sido praticado com sucesso desde os primórdios da civilização (Ferreira & Grattapaglia, 1995), podendo ser alcançado desde que:

- haja variabilidade genética acessível;
- o ambiente não mascare completamente a variabilidade;
- possa ser realizada a selecção e recombinação de genótipos superiores para estabelecimento da geração seguinte (Grattapaglia, 1994).

Ao princípio inconscientemente e agora com plena consciência e assente em bases científicas, o que o melhoramento faz é imitar os processos evolutivos naturais, mas dirigindo-os para uma direcção determinada: a obtenção de genótipos que resultem mais benéficos para o Homem (Lacadena, 1970).

No caso do sobreiro (*Quercus suber* L.) alguns dos objectivos a alcançar são: criação de boas condições para uma evolução futura, conservação genética das espécies companheiras ou até que dele dependem (Varela & Eriksson, 1995), obtenção de árvores de crescimento mais rápido, em que seja possível antecipar a idade da exploração e que forneçam maiores produções, melhoramento das características mecânicas e físicas da cortiça de acordo com as exigências da indústria, supressão de certos defeitos devidos a factores genéticos, aumento do valor altriz da glande e redução do teor de princípios amargos e adstringentes, eliminação ou atenuação do hábito de frutificação alternada, obtenção de indivíduos com maior resistência a algumas doenças (Natividade, 1950), e pragas como *Armillaria mellea* L. (Natividade, 1958 cit. Gil, 1998), *Rosellinia necatrix* L., *Endothiella gyrosa* Sacc., *Nummularia regia* Sacc. ou *Hypoxyylon mediterraneum* L. (Fabião, 1996; Natividade, 1950; Neves, 1992), *Lymantria* L. (Natividade, 1951-52 cit. Gil, 1998; Fabião, 1996), *Euproctis*

*chrysorrhoea*, *Periclista andrei* e *P. dusmeti*, *Coroebus florentinus*, *C. undatus*, *Crematogaster scutellaris* (Fabião, 1996), a coleópteros de várias espécies do género *Balanus* (Natividade, 1950), *Tortrix viridana*, *Malacosoma neustria*, *Catocala nymphacea*, *Ephesia nymphacea*, *Eupoctris chysorrhoea*, *Cerambix cerdo*, *Curculio glandium*, *Curculio elephas*, *Platypus cylindrus*, *Sinoxylon sp.*, *Cremastogaster scutellaris* e *Microtus agrestis rozianus* (Gil, 1998).

O melhoramento genético tem sido um dos principais objectivos da optimização das culturas, sendo por isso imprescindível adquirir conhecimentos sobre a variabilidade genética, uma das forma de ultrapassar as fortes limitações da análise fenotípica tradicional. Recentemente, as técnicas de Biologia Molecular vieram enriquecer e complementar os métodos tradicionais da Genética Quantitativa, permitindo alcançar resultados de uma forma mais rápida. Em relação à Biologia Molecular do sobreiro, os conhecimentos são escassos ou praticamente inexistentes.

A reduzida diferenciação morfológica observada dentro do género *Quercus*, levou Borzi (1911) cit. Natividade (1950), a dizer que o sobreiro representa a perfeita negação do conceito de espécie. Levou também Schwarz (1936) cit. Natividade (1950), a chamar-lhe “*crux botanicorum*”. A própria identidade cariológica denuncia relações íntimas entre as espécies deste género e que só podem ser explicadas atribuindo às Quercínias uma origem filogenética comum. O reduzido conhecimento que possuímos sobre as afinidades do sobreiro com outros carvalhos, torna difícil a determinação da sua posição exacta dentro do género *Quercus*.

A urgência de realização de um trabalho de selecção e melhoramento como forma de aumentar a produção qualitativa e quantitativa da cortiça, constou das conclusões do encontro “Future Expectations of Portuguese Forestry”, organizado em 1983 pelo JNICT/NAS/USAID. Posteriormente outros autores, referiram a necessidade desse trabalho, tendo surgido estratégias distintas (Gomes, 1989; d’Alpuim & Roldão, 1993; Varela & Eriksson, 1995). No entanto, até ao momento não foi efectuado qualquer trabalho sistemático com o objectivo de caracterizar a variabilidade genética do sobreiro.

Estudos realizados em outras espécies do género *Quercus*, revelaram a utilidade de técnicas da Biologia Molecular para a detecção da variabilidade genética inter e intrapopulacional, em estudos de hibridação. O estudo da hibridação do *Q. suber* com *Q. ilex* (Rossello *et al.*, 1992), representa um dos raros trabalhos de Biologia Molecular em sobreiro.

De acordo com Natividade (1950), as espécies do género *Quercus* seriam halotetraploides, derivadas de uma forma ancestral com doze cromossomas somáticos.

A constituição genética do sobreiro é muito complexa (Natividade, 1934, 1937 cit. Natividade, 1950) e os produtos obtidos por via sexual, em que existe segregação e recombinação génica, são instáveis e geneticamente distintos dos progenitores. Por esse motivo, só recorrendo à propagação vegetativa se poderá perpetuar as formas botânicas com maior interesse cultural e, apesar da heterozigotia da espécie, criar povoamentos constituídos por indivíduos fenotipicamente iguais e dotados de características favoráveis. Nesse sentido, é necessário seleccionar os indivíduos que mais se aproximam do sobreiro ideal e com base neles estabelecer clones ou linhas vegetativas (Natividade, 1950).

Na selecção, deve considerar-se não apenas a quantidade e qualidade da cortiça e o tipo de fuste, mas também a velocidade de crescimento, a qualidade da glande e da madeira, a resistência a doenças e climas adversos (Gil, 1998).

Como a propagação do sobreiro, tanto vegetativa como a partir da bolota apresentam problemas, existem estudos sobre sistemas alternativos de propagação, tais como a cultura de tecidos e a embriogénese somática.

Gallego *et al.* (1997), testaram a variação somaclonal de embriões somáticos de *Quercus suber* L. durante a embriogénese, utilizando os perfis de bandas RAPD (vide I.2). Os padrões de RAPD não eram idênticos para cada genótipo e tempo de cultura, o que permitia a diferenciação de todos os genótipos. O agrupamento de genótipos, com base na sua distância genética e utilizando diferentes índices de similaridade, eram consistentes com a proveniência conhecida das linhas embriogénicas.

O conjunto de resultados obtidos por Fonseca *et al.* (1997), pode ser considerado um bom indício acerca da potencial qualidade nutricional das proteínas de *Quercus suber*.

Puigderrajols et al (1996) estudaram a origem e desenvolvimento precoce de embriões secundários em sobreiro. Os resultados obtidos, permitem afirmar que as condições de cultura podem determinar o caminho pelo qual a embriogénese secundária é realizada.

Os resultados obtidos por Elena Rossello & Cabrera (1996), ao estudarem a diversidade da estrutura populacional, a diferenciação e os genes da floração em populações mediterrâneas espanholas naturais de *Quercus suber* L., utilizando isoenzimas, revelaram que as mesmas possuíam uma fonte genética comum. O número de alelos, génotipos e níveis de diversidade genética indicam que estas populações são geneticamente ricas. Estes elevados níveis de variabilidade genética associados à importância ecológica e económica desta espécie, fazem dela uma forte candidata para programas de conservação genética.

A diversidade genética do sobreiro é muito ampla. Os cruzamentos originam fenótipos intermédios, com gradações insensíveis de um extremo ao outro, o que leva a supor que a hereditariedade seja dos principais factores governados por genes cumulativos. Por esse motivo, é conveniente trabalhar com populações grandes e efectuar cruzamentos sucessivos para se alcançarem os resultados desejados.

O longo período necessário para se poderem apreciar as características que mais interessam para a cultura, bem como o espaço exigido para as grandes populações com que é preciso trabalhar, dificultam os trabalhos de melhoramento do sobreiro (Natividade, 1950).

As características que apresentam maior variabilidade são:

- \* a morfologia do porte (vigor e arborescência);
- \* o recorte e dimensão das folhas;
- \* flores e frutos;
- \* singularidade da cortiça (porosidade, cor, densidade e inclusões);
- \* o arranjo lenticular da periderme (Carvalho, 1994).

O sobreiro apresenta um polimorfismo tão grande que se pode considerar cada árvore como uma forma botânica distinta (Natividade, 1954 cit. Gil 1998).

## 2 - Marcadores Moleculares para Análise Genética

### 2.1- Conceitos Gerais

Em Genética e Melhoramento Vegetal, o termo marcador molecular inclui qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (isoenzimas, por exemplo) ou de um segmento específico de RNA ou DNA que pode ou não corresponder a regiões codificantes do genoma. A sua função e sequência nucleotídica podem ou não ser conhecidas. Quando se comportam de acordo com as leis de Mendel, são denominados marcadores genéticos. (Ferreira & Grattapaglia, 1995, Grattapaglia, 1994).

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento da Bioquímica e Biologia, os estudos relacionados com a Genética Molecular de Plantas cresceram exponencialmente, existindo várias técnicas que permitem detectar a variabilidade genética ao nível de sequências de DNA (polimorfismo genético) (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Anderson & Fairbanks, 1990 cit. Heliodoro, 1997).

Nos anos 70, a descoberta e uso das enzimas de restrição, bem como da hibridação do DNA, permitiram a análise de RFLPs.

Mais recentemente, com o advento do PCR, processo pelo qual segmentos de DNA podem ser amplificados usando uma *DNA* polimerase termoestável (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988), foram descritas várias classes de marcadores moleculares que cobrem todo o genoma do organismo (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Os marcadores moleculares normalmente usados são RFLP (Fragmentos de Restrição de Comprimento Polimórfico), RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente), AFLP (Fragmentos Amplificados de Comprimento Polimórfico) e Microsatélites (Demeke et al., 1997).

As técnicas RFLP, RAPD, AFLP, VNTR e SSR diferem no modo como resolvem diferenças genéticas, no tipo de dados que geram e nos níveis taxonómicos, aos quais devem ser apropriadamente aplicados.

É imperativo entender os diferentes modos pelos quais os dados de diferentes técnicas moleculares podem ser utilizados, antes de embarcar num programa de aplicações desses dados a estudos particulares de diversidade (Karp et al., 1996).

É de salientar que a técnica RAPD apresenta maior simplicidade e rapidez do que a técnica RFLPs (Hahn et al., 1995; Rasmussen & Rasmussen, 1995). Este facto é devido ao facto dos marcadores RFLP se basearem na hibridação de DNA, enquanto os RAPD se baseiam na sua amplificação. Por outro lado, enquanto que para os RFLPs são necessárias grandes quantidades de DNA, a análise RAPD exige uma quantidade mínima de DNA para a análise genotípica de um indivíduo (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

O custo da técnica RAPD é mais baixo que o da técnica RFLP. Este facto é devido principalmente a diferenças nos gastos com mão-de-obra e no consumo de reagentes (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A técnica RAPD é mais eficaz que as isoenzimas, em virtude da possibilidade de processamento de um maior número de amostras, evidenciando portanto mais detalhes sobre o genoma. Este facto, foi detectado por Swazaki et al. (1997), ao estudar a variabilidade genética em couve manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D. C.);

A maior vantagem dos marcadores RAPDs em relação aos microsátélites é a facilidade com a qual novos marcadores polimórficos são formados (Lagercrantz et al., 1993). Além disso, são fáceis de desenvolver e mais baratos (Wu et al., 1994);

A técnica RAPD permite a utilização de um conjunto universal de iniciadores para análise genómica numa variedade de espécies (Williams et al., 1990); não requerendo investimentos preliminares em termos de análises de sequências nucleotídicas, caracterização de sondas ou síntese de iniciadores (Williams et al., 1990; Vos et al., 1995).

Os marcadores moleculares são úteis em estudos genéticos e no melhoramento de plantas pois permitem a identificação e selecção de génotipos (Carboni et al., 1995), sendo actualmente usados para estudar muitas das limitações correntes da cultura de tecidos, para a pesquisa de mecanismos que servem de base às variações somaclonais nos genomas nucleares, mitocondriais e cloroplastidiais, determinação precisa da origem de plantas derivadas da



cultura de microsporos ou anteras, fusão de protoplastos e outros estudos de cultura de tecidos em que estas informações são importantes (Cloutier & Landry, 1994).

Os cereais, a batata e o tomate têm sido usados como sistemas genéticos modelo porque são extremamente importantes para a produção de alimentos. Até cerca de 1993, praticamente todos os progressos nos vários melhoramentos estavam ligados a análises fenotípicas do genótipo. Devido ao facto da eficiência de um esquema de selecção e da análise genética baseada no fenótipo serem uma função da heritabilidade das características, factores como o ambiente, multigénicos e quantitativos, ou dominância completa ou parcial frequentemente confundem a expressão duma característica genética. Muitos dos problemas das análises morfológicas podem ser diminuídos mediante a identificação directa do genótipo com análises de diagnóstico baseadas em DNA. Por esta razão, os marcadores genéticos baseados em DNA estão a ser integrados em vários sistemas de plantas e espera-se que desempenhem um papel importante no futuro do melhoramento de plantas (Tingey & del Tufo, 1993).

## 2.2- Marcadores Isoenzimáticos

O termo isoenzimas foi proposto em 1959, por Markert & Møller (Simpson & Withers, 1986; Royo *et al.*, 1989a,b) e designa as formas moleculares distintas de uma mesma enzima que apresentam especificidade pelo mesmo substrato. Por este motivo, as isoenzimas diferenciam-se na carga total, no tamanho e na forma.

As isoenzimas têm provado ser não apenas uma preciosa ajuda em muitos estudos biológicos, mas têm fornecido novas e excitantes perspectivas para a interpretação de problemas inerentes à diferenciação celular, desenvolvimento ontogenético e evolução (Brewer & Sing, 1970), sistemática, processos evolutivos, genética populacional, citogenética, melhoramento e conservação dos recursos genéticos vegetais (Konishi, 1995 cit. Heliodoro, 1997).

Foram dos primeiros marcadores moleculares a ser usados para caracterização e posteriormente no melhoramento, como alternativa aos marcadores morfológicos, em virtude de serem produto de genes individuais (Hahn *et al.*, 1995).

Um dos laboratórios mais activos no estudo das isoenzimas é o Dr. George Brewer na Universidade de Michigan (Brewer & Sing, 1970).

A ocorrência de isoenzimas pode ser explicada, como o produto de mutações a nível do DNA que se irão reflectir na composição e sequência dos aminoácidos das cadeias polipeptídicas traduzidas a partir de sequências nucleotídicas de genes estruturais. Estas mutações podem provocar diferenças significativas nas cargas iónicas das cadeias polipeptídicas e, ainda, nas suas dimensões e formas. Ao serem submetidas a uma diferença de potencial num gel semiporoso de amido ou de poliácridamida, estas diferenças provocarão velocidades diferentes, devido ao efeito eléctrico e à clivagem molecular facultada pela estrutura do gel, o que levará à produção de uma banda distinta para cada forma isoenzimática (Castro, 1989 cit. Heliodoro, 1997).

Os marcadores isoenzimáticos apresentam diversas vantagens:

- ⊗ possibilidade de análise das bandas observadas uma vez que o controlo genético para a maioria das isoenzimas é conhecido;
- ⊗ relativamente baratos (Simpson & Withers, 1986; Ferreira & Grattapaglia, 1995; Heliodoro, 1997), rápidos (Brown, 1990) e bastante acessíveis em termos técnicos. Os métodos de separação das enzimas (electroforese de zona e focagem isoelectrica) são de realização simples e compatíveis com a análise de muitas amostras (Roux, 1987 cit. Heliodoro, 1997);
- ⊗ a expressão das isoenzimas é co-dominante (Simpson & Withers, 1986), isto é, os dois alelos de um *locus* de um indivíduo diplóide são expressos e podem ser visualizados, o que permite diferenciar homozigóticos e heterozigóticos. Este facto, permite estimar directamente parâmetros tais como a frequência genotípica ou alélica e o coeficiente de diversidade genética (Ferreira & Grattapaglia, 1995);
- ⊗ são marcadores selectivamente neutros;
- ⊗ a correspondência entre a variedade de monómeros proteicos de um determinado conjunto de isoenzimas e a sua determinação genética permitir a interpretação de vários *loci* simultaneamente, através da observação do padrão de bandas. No entanto, existem conjuntos de isoenzimas aos quais não é possível aplicar esta técnica devido ao grande número de bandas correspondentes;

⊗ os efeitos pleiotrópicos ou epistáticos são reduzidos ou nulos;

⊗ apresentam grande estabilidade face aos factores ambientais, uma vez que são produto quase directo dos genes. As condições ambientais não parecem intervir na composição e sequência dos aminoácidos enzimáticos e, conseqüentemente, na posição das bandas dos perfis enzimáticos (Eiras - Dias et al, 1989).

De acordo com Brown & Moran (1981) cit. Simpson & Withers (1986), a técnica electroforética pode ser descrita como o melhor método correntemente usado para medir a variação genética, relativamente livre dos efeitos ambientais e num número de amostras manejável.

No entanto, o reduzido número de *loci* e alelos por *locus* que podem ser detectados constitui a sua grande limitação. Em alguns tecidos vegetais, as formas isoenzimáticas são específicas, o que pode ser uma limitação para análise genética pois podem não ser boas discriminadoras da variabilidade entre plantas devido à reduzida fracção do genoma da planta que é expressa e analisada (Dias, 1990). É óbvio que, com uma cobertura apenas parcial do genoma, é difícil encontrar associações entre as isoenzimas e os genes que controlam características de interesse agronómico. Este facto, é especialmente limitante no mapeamento de caracteres quantitativos. Mesmo assim, continuam a ser muito úteis para análises genéticas que não requeiram uma amostragem ampla do genoma e detecção rápida de polimorfismos (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Grattapaglia, 1994).

Nos últimos 27 anos, muitas investigações têm utilizado a tecnologia das isoenzimas no sentido de: estimar os níveis e entender a estrutura da variabilidade genética de populações naturais, estudar o fluxo genético entre populações, estudar os processos de hibridização natural, estudar a dispersão de espécies, analisar filogenias (Ferreira & Grattapaglia, 1995), construir mapas genéticos do cromossoma das plantas (Tanksley, 1983 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995), identificar génotipos particulares, facilitando deste modo a remoção de amostras duplicadas nos bancos genéticos (Simpson & Withers, 1986), obter informações elementares sobre a distribuição da diversidade intra-específica e entre populações da espécie, permitindo definir as áreas a serem poupadas para a preservação do património genético e para o estudo da variabilidade das espécies desse património (Heliodoro, 1997).



No melhoramento de plantas, as isoenzimas têm sido utilizadas na: detecção de ligações génicas com características mono e poligénicas, identificação de variedades, selecção indirecta de características agronómicas, introgressão génica, avaliação de germoplasma (Ferreira & Grattapaglia, 1995), determinação de relações genéticas entre linhas de populações melhoradas (Heun *et al.*, 1994) e distinção de cultivares de soja (Payne & Koszykowski, 1978).

### 2.3- Fragmentos de Restrição de Comprimento Polimórfico - RFLP

Dá-se o nome de RFLP, às variações no comprimento de fragmentos do DNA resultantes da digestão com endonucleases de restrição (Dias, 1990).

Há vinte e dois anos, estes marcadores foram estudados pela primeira vez para detectar mutações do DNA viral, o que levou à sua utilização na análise dos genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Esta metodologia melhorou a capacidade de descoberta de marcadores moleculares genéticos (Beckman & Soller, 1986; Paterson *et al.*, 1988 cit. Striem *et al.*, 1990).

Na técnica de RFLP, o polimorfismo é evidenciado pelos fragmentos de DNA obtidos através de enzimas de restrição e observado por hibridação de sequências homólogas (Tingey e del Tufo, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1995), marcadas radioactivamente ou por quimioluminescência (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Esta técnica só é possível devido à especificidade das endonucleases de restrição que têm a capacidade de cortar a molécula de DNA em determinados pontos definidos por sequências curtas e específicas de 4-8 nucleótidos. O comprimento dos fragmentos de DNA assim obtidos depende da localização dos locais de restrição e tem uma distribuição específica para cada combinação particular enzima - DNA (Dias, 1990).

Os padrões de restrição para determinadas enzimas podem ser alterados por inserções, deleções ou inversões que modificam significativamente todo o comprimento da sequência génica (Dias, 1990). Muitas alterações nucleotídicas não são detectadas pelas análises RFLPs porque não afectam o local de corte com as enzimas de restrição (Kornher & Livak, 1989).

A maior vantagem dos marcadores de RFLP, na identificação de variedades, reside na disponibilidade de uma infinidade de combinações entre as enzimas de restrição e as sondas

que cobrirão mais eficientemente o genoma dos indivíduos a caracterizar (Dias, 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1995). A proporção do genoma que pode ser abrangido com os RFLPs é apenas limitado pelo número de sondas, enquanto que o número de caracteres bioquímicos e morfológicos que podem ser usados como marcadores genéticos é muito limitado devido ao facto de apenas uma pequena fracção do genoma da planta ser expressa (Dias, 1990; Smith *et al*, 1990).

Os marcadores RFLP são co-dominantes, revelam variações em regiões codificantes e não codificantes (Ferreira & Grattapaglia, 1995), são independentes de factores externos e altamente reprodutíveis (Bourquin *et al*, 1992; Cotrim & Pais, 1998).

A metodologia dos RFLPs é muito complexa e requer técnicas de isolamento de DNA, digestão, electroforese, transferência para membrana, hibridação e autoradiografia, que são muito demoradas e trabalhosas (Dias, 1990; Tingey & del Tufo, 1993; Lin *et al*, 1996b), necessitando de pessoal altamente especializado na manipulação de radioisótopos. Deste modo, torna-se muito cara (Dias, 1990). Por outro lado, requer grandes quantidades de DNA genómico. (Lin *et al*, 1996a)

Devido ao facto das tecnologia dos RFLPs ser recente, dispendiosa e estar ainda em pleno desenvolvimento, há falta de sondas adequadas para certas regiões do genoma (Dias, 1990; Moreno *et al*, 1995). Por esse motivo, o processo de obtenção dessas sondas leva geralmente vários meses (Cotrim & Pais, 1998). Este facto constitui uma limitação à identificação de novas variedades, à avaliação do seu grau de pureza (Dias, 1990) e para estudos de diversidade genética (Cotrim & Pais, 1998).

Nas análises de rotina de mapeamento genómico, os RFLP têm vindo a ser substituídos por marcadores baseados na variação do número de pequenas sequências repetidas (Griffiths *et al*, 1996).

Wang *et al* (1994) cit. Fukuoka *et al* (1996), determinaram a relação entre 138 marcadores RFLP e a resistência /susceptibilidade nas linhas F<sub>3</sub> de plantas de arroz, tendo verificado que existe uma correlação entre a resistência ao vento e a frequência genética em oito regiões do cromossoma. Estes autores, verificaram que os *loci* ligados aos marcadores RFLP nos

cromossomas 4 e 11 desempenham um papel principal na expressão da resistência ao vento em condições de campo

Os RFLP têm sido aplicados com sucesso na identificação de marcadores genéticos nas plantas (Helentjaris et al., 1985; Tanksley et al., 1989 cit. Wang et al., 1994; Wang et al., 1992; Zhang et al., 1992; Ishii et al., 1993 cit Wang et al., 1994). Têm sido usados na identificação de cultivares em muitas espécies de plantas, incluindo arroz (Dallas, 1988 cit. Bowers et al., 1993; Wang et al., 1992; Zhang et al., 1992; Ishii et al., 1993 cit Wang et al., 1994), amoreiras silvestres (Nybom et al., 1989 cit. Bowers et al., 1993), macieira (Nybom et al., 1990 cit. Bowers et al., 1993), pimenta (Livneh et al., 1990 cit. Bowers et al., 1993), roseiras ( Hubbard et al., 1992 cit. Bowers et al., 1993). É também a base para a tecnologia de DNA “fingerprint”, largamente aceita como uma evidência conclusiva e legal para identificação criminal e paternidade (Neufeld & Colman, 1990 cit. Bowers et al., 1993).

Os marcadores RFLP têm sido utilizados para sinalizar genes principais envolvidos na resistência a doenças em tomate (Young et al., 1988; Klein- Lankhorst et al., 1991a; Sarfatti et al., 1989 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995) e soja (Muehlbauer et al., 1991; Diers et al., 1992 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995), tendo sido usados no mapeamento genético de arroz (Causse et al., 1994), soja, e trigo (Akkaya et al., 1992; Zhao & Kochert, 1993; Rongwen et al., 1995; Roder et al., 1995 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Como os RFLPs fornecem um meio de medir as similaridades genéticas entre cultivares, podem ser usados para examinar relações entre variedades e talvez inferir dessas relações algo sobre a origem e migração de cultivares de videira (Meredith et al., 1992).

Através de programas de melhoramento assistido por marcadores tentou-se transferir a capacidade de acumulação de açúcares acilados exsudados por tricomas do tipo IV que medeiam a resistência à peste múltipla de plantas de tomate selvagem (*Lycopersicon pennellii*) para plantas cultivadas. Nesse sentido, a tecnologia RFLP foi usada durante três gerações de retrocruzamento para seleccionar plantas que contivessem a região flanqueadora 5 associada a análise QTL com acumulação de açúcares acilados. Observou-se que de mil plantas inter cruzadas BC3F, apenas três continham três a cinco regiões flanqueadoras e acumulavam açúcares acilados, embora a níveis baixos. A descoberta da acumulação de

açúcares acilados na descendência de plantas inter cruzadas BC3F<sub>1</sub> suporta o envolvimento de pelo menos cinco regiões flanqueadoras na biossíntese dos açúcares acilados. Contudo, como o nível de açúcares acilados acumulado por essas plantas é menor que o da F<sub>1</sub> interespecífica, pensa-se que seja provável que uma outra região ainda não identificada seja necessária para a acumulação de níveis elevados de açúcares acilados (Lawson et al., 1997).

Ling et al. (1996), caracterizaram, através da RFLPs, dois mutantes espontâneos de tomate, defeituosos em etapas chave que controlam os processos de absorção activa de ferro:

- ❖ a mutação recessiva chloronerva (chin) afecta o gene que controla a síntese do aminoácido não proteico nicotianamina (N.T), um componente chave na fisiologia do ferro;
- ❖ o sistema radicular do mutante recessivo fer é incapaz de qualquer resposta característica à deficiência de ferro e assim a absorção do mesmo é completamente bloqueada.

Estes autores mostraram que o gene fer é epistático em relação ao gene chin, sendo por isso muito propício para ser um dos maiores elementos genéticos que controlam a fisiologia do ferro em tomate.. Com base nestes estudos, concluíram que o gene chin está localizado no cromossoma 1 e o gene fer no cromossoma 6. O isolamento do gene fer fornecerá novos conhecimentos sobre o mecanismo molecular de controlo de absorção de ferro em plantas.

A identificação de espécies baseadas em RFLP é possível mas depende das sequências alvo escolhidas, das enzimas de restrição utilizadas e do comprimento dos fragmentos amplificados (Meyer & Candrian, 1996).

#### 2.4- Repetições em Tandem em Número Variável - VNTRs

Os minisatélites ou VNTRs são sequências repetitivas (Griffiths et al., 1996; Ferreira & Grattapaglia, 1995; Lewin, 1997; Jeffreys et al., 1985; Horn et al., 1989; Caetano-Anollés, 1996a), que possuem de quinze a cem pares de bases (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Griffiths et al., 1996) e, em cada *locus* hipervariável podem ser repetidas até 50 vezes (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Segundo Caetano-Anollés (1996a), os minisatélites estão geralmente localizados em regiões eucromáticas, mas frequentemente agrupadas junto aos telômeros.

A primeira região hipervariável foi isolada por acaso por Wyman e White (Barker *et al.*, 1984 cit. Jeffreys *et al.*, 1985), de uma biblioteca de segmentos aleatórios de DNA humano (Jeffreys *et al.*, 1985).

O nome minisatélite deriva do facto das sequências repetitivas formarem um pico satélite distinto do pico principal de DNA genómico na separação do DNA em gradientes de cloreto de céσιο, por conter uma proporção de pares de bases GC diferentes da média do resto do genoma (Lewin, 1990 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995).

As variações genéticas no loci hipervariável têm sido usadas extensivamente em análises de ligação (Weissenbach, 1992 cit. Bowcock *et al.*, 1994) e na identificação individual (Pena *et al.*, 1993 cit. Bowcock *et al.*, 1994), podendo ser úteis em estudos inter-populacionais (Pena *et al.*, 1993; Chakraborty *et al.*, 1992 cit. Bowcock *et al.*, 1994).

O polimorfismo dos marcadores minisatélites resulta de diferenças no número de alelos das sequências repetidas, resultando presumivelmente de trocas mitóticas ou meióticas desiguais ou por “slippage” do DNA durante a replicação (Jeffreys *et al.*, 1985). A alta variabilidade nos minisatélites torna-os especialmente úteis no mapeamento genómico porque há uma alta probabilidade de que os indivíduos variem nos seus alelos como um *locus* (Lewin, 1997).

Como esta técnica é muito idêntica à dos RFLP, as suas vantagens são muito semelhantes (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Assim, é um método rápido, codominante que explora qualquer parte do genoma. O nível de polimorfismo é elevado e permite revelar variações em populações muito próximas.

Os padrões de bandas são muito complexos devido ao elevado polimorfismo dos minisatélites. Deste modo, cada indivíduo possui um perfil de bandas diferente (“genetic fingerprint”). Por outro lado, é quase impossível identificar os alelos correspondentes a cada *locus*, o que compromete a determinação de genótipos e o teste de hipóteses de segregação mendeliana. Assim, não são úteis no mapeamento genético ou testes de ligação génica entre marcadores e genes de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1995).



Esta metodologia não permite definir fenótipos (Dias, 1990), é demorada (Schnell et al., 1985), tem um custo elevado e há a possibilidade de usar radioisótopos (Dias, 1997; Schnell et al., 1995).

Os minisatélites existem em muitos genomas de plantas (Wang et al., 1994), tendo sido usados para a identificação de variedades, cultivares e clones, na análise genética, determinação da paternidade (Dallas, 1988; Nybom & Hall, 1991; Rogstad et al., 1988; Gepts et al., 1992; Broun et al., 1992 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995) e identificação forense (Horn et al., 1989).

## 2.5- Repetições de Sequências Simples - SSRs

O termo repetições de sequências simples (SSR) também denominado microsátélites designa regiões dispersas compostas por dinucleótidos repetidos em tandem (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Taramino & Tingey, 1996; Powell et al., 1996a; Lewin, 1997; McCouch et al., 1997). O mais comum é a repetição de CA e o seu complementar GT (Griffiths et al., 1996), em mamíferos (Dow et al., 1995). A qualidade de um determinado *locus* microsátélite depende do número de elementos repetitivos (Cotrim & Pais, 1998).

A existência de microsátélites foi documentada há cerca de 16 anos, por Hamada e seus colegas (Hamada, 1982 cit. Powell et al., 1996a).

De acordo com Caetano-Anollés (1996a), os microsátélites localizam-se geralmente em regiões eucromáticas, mas mais ou menos aleatoriamente dispersas por todo o genoma.

Em termos absolutos, os microsátélites parecem ser mais abundantes nas plantas do que nos vertebrados ( Lagercrantz et al., 1993).

Os microsátélites são uma classe de marcadores moleculares relativamente recente, encontrando-se largamente distribuídos nos genomas eucarióticos (Taramino & Tingey, 1996; Powell, et al., 1996a; Ferreira & Grattapaglia, 1995), como confirmado pelos estudos de Tautz e Ranz (Powell et al., 1996a).

O valor dos microsátélites resulta da sua natureza multialélica, da sua transmissão codominante, de ser baseado em PCR, da sua abundância relativa, da cobertura extensiva do genoma, de possuírem um elevado conteúdo de informação polimórfica (PIC) (Ferreira &

Grattapaglia, 1995; Powell et al, 1996a), e requererem apenas uma pequena quantidade de DNA iniciador. É um método robusto e reprodutível. Permite analisar genomas cloroplastidiais ou nucleares, possibilitando a identificação de fenómenos de hibridação (Cotrim & Pais, 1998).

A maior limitação dos marcadores microsátélites na análise genética e melhoramento de plantas refere-se à grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento prévio do marcador (Cifarelli et al, 1995), exigindo pessoal especializado e equipamento sofisticado (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

As análises de microsátélites requerem um par de “primers” por cada *locus* do marcador, mas essa sequência iniciadora é facilmente distribuída à volta do mundo por correio electrónico e rapidamente construída usando um sintetizador de oligonucleótidos (Griffiths et al, 1996).

Como requerem algum conhecimento prévio do genoma a analisar, o método tem sido pouco usado em estudos de conservação, sendo um dos poucos exemplos o de *Swietenia humilis* (White & Powell, 1997 cit Cotrim & Pais, 1998).

A primeira aplicação dos microsátélites em plantas foi na identificação de cultivares, tendo sido usados na genotipagem da soja, por exemplo (Powell et al, 1996a).

De acordo com Dow et al (1995), a aplicação das análises de microsátélites tem sido relativamente rara em cereais e praticamente inexistente em populações naturais de plantas.

O primeiro exemplo de um microsátélite ligado a genes de resistência a doenças nas plantas foi publicado por Yu et al (1994) cit. Powell et al (1996a). As ligações a marcadores microsátélite diagnóstico permitiram a transferência de genes de resistência, incluindo os de Peanut mottle vírus (Rpv), *Phytophthora* (Rps3) e Javanese root-knot nematóide em cultivares elite de soja (Powell et al, 1996a).

No futuro, a necessidade de protecção aos proprietários de germoplasma aumentará, e os microsátélites terão um papel importante na certificação da propriedade de variedades de plantas (Powell et al, 1996a).

Os marcadores baseados em microsátélites têm sido desenvolvidos para aplicações de mapeamento genético para algumas culturas, tais como soja, arroz e trigo (Akkaya et al, 1992; Zhao & Kochert, 1993 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Com base num mapa, com cento e vinte marcadores microsátélites, McCouch *et al* (1997), demonstraram que estes marcadores estão bem distribuídos pelos doze cromossomas do arroz e identificaram cinco sequências de cópia múltipla que podem ser mapeadas para localizações independentes.

Sampaio (1998), detectou o primeiro microsátélite composto em *O. suber* L., constituído por dez repetições da sequência TC.

## 2.6- Fragmentos Amplificados de Comprimento Polimórfico - AFLP

A tecnologia de marcadores de DNA de alta densidade foi desenvolvida por Keygene N. V. (Wageningen, Holanda) (Cervera *et al*, 1996), fornecendo uma contribuição versátil e universal para a análise de ácidos nucleicos. Foram estudadas cerca de trezentas espécies de plantas igualmente espalhadas pelo reino vegetal incluindo muitas de importância comercial (Caetano-Anollés, 1996b).

É uma técnica de DNA “fingerprinting” (Lin *et al*, 1996a; Vos *et al*, 1995; Janssen *et al*, 1996-1997; Hongtrakul *et al*, 1997), rápida e eficiente (Hongtrakul *et al*, 1997), que detecta fragmentos de restrição (Janssen *et al*, 1996). Por esse motivo é semelhante à técnica RFLP, com a principal diferença de que em vez da hibridação Southern se usa a amplificação via PCR. As semelhanças com a técnica RFLP foram a base para a escolha do nome AFLP (Vos *et al*, 1995).

A técnica AFLP é baseada na detecção de fragmentos de restrição genómicos por amplificação via PCR (Vos *et al*, 1995; Janssen *et al*, 1997; Otsen *et al*, 1996; Breyne *et al*, 1997), podendo ser usada para DNAs de qualquer origem ou complexidade (Vos *et al*, 1995) e não requerendo informações prévias sobre as sequências de DNA genómico (Otsen *et al*, 1996).

Constitui a técnica mais recente para obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos por genomas procarióticos e eucarióticos. Combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e facilidade de detecção do polimorfismo via PCR.

Os marcadores AFLP apresentam vantagens relativamente a outros marcadores. Há formação de um grande número de fragmentos que são resolvidos num único gel. Deste modo, o número de marcadores analisados no gel, é o mais elevado entre os vários existentes. Este facto, leva a que os AFLP sejam mais eficientes na amostragem ampla e simultânea do genoma.

A análise AFLP é altamente segura e reprodutível podendo ser facilmente adaptada e usada para uma série de aplicações que vão desde os estudos de Biologia Molecular à utilização em programas de Melhoramento de Plantas (Breyne et al., 1997).

A principal limitação destes marcadores é o baixo conteúdo de informação genética por *locus*. Uma vez que os marcadores AFLP são “dominantes”, não é possível diferenciar os génotipos heterozigóticos dos homozigóticos.

Por outro lado, segundo Ferreira & Grattapaglia (1995), a análise de marcadores AFLP envolve uma série de etapas, necessitando por isso de uma maior quantidade de enzimas de restrição, adaptadores, “primers” específicos e equipamento.

Deste modo, esta técnica é trabalhosa e dispendiosa, requerendo sondas específicas (Lin et al., 1996a) e grandes quantidades de DNA genómico o mais puro possível para garantir uma digestão completa pelas enzimas de restrição em todas as amostras, o que torna a sua extracção demorada. A digestão parcial ou a má qualidade de DNA pode levar a interpretações erradas em termos de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A técnica AFLP tem sido usado para o estabelecimento de mapas de ligação genética (Mackill et al., 1996; Vos et al., 1995; Thomas et al., 1995 cit. Lin et al., 1996a; Otsen et al., 1996) e para a localização de genes de resistência a doenças ( Vos et al., 1995; Thomas et al., 1995 cit. Lin et al., 1996a).

Permitem a diferenciação genómica de espécies do género *Acinetobacter*. Além disso, como permitem um conhecimento mais detalhado da estrutura interespecífica dos taxa *Acinetobacter*, representam um meio efectivo para a confirmação da identidade de estirpes na epidemiologia desta bactéria (Janssen et al., 1997).

No Reino Unido, desde 1953, a formação de AFLPs em cultivares de cevada de Primavera, fornece informações genéticas relativas ao desenvolvimento de plantas cultivadas (Ellis et al. 1997).

Mackill et al. (1996), ensaiaram iniciadores AFLP em plantas F<sub>2</sub> de um cruzamento de arroz, Indica versus Japonica previamente mapeado por RFLP. Os dados obtidos indicaram que os AFLPs são marcadores promissores no mapeamento genético em arroz.

Lin et al. (1996b), compararam a capacidade de identificação dos marcadores moleculares no desenvolvimento de mapas de ligação, empregando técnicas de AFLP, RAPD e RFLP em germoplasmas idênticos de soja. Verificaram que das três técnicas utilizadas, a AFLP é a mais útil para esse efeito.

A detecção de polimorfismo em *Arachis hypogaea* L. foi relatado pela primeira vez por He & Prakash (1997). Estes autores referem que a técnica AFLP pode ser usada no melhoramento genético assistido por marcadores e na avaliação do germoplasma desta cultura.

Maughan et al. (1996), verificaram que os AFLP são marcadores ideais para um amplo leque de investigação genéticas, em virtude da sua capacidade detectar milhares de *loci* genéticos independentes com custos e tempos mínimos. Observaram ainda que os valores de diversidade fenotípica são maiores na soja selvagem do que na cultivada.

Maheswaran et al. (1997), exploraram a técnica AFLP para estudar o polimorfismo, a distribuição e herança dos marcadores RAPD com uma população de duplos haplóides de arroz derivados de 'IR 64'/Azucena'. As bandas polimórficas foram mapeadas e distribuídas pelos doze cromossomas. Concluíram que a utilização de marcadores AFLP torna rápida a realização de um mapa de ligação, o que os torna muito úteis em retrocruzamentos assistidos por marcadores.

Os resultados dos estudos de Huys et al. (1996), mostraram que os AFLPs são uma valiosa análise genotípica de alta resolução para a classificação de espécies de *Aeromonas*. Enfatizaram também a importância deste método para a taxonomia bacteriana em geral.

Qi & Lindhout (1997), ao compararem os quarenta e oito padrões AFLP de linhas progenitoras de cevada verificaram que era fácil identificar entre populações ou cruzamentos, mais de cem marcadores comuns (possivelmente *locus* específico). A existência de um

número tão grande de marcadores comuns à população facilita a fusão de dados fornecidos por marcadores moleculares e outros dados genéticos num mapa genético integrado.

Habu et al (1997), utilizaram AFLPs para o desenvolvimento de um protocolo para a obtenção de “fingerprinting” de mRNA que permitisse a comparação sistemática da expressão diferencial de genes.

Greef et al (1997), verificaram que a técnica AFLP é adequada e poderosa para a avaliação da diversidade genética, para analisar o sucesso da hibridação e de encontrar classificações erradas. De acordo com Paul et al (1997), permitem ainda a detecção da diversidade e diferenciação genética entre populações indianas e quenianas de chá.

A resistência da cevada (*Hordeum vulgare*) ao fungo *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei* é conferida por vários genes dominantes, e também por alelos recessivos do *locus* Mlo mapeado no braço longo do cromossoma 4. Por outro lado, estes factores que medeiam a resistência são activos contra todas as raças fisiológicas do parasita. Assim, o mecanismo baseado na resistência mediado pelo Mlo pode diferir significativamente do mediado pelos genes dominantes. As técnicas AFLPs foram utilizadas na identificação de marcadores firmemente ligados ao *locus* Mlo e na produção de mapas genéticos locais de alta resolução. O uso da tecnologia AFLP permite o rastreio rápido de cerca de 250,000 *loci* ligados ao Mlo (Simons et al, 1997).

Quando se compararam “fingerprints” AFLP obtidos de raízes e caules de plântulas individuais de trigos aparentados *Aegilops mutica* e *Aegilops speltoides*, observaram-se um grande número de fragmentos específicos dos diferentes órgãos amplificados. Este fenómeno, salienta a importância, nos estudos filogenéticos baseados em “fingerprints” AFLP, de assegurar que o DNA seja extraído de um tecido fisiologicamente uniforme. Para esse fim, as sementes maduras são uma fonte conveniente (Donini et al, 1997).

## 2.7- Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente - RAPD

### 2.7.1- Conceitos Gerais

Por volta de 1990, foi criada uma nova técnica (Tingey & del Tufo, 1993; Jianhua *et al.*, 1996; Jean-Jaques *et al.*, 1993), em dois laboratórios diferentes (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Esta técnica a que se chamou RAPD, detecta polimorfismos de sequências nucleotídicas mediante amplificação do DNA via PCR (Tingey & del Tufo, 1993; Jean-Jaques *et al.*, 1993; Caetano-Anollés, 1996a; Demeke *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1996), usando um “primer” de sequências nucleotídicas aleatórias (Tingey & del Tufo, 1993; Williams *et al.*, 1990; Lagercrantz *et al.*, 1993; Costa *et al.*, 1996), de base 10 (Welsh & McClelland, Williams *et al.*, 1990; Manen *et al.*, 1995; Jean-Jaques *et al.*, 1993).

Um “primer” aleatório para PCR dá-nos a chance de amplificar diversas regiões diferentes no genoma. As sequências simples descobertas no DNA estão flanqueadas por duas cópias invertidas do “primer” (Griffiths *et al.*, 1996). Por cada grupo específico de iniciador usado, resulta um conjunto de polímeros de diferentes tamanhos, que separados em gel, dão padrões de bandas característicos (Costa *et al.*, 1996).

De acordo com Manen *et al.* (1995) dá-se o nome de RAPD ao padrão observado após electroforese e que é resultante da amplificação. Estes padrões são normalmente polimórficos nas populações e assim os vários padrões obtidos por amplificação com diferentes iniciadores são característicos do genoma.

É uma das técnicas mais populares dos últimos anos, quer pela sua acessibilidade, quer por não requerer o conhecimento prévio do genoma em causa. Deste modo, tem sido amplamente usada em estudos de variabilidade genética (Dawson *et al.*, 1993; Russel *et al.*, 1993; Rosseto *et al.*, 1995 cit Cotrim & Pais, 1998), mas também em estudos de certificação genética como marcadores moleculares (Cotrim & Pais, 1998).

Os marcadores de RAPD distribuem-se regularmente por todo o genoma (Hahn *et al.*, 1995).

De acordo com Williams *et al.* (1990), a informação contida num único marcador RAPD é muito pouca. Deste modo, só quando muitos marcadores são usados para definir um genoma, é que começam a ser úteis.

### 2.7.2- Base Genética dos Marcadores RAPD

A tecnologia RAPD baseia-se na utilização de um “primer” oligonucleotídico de sequências aleatórias que amplificam sequências de DNA genómico, usando PCR (Wang *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1990), sempre que encontre regiões de homologia a uma distância favorável e com orientação convergente para duas cadeias de DNA (Wang *et al.*, 1994).

Nesta reacção, uma única espécie de “primers” liga-se ao DNA genómico em dois locais diferentes em cadeias opostas do DNA alvo, promovendo através da actividade da *Taq DNA* polimerase na presença de desoxirribonucleósidos a síntese do DNA cópia. Como a sequência destas pequenas moléculas é aleatória e as temperaturas usadas são de baixa extringência, isto irá traduzir-se na síntese final de vários segmentos de DNA de diferentes tamanhos (Cotrim & Pais, 1998). Nestes locais, quando os iniciadores estão a uma distância amplificável um do outro, um produto de DNA é formado mediante um termociclador de amplificação. A presença de cada produto de amplificação, identifica por completo ou parcialmente homologias em sequências nucleotídicas entre o DNA genómico e os “primers” em cada extremidade do produto amplificado. Em média, cada iniciador dirige a amplificação de vários *loci* discretos, o que torna esta técnica óptima para a pesquisa de polimorfismo de sequências nucleotídicas entre indivíduos. Exige pequenas quantidades de DNA e é praticável (Tingey & del Tufo, 1993).

### 2.7.3- Detecção dos Marcadores RAPD

Como o polimorfismo RAPD é o resultado de trocas de ambas as bases nucleotídicas que alteram os sítios de ligação do iniciador, ou de inserções ou deleções na região amplificada (Williams *et al.*, 1990), são usualmente notados pela presença ou ausência do produto de amplificação de um só *locus* (Tingey & del Tufo, 1993).

Os fragmentos produzidos são facilmente visualizados em um gel corado com brometo de etídio, e o polimorfismo entre genótipos reflecte diferenças herdáveis no genoma. Um grande número de bandas, ou *loci*, podem ser gerados facilmente. Devido à natureza aleatória dos primers, os marcadores RAPD, ao contrário dos RFLP, VNTRs e isoenzimas, representam uma amostra aleatória do genoma inteiro (Schnell *et al.*, 1995).



#### 2.7.4- Vantagens dos Marcadores RAPD

Este método usa concentrações baixas de DNA (Rasmussen & Rasmussen, 1995; Demeke et al., 1997; Gogorcena et al., 1993; Wang et al., 1994), não necessita da digestão do DNA (Gogorcena et al., 1993), nem de radioisótopos, é facilmente automatizado (Rasmussen & Rasmussen, 1995; Williams et al., 1990) e permite a exploração da maior parte de genoma (Wang et al., 1994).

A tecnologia RAPD permite a visualização directa das bandas no gel, não requer o desenvolvimento prévio de um banco para a extracção das sondas (Caetano-Anollés, 1996b), permite mostrar regiões de DNA repetitivo uma vez que os iniciadores utilizados são arbitrários, não requer instalações sofisticadas sendo por isso bastante acessível em estações experimentais e os resultados são geralmente de fácil interpretação.

#### 2.7.5- Limitações dos Marcadores RAPD

É um método caro (Hedrick, 1992), pois o termociclador e os iniciadores têm um preço elevado.

Esta técnica apresenta problemas de reprodutibilidade (Hedrick, 1992; Moreno et al., 1995), podendo ocorrer contaminações.

A principal limitação dos marcadores RAPD é a pouca informação por *locus* porque apenas um alelo é detectado no fragmento amplificado. Estes marcadores não detectam variações alélicas e requerem um largo número de *loci* para serem identificados e pesquisados no sentido de recolher a mesma informação que com RFLP, VNTR e isoenzimas (Schnell et al., 1995).

Em virtude do seu comportamento dominante (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Williams et al., 1990; Schnell et al., 1995; Lagercrantz et al., 1993; Cifarelli et al., 1995; Caetano-Anollés, 1996a), os marcadores RAPD são pouco eficientes em análises que envolvam inferência de frequências alélicas e genotípicas.

O problema da dominância pode ser ultrapassado, através da obtenção de mais marcadores, incrementando deste modo, o poder estatístico ou pela marcação de variantes com locais de restrição codominantes (Hedrick, 1992).

Uma vez que os marcadores RAPD se baseiam na amplificação via PCR, ficam sujeitos a variações nos parâmetros físicos e químicos da reacção (Caetano-Anollés, 1993 cit. Caetano-Anollés, 1996a). São sensíveis a muitos factores tais como: selecção e concentração de iniciadores, concentração de magnésio nos tampões PCR e o termociclador para PCR (Lin et al, 1996).

Diminuições na concentração de DNA ou aumento da concentração do “primer” conduzem a uma melhor amplificação dos produtos mais pequenos. Este efeito pode ser explicado pela diferente validade dos “primers” para os locais de ligação do DNA, dado que o comprimento dos produtos de amplificação é determinado pela distância de dois iniciadores ligados em ligações opostas. Se nem todos os locais de ligação estiverem ocupados (devido a uma menor concentração do “primer”), a distância média é maior e por isso a quantidade relativa de produtos longos é mais elevada (Büscher et al, 1993).

Büscher et al (1993), demonstraram ainda que embora todas as *Taq DNA* polimerase sejam adequadas para esta técnica podem existir diferenças em termos de amplificação.

A análise genética pode ser obscurecida pela amplificação de artefactos ou produtos ambíguos. Na análise RAPD, podem ocorrer artefactos não genéticos na ausência de optimização cuidadosa da concentração dos “primers” e temperatura de reassociação (Muralidharan et al, 1993; Ellsworth et al, 1993 cit. Caetano-Anollés, 1996a).

#### 2.7.6- Utilização dos Marcadores RAPD na Análise de Variabilidade e no Melhoramento Genético

A tecnologia RAPD tem emergido na pesquisa biotecnológica como uma determinante útil na identificação genética prática no melhoramento de plantas, produção e programas de testes de sementes (McDonald et al, 1994).

As aplicações dos marcadores RAPD na análise genética e no melhoramento de plantas permitem: a obtenção de “fingerprints” genómicos individuais, varietais e populacionais, a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, de melhoramento e bancos de germoplasma, o estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes espécies, a construção de mapas de ampla cobertura genómica e a localização de genes com interesse

económico (Ferreira & Grattapaglia, 1995), a identificação e diferenciação de cultivares de arroz (Welsh & McClelland, 1990), soja (Caetano-Anóles et al., 1991; Williams et al. 1991 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995) e cevada (Weining & Langridge, 1991 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995), a quantificação da diversidade genética favorável em linhas de arroz propostas para a produção de heterose (Wang et al., 1994) e o mapeamento de genes que controlam a resistência a doenças em tomate (Klein-Lankhorst et al., 1991a,b; Michelmore et al., 1991 cit. Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A tecnologia RAPD foi usada para evidenciar variações somaclonais em plantas transgênicas de arroz (Bao et al., 1993 cit. Wang et al., 1994).

Os marcadores de RAPD demonstraram ser um instrumento conveniente para a detecção e estimativa de fenómenos a nível molecular, em plantas de arroz do tipo Indica, cultivar Chinsurah Bore II, recuperadas de protoplastos e a sua transmissão à descendência autogâmica. É também um instrumento rápido para a selecção de plantas transgênicas individuais que retêm a estrutura genómica mais equilibrada e para o controlo dos resultados de retrocruzamentos planeados para restaurar o genoma original (Bao et al., 1996).

O polimorfismo RAPD permitiu a construção de mapas genéticos de DNA de arroz. Este facto, pode abrir o caminho para a pesquisa de ligações entre marcadores RAPD e características genéticas de importância na agricultura, incluindo os determinantes da esterilidade masculina (Wang et al., 1994).

Os marcadores RAPD permitem analisar as relações genéticas entre variedades de plantas.

Deste modo:

- ◆ Ko et al. (1994), estudaram a relação entre as variedades de arroz Australian e USA, tendo confirmado a estreita relação genética entre estas variedades, com índices de similaridade de 88-97%;
- ◆ Skeepers et al. (1997), analisaram nove amostras de diferentes proveniências Europeias de *Picea abies*. Verificaram que as proveniências eram separadas em dois grupos principais: uma com as proveniências nórdicas (Suécia e Bielorrússia) e outra as Alpinas (França, Áustria, Alemanha e Bélgica);

◆ a técnica RAPD é ideal para o estudo dos genótipos de arroz usados para a produção de híbridos  $F_1$ . Além disso, sendo um modo molecular de verificar o grau de dissimilaridade entre as linhas parentais, as análises RAPD podem ser também usadas para encontrar novas combinações parentais (Wang et al., 1994);

◆ os resultados obtidos por Momol et al. (1997), mostraram que a técnica RAPD permitiu a detecção da variabilidade genética existente entre estirpes de *Erwinia amylovora*, podendo ser usada para a distinção e estudo de relações entre as estirpes.

Os marcadores de RAPDs são também bem sucedidos na produção de dendogramas mostrando as distâncias genéticas entre cultivares de arroz italianas (a ser publicado, cit. Wang et al., 1994).

A tecnologia RAPD tem ainda sido aplicada no estudo da diversidade de plantas:

☆ de ginsengue Norte Americano em Ontário (Bai et al., 1997);

☆ de cebola e chalota. Com este fim e também para classificar as culturas entre os genótipos de *Allium cepa* foram utilizados RAPD conjuntamente com características morfológicas (D'Ennequin et al., 1997);

☆ de subpopulações de *Alkanna orientalis* do Deserto do Sinai. Os resultados de estudos preliminares sugeriram que o comportamento das abelhas é o responsável por uma limitada dispersão dentro da população e que as subpopulações talvez tenham divergido umas das outras geneticamente (Wolff et al., 1997);

☆ de arroz (*Oryza sativa*) obtidas da maior colecção de germoplasma detida pelo IRRI (International Rice Research Institut) (Virk et al., 1995).

As bandas de RAPD demonstraram a existência de diferenças genéticas entre os isolados holandeses de *Mycosphaerella graminicola*. Mostraram ainda que ocorreram contaminações não significativas das manchas inoculadas com a população natural de *Mycosphaerella graminicola* (Kema & van Silfhout, 1997).

Hu et al. (1997), identificaram três marcadores RAPD estreitamente ligados a um gene de resistência do trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell) à *Blumeria graminis* Dc. f. sp. Tritici EM. Marchall que causa o míldio pulverulento. Observaram que os marcadores RAPD

estritamente ligados a genes alvo podem facilitar a selecção e permitir a pirimidização de genes para a resistência ao míldio pulverulento em programas de melhoramento de trigo.

Seo et al (1997), utilizando linhas de trigo próximas da isogenia e a análise de segregação em grupos, identificaram um marcador RAPD associado ao gene H21 que confere resistência ao biótopo L da larva de mosca Hessian [ *Mayetiola destructor* (Say)]. O uso deste marcador pode facilitar o rastreio mais rápido da população de plantas para a resistência à mosca Hessian e monitorizar a introgressão do gene H21.

Helms et al (1997), calcularam o coeficiente de parentesco para cada par de progenitores de plantas de soja usados no desenvolvimento de populações segregantes e a distância genética baseada em marcadores RAPD. Verificaram que estes eram polimórficos para cada par de progenitores. A distância genética não foi associada ao coeficiente de parentesco ou à magnitude da variância genética. Verificou-se que a variância genética nas populações aparentadas é menor do que nas populações obtidas através de cruzamentos de pais não aparentados para as quatro características avaliadas.

O polimorfismo molecular pode ser utilizado para validar a pureza genética das linhas Peking utilizadas como hospedeiros diferenciais no sistema de classificação de raças do “*Soybean cyst nematode*”, bem como em programas de melhoramento genético (Skorupska et al, 1994).

Peltonen et al (1996), diferenciaram isolados de *Drechslera teres* originária de diferentes locais na Filândia, utilizando o polimorfismo RAPD.

As análises efectuadas por Hong et al (1996), forneceram polimorfismo suficiente para a diferenciação de dois grupos distintos de isolados (Raças KI e KJ), com uma similaridade total de 0,85. O MGR-DNA baseado em análises de DNA forneceu uma similaridade total de 0,78. Contudo, a análise do teor em gt do DNA genómico dos vários isolados entre raças KI apresentavam dissimilaridades genéticas relacionadas com as raças. Com base nestes estudos, Hong et al (1996), verificaram que o polimorfismo RAPD forneceu agrupamentos filogenéticos muito mais seguros para raças de fungos de crescimento rápido na Coreia do que o MGR-DNA baseado em RFLP.

Os marcadores moleculares foram usados para mapear e caracterizar *loci* característicos quantitativos (QTLs) para dezanove características de importância biológica e agronômica num retrocruzamento interespecífico de tomate (Grandillo & Tanksley, 1996).

A tecnologia RAPD permitiu a determinação das distâncias genéticas entre variedades de *Hordeum vulgare* e a integração dessas variedades em grupos. Por outro lado, é possível, com base neste tipo de análises, construir dendrogramas de relações entre espécies do género *Hordeum* e espécies de alguns cereais cultivados (Sivolap & Kalendar, 1995).

A combinação de temperaturas de corrida da electroforese em gel com análises RAPD permitiu a detecção de dois marcadores para o gene que governa o aumento do baixo nível de cádmio em trigo duro canadiano (*Triticum turgidum* L., var. durum). A selecção assistida por marcadores no sentido de aumentar os genes com níveis baixos de cádmio oferece uma alternativa efectiva (Penner et al, 1995).

Um estudo comparativo entre soja selvagem e cultivada, utilizando RAPD, forneceu informações básicas para o uso de soja selvagem no melhoramento desta espécie, como também para um melhor entendimento da sua origem e evolução. A técnica RAPD tem sido muito usada desde que foi desenvolvida por William (1990) e Welsh (1991), porque é simples, rápida, extremamente sensível e não é afectada pelo desenvolvimento da planta ou por condições ambientais (Zhuang et al, 1995).

Tancred et al (1994), utilizaram a técnica RAPD para a diferenciação de uma nova cultivar de macieira Queensland de maturação precoce de 3 cultivares de aparência semelhante (Summerdel, Jonathan e Royal Gala).

Chacon et al (1994), utilizaram marcadores de RAPD para a identificação de várias espécies e raças de nemátodos parasitas de plantas.

Heun et al (1994), compararam análises RAPD e isoenzimas, com base nas relações entre “accessions” de uma aveia hexaploide selvagem (*Avena sterilis* L.). Verificaram que a análise RAPD permitia a separação mais definitiva dos “clusters” das “accessions”.

delRio et al (1997), referiram a capacidade dos RAPDs para a separação de “accessions” do género *Solanum*.

BlackSamuelson et al (1997), foram os primeiros a comparar a quantidade e os padrões de variabilidade genéticos, através das análises RAPD e morfológicas em espécies ameaçadas de *Vicia pisiformis*.

Palacios & GonzalezCandelas (1997), utilizando esta técnica, verificaram que a variabilidade genética numa pequena população de *Limonium cavanillesii* é extremamente baixa.

Goehrig et al (1997), utilizaram a técnica RAPD para a comparação de espécies seleccionadas de género *Kalanchoe*. Os resultados obtidos por estes autores, sugerem que a técnica RAPD é rápida, sensível e útil para o estudo das relações filogenéticas vegetais ao nível infragenético.

As análises RAPD mostraram a homogeneidade genética da espécie *Panax notoginseng* regeneradas por embriogénese, o que sugere que a embriogénese somática pode ser usada para micropropagação clonal destas plantas (Shoyama et al, 1997).

Os resultados obtidos por RAPD indicaram que a variabilidade encontrada em populações naturais e na maioria das plantas cultivadas de *Carpoxydon macrospermum* H. Wendl & Drude, derivava aparentemente de um número limitado de árvores (Dowe et al, 1997).

Os marcadores RAPD foram utilizados na diferenciação de genótipos seleccionados de plantas selvagens de *Digitalis obscura*, tendo-se verificado uma grande variabilidade de acordo com o genótipo. Foi ainda possível confirmar a identidade da planta dadora e dos regenerantes de um isolamento e micropropagação de um genótipo elite com elevada produção (Gavidia et al, 1996).

Messner et al (1996), utilizaram a técnica RAPD para estimar a variabilidade genética intraespecífica de 34 isolados de *Verticillium dahliae* Kleb. de nove géneros diferentes de plantas hospedeiras em várias regiões. Observaram que o fenograma obtido agrupava os isolados em dois grupos: um contendo os isolados de *Brassica napus napus* e outro contendo isolados de uma gama de plantas hospedeiras. Não encontraram correlações entre os padrões RAPD e a localização geográfica.

Os marcadores de RAPD foram utilizados para estimar a variabilidade inter e intrapopulacional de espécies do género *Orobancha* (Paran et al, 1997). Pequenas sementes de

sete espécies diferentes de ervas daninhas do mesmo género foram também identificadas por esta análise (Joel et al, 1996).

Warburton et al (1996), estabeleceram o comportamento dos *loci* RAPD para a identificação de ligações genéticas a genes de interesse económico em pessegueiro. Os resultados obtidos sugerem a utilidade destes marcadores neste programa de melhoramento.

Os resultados obtidos com marcadores RAPD por Neuffer (1996), apoiaram as hipóteses da colonização precoce da *Capsella bursa pastoris* e ajudaram a perceber a história da colonização desta cultura. Revelaram ainda que a estrutura populacional colonial está de acordo com os padrões de variabilidade genética intra e interpopulacional.

A análise RAPD foi realizada para estudar somaclones de *Latirus sativus* contrastantes com a progenitora. Embora , com um único “primer”, não fosse possível a identificação de um somaclone particular, a combinação de dois ou mais “primers” podia ser utilizada para esse fim (Mandal et al, 1996).

Os resultados obtidos por Ko et al (1996), indicaram que a técnica RAPD é útil para o estabelecimento da diversidade genética em *Ozothamnus diosmifolius* (Vent) DC [Syn. *Helichrysum diosmifolium* (Vent) Sweet], bem como na protecção comercial dos direitos dos melhoradores de plantas.

Pooler et al (1996), determinaram utilizando a técnica RAPD as relações genéticas entre os isolados de *Xanthomonas fragaria* de diferentes proveniências. Foi possível a identificação de nove genótipos de isolados. Apenas um não patogénico não foi identificado por este método. Por outro lado, não existiam correlações entre os padrões RAPD e a proveniência geográfica, o que sugere a disseminação destas bactérias através de trocas de germoplasma infectado.

Anastassopoulos & Keil (1996), estudaram a variabilidade genética de diferentes genótipos de *Alstroemeria* obtidos por melhoramento clássico, através dos marcadores RAPD. Os perfis de RAPD permitiram a distinção de todos os genótipos, mas não eram apropriados para um “screening” rápido da variabilidade induzida neste género de plantas.



Xie *et al* (1995), transferiram DNA total de soja selvagem rica em proteínas para soja cultivada e estudaram a variabilidade genómica dos descendentes através da análise RAPD. Os autores inferiram que a recombinação homogénica do DNA exógeno é a causa principal da variabilidade.

Heinze & Schmidt (1995), utilizaram técnicas RAPD para a análise de embriões somáticos e regenerantes de plantas de linhas celulares embriogénicas em abeto norueguês [*Picea abies* (L.) Karst]. Esta análise facilitou a identificação clonal.

Benner *et al* (1995), utilizaram a metodologia RAPD para a detecção de polimorfismo molecular em orquídeas do género *Cattleya*. Reportaram um elevado nível de variabilidade molecular interespecífica. A identificação e mapeamento do polimorfismo de DNA por esta técnica:

- ✱ facilitaram o uso deste *taxa* para a identificação de características específicas de espécies e géneros;
- ✱ permitiram medir a recombinação e introgressão em populações híbridas. Este facto levou os geneticistas a concordar nos processos de especiação, evolução morfológica e alterações moleculares nesta família de plantas.

Ronning *et al* (1995), demonstraram que os marcadores RAPD podem ser utilizados em estudos genómicos do cacauero (*Theobroma cacao* L.).

As análises RAPD diferenciam eficientemente cultivares de cana de açúcar (Taylor *et al*, 1995).

Os marcadores RAPD mostram uma grande potencialidade para a análise genética de *Spartina alterniflora*, particularmente em populações invasoras (Stiller & Denton, 1995).

Os resultados da análise RAPD, com 23 plantas micropropagadas de um clone (L34) de *Populus deltoides*, mostraram que esta técnica podia ser utilizada para a obtenção de informações rápidas e precisas sobre similaridades e dissimilaridades genéticas em sistemas de micropopagação que podiam não ser tão evidentes quando se usavam outras técnicas (Rani *et al*, 1995).

As análises RAPD permitiram a identificação de variedades de feijão branco australiano e forneceram informações sobre as relações genéticas dessas variedades para fins de melhoramento (Graham et al, 1994).

### 3- Objectivos do Trabalho

O presente trabalho encontra-se inserido num projecto de âmbito nacional financiado pelo programa Praxis XXI (“Estudo da Variabilidade Genética do Sobreiro com Vista ao Melhoramento e à Conservação dos Recursos Genéticos”), no qual participam o ITQB, ESAB, INETI, FFCUL, UAL, ISA/DEF/EFN.

O objectivo deste trabalho foi a análise da variabilidade genética inter e intrapopulacional de *Q. suber* L. de diferentes proveniências (Évora/Azaruja, Besteiros, Santiago do Cacém e S. Brás de Alportel).

## II- Métodos Experimentais

### 1- Material e Métodos

#### 1.1- Material Vegetal

Para estudo, foram seleccionadas 90 árvores de sobreiro (*Quercus suber* L.) de diferentes proveniências: 25 espécimens de Évora/Azaruja ( População V-01), Santiago do Cacém (População VI-02) e São Brás de Alportel (População VI-03), e 15 de Besteiros (População V-02).

Como fonte de DNA total foram utilizadas folhas colhidas em Setembro- Outubro pelo grupo da Dr<sup>a</sup> Helena de Almeida, do ISA.

O DNA total foi também extraído de dois espécimens de *Q. ilex* L. que coabitavam com a população de Évora/Azaruja (Qi 02 e Qi 03) e de plântulas presumivelmente livres de parasitas, regeneradas por cultura de meristemas realizada na FCUL (QsFCUL).

Estas folhas, depois de devidamente separadas, embaladas em sacos Zip-Cock hermeticamente fechados e etiquetados de acordo com a sua proveniência, espécie e indivíduo, foram armazenadas a -70°C para uso posterior.

#### 1.2- Reagentes

Todos os reagentes utilizados possuíam um grau de pureza adequado para Biologia Molecular.

Neste trabalho foram utilizados:

- ✿ *Taq* polimerase EcoTaq (5U/μl) [bem como tampão da enzima (10X) e MgCl<sub>2</sub> (50mM)] fornecidos pela Ecogene;
- ✿ dNTPs obtidos da Pharmacia Biotech;
- ✿ oligonucleótidos iniciadores (“primers”) de 10 bases de comprimento de sequências aleatórias do Kit AB1, adquiridos à Advanced Biotechnologies Ltd. com as seguintes sequências:

“Primers”	Sequências
AB1-05	TGCGCCCTTC
AB1-10	CTGCTGGGAC
AB1-18	CCACAGCAGT

✿ tampão de aplicação - “Blue Juice” (vide anexo 1);

✿ agarose NA obtida da Pharmacia Biotech;

✿ os restantes reagentes, salvo referência em contrário, foram fornecidos pela Sigma.

O material de plástico descartável foi esterilizado por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos.

### 1.3- Equipamento

➤ Arca congeladora a -70°C;

➤ Sistema de purificação de água Milli-Q;

➤ Almofariz e respectivo pilão;

➤ Estufa de incubação da Cassel modelo THP 72;

➤ Micropipetas (P<sub>10</sub>, P<sub>20</sub>, P<sub>100</sub>, P<sub>200</sub> e P<sub>1000</sub>) - Pipetman da Gilson;

➤ Espectrofotómetro - Modelo Ultrospec II 4050 da LKB;

➤ Cuvettes de quartzo;

➤ Balança analítica da Sartorius Universal;

➤ Banho maria - 2019 Multiheat da LKB;

➤ Centrífuga de vácuo- Modelo RL5C da Sorvall Instruments;

➤ Microcentrífuga - Modelo Sigma 113 da B. Braun Biotech Internacional;

➤ Vortex 2 Genie da VWR Scientific;

➤ Forno de microondas- Modelo Precise 190 da Ufesa;

➤ Termociclador da BIO-RAD - personal cycler;

- Tinas de electroforese -Modelo EC 160. DNA Sequencing System da E.C. Apparatos Corporation;
- Fonte de alimentação - Modelo EC 650 e EC 4000 P da E.C. Apparatos Corporation System;
- Transiluminador de U.V - Modelo LKB 2011 Macrovue Transiluminator Bromma;
- Sistema de Bioprofil/Biocapture;
- Programa de software “NTSYS”.

#### 1.4- Métodos

##### 1.4.1- Isolamento do DNA Total a Partir de Folhas de *Quercus suber* L.

A extracção do DNA total foi realizada de acordo com os protocolos de dois métodos utilizando:

- ✂ o Kit 69106: "DNeasy Plant Mini Kit" da Qiagen;
- ✂ o Kit 1667319: “Plant DNA Isolation Kit” da Boehringer Mannheim Corporation.

O "DNeasy Plant Mini Kit" é de muito fácil utilização e de execução rápida, sendo possível o isolamento de DNA a partir de mais de 100mg de tecido vegetal. Este Kit contém um conjunto de soluções específicas (AP<sub>1</sub>, AP<sub>2</sub>, AP<sub>3</sub>, AW e AE) que foram optimizadas para uma recuperação de DNA e remoção de contaminantes. Este conjunto de reagentes utilizados são marca registada da Qiagen. Contém ainda o “DNeasy Plant Mini Handbook”, do qual consta o protocolo utilizado.

Retiraram-se cuidadosamente as folhas de sobreiro da câmara a -70°C e lavaram-se cerca de 1g com água corrente. Depois de secas com papel absorvente foram cortadas em pedaços pequenos (cerca de 0,5cm).

Teve-se o cuidado de não aproveitar a nervura principal e todas as zonas escuras (possivelmente infectadas).

As folhas cortadas foram depois submetidas a maceração em almofariz com azoto líquido até à obtenção de um pó fino.

A Figura 2 representa o protocolo de extracção de DNA utilizado com o "DNeasy Plant Mini Kit".

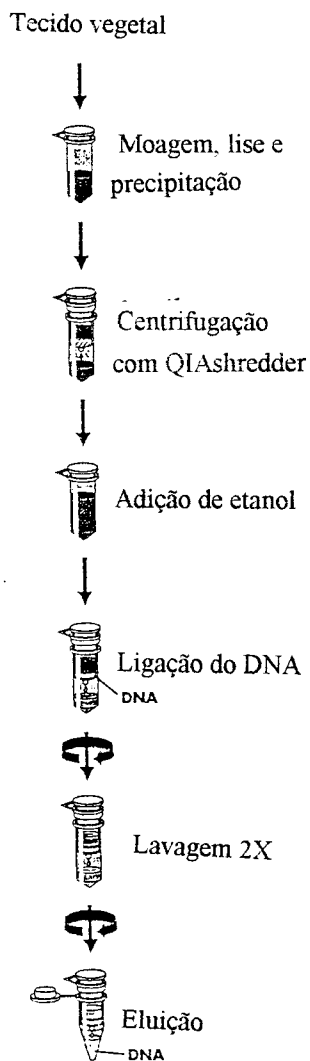


Fig. 2 - Protocolo de extracção do DNA utilizando o "DNeasy Plant Mini Kit"

Fonte: DNeasy Plant Mini Handbook, 1996

Iniciou-se o processo de extracção com este método colocando 100mg da amostra reduzida a pó fino em tubos de microcentrífuga de 2ml.

Ressuspendeu-se o pó fino resultante em 400  $\mu$ l de tampão AP<sub>1</sub> e 4  $\mu$ l de RNase (20mg/ml). Esta mistura foi posteriormente homogeneizada por agitação no Vortex, no sentido de evitar os aglomerados.

Incubou-se em banho maria a 65°C durante 10 minutos, agitando duas a três vezes no Vortex para homogeneizar a mistura. Esta etapa provoca o início da lise das células.

Agitou-se a mistura numa microcentrífuga durante cinco minutos à velocidade máxima.

Adicionou-se de seguida 130  $\mu$ l de AP<sub>2</sub> e incubou-se em gelo durante cinco minutos. Nesta etapa, há precipitação dos detergentes, proteínas e polissacáridos.

Aplicou-se o lisado numa "QIA Schredder Spin Column" de cor lilás e centrifugou-se durante 2 minutos a 4°C, à velocidade máxima. Estas colunas removem a maioria do precipitado e restos celulares.

Adicionou-se ao precipitado cerca de 400  $\mu$ l de AP<sub>1</sub> e 130 $\mu$ l de AP<sub>2</sub> e transferiu-se o filtrado para um novo tubo, tendo o cuidado de não tocar no sedimento.

Adicionou-se ao sobrenadante 300  $\mu$ l de AP<sub>3</sub> e 600  $\mu$ l de etanol. Da solução obtida, retirou-se 650  $\mu$ l para uma coluna "DNeasy", a qual possui resina para reter o DNA, e centrifugou-se durante 1 minuto, a 4°C com 9000 rpm, tendo-se posteriormente decantado o líquido filtrado. Este passo foi repetido com o restante volume da amostra. A coluna foi colocada num novo tubo de 2 ml.

Lavou-se a coluna com 650  $\mu$ l de AW, tendo-se centrifugado durante 1 minuto a 9000 rpm. Decantou-se o filtrado, retirou-se o sobrenadante e efectuou-se nova lavagem e centrifugação.

Transferiu-se a coluna para um novo tubo de microcentrífuga e aplicou-se 50  $\mu$ l de AE previamente aquecido a 65°C, arrefecendo-se em gelo durante 5 minutos. Centrifugou-se durante 1 minuto a 8-9000 rpm, com aproveitamento do sobrenadante para repetição do passo anterior.

Retirou-se o sobrenadante e deixou-se o DNA secar ao ar.

Este tubo contendo o DNA, depois de devidamente identificado, foi guardado no frigorífico a 4°C.

Para o 2º método de extracção foi utilizado o “Plant DNA Isolation Kit”. Este Kit é rápido e contém um conjunto de tampões (1, 2, 3 e 4), que são marca registada da Boehringer Mannheim Corporation e um conjunto de esferas de moagem..

Os procedimentos adoptados para o isolamento de DNA podem ser utilizados para 4mg (um disco foliar) a 1g de tecido em cada amostra.

Em relação a este método, foram realizadas duas alterações ao protocolo:

- \* não se utilizaram as esferas de moagem;
- \* utilizou-se água em vez de TE no último passo.

Colocou-se 1g da amostra reduzida a pó, num tubo de centrífuga de 30 ml e incubou-se em gelo. Adicionou-se 15 ml de tampão 1, invertendo-se até estar completamente suspenso. Deixou-se um pouco à temperatura ambiente. Este tampão limita a oxidação e a actividade de nucleases.

Adicionou-se 1 ml de tampão 2 e inverteu-se o tubo, cerca de 10 vezes, para homogeneizar. Este tampão provoca a lise das paredes celulares. Incubou-se 5 minutos a 65°C e em seguida adicionou-se 5 ml de tampão 3, misturando bem e incubando de novo durante 5 minutos.

Centrifugou-se durante 10 minutos a 4°C a 25000 g a fim de retirar os restos da parede celular e eventualmente as proteínas da amostra. Repetiu-se este passo.

Seguidamente, adicionou-se 10 ml de isopropanol previamente arrefecido a -20°C, o qual provoca a precipitação do DNA. Incubou-se o tubo em gelo durante 10 minutos e centrifugou-se durante 10 minutos a 20000 g, a 4°C.

Deitou-se o sobrenadante fora e secou-se o sedimento à temperatura ambiente.

Ressuspendeu-se o “pellet” de DNA em 700 µl de tampão 4 (lavagem), deixando-se em seguida durante 30 minutos em gelo, tendo o cuidado de agitar ocasionalmente.

Transferiu-se a solução de DNA para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml limpo e centrifugou-se 5 minutos a 8000 rpm.

Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 75 µl de acetato de sódio 3M e 500 µl de isopropanol frio. Misturou-se bem, por inversão do tubo.



Centrifugou-se 5 minutos a 8000 rpm. Deitou-se fora o sobrenadante e secou-se na centrífuga de vácuo durante 5-10 minutos. Ressuspendeu-se em 80 µl de água.

#### 1.4.2 - Determinação da Concentração e Grau de Pureza do DNA

A concentração e grau de pureza do DNA podem ser determinados, através da medição da absorvância a 260 e 280 nm, utilizando um espectrofotómetro.

Colocou-se 995 µl de água estéril numa cuvette e utilizou-se como branco no espectrofotómetro, efectuando o auto zero do aparelho.

Numa cuvette de quartzo, colocaram-se 5 µl da amostra de DNA e 995 µl de água estéril e vedou-se a mesma com parafilme. A mistura foi homogeneizada por inversões sucessivas da cuvette. Procedeu-se, depois, à determinação da densidade óptica do DNA diluído a 260 e 280 nm.

A uma absorvância de 1.0 a 260 nm correspondem cerca de 50 µg de DNA de cadeia dupla. O grau de pureza do DNA foi determinado pela razão entre os valores da absorvância a 260 nm (pico de absorvância para ácidos nucleicos) e a 280 nm (pico de absorvância para proteínas). Esta relação deverá variar, em situações ideais, entre 1.5 e 1.8, permitindo determinar o grau de pureza do DNA em termos de contaminações com RNA ou proteínas. Após a determinação da concentração e grau de pureza do DNA, utilizou-se a PCR para a amplificação das fragmentos aleatórios.

#### 1.4.3- Amplificação Aleatória de Fragmentos por PCR

As reacções foram preparadas num volume final de 20µl, contendo os seguintes reagentes:

- ☆ 50-150 ng de DNA genómico purificado como indicado em 1.4.2;
- ☆ 0.8 mM de MgCl<sub>2</sub>;
- ☆ 2 µl de tampão de reacção (10x);
- ☆ 200 µM de dNTPs;
- ☆ 0.5 µl de *Taq* polimerase (5U/µl);

☆ 5  $\mu$ mol de "Primer"(AB1-05, AB1-10 ou AB1-18). Estes "primers" foram escolhidos de acordo com resultados de estudos prévios (Romão et al., 1998).

☆ água para perfazer o volume.

As reacções de PCR, utilizando o DNA extraído com o "DNeasy Plant Mini Kit", foram efectuadas num termociclador da BIO-RAD nas seguintes condições:

☆ Um minuto a 94°C;

☆ Um minuto a 39°C;

☆ Um minuto a 72°C.

Este ciclo foi repetido 35 vezes.

As reacções de PCR, utilizando o DNA extraído com o "Plant DNA Isolation Kit", foram efectuadas num termociclador da BIO-RAD nas seguintes condições:

☆ um minuto a 94°C;

☆ um minuto a 50°C;

☆ trinta segundos a 72°C.

Este ciclo foi repetido 35 vezes.

Os produtos de amplificação da reacção de PCR foram posteriormente analisados por electroforese em gel de agarose.

Para nos certificarmos da reprodutibilidade de resultados, repetiram-se 10% das diferentes amostras, pelo menos duas vezes.

#### 1.4.4- Electroforese em Gel de Agarose

Os géis de agarose foram preparados, para uma concentração de 1%, em TBE 1X (vide Anexo 1). Este tampão foi colocado dentro de uma tina de electroforese bem limpa.

Dissolveu-se a agarose no tampão, utilizando um forno de microondas, durante 3-5 minutos.

Após arrefecimento, até uma temperatura de cerca de 65°C, foram adicionados 7-8  $\mu$ l de brometo de etídio (20 mg/ml em água) por 200 ml de gel.

A solução de agarose foi colocada em tabuleiros de plástico de forma a obter um gel com cerca de 5 mm de espessura. Seguidamente, colocou-se o pente adequado ao número de amostras a carregar no gel e aguardou-se a solidificação da agarose.

Posteriormente, retirou-se o pente e as protecções laterais do tabuleiro e colocaram-se os géis em tinas de electroforese horizontais, de modo a ficarem completamente cobertos por tampão TBE 1X ( vide Anexo 1) .

As amostras de 20 µl foram previamente preparadas, adicionando a cada uma, 2,5 µl de tampão de aplicação - “Blue Juice” (vide Anexo 1).

Foi utilizado um marcador de bandas cujos fragmentos estão separados entre si por 100pb, e em que a banda mais intensa é correspondente aos 800pb.

A Figura 3 representa os fragmentos de DNA característicos do marcador de múltiplos de 100pb.

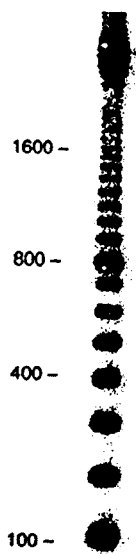


Fig 3- Fotografia ilustrativa dos fragmentos de DNA característicos do marcador de múltiplos de 100pb

Fonte: Pharmacia Biotech

Foi aplicado 0,5 µl de marcador num volume total de 10ml em ambas as extremidades do gel, ladeando as amostras, para melhor monitorizar a separação das amostras.

As amostras e o marcador foram então aplicados nos poços do gel. Ligaram-se os eléctrodos de modo a que o pólo positivo se encontrasse na extremidade do gel mais distante dos poços.

A electroforese foi efectuada, salvo referência em contrário, a 80V/cm, durante cerca de 5 horas.

#### 1.4.5- Análise/Tratamento das Imagens dos Produtos de Amplificação no Gel

Após electroforese, os produtos de amplificação foram visualizados num transiluminador de ultra-violetas. Os géis de agarose foram analisados no sistema Vilber Lourmat (Bioprofil), sendo as imagens captadas por câmara de vídeo e digitalizadas para visualização em écran de computador.

Sempre que a visualização das bandas não era muito clara, mergulhou-se o gel numa solução de 200 ml de água destilada e 10 µl de brometo de etídio, durante cerca de 20 minutos.

#### 1.4.6- Tratamento Estatístico dos Resultados

Neste campo, os dados obtidos foram armazenados informaticamente sob a forma de imagens digitalizadas para construção de uma base de dados de variabilidade. A imagem digitalizada foi impressa e analisada em termos de presença ou ausência de bandas, de acordo com o facto de ser facilmente ou dificilmente visualizada. Por exemplo no perfil representado na Figura 4 só eram considerados 8 fragmentos. Sempre que surgiram dúvidas sobre a existência dos mesmos, comparou-se a imagem impressa com a imagem digitalizada.



Fig. 4- Perfil de fragmentos de DNA

Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o marcador visualmente ou utilizando o software BicProfil e registados em papel, constituindo uma representação gráfica.

Esta representação gráfica que esquematizou o conjunto de bandas reprodutíveis e fiáveis produzido pelos 3 oligonucleótidos iniciadores serviu de base à construção de uma matriz binária, em que o 1 representa a existência de um fragmento de determinado tamanho e o 0 a sua ausência.

Esta matriz binária foi posteriormente submetida a análise multivariada (UPGMA-NTSYS), tendo sido utilizado o coeficiente de Nei & Li (também chamado Dice):

$$\text{coef: } a = \frac{2n_{xy}}{(n_x + n_y)}$$

em que:

$n_x$  e  $n_y$  são o número de bandas das linhas x e y respectivamente;

$n_{xy}$  é o número de bandas detectadas entre duas linhas.

### III- Resultados

#### 1- Isolamento do DNA a Partir de Folhas de *Quercus suber*

O DNA extraído com o "Plant DNA Isolation Kit", apareceu em concentrações da ordem dos 0,05 µg/µl, valor obtido por espectrofotometria. No caso da extração com o "DNeasy Plant Mini Kit", o DNA apareceu em concentrações que variavam entre 0,05 e 0,5 µg/µl, sendo portanto maior o rendimento e tendo-se por isso optado pela extração através deste método.

As amostras foram analisadas por espectrofotometria, sendo alguns dos valores indicados na tabela 1.

Tabela 1- Valores de absorvância a 260 e 280nm, para os 25 indivíduos da população VI-02

Indivíduo da população VI-02	Abs. 260	Abs. 280	Grau de pureza do DNA (Abs. 260/Abs 280)	Concentração do DNA (µg/µl)
1	0,039	0,028	1,39	0,39
2	0,047	0,047	1,47	0,47
3	0,022	0,018	1,22	0,22
4	0,046	0,030	1,53	0,46
5	0,030	0,017	1,76	0,30
6	0,031	0,025	1,24	0,31
7	0,028	0,018	1,56	0,28
8	0,025	0,020	1,25	0,25
9	0,042	0,037	1,14	0,42
10	0,032	0,026	1,23	0,32
11	0,034	0,024	1,42	0,34
12	0,033	0,019	1,74	0,33
13	0,031	0,027	1,15	0,31
14	0,028	0,020	1,40	0,28
15	0,021	0,019	1,11	0,21
16	0,042	0,028	1,50	0,42
17	0,034	0,019	1,79	0,34
18	0,033	0,018	1,83	0,33
19	0,041	0,035	1,17	0,41
20	0,031	0,018	1,72	0,31
21	0,048	0,028	1,71	0,48
22	0,037	0,021	1,76	0,37
23	0,048	0,026	1,85	0,48
24	0,047	0,045	1,04	0,47
25	0,036	0,029	1,24	0,36

O DNA genómico utilizado (obtido com o o "DNeasy Plant Mini Kit"), foi analisado por electroforese em gel de agarose, tendo-se revelado geralmente integro, com baixo grau de fragmentação.

Quando se analisou o DNA extraído com o “Plant DNA Isolation Kit”, em electroforese em gel de agarose, não se observou a existência de qualquer banda no gel. Também se efectuaram reacções de PCR, utilizando o “primers” MSQ 3, MSQQ 13, MSQ 16, não se tendo verificado qualquer produto de amplificação.

A Fig. 5 mostra o DNA genómico de folhas de sobreiro testado, analisado por electroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídio.

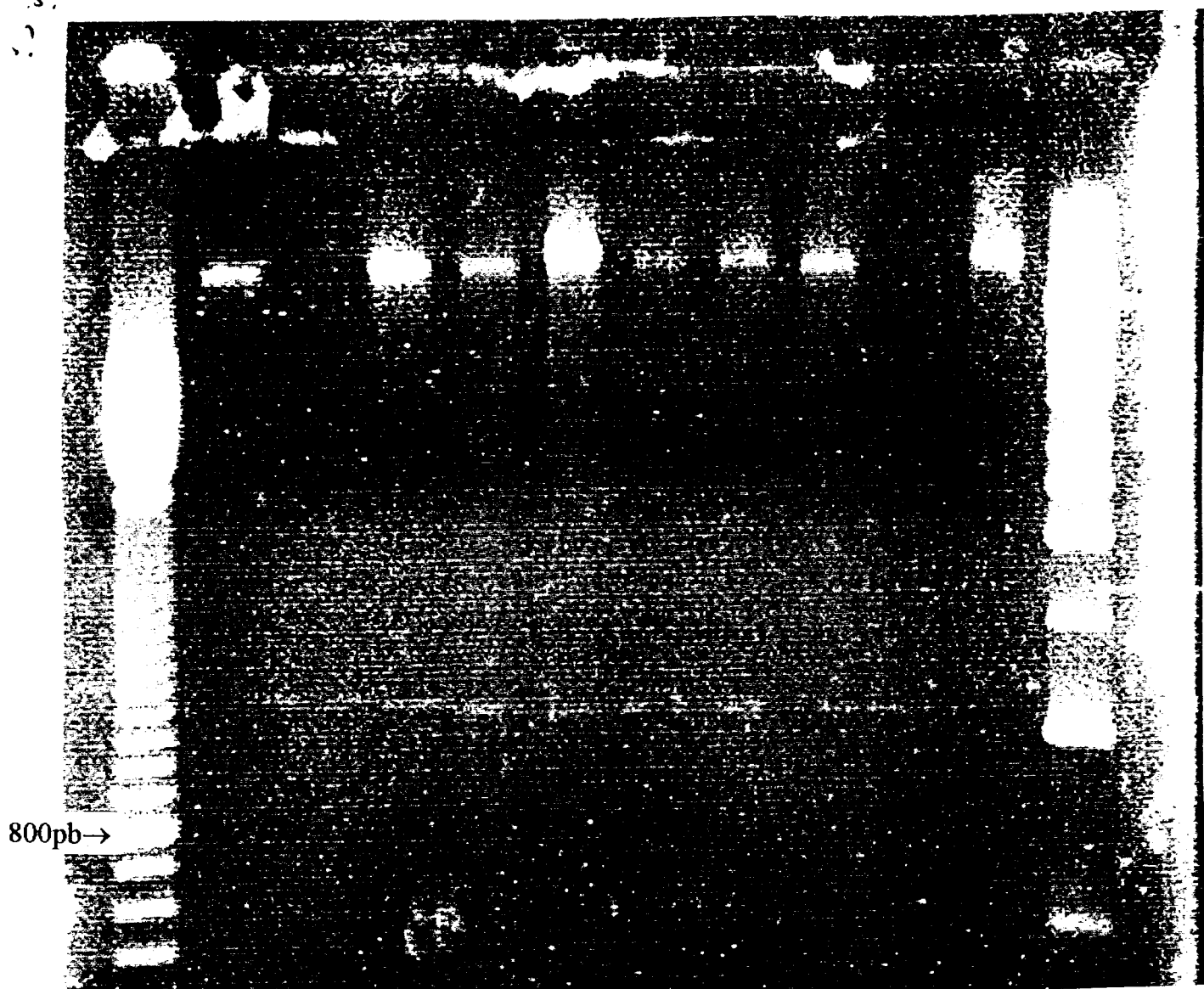


Fig. 5- DNA genómico de folhas de sobreiro testado (de diferentes indivíduos da população V-01: 20, 21, 24, 25, 29, 34, 35, 40 e 41 respectivamente), analisado por electroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídio.  
M: marcador de fragmentos de DNA de múltiplos de 100pb

## 2- Análise da Variabilidade Intra-Populacional

### 2.1- Análise das Diferentes Populações com o “Primer” AB1-05

Os produtos de amplificação foram visualizados por UV na presença de brometo de etídio. Os perfis polimórficos obtidos foram registados em fotografia para posterior análise comparativa, visualmente ou utilizando o software BioProfil (específico para o efeito) que permite a correcção do efeito de “smile”, através da união de diferentes pontos. Com base nos resultados obtidos optou-se pela análise visual dos perfis de amplificação.

A Figura 6 ilustra os perfis de amplificação do DNA obtidos com diferentes indivíduos de *Quercus suber* L., para o “primer” AB1-05.

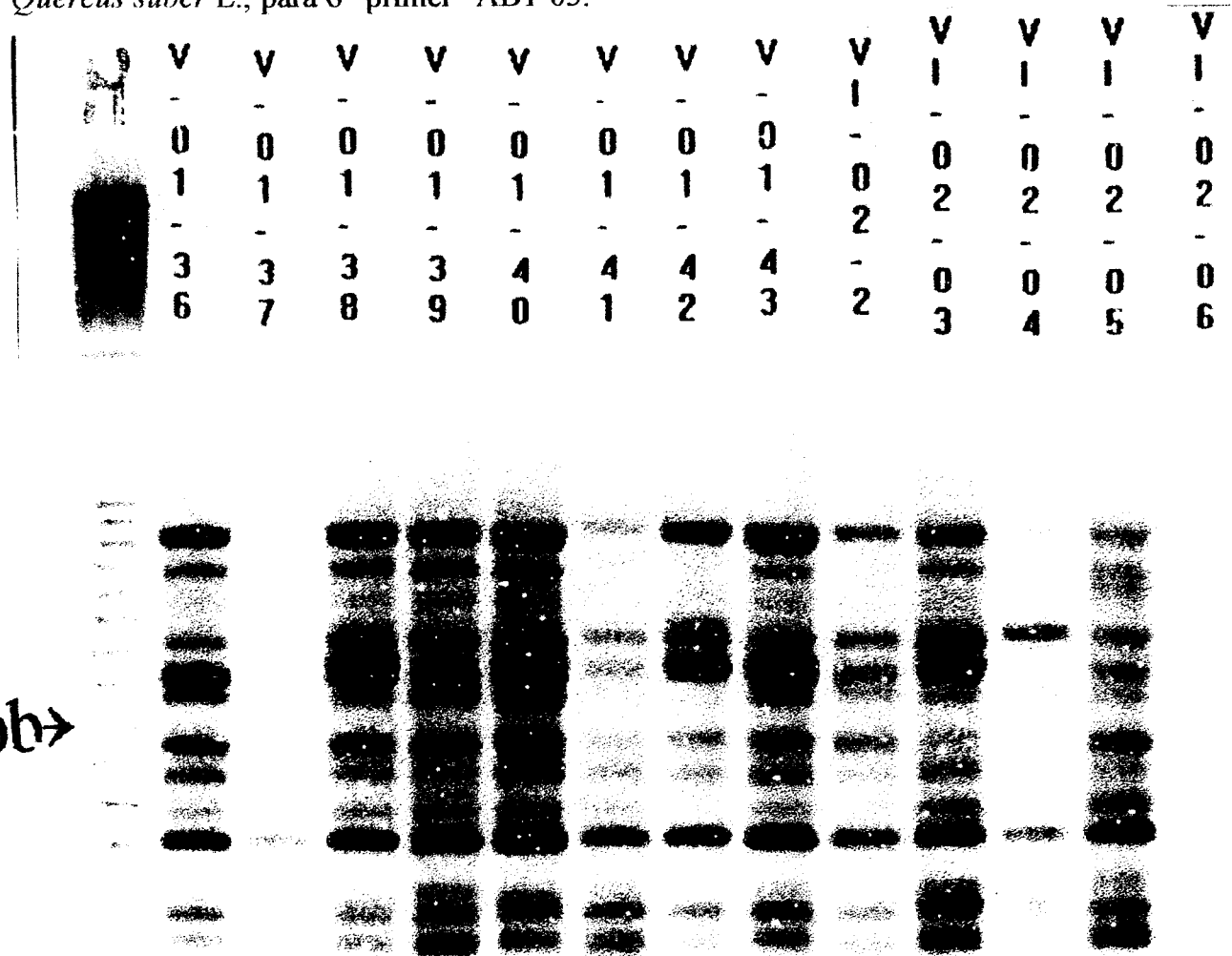


Fig. 6- Perfis de amplificação do DNA obtidos de diferentes indivíduos a testar, com o “primer” AB1-05



Os perfis de amplificação do DNA da população V-01 para este “primer” são formados por 4 (indivíduo 37) -12 bandas (nos indivíduos 39 e 40), o que facilitou a sua análise.

No processo de detecção das bandas teve-se em consideração que:

- não existiam bandas entre 1020-1180pb, em virtude da falta de reproductibilidade;
- a banda dos 580pb não era facilmente identificada nos indivíduos 41 e 42 da população V-01 bem como nos 2 e 4 da população VI-02, não tendo por isso sido considerada;
- entre 300-400pb, foram consideradas todas as bandas.

Com base na análise comparativa visual efectuou-se uma representação esquemática do tamanho aproximado dos fragmentos de amplificação, que se encontra ilustrada na Figura 7.

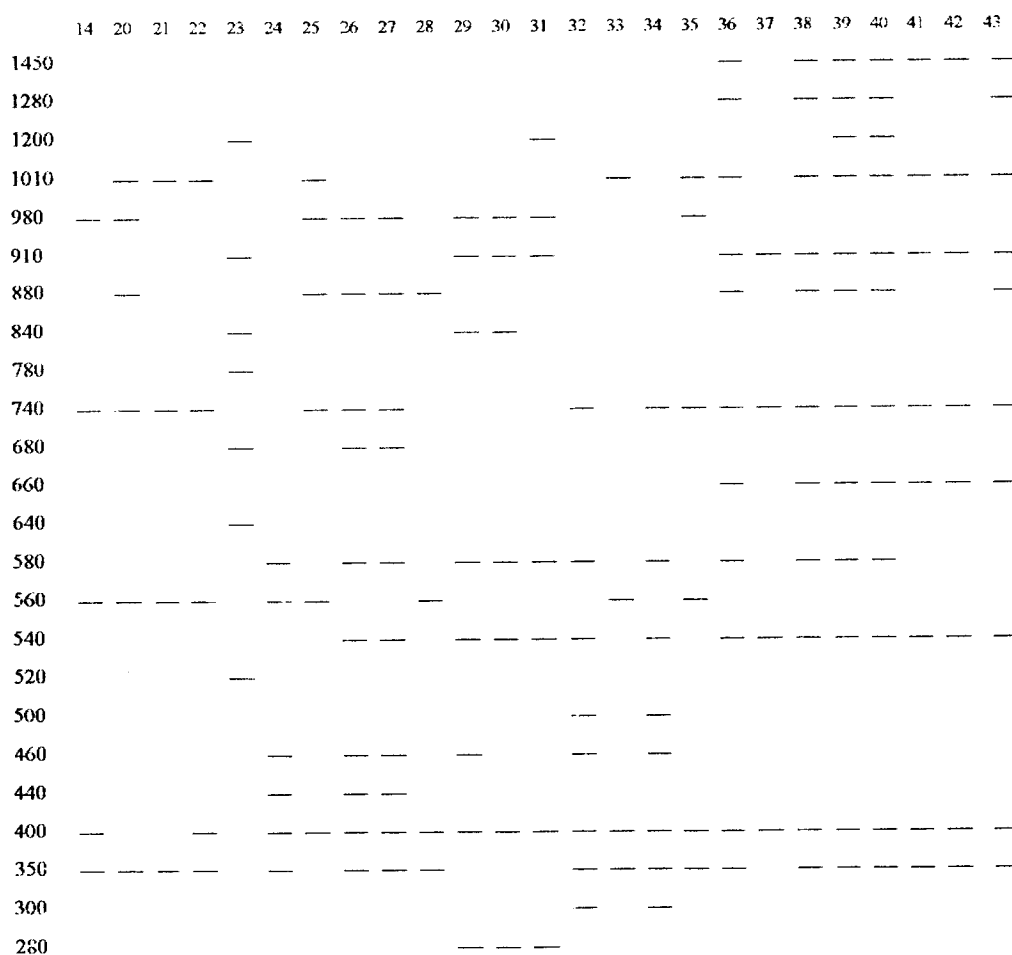


Fig. 7- Representação esquemática do tamanho aproximado dos fragmentos de amplificação da população V-01

Acima dos 1450 e abaixo dos 280pb, não foi considerada a existência de bandas devido à falta de reproductibilidade.

O indivíduo 23 é o único que apresenta um fragmento com cerca de 780pb, um de 640 e outro de 520pb . Por outro lado, a banda dos 500pb só aparece em dois indivíduos: 32 e 34 e a dos 280pb só aparece em três indivíduos desta população: 29,30 e 31.

É também de salientar que a banda dos 840pb só aparece nos indivíduos 23, 29 e 30 e a dos 440pb nas amostras 24, 26 e 27.

Podemos constatar a existência de 24 bandas, das quais 21 são polimórficas.

Os perfis de amplificação do DNA da população V-02 para este “primer” são formados por 4 (amostra 33 e 37) a 11 bandas (amostra 39 e 40). No caso da população VI-02, o número de bandas varia entre 3 (amostra 24) e 11 (indivíduo 7). A população VI-03 apresenta um perfil com 2 (indivíduo 24) a 12 bandas (indivíduo 33).

A Figura 8 ilustra esquematicamente, o tamanho dos fragmentos de amplificação da população VI-02.

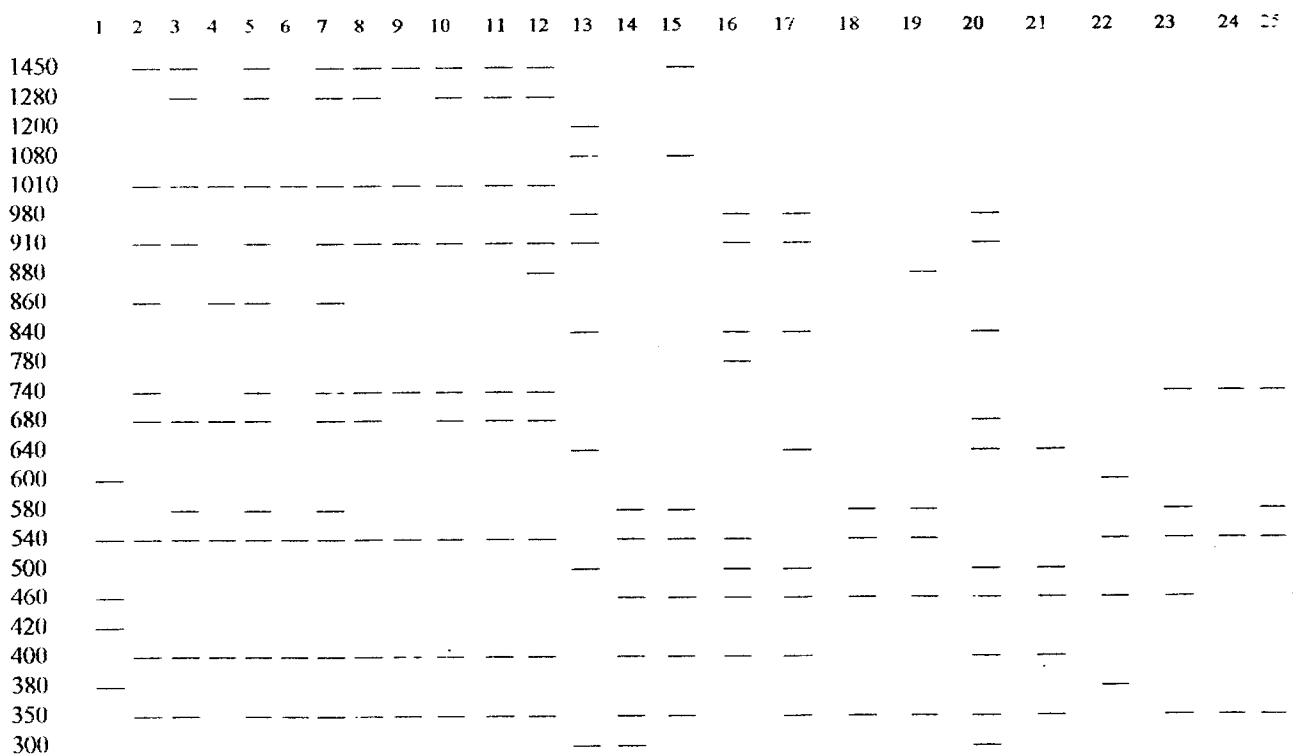


Fig. 8- Representação esquemática do tamanho dos fragmentos de amplificação da população VI-02

Acima dos 1450 e abaixo dos 300pb, não foi considerada a existência de bandas devido à falta de reproductibilidade.

Quando se compararam a análise do gel e a representação gráfica, verificamos que o indivíduo 5 da população VI-02 possuía 11 bandas, não se tendo considerado bandas entre 400-540pb e 1020-1280pb.

Com base nos resultados obtidos, construíram-se as matrizes binárias, de que são exemplo as que se encontram representadas na figura 8 e 9.

A Figura 9 ilustra a matriz binária obtida para a população V-01 para o “primer” AB1-05.

	14	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
1450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
1280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
1200	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1080	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
980	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
910	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
880	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1
840	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
780	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
740	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
680	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
640	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
580	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
560	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
540	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
520	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
460	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fig 9- Matriz binária obtida para a população V-01 para o “primer” AB1-05

A Figura 10 ilustra a matriz binária obtida para a população VI-02 para o “primer” AB1-05.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1450	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1280	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1010	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
980	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
910	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
880	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
860	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
840	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
780	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
740	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
680	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
640	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
600	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
580	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
540	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
460	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
420	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
380	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
350	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Fig 10- Matriz binária obtida para a população VI-02 para o “primer” AB1-05

É importante salientar que as matrizes binárias representam a presença ou ausência de um fragmento de determinado tamanho pelos números 1 e 0 respectivamente.

Com base na análise/tratamento das imagens dos produtos de amplificação e no método UPGMA do programa NTSYS, foram construídos os respectivos dendrogramas:

A Figura 11 representa o dendrograma da população V-01 para o “primer” AB1-05

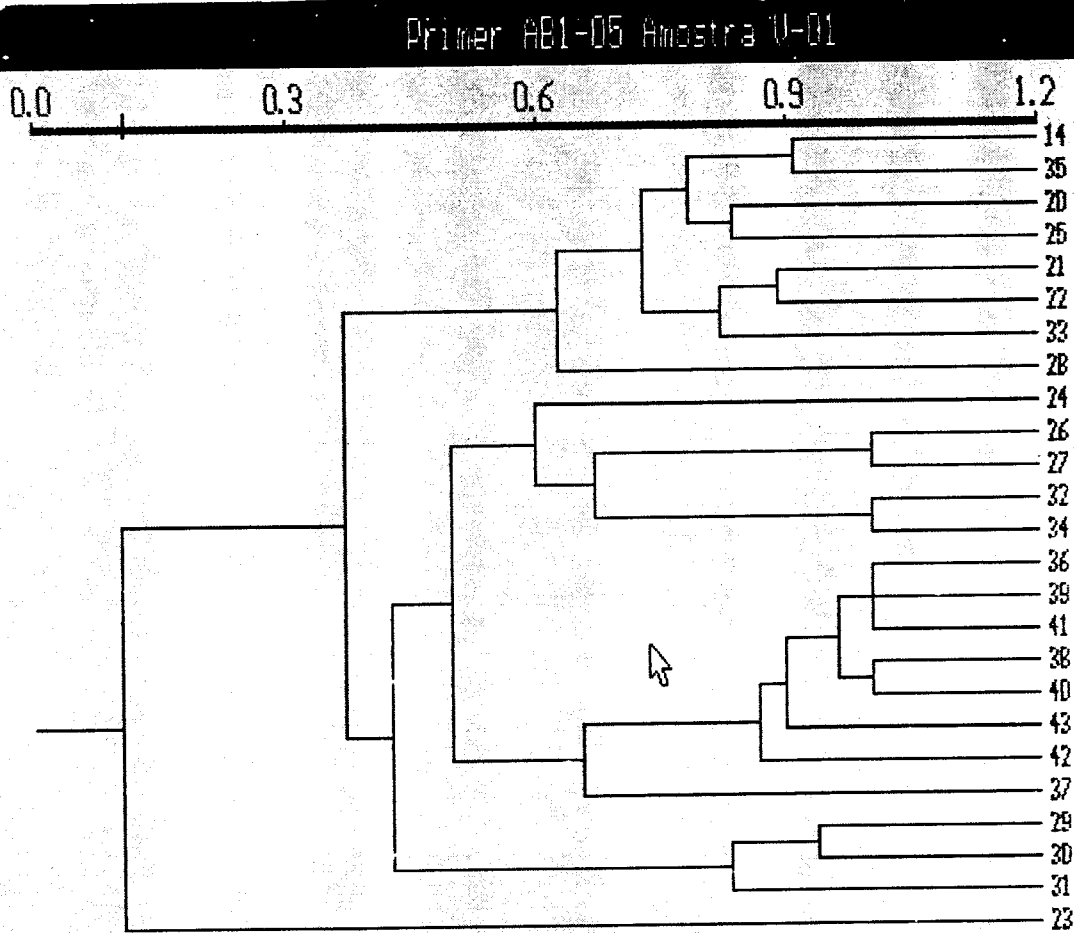


Fig.11- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-05 e população V-01. Testes de associação: matriz de correlação  $r=90,7\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Analisando o dendrograma, verificou-se que os indivíduos 26 e 27, 32 e 34, 36 e 41 bem o 40 e o 42 apresentam 100% de semelhança. Deste modo, o “primer” AB1-05 não diferencia completamente esta população.

O indivíduo 23 é diferente dos restantes, apresentando um índice de similaridade de apenas cerca de 6%.

Observa-se que de facto há elevada variabilidade genética entre a totalidade das amostras..

A Figura 12 representa o dendrograma da população V-02 para o “primer” AB1-05.

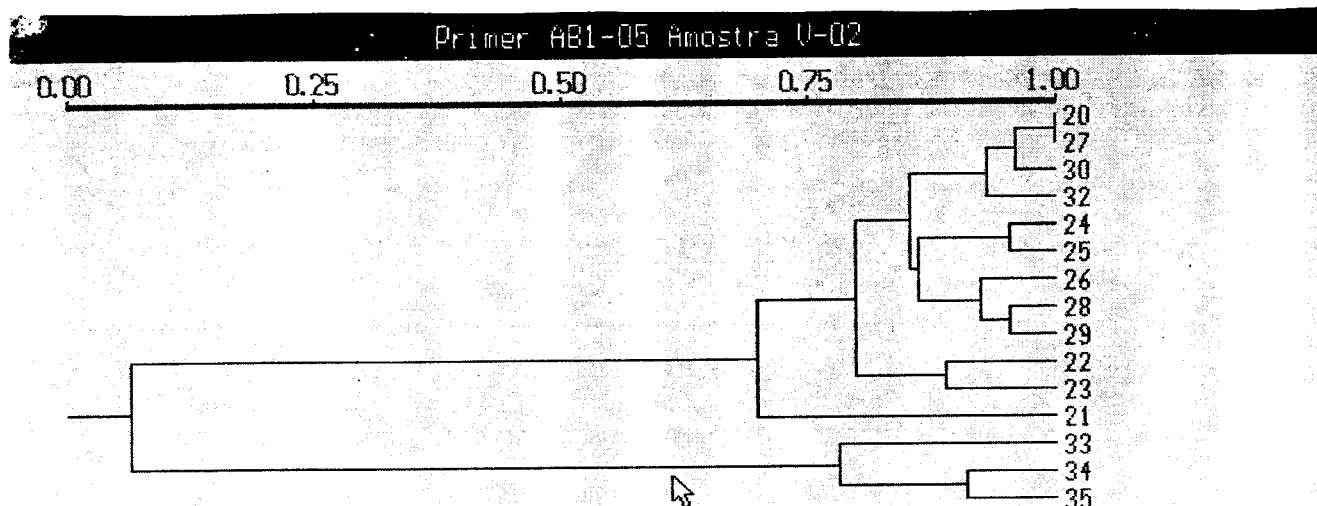


Fig. 12- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-05 e população V-02. Testes de associação: matriz de correlação  $r=98,9\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Analisando o dendrograma anterior, verificou-se que:

- os indivíduos 20 e 27 apresentam semelhanças a 100%;
- as amostras 33, 34 e 35 formam um grupo que apenas possui 6% de semelhança com os restantes;
- o “primer” AB1-05 não consegue diferenciar a totalidade das populações.

A Figura 13 representa o dendrograma obtido com o “primer” AB1-05 e população VI-02, sendo possível observar que os indivíduos 3, 8 e 11 apresentavam 100% de similaridade, pelo que este “primer” não é indicado para a sua diferenciação. Por outro lado, as amostras 13, 15, 17, 20, e 21 formavam um grupo que apenas apresentava 29% de semelhanças com a restante população. Os indivíduos 1 e 22 apresentam apenas cerca de 25% de semelhanças com a população restante.

Primer AB1-05 Amostra VI-02

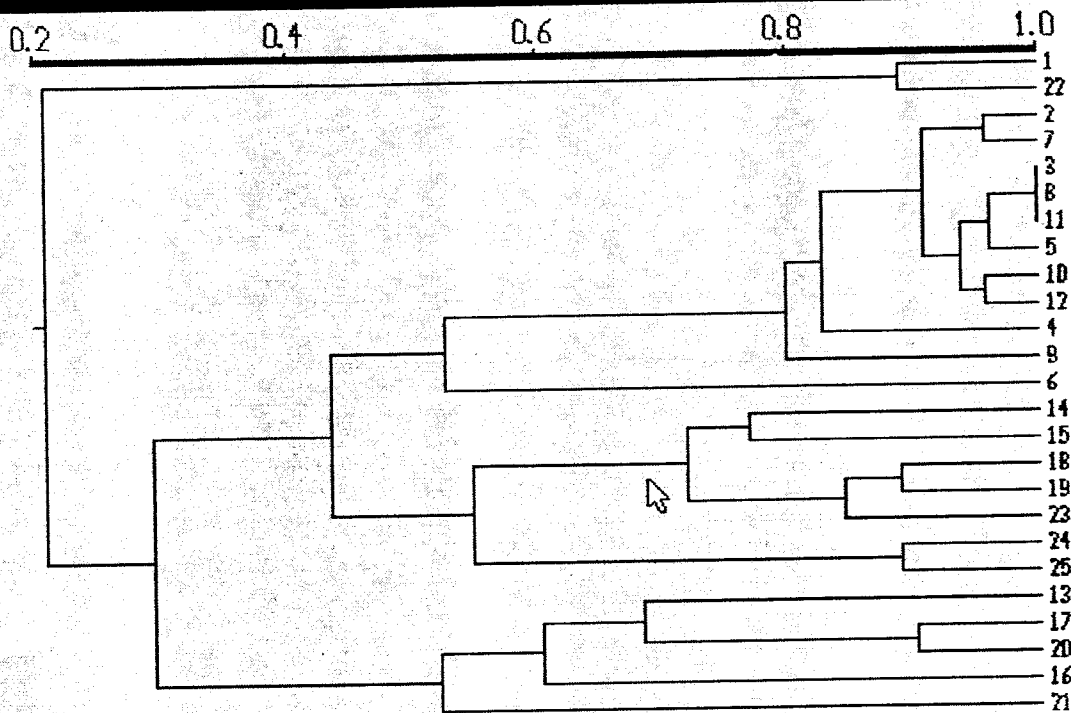


Fig.13- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-05 e população VI-02. Testes de associação: matriz de correlação  $r=92,2\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

A Figura 14 representa o dendrograma obtido com o “primer” AB1-05 e população VI-03

Primer AB1-05 Amostra VI-03

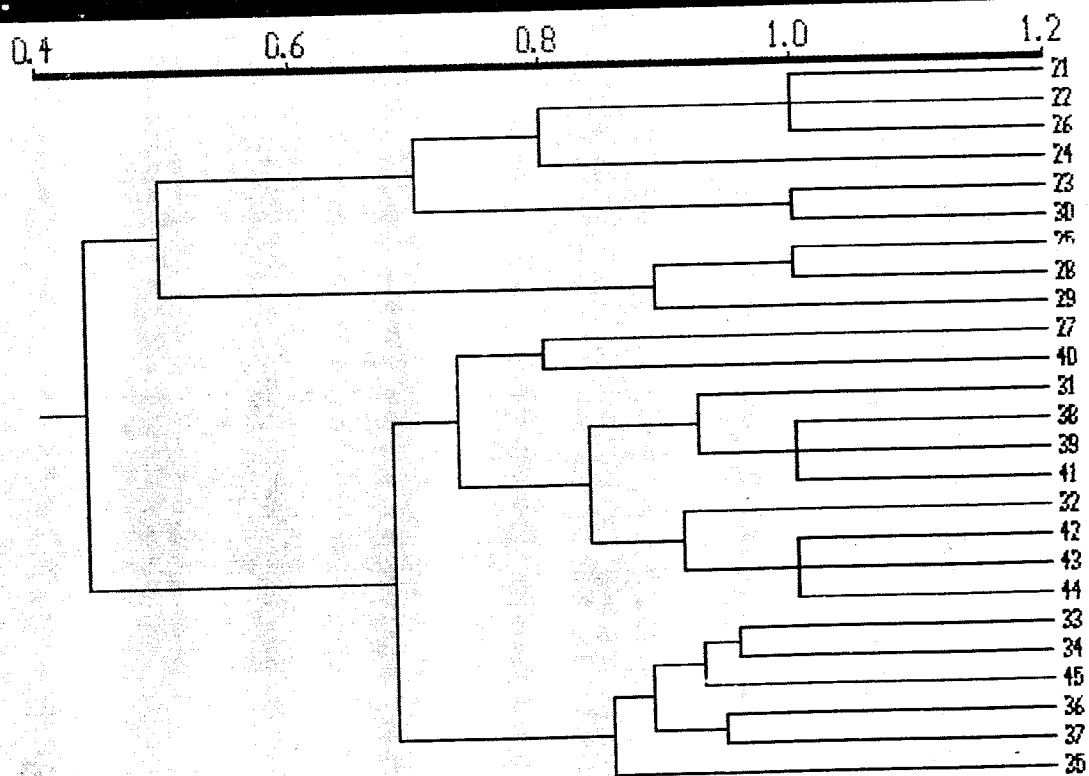


Fig.14- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-05 e população VI-03. Testes de associação: matriz de correlação  $r=91,8\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Observando o dendrograma da Figura 14, podemos verificar que:

★este “primer” não me permitiu diferenciar todos os indivíduos desta população, pois as amostras 21 e 26, 23 e 30, 25 e 28, 38 e 41 bem como 42 e 44 apresentavam 100% de semelhanças;

★ os indivíduos 21, 22, 26, 24, 23, 30, 25, 28 e 29 evidenciavam apenas cerca de 43% de semelhança com a restante população.

Deste modo, o “primer” AB1-05 não é adequado para a diferenciação das quatro populações estudadas.

Os coeficientes de correlação para o “primer” AB1-05 são representados na tabela 2.

Tabela 2- Coeficientes de correlação das diferentes populações para o “primer” AB1-05

<b>População:</b>	<b>Coeficiente de Correlação ( r )</b>
V-01	90,7%
V-02	98,9%
VI-02	92,2%
VI-03	91,8%

Verificou-se que o coeficiente de correlação variava entre 90,7% (população V-01) e 98,9% (população V-02).



## 2.2- Análise das Diferentes Populações com o “Primer” AB1-10

Os produtos de amplificação foram visualizados por UV na presença de brometo de etídio. Os perfis polimórficos obtidos foram registrados em fotografia para posterior análise visual comparativa, de acordo com o tamanho e intensidade das bandas.

A Figura 15 ilustra os padrões de DNA amplificados obtidos de diferentes indivíduos de *Quercus suber* L., com o “primer” AB1-10.

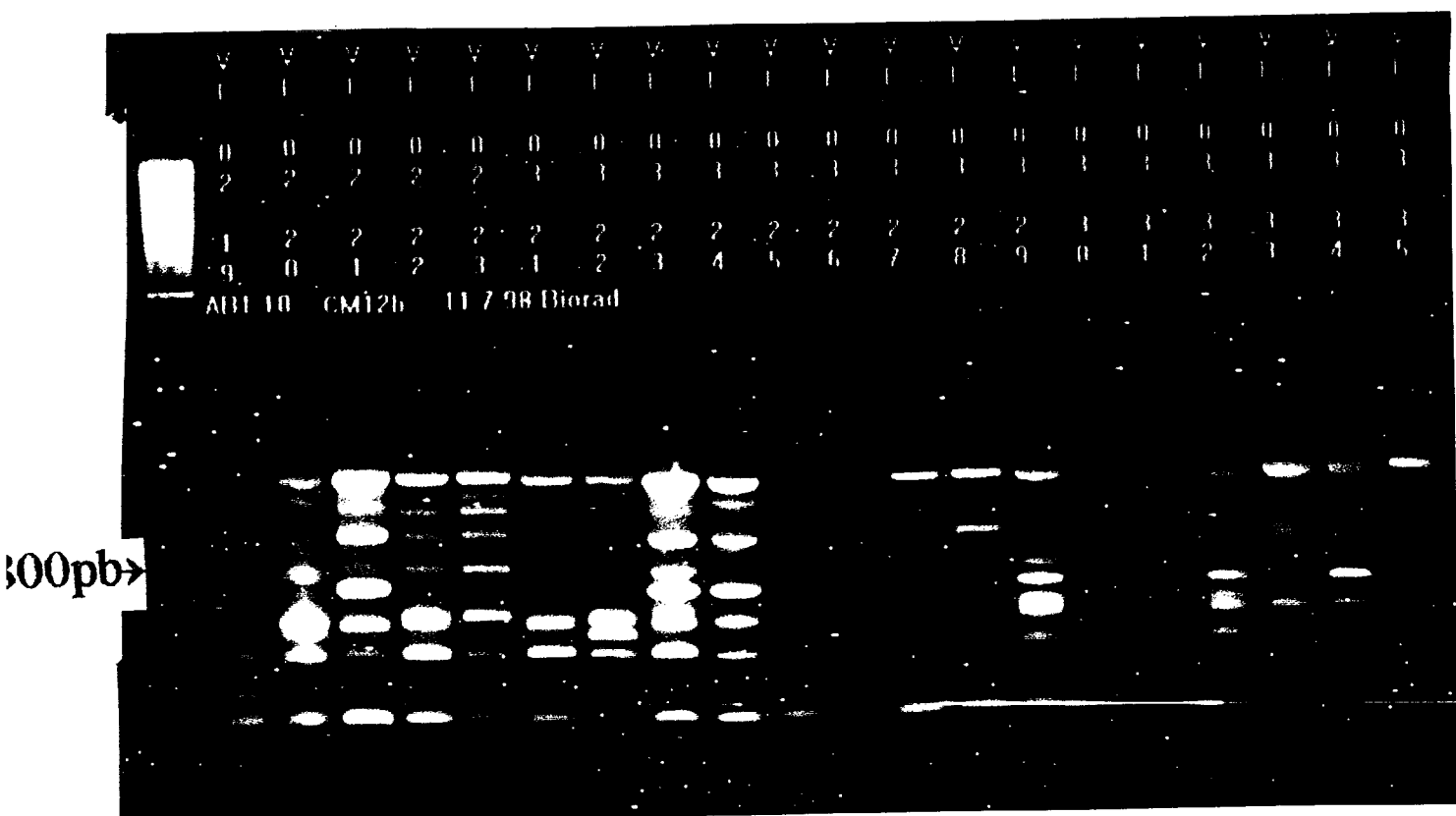


Fig.15- Padrões de DNA amplificados obtidos diferentes indivíduos a testar, com o “primer” AB1-10

Como se pode ver na Figura 15, o número de bandas amplificadas por este “primer” na população VI-03 variou entre 3 (nos indivíduos 19, 28 e 34) e 9 (no indivíduo 23)

No intervalo entre 350-1200pb, foram consideradas todas as bandas.

Na 2ª coluna (correspondente ao indivíduo 20 da população VI-02), não foram consideradas bandas entre 820-1180pb em virtude da fraca intensidade apresentada.

Os fragmentos amplificados para a população VI-03, indivíduo 27, não foram consideradas devido à falta de reprodutibilidade.

A Figura 16 representa esquematicamente os fragmentos amplificados na população VI-03 com o “primer” AB1-10.

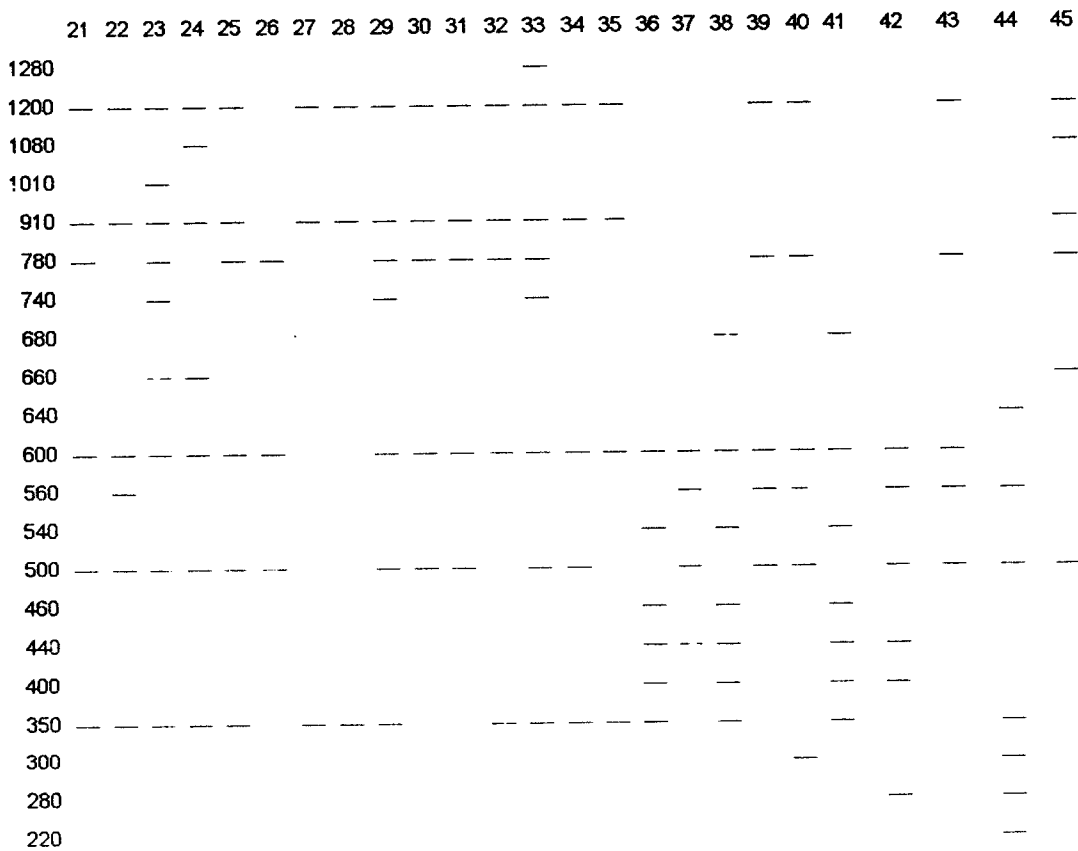


Fig. 16- Representação esquemática do tamanho dos fragmentos amplificados na população VI-03 com o “primer” AB1-10.

Acima de 1300pb e abaixo de 200 não foram consideradas bandas devido à falta de reproductibilidade.

O indivíduo 33 foi o único a apresentar uma banda entre 1250-1300pb.

O perfil de amplificação é constituído por 21 bandas, das quais 18 são polimórficas.

Utilizando a representação esquemática apresentada na figura anterior, construiu-se a matriz binária para esta população representada na Figura 17.

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
1280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1200	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	
1080	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
1010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
910	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
780	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	
740	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
680	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
660	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
640	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
600	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
560	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	
540	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
500	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
350	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	

Fig. 17- Matriz binária da população VI-03 para o “primer” AB1-10

Os dados da matriz foram submetidos à análise UPGMA do programa NTSYS tendo-se obtido os dendrogramas correspondentes.

A Figura 18 representa o dendrograma obtido com o “primer” AB1-10 e população V-01.

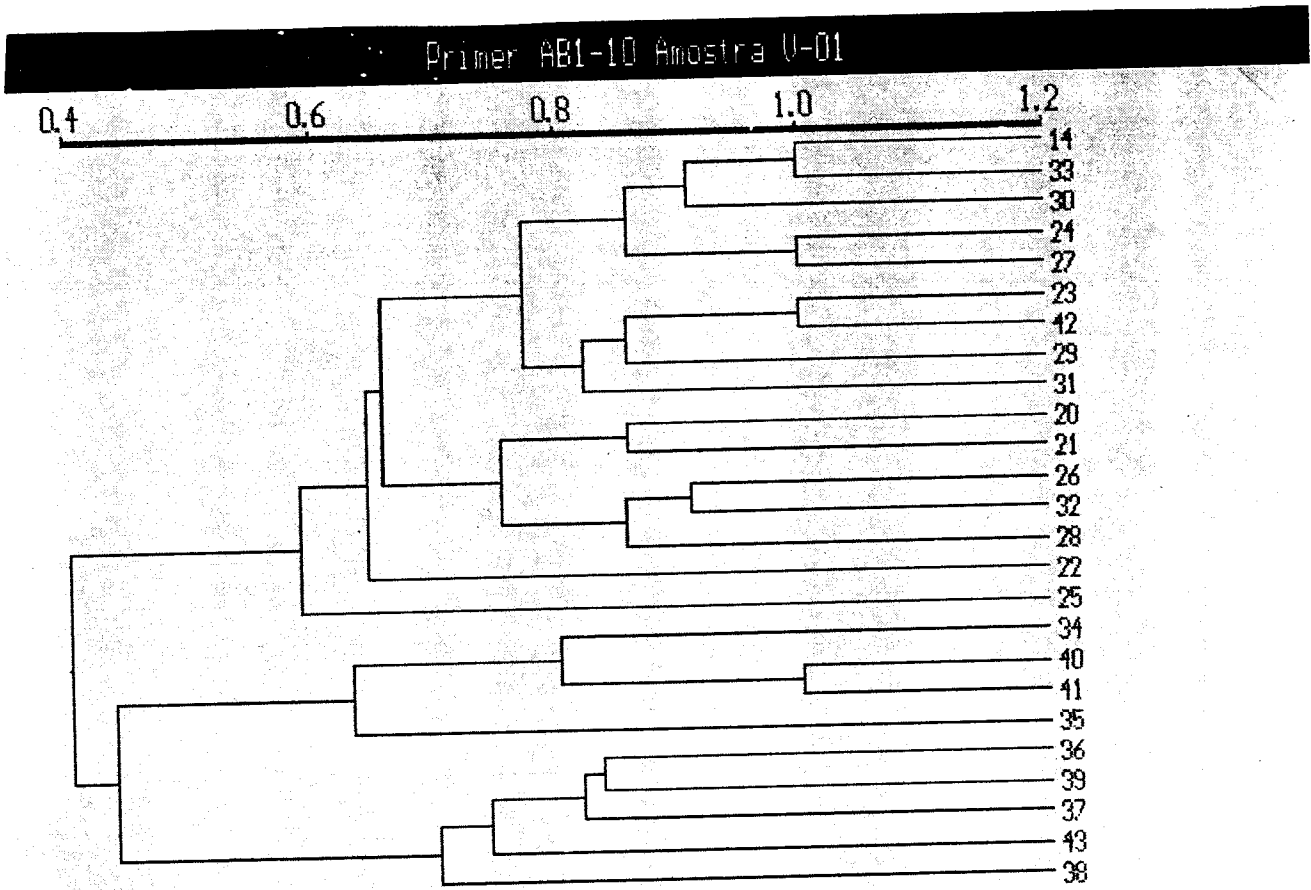


Fig. 18- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-10 e população V-01. Testes de associação: matriz de correlação  $r=80,6\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

A análise do dendrograma anterior, mostra-nos que este “primer” não permite a diferenciação de todos os indivíduos desta população. Verificou-se que os indivíduos 14 e 33, 24 e 27, 23 e 42, bem como o 40 e 41 apresentam um índice de semelhança de 100%. Por outro lado, as amostras 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, e 43 apresentam apenas cerca de 45% de semelhanças.

Verificou-se a existência de variabilidade genética na totalidade da população.

A Figura 19 representa o dendrograma obtido com o “primer” AB1-10 e população V-02

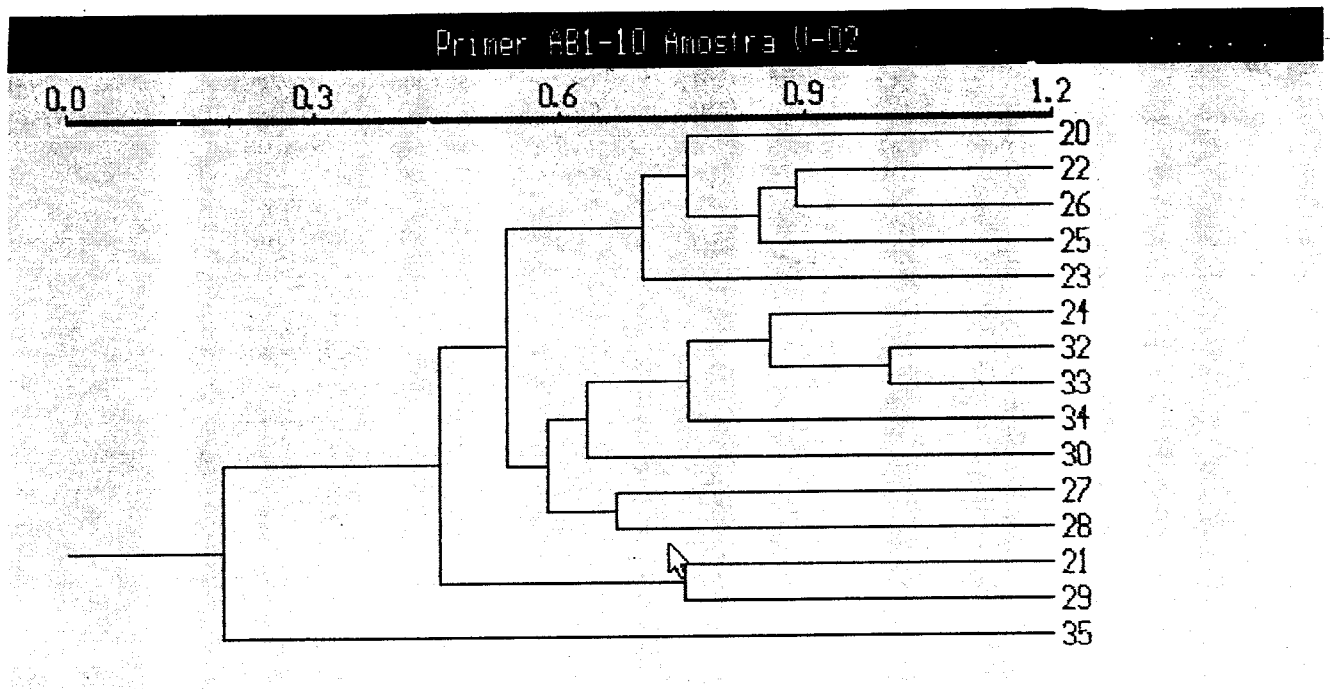


Fig. 19- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-10 e população V-02. Testes de associação: matriz de correlação  $r=80,2\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Pela interpretação do dendrograma relativo à população V-02 para o “primer” AB1-10, verificou-se que os indivíduos 32 e 38 apresentavam semelhanças a um nível de 100%. Por outro lado, o indivíduo 35 era diferente de todos os outros, apresentando apenas cerca de 16% de semelhanças. O mesmo aconteceu em relação às amostras 21 e 29 com semelhanças de apenas 38%.

Este “primer” não permitiu a diferenciação de todos os indivíduos da população V-02..

A Figura 20 representa o dendrograma obtido com o “primer” AB1-10 e população VI-02.

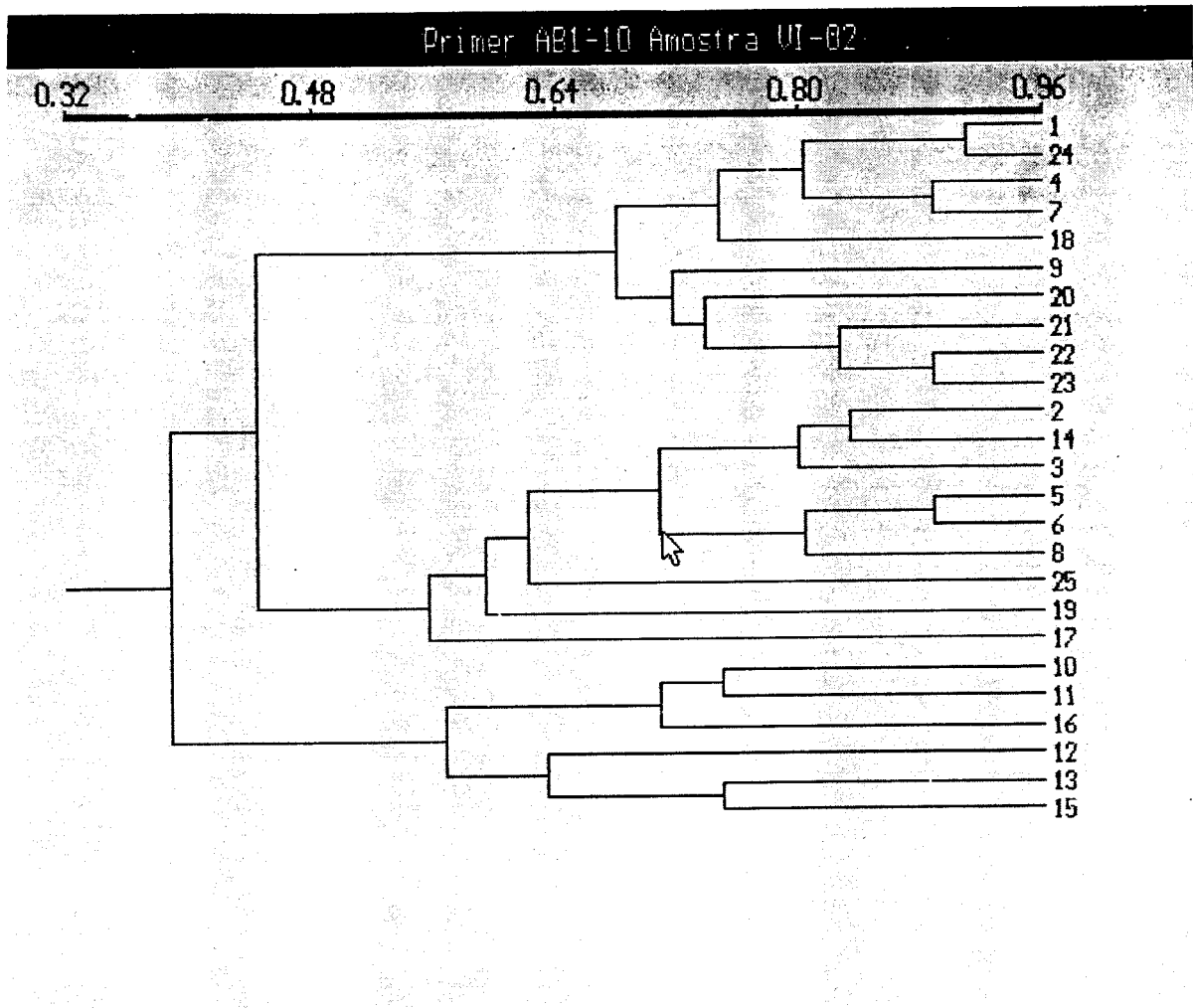


Fig.20- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-10 e população VI-02. Testes de associação: matriz de correlação  $r=77,4\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Observando o dendrograma obtido para a população VI-02, verificou-se que o “primer” AB1-10 diferenciou todos os indivíduos da população.

Observou-se ainda que as amostras 10, 11, 12, 13, 14 e 16, apresentavam apenas cerca de 40% de semelhanças com o resto da população. Por outro lado, os indivíduos 2, 3, 5, 6, 8, 14, 17, 19 e 25, apresentavam apenas 46% de semelhanças.

A Figura 21 representa o dendrograma obtido com o “primer” AB1-10 e população VI-03.

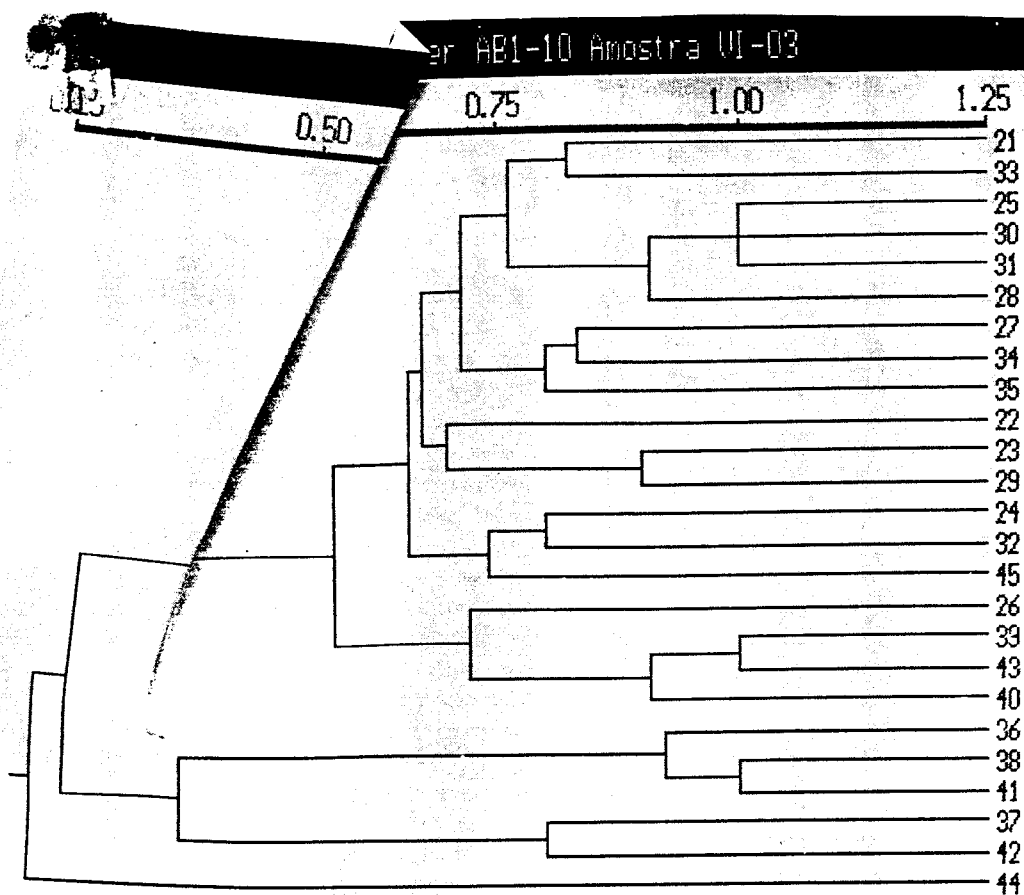


Fig.21- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-10 e população VI-03. Testes de associação: matriz de correlação  $r=88,8\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

O “primer” AB1-10 não permitiu a diferenciação de todos os indivíduos da população VI-03, pois os indivíduos 25 e 31, 23 e 29, 39 e 43, 38 e 41 apresentavam um índice de similaridade de 100%.

O indivíduo 44 era diferente dos restantes, com uma semelhança de apenas 20%. Verificou-se ainda que os indivíduos 36, 37, 38, 41, 42 e 44 formavam um grupo com apenas 24% de semelhança com o resto da população.

Os coeficientes de correlação para este “primer” são representados na tabela 3.

Tabela 3- Coeficientes de correlação das diferentes populações para o “primer” AB1-10

<b>População:</b>	<b>Coeficiente de Correlação ( r )</b>
V-01	80,6%
V-02	80,2%
VI-02	77,4%
VI-03	88,8%

Verificou-se que o coeficiente de correlação variava entre 77,4% (população VI-02) e 88,8% (população VI-03).



### 2.3- Análise das Diferentes Populações com o “Primer” AB1-18

A Figura 22 ilustra os padrões de DNA amplificados obtidos de diferentes indivíduos de *Quercus suber* L., com o “primer” AB1-18.

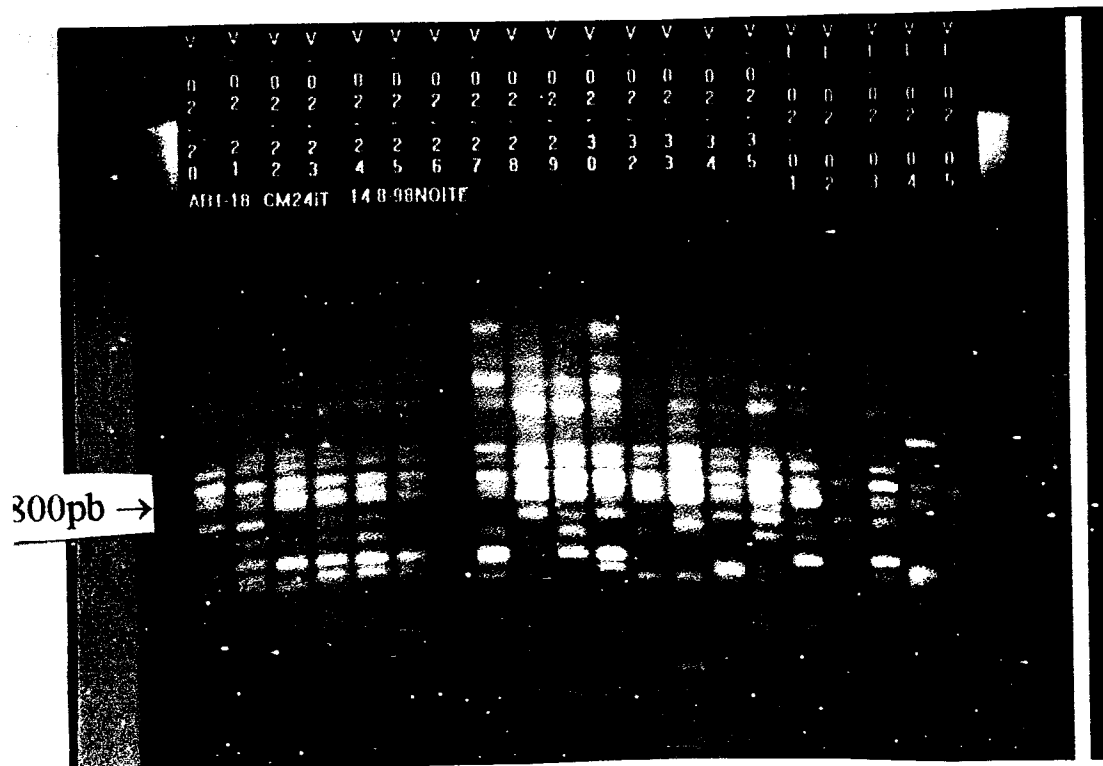


Fig. 22- Padrões de DNA amplificados obtidos diferentes indivíduos a testar, com o “primer” AB1-18

O perfil da amplificação da população V-02 para o “primer” AB1-18 varia entre 10 (amostra 26) e 17 bandas(amostra 23).

A escolha das bandas de acordo com a sua intensidade levou a que, por exemplo, no perfil apresentado na figura anterior, nas colunas correspondentes aos indivíduos 20, 22, 23, 24, 25 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33 fosse considerada a existência de quatro fragmentos com mais de 1150pb, enquanto na coluna correspondente ao indivíduo 32 só foi considerado um com cerca de 1200pb.

É ainda de salientar que todos os indivíduos possuíam bandas comuns com cerca de 910 e 350pb.

A Figura 23 representa esquematicamente o perfil de bandas da população V-02 de acordo com o seu tamanho.

	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32	33	34	35
1680	—		—	—	—	—		—	—	—	—		—	—	—
1450	—		—	—	—	—		—	—	—	—		—	—	—
1280	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—		—	—	—
1200	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—
1080								—	—				—		
980		—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—
910	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
860	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—
840							—								
800	—	—	—	—	—	—	—		—	—		—	—	—	—
780							—								
740	—	—		—	—				—	—	—				
680		—	—	—	—		—	—	—	—		—	—	—	—
600		—	—	—	—	—		—		—	—				
560	—	—		—	—	—	—			—	—			—	—
540	—	—	—	—				—	—	—		—	—	—	—
500							—								
480	—	—	—	—				—					—		—
440	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—
400						—					—	—			—
350	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
300							—								
280			—	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—

Fig. 23- Representação esquemática do perfil de bandas da população V-02 de acordo com o seu tamanho.

Pela observação da representação esquemática, pode verificar-se que o perfil de amplificação da população V-02, era constituído por 23 bandas, das quais 17 eram polimórficas.

Verificou-se ainda que:

- ❖ o indivíduo 26 era o único que possuía bandas com 780 e 500pb;
- ❖ todos os indivíduos apresentavam fragmentos de tamanho comum com cerca de 350 e 910pb.

Esta representação esquemática foi posteriormente convertida numa matriz binária, em que o 1 representava a presença de uma banda de determinado tamanho e o 0 a sua ausência.

A Figura 24 ilustra a matriz binária obtida com a população V-02 para o primer testado (AB1-18).

	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32	33	34	35
1680	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
1450	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
1280	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
1200	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1080	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
980	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
910	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
860	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
840	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
800	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
780	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
740	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
680	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
600	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
560	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
540	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
500	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
440	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
400	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
280	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1

Fig. 24- Matriz binária obtida com a população V-02 para o primer testado (AB1-18)

Os dados fornecidos pelas matrizes correspondentes às diferentes populações foram depois sujeitos a análise através do programa NTSYS (UPGMA), tendo originado os dendrogramas seguintes.

A Figura 25 representa o dendrograma obtido com o “primer” AB1-18 e população V-01

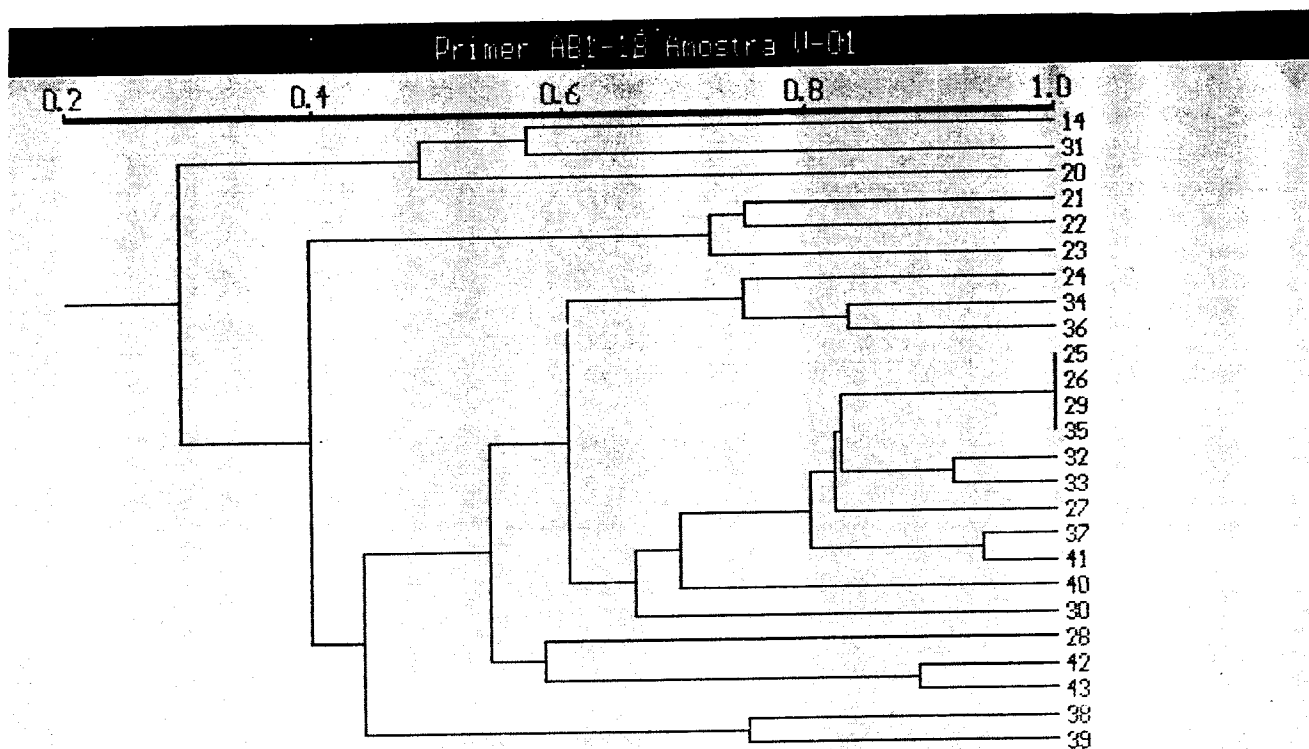


Fig.25- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-18 e população V-01. Testes de associação: matriz de correlação  $r=84,8\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Pela interpretação do dendrograma obtido com a população V-01, pode verificar-se que:

- ▲ este “primer” não permitiu a diferenciação de todos os indivíduos desta população, pois os indivíduos 25, 26, 29 e 35 apresentavam uma semelhança de 100%;
- ▲ os indivíduos 1, 2 e 13 apresentavam apenas cerca de 30% de semelhanças com o resto da população;
- ▲ os indivíduos 21, 22 e 23 apresentavam apenas cerca de 40% de semelhanças relativamente ao resto da população;
- ▲ os indivíduos 38 e 39 apresentavam apenas cerca de 45% de semelhanças com o resto da população.

A Figura 26 representa o dendrograma obtido com o “primer” AB1-18 e população V-02

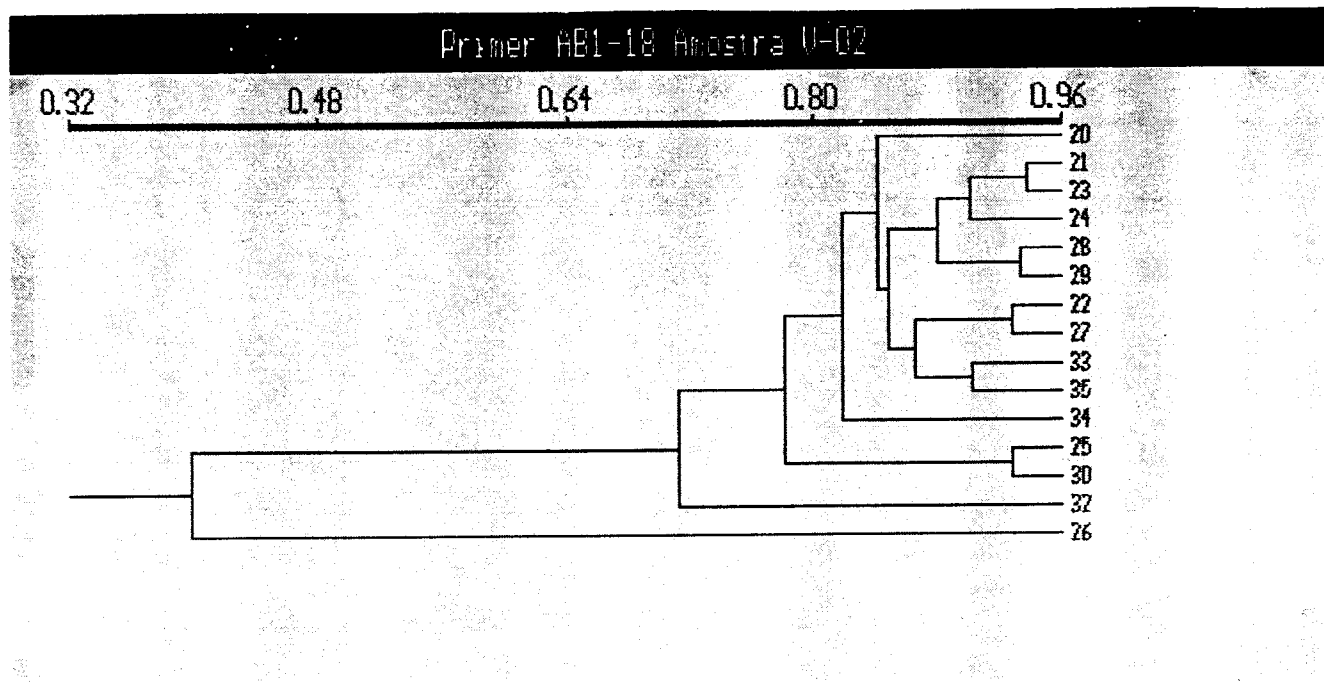


Fig.26- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-18 e população V-02. Testes de associação: matriz de correlação  $r=95,3\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Pela observação do dendrograma apresentado na figura anterior, pode verificar-se que:

- \* o “primer” testado (AB1-18) permitiu a diferenciação de todos os indivíduos desta população;
- \* o indivíduo 26 era muito diferente dos restantes, apresentando apenas um índice de similaridade de cerca de 41%.

A Figura 27 representa o dendrograma obtido com o “primer” AB1-18 e população VI-02

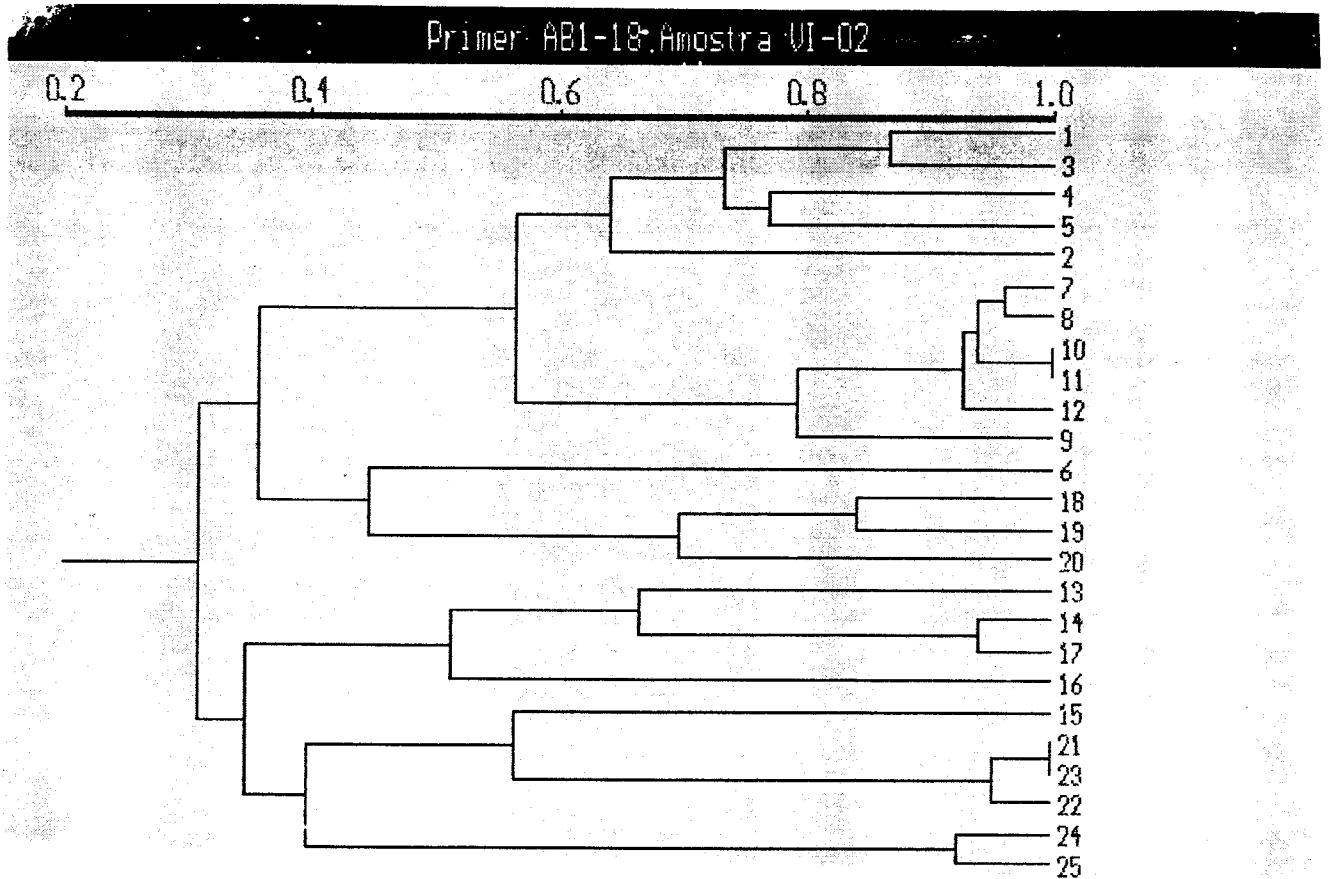


Fig.27- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-18 e população VI-02. Testes de associação: matriz de correlação  $r=89,0\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Como se pode observar no dendrograma da figura anterior, os indivíduos 10 e 11, 24 e 25 apresentam um índice de semelhanças de 100%. Deste modo, este “primer” não diferenciou todos os indivíduos desta população.

No entanto, os indivíduos 13, 14, 15, 16, 17, 21, 22, 23, 24 e 25 apenas apresentavam uma semelhança de 30% em relação ao total dos indivíduos desta população.

A Figura 28 representa o dendrograma obtido com a população VI-03 para o “primer” AB1-18.

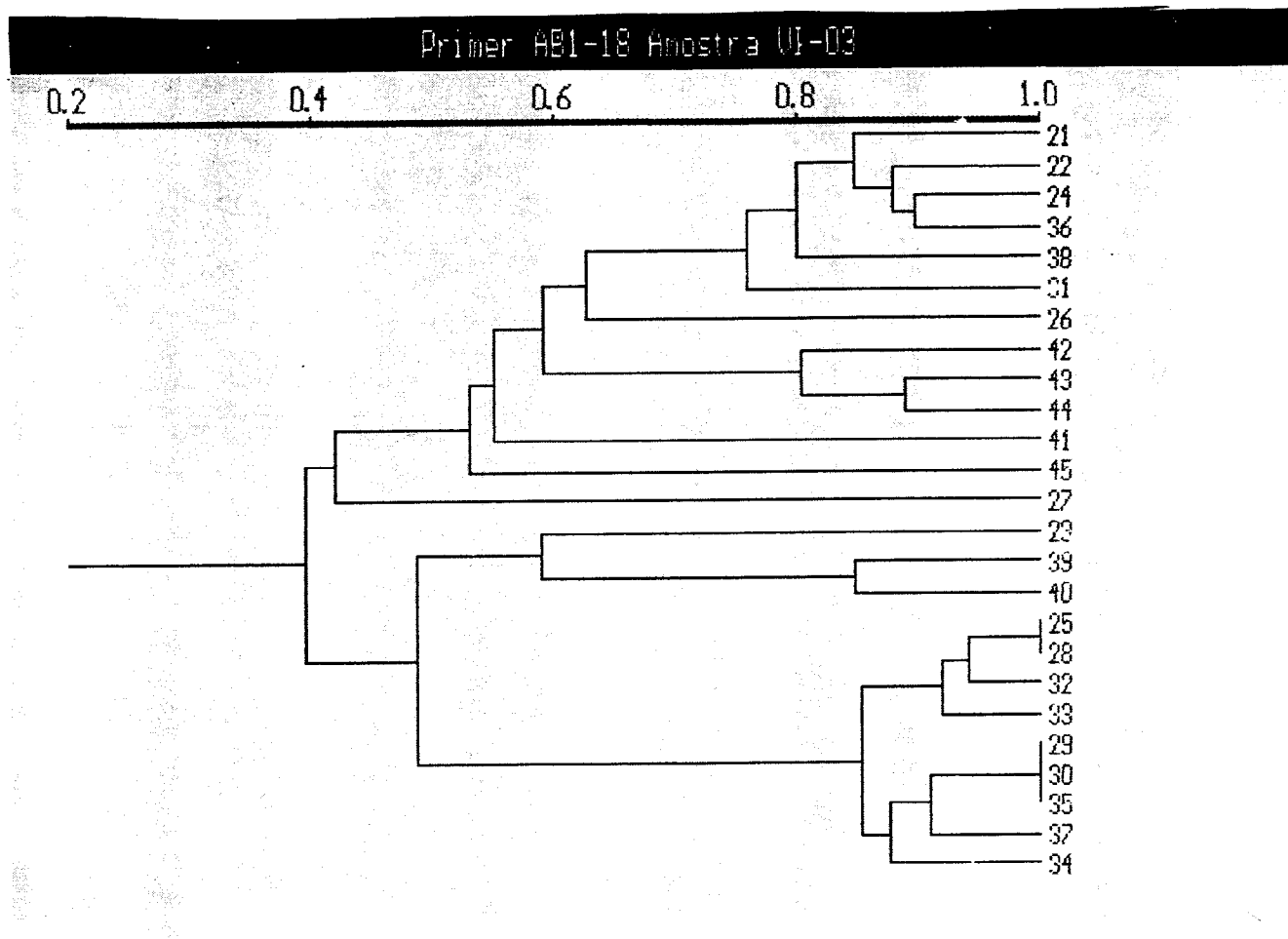


Fig.28- Dendrograma obtido com o “primer” AB1-18 e população VI-03. Testes de associação: matriz de correlação  $r=89,1\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Verificou-se que os indivíduos 25 e 28 apresentavam um índice de similaridade de 100%. Assim, este “primer” não permitiu a diferenciação de todos os indivíduos da população VI-03.

Verificou-se ainda que os indivíduos 21, 22, 24, 26, 27, 31, 36, 38, 41, 42, 43, 44 e 45 apenas apresentavam semelhanças da ordem dos 40% com o resto da população.

Os resultados obtidos indicaram que o “primer” AB1-18 só é adequado para a análise da variabilidade da população V-02.

Os coeficientes de correlação para este “primer” são representados na tabela 4.

Tabela 4- Coeficientes de correlação das diferentes populações para o “primer” AB1-18

<b>População:</b>	<b>Coeficiente de Correlação ( r )</b>
V-01	84,8%
V-02	95,3%
VI-02	89,0%
VI-03	89,1%

Verificou-se que o coeficiente de correlação variava entre 84,8% (população V-01) e 95,3% (população V-02).

A Tabela 5 indica a variação do grau de similaridade genética de acordo com a população e “primer” testado.

Tabela 5- Variação do grau de similaridade genética de acordo com a população e “primer” testado

<b>População</b>	<b>“Primer” utilizado</b>	<b>Variação do grau de similaridade genética</b>
V-01	AB1-05	10-100%
	AB1-10	40-100%
	AB1-18	30-100%
V-02	AB1-05	10-100%
	AB1-10	10-100%
	AB1-18	41-90%
VI-02	AB1-05	20-100%
	AB1-10	40-90%
	AB1-18	30-100%
VI-03	AB1-05	40-100%
	AB1-10	25-100%
	AB1-18	40-100%



O grau de similaridade genética é muito variável em todas as populações.

Nenhum dos “primers” utilizados conseguiu discriminar todos os indivíduos da população V-01 E VI-03. O “primer” AB1-10 diferenciou a população VI-02 na sua totalidade, enquanto o AB1-18 discriminou a população V-02.

## 2.4- Análise das Populações Individuais com o Conjunto dos “Primers”

Com base na análise/tratamento das imagens dos produtos de amplificação e com o método UPGMA do programa NTSYS, foram construídos:

- ◆ dendrogramas isolados para cada um dos três “primers “ e população utilizados. Estes permitem o estabelecimento de percentagens de semelhança genética entre as árvores de uma população e para cada “primer”;
- ◆ dendrogramas totais considerando as árvores de populações individuais em estudo e o conjunto dos “primers”.

A análise e interpretação de dendrogramas considerando os três “primers”, permite a realização de uma análise mais representativa do genoma e portanto a obtenção de informações adicionais ,em termos de diferenciação, uma vez que se consideram os valores de todos os fragmentos amplificados pelo conjunto dos iniciadores.

A Figura 29 representa o dendrograma obtido para a população V-01 com o conjunto dos “primers” testados.

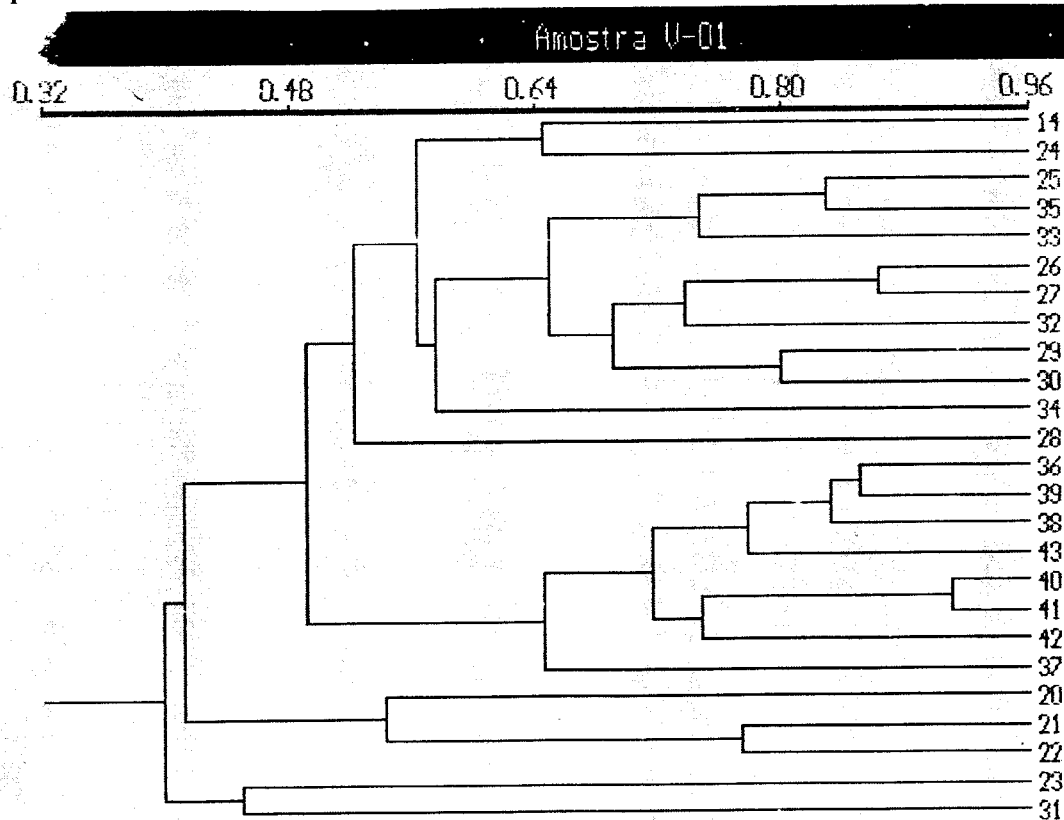


Fig.29- Dendrograma obtido com todos os “primers” e população V-01. Testes de associação: matriz de correlação  $r=81,3\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Como se pode observar na Figura 29, o conjunto dos “primers” permitiu a diferenciação de todos os indivíduos da população V-01.

Verificou-se que os indivíduos 23 e 31 apresentavam unicamente cerca de 38% de semelhanças com o resto da população.

A Figura 30 representa o dendrograma obtido para a população V-02 com o conjunto dos “primers” testados.

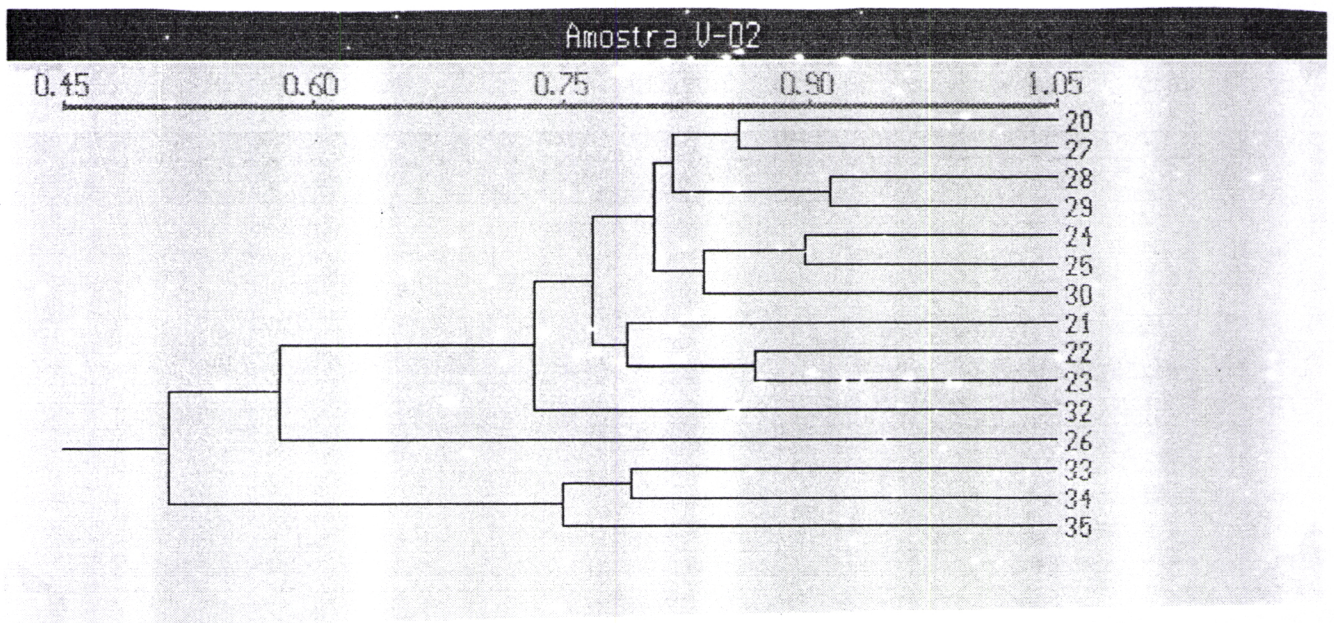


Fig.30- Dendrograma obtido com todos os “primers” e população V-02. Testes de associação: matriz de correlação  $r=92,0\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Analisando o dendrograma obtido com a população V-02 , verificou-se que:

- o conjunto dos “primers” permitiu a diferenciação de todos os indivíduos desta população;
- os indivíduos 33, 34 e 35 evidenciavam apenas semelhanças a um nível de 49%.

A Figura 31 representa o dendrograma obtido para a população VI-02 com o conjunto dos “primers” testados.

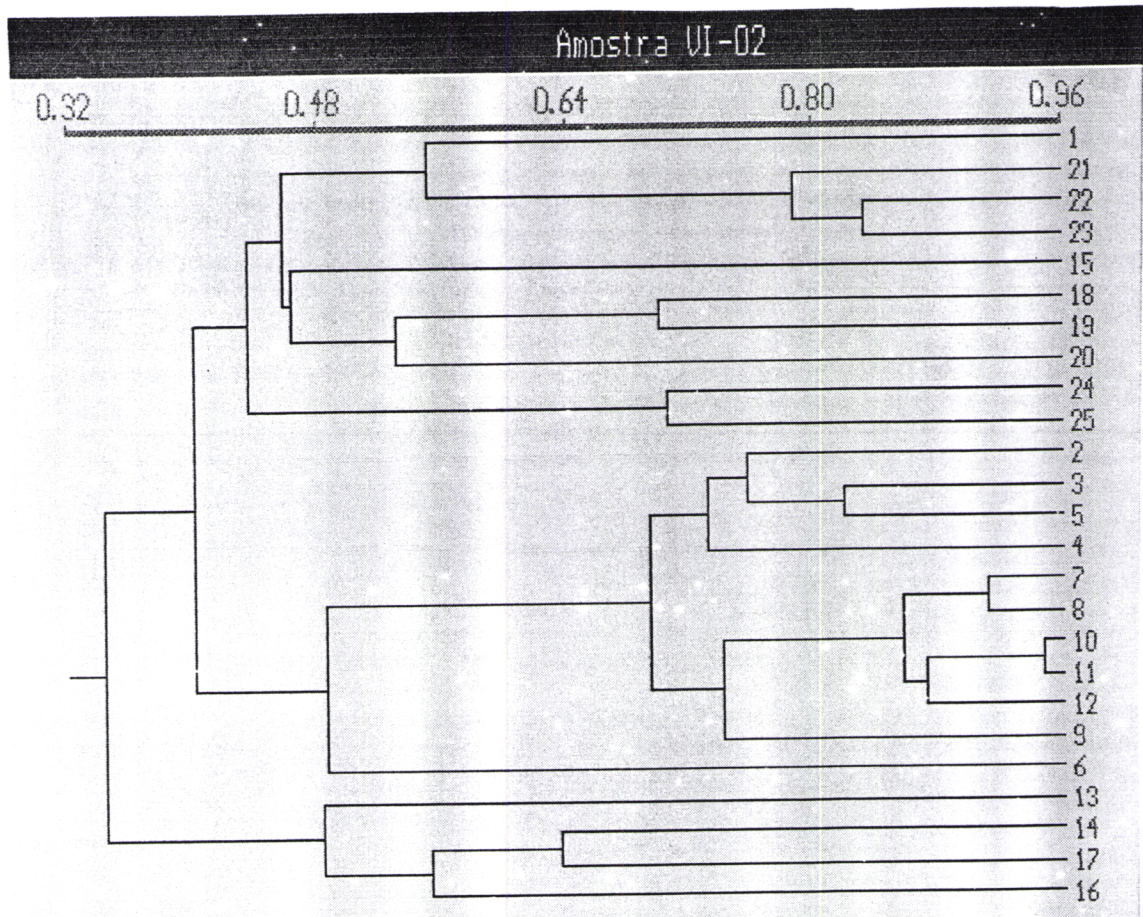


Fig.31- Dendrograma obtido com todos os “primers” e população VI-02. Testes de associação: matriz de correlação  $r=90,4\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Pela interpretação do dendrograma anterior, pode dizer-se que:

- ✧ a população VI-02 foi diferenciada na sua totalidade pelo conjunto dos “primers” testados. No entanto, os indivíduos 10 e 11 apresentavam cerca de 97% de semelhanças;
- ✧ Os indivíduos 6, 13, 14, 16 e 17 evidenciaram apenas cerca de 35% de semelhanças com o resto da população.

A Figura 32 representa o dendrograma obtido para a população VI-03 com o conjunto dos “primers” testados.

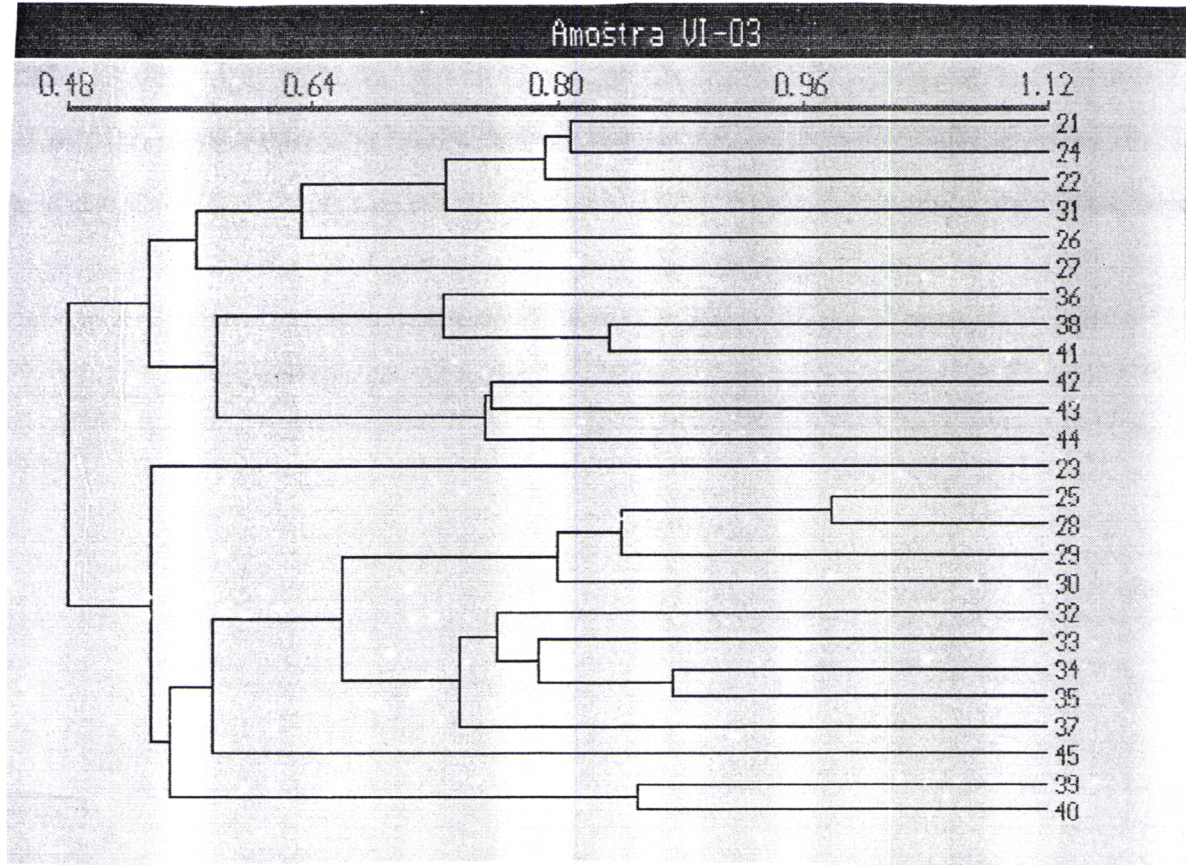


Fig.32- Dendrograma obtido com todos os “primers” e população VI-03. Testes de associação: matriz de correlação  $r=80,8\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Pela observação do dendrograma anterior, verificou-se que o conjunto dos “primers” não permitiu a diferenciação de todos os indivíduos desta população, pois os indivíduos 25 e 28 apresentavam semelhanças a 100%.

A utilização do conjunto dos “primers” diferenciou as populações V-01, V-02 E VI-02. A população VI-03 é dificilmente diferenciada, quer pelos “primers” individuais quer pelo seu conjunto.

### 3- Análise da Variabilidade Inter-Populacional

As diferentes populações quando comparadas entre si revelaram diferenças quanto ao número de fragmentos amplificados por reacção, número de bandas polimórficas e número de bandas do perfil.

A Tabela 6 representa o número de bandas do perfil, número total de bandas e número de bandas polimórficas nas diferentes populações para os três “primers” usados.

Tabela 6- Número de bandas do perfil, número total de bandas e número de bandas polimórficas nas diferentes populações para os três “primers” usados.

População	“Primer” AB1-05			“Primer” AB1-10			“Primer” AB1-18		
	Nº bandas do perfil	Nº bandas total	Nº bandas polimórficas	Nº bandas do perfil	Nº bandas total	Nº bandas polimórficas	Nº bandas do perfil	Nº bandas total	Nº bandas polimórficas
V-01	4-11	24	21	2-7	10	9	4-12	22	19
V-02	4-11	19	18	3-8	16	12	10-17	23	17
VI-02	3-12	24	22	3-10	18	13	4-15	31	30
VI-03	2-11	19	15	3-9	21	18	6-16	27	22

Dadas as características do programa NTSYS tornou-se difícil a análise da totalidade dos indivíduos (90) para “primers” individuais. Assim, foram construídas matrizes binárias utilizando um número de indivíduos representativo de cada uma das populações em análise e para cada “primer” individual.

Deste modo, para cada “primer”, foram seleccionados aleatoriamente 30 indivíduos, sendo nove da população V-01, cinco da população V-02, nove da população VI-02 e sete da VI-03 (ver tabela 7).

Tabela 7- Selecção aleatória de indivíduos para análise interpopulacional com os “primers” individuais AB1-05, AB1-10 e AB1-18

População	Indivíduos seleccionados
V-01	21, 22, 24, 29, 30, 34, 36, 40 e 41
V-02	21, 24, 30, 34 e 35
VI-02	4, 6, 9, 13, 16, 18, 19, 20 e 23
VI-03	24, 26, 31, 33, 36, 38 e 42

A Figura 33 representa o dendrograma obtido para uma amostra aleatória de trinta indivíduos das 4 populações com o “primer” ABI-05.

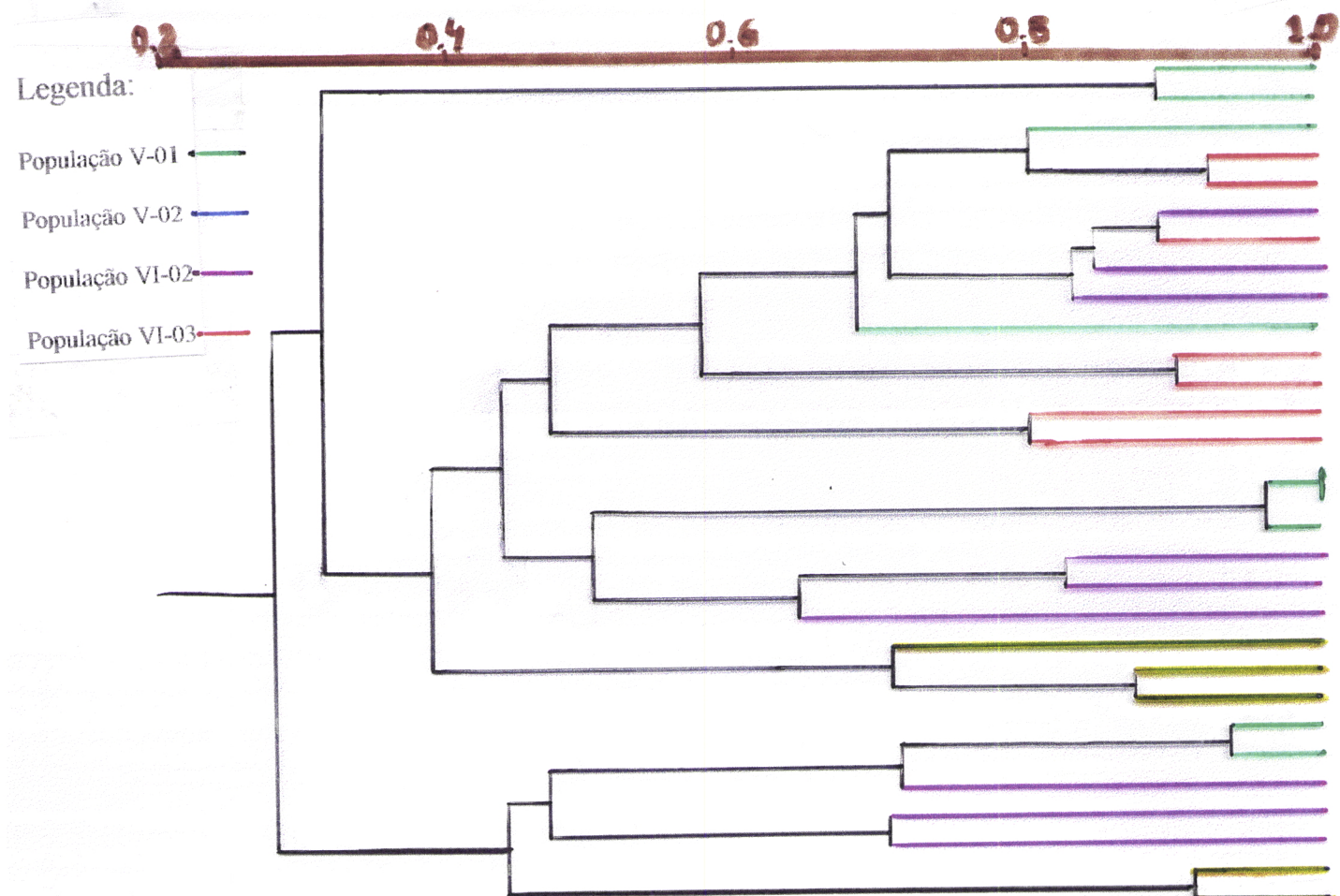


Fig.33- Dendrograma obtido para uma amostra aleatória de trinta indivíduos das 4 populações com o “primer” ABI-05. Testes de associação: matriz de correlação  $r=82,7\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

Este “primer” não permitiu a diferenciação de todas as amostras seleccionadas, pois os indivíduos 36 e 41 apresentavam 100% de semelhanças.

Não se observou a formação de agrupamentos, no entanto, a identidade absoluta só surgiu entre indivíduos da mesma população.

A Figura 34 representa o dendrograma obtido para uma amostra aleatória de trinta indivíduos das 4 populações com o “primer” AB1-10.

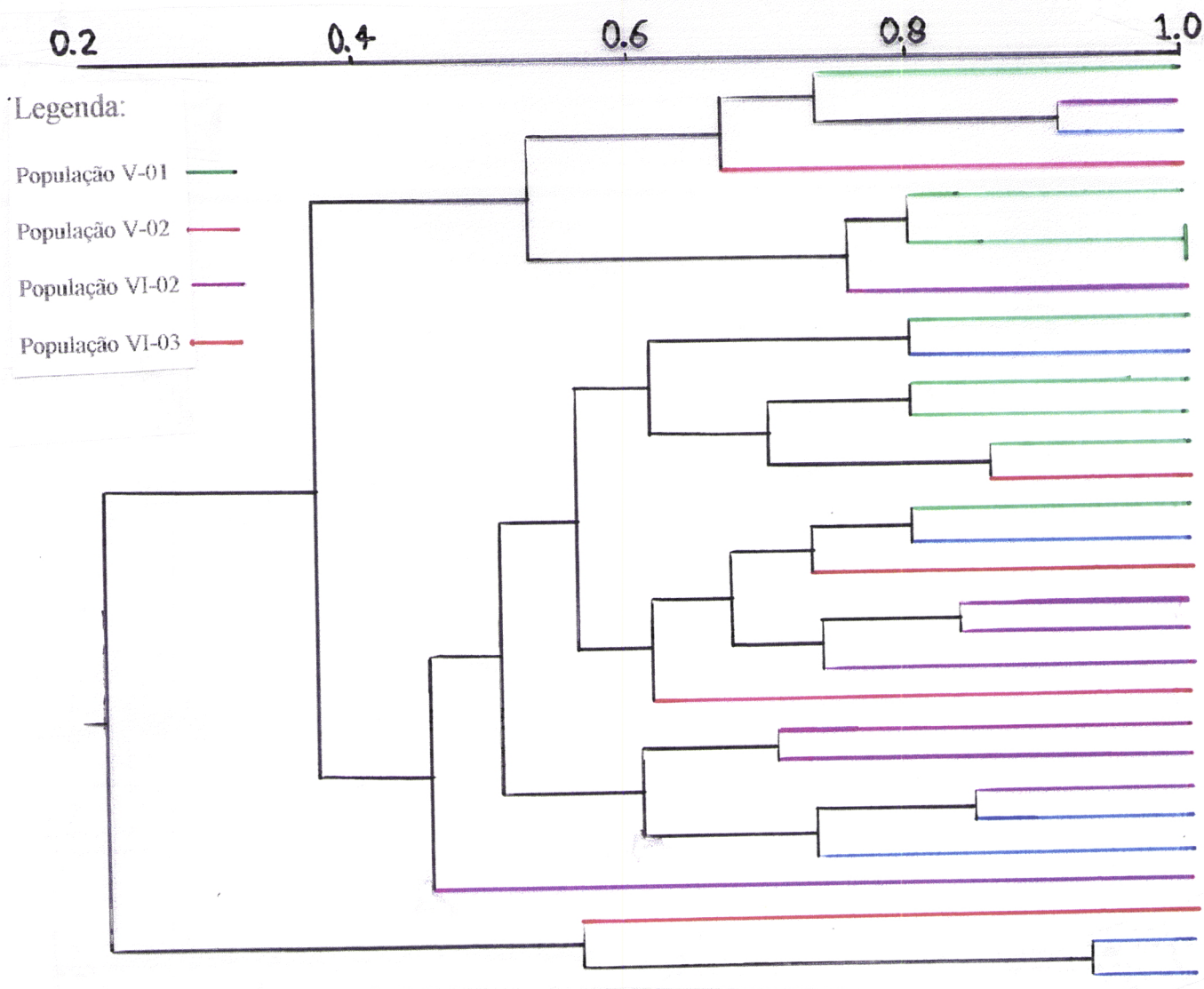


Fig.34- Dendrograma obtido para uma amostra aleatória de trinta indivíduos das 4 populações com o “primer” AB1-10. Testes de associação: matriz de correlação  $r=73,5\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

O “primer” AB1-10 não diferenciou todos os indivíduos seleccionados, uma vez que as amostras 40 e 41 apresentavam 100% de semelhança. Mais uma vez, se verificou que não há



tendência para a formação de “clusters”, mas identidade absoluta só entre indivíduos da mesma população.

A Figura 35 representa o dendrograma obtido para uma amostra aleatória de trinta indivíduos das 4 populações com o “primer” AB1-18.

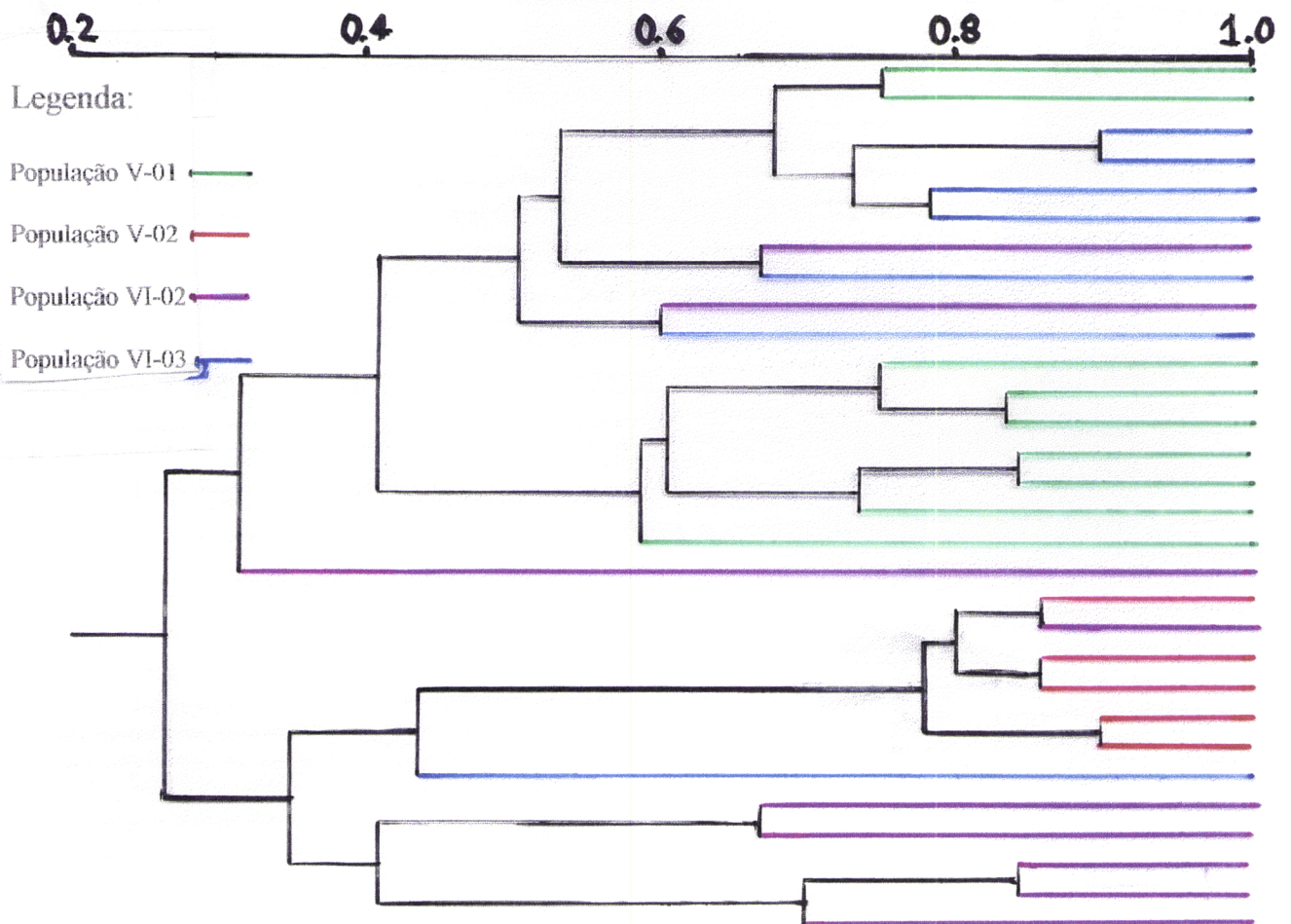


Fig.35- Dendrograma obtido para uma amostra aleatória de trinta indivíduos das 4 populações com o “primer” AB1-18. Testes de associação: matriz de correlação  $r=85,3\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

O “primer” AB1-18 foi o único dos testados que permitiu a diferenciação de todos os indivíduos seleccionados.

Verificou-se que os indivíduos 13 da população VI-02 e 25 da população VI-03 apresentavam cerca de 68% de semelhanças. Por outro lado, o indivíduo 23 da população VI-02 evidenciava cerca de 60% de semelhanças com o indivíduo 35 da VI-03.

Os indivíduos 21 da população V-02 e 4 da população VI-02, bem como, o 34 e 35 da V-02, apresentavam cerca de 85% de semelhanças entre si.

O grau de similaridade genética entre as 30 amostras aleatórias variou de acordo com o “primer” utilizado. A Tabela 6 representa a variação do grau de similaridade genética de 30 amostras aleatórias, para os “primers” utilizados.

<b>“Primer”</b>	<b>Variação do grau de similaridade genética</b>
AB1-05	28% - 100%
AB1-10	20% - 100%
AB1-18	25% - 100%

É importante salientar a elevada variabilidade existente entre os indivíduos, independentemente da região a que pertencem. De facto, indivíduos de duas regiões diferentes podem ser próximos (é o que acontece para o “primer” AB1-05 com as amostras 18 da população VI-02 e 22 da população VI-03 que apresentam um índice de similaridade de cerca de 90%) e indivíduos da mesma região podem ser distantes (as amostras 21 e 22 da população V-01 apresentaram apenas cerca de 30% de semelhanças com o indivíduo 24 da mesma população).

O mesmo acontece com o “primer” AB1-10. Assim, os indivíduos 29 da população V-01 e 24 da população V-02 evidenciam semelhanças superiores a 80%. Por outro lado, os indivíduos 34 e 35 da população V-02 apresentam apenas um índice de similaridade de cerca de 20%.

É de salientar que as bandas amostradas foram obtidas através da análise de geis diferentes.

Para além, da construção de matrizes com trinta indivíduos aleatórios, foi construída com os noventa indivíduos uma matriz binária com a totalidade das bandas escolhidas e correspondentes a todos os “primers” com o objectivo de uma análise global.

Observando o dendrograma da Figura 36, correspondente à totalidade das bandas escolhidas e correspondentes a todos os “primers”, verificou-se que não existe uma formação definida de agrupamentos (“clusters”). No entanto, pela análise efectuada, parece que a identidade absoluta só surge geralmente entre indivíduos da mesma população, como é o caso dos indivíduos 7 e 9 da população VI-02 e 25 e 26 da V-02.

O grau de similaridade das 90 amostras de *Q. suber* L. variou entre 6% e 100%, o que mostra a existência de variabilidade.

Legenda:  
População V-01 ———  
População V-02 ———  
População VI-02 ———  
População VI-03 ———

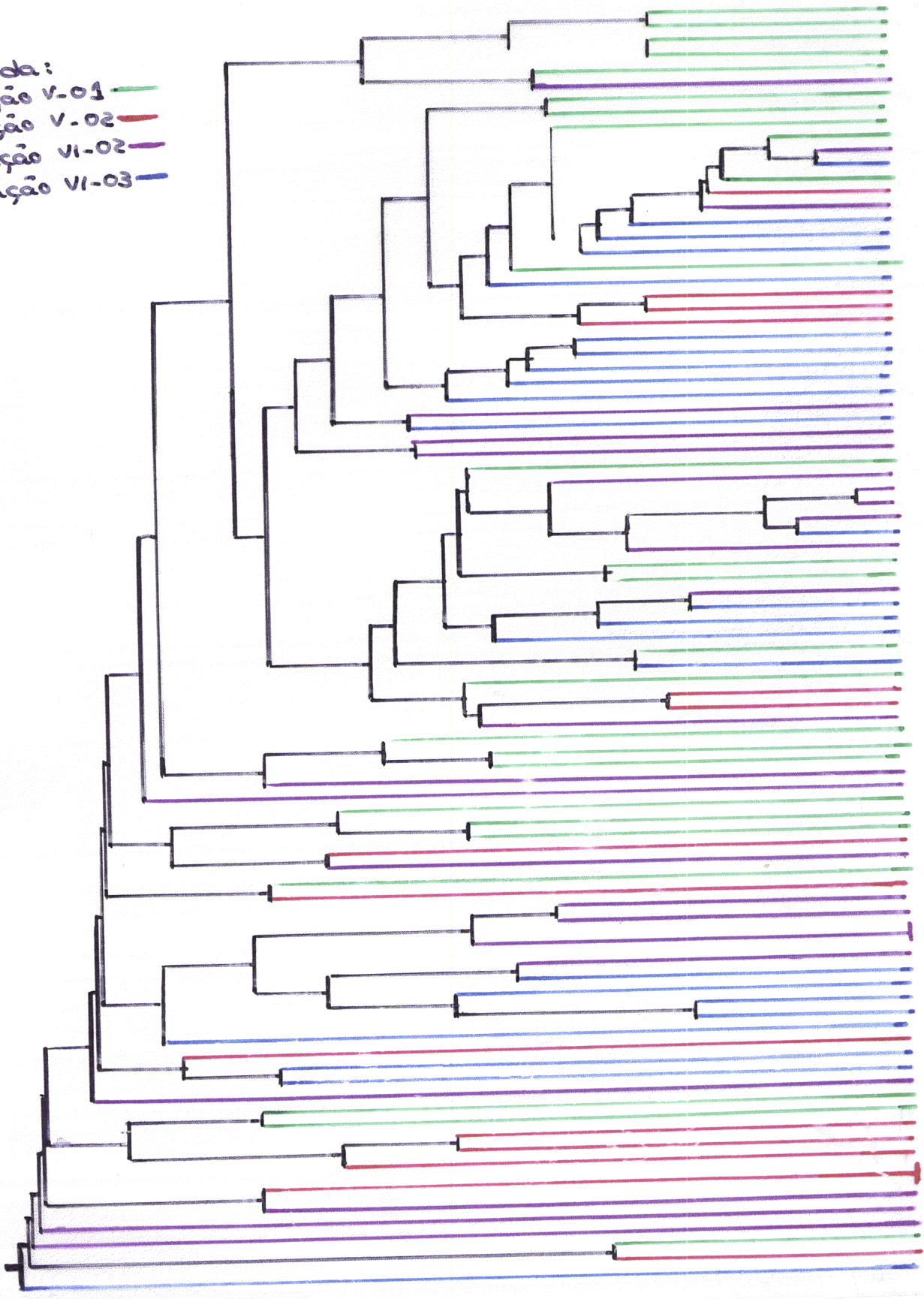


Fig. 36- Dendrograma correspondente à totalidade das bandas escolhidas e a todos os "primers". Testes de associação: matriz de correlação  $r=81,0\%$  (= estatística Mantel normalizada Z).

## IV- Discussão e Conclusões

O objectivo deste estudo era a análise da variabilidade intra e interpopulacional de sobreiro (*Q. suber* L.) tomando por base o polimorfismo dos marcadores RAPD.

A técnica de RAPD é rápida, fácil de executar, sensível e utiliza pequenos “primers” o que origina ligações não muito específicas.

Para o isolamento do DNA foram utilizadas folhas, em virtude da sua maleabilidade, menor rigidez o que facilita a extracção do DNA e facilidade de obtenção.

No processo de extracção deveriam ter sido utilizadas preferencialmente folhas jovens (2-8 semanas). No entanto, as folhas utilizadas eram adultas, o que teve como consequência que os métodos usados não foram tão eficientes como são para outras plantas. Como foi referido, o trabalho insere-se num projecto a nível nacional que envolve várias instituições, e por razões de trabalho só nessa altura foi possível a colheita das folhas. No entanto, o DNA extraído a partir de 1g de folhas revelou ter sido adequado para análise, tanto em termo de qualidade como de grau de pureza.

A extracção do DNA total de *Q. suber* L. foi efectuada, pela utilização de dois métodos descritos em II-1.4.1.

A não utilização das esferas de moagem integradas no “Plant DNA Isolation Kit” deveu-se ao facto da maceração não ser total, não havendo portanto a destruição de todas as paredes celulares.

Com base nos resultados obtidos e apresentados em III-1, concluiu-se que o método mais eficaz para a extracção de folhas de sobreiro foi o que utilizava o “DNeasy Plant Mini Kit”, o qual apresentou maior rendimento, menor grau de degradação e ausência de RNA contaminante.

Após a extracção do DNA procedeu-se à determinação da sua concentração por espectrofotometria a 260 nm e do seu grau de pureza.

A quantificação do DNA por espectrofotometria a 260nm é um método impreciso dado que o RNA absorve também neste comprimento de onda. A razão absorvância a

260nm/absorvância a 280nm fornece uma indicação acerca do grau de pureza do DNA. No entanto, este método fornece por vezes resultados imprecisos.

Por esse motivo, foi conveniente a utilização da electroforese em gel de agarose para uma análise complementar da quantificação do DNA. Deste modo, os dois métodos complementam-se, sendo suficientes para determinar o grau de pureza do DNA, uma vez que a reacção de PCR não exige DNA com elevado grau de pureza.

Quando se utilizou o “Plant DNA Isolation Kit” para a extracção de DNA, verificou-se que o rendimento era baixo. Quando se analisou este DNA em electroforese em gel de agarose, não se observou a existência de qualquer banda no gel, enquanto o DNA extraído com o “DNeasy Plant Mini Kit”, se revelou geralmente íntegro.

As amostras de DNA foram submetidas a reacções de PCR de acordo com as condições descritas em II-1.4.3. Quando se efectuaram reacções de PCR com o DNA extraído com o “Plant DNA Isolation Kit”, não se verificou a existência de fragmentos de amplificação, provavelmente porque o DNA não tinha o grau de pureza suficiente para estas reacções. Este facto, é provavelmente devido à existência de fenóis ou outras substâncias inibidores da enzima *Taq* DNA polimerase.

A técnica RAPD apresenta variações de acordo com as condições da reacção de PCR e falta de reprodutibilidade. Para garantir a reprodutibilidade, utilizou-se sempre a mesma enzima, a mesma quantidade de DNA e do mesmo lote, bem como o mesmo termociclador.

Os produtos de amplificação foram directamente analisados por electroforese em gel de agarose (II-1.4.3). As condições de PCR parecem ser adequadas à amplificação de DNA de sobreiro, pois as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados apresentavam-se mais ou menos nítidas nos diferentes géis elaborados e o “background” foi reduzido.

De acordo com Griffiths *et al* (1996), a coexistência na população de dois ou mais fenótipos alternativos, geralmente atribuídos aos alelos de um gene, é chamada polimorfismo (do grego “presença de muitas formas”). O mesmo termo tem sido utilizado para classificar fragmentos variáveis que podem não ser necessariamente genes ou sendo genes não tenham expressão fenotípica.

Consideram-se polimórficos os fragmentos que surgem em algumas amostras e não noutras. A análise comparativa dos perfis de amplificação polimórficos foi realizada visualmente ou utilizando o software BioProfil. Verificou-se que o software BioProfil não é útil neste tipo de análises, pois considera, por exemplo uma banda mais intensa como duas ou mais. Por outro lado, em virtude da sua sensibilidade, fornece valores muito diferentes para a mesma banda. Por esse motivo, optou-se pela análise visual dos perfis de amplificação.

A subjectividade inerente à detecção do polimorfismo RAPD foi uma dificuldade difícil de ultrapassar e se não existir uma uniformização dos critérios de detecção para a pesquisa destes marcadores, a mesma amostra poderá ser descrita de modo diferente, em função do observador. Algumas das bandas eram fácil e claramente interpretadas, enquanto outras eram ambíguas. Esta ambiguidade pode resultar:

- do baixo poder de um “primer” específico em discriminar locais de amplificação distintos;
- da competição entre diferentes locais de amplificação pelo substrato e enzima, de modo que a presença de certos segmentos pode interferir com a amplificação de outros, num processo equivalente a uma interacção “epistática” entre marcadores, o que influencia o fenótipo final de bandas;
- de problemas relacionados com a padronização de condições de amplificação (Grattapaglia, 1994).

O facto do polimorfismo RAPD ter natureza binária (presença ou ausência do fragmento de amplificação), se por um lado não permite a distinção de heterozigóticos, é uma característica mais adequada à automatização do processo de aquisição de dados dentro da sistemática binária de ambientes computacionais. Deste modo, foi utilizado o programa NTSYS (UPGMA) para a análise multivariada. Pode verificar-se que este programa é muito útil e apropriado para este tipo de análises.

Pela interpretação dos dendrogramas relativos à população V-01, podemos afirmar que:

- \* nenhum dos “primers” testados permitiu a diferenciação de todas as amostras desta população. No entanto, o “primer” AB1-18, permitiu a diferenciação da maior parte dos indivíduos, dado que apenas quatro (25, 26, 29 e 35) apresentam uma semelhança



de 100%. Quando muito, é útil para distinguir grupos ou classes dentro de uma população;

\* o conjunto dos três “primers” permitiu a separação de todos os indivíduos, o que demonstra um grau de variabilidade bastante elevado;

\* as amostras 40 e 41 são as mais semelhantes com um índice de similaridade de cerca de 90%.

Em relação à população V-02, verificou-se que dos três “primers” utilizados, o AB1-18 é o mais adequado porque apresenta um maior número de bandas, diferenciando todos os indivíduos. Por outro lado, observou-se que os indivíduos 21 e 23, 28 e 29, 22 e 27, bem como o 25 e 30 são os mais semelhantes, com cerca de 95% de semelhanças

O dendrograma obtido com o conjunto dos “primers” confirma a diferenciação de todos os indivíduos, embora os índices de similaridade sejam menores. Por outro lado, é natural a existência de diferentes agrupamentos com “primers” diferentes porque se estão a analisar sequências diferentes.

O “primer” AB1-18 mostrou ser o mais adequado para a discriminação da população VI-02, não diferenciando, no entanto, os indivíduos 10 e 11 que possuem um índice de similaridade de 100%. O dendrograma total considerando os três “primers” confirma a diferenciação da totalidade da população.

A utilização do conjunto dos “primers” permitiu a diferenciação dos indivíduos das populações V-01, V-02 e VI-02. A população VI-03 não foi diferenciada nem pelos “primers” individuais nem pelo seu conjunto. Deste modo, nenhum dos “primers” testados é apropriado para a análise de variabilidade desta população.

No entanto, o “primer” AB1-18 mostrou ser o mais adequado para a diferenciação das amostras das diferentes populações

Analisando o coeficiente de correlação cofenético ( $r$ ) de cada um dos dendrogramas apresentados, podemos verificar que variam entre 77,4% para a população VI-02 com o “primer” AB1-10 e 98,9% para a população V-02 com o “primer” AB1-05, pelo que podemos considerar que os resultados são fiáveis, na medida em se considera que a partir de 70% as relações entre a matriz binária e os dendrogramas são de confiança.



As variações existentes no grau de similaridade genética, apresentadas em III-2.3, permitem-nos concluir que existe de facto uma elevada variabilidade genética intrapopulacional.

Com o objectivo de analisar a variabilidade inter-populacional, e em virtude do programa NTSYS não permitir a análise simultânea de todos os indivíduos em estudo (90) considerou-se uma amostra aleatória de 30 indivíduos das diferentes populações. Os dendrogramas obtidos mostram que existe de facto uma separação entre as referidas populações.

Observando o dendrograma obtido com a amostra aleatória e com o “primer” AB1-05 verifica-se que há um conjunto de indivíduos da população VI-02 diferentes dos restantes. A população V-01 também apresenta valores de similaridade mais próximos entre si do que em relação às restantes amostras.

O grau de similaridade genética das amostras aleatórias variou de acordo com o “primer” utilizado. Este facto é perfeitamente lógico porque se estão a analisar sequências diferentes.

As variações encontradas no grau de similaridade genética entre as 30 amostras seleccionadas aleatoriamente, apresentadas em III-3, permitiram concluir que existe uma elevada variabilidade interpopulacional. Este facto é lógico, pois as árvores em estudo apresentam diferentes características fenóticas (características da folha, longevidade, resistência a doenças, qualidade da cortiça e vigor) e não seria natural que diferenças tão profundas fossem devidas, por exemplo, a microclimas. No entanto, não se esperavam diferenças tão profundas e extensas como as observadas.

Verificou-se que, qualquer que seja o marcador utilizado, a variação é muito elevada independentemente da região a que pertencem. De facto, há indivíduos de regiões diferentes que apresentam índices de similaridade elevados e indivíduos da mesma região que são muito diferentes. Deste modo, não se encontraram correlações com a localização geográfica entre as amostras das diferentes regiões, embora a identidade exacta só ocorra entre indivíduos da mesma população

Pode-se concluir que a técnica RAPD é apropriada para a análise de polimorfismo intra e interpopulacional de sobreiro, ao contrário do que acontece com outros materiais.

## V- Anexo 1 - Composição das soluções e tampões

### ☛ Solução Stock dNTPs 2mM:

Solução inicial de 100mM dNTPs:

5µl de dATP

5µl de dCTP

5µl de dGTP

5µl de dTTP

980 µl de água

### ☛ Gel de Agarose

2g Agarose NA

200ml tampão TBE (1X)

### ☛ Tampão TBE (5X)

60,55g Tris Base

25,65g Ácido Bórico

1,86g de EDTA (pH 8) 0,5M

Prefazer o volume com água a 1000ml

### ☛ Tampão de Aplicação - Blue Juice

10ml de Formamida

10mg de Xileno cianol FF

10mg de Azul de bromofenol

200ml de EDTA (pH 8) 0,5M

Este tampão foi guardado a 4°C

➤ **EDTA**

18,61g de EDTA

80ml de água

Prefazer o volume a 100ml

➤ **Brometo de Etídio**

Stock: 10mg/ml

1g de Brometo de etídio

100ml de água

Misturar bem durante várias horas. Deve guardar-se num frasco escuro à temperatura ambiente

## VI- Anexo 2: Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação *in vitro* de sequências específicas de DNA utilizando oligonucleótidos de sequências complementares à das extremidades das sequências da cadeia de DNA a amplificar denominados iniciadores ou “primers”.

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) foi imaginada por Kary Mullis (Mullis, 1990; Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986; Mullis & Faloona, 1987 cit. Innis & Gelfand, 1990) numa sexta-feira à noite, em Abril de 1983 (Mullis, 1990). Introduzida em 1985, alterou o modo de condução dos estudos moleculares e as questões que podem ser postas (Erlich *et al.*, 1991), contribuindo dum forma totalmente nova para o estudo e análise genética (Watson *et al.*, 1994).

O maior problema na análise de genes é que eles são alvos raros num genoma complexo. Deste modo, muitas das técnicas de genética molecular estão preocupadas em ultrapassar este problema. No entanto, essas técnicas são demoradas e envolvem clonagem e métodos de detecção de sequências específicas de DNA. A reacção em cadeia da polimerase alterou esta situação, ao permitir a produção de muitas cópias de uma sequência de DNA específica sem recorrer à clonagem (Watson *et al.*, 1994).

Inicialmente nas reacções de PCR, era utilizada a enzima DNA polimerase de *E. Coli*. Mas, esta enzima é sensível ao calor e é destruída às temperaturas necessárias para separar as cadeias duplas de DNA (Watson *et al.*, 1994; Erlich *et al.*, 1991). Este problema foi eliminado, ao introduzir a enzima *Taq* DNA polimerase, isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* (Watson *et al.*, 1994; Erlich *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1996; Gelfand & White, 1990), que vive em águas com temperaturas de 75°C.

A enzima *Taq* DNA polimerase tem a sua temperatura óptima a 72°C e é razoavelmente estável mesmo a 94°C (Watson *et al.*, 1994). A sua actividade não é destruída pelas elevadas temperaturas necessárias para a desnaturação do DNA molde (Fenoll *et al.*, 1993). Deste modo, é a enzima mais usada nas reacções de PCR.

A incorporação da *Taq* DNA polimerase na reacção de PCR permite a reassociação e a extensão dos iniciadores a temperaturas mais altas do que as que eram possíveis com a DNA polimerase de *E. Coli*, eliminando muita da amplificação não específica (Erlich et al, 1991). A *Taq* DNA polimerase não tem actividade de exonuclease na direcção 3' - 5' (Erlich et al, 1991; Gelfand & White, 1990), mas tem actividade de exonuclease 5' - 3' durante a polimerização (Erlich et al, 1991);

O sucesso da amplificação via PCR é ditado pela escolha correcta dos “primers” e o primeiro passo na obtenção de um “primer” é assegurar a sua especificidade (Sharrocks, 1994).

Desenhando adequadamente os iniciadores e as condições da reacção, pode-se amplificar praticamente qualquer sequência (Fenoll et al, 1993).

A tabela 7 fornece-nos algumas regras para o desenho das sequências dos iniciadores.

Tabela 7- Regras gerais para o desenho de “primers” para PCR

Parâmetros	Valores Óptimos
1- Sequência única de oligonucleótidos	
2- Existência de ilhas GC na extremidade 3'	1-2 nucleótidos GC
3- Não existência de homologias próprias	Três ou menos bases contíguas
4- Não complementaridade na cópia anti-sense	Três ou menos bases contíguas
5- Comprimento dos “primers”	18 - 25 bases
6- Distância e composição das sequências entre iniciadores	100 - 600 bases separadas

Fonte: Sharrocks, 1994

Na reacção de PCR utiliza-se, geralmente, DNA genómico total extraído de células. Contudo, o PCR não requer DNA altamente purificado (Watson et al, 1994).

O DNA a utilizar deve estar intacto na região a analisar. Também não devem existir inibidores da reacção (detergentes, EDTA, fenol).

A reacção de PCR decorre em ciclos sucessivos (Fenoll et al, 1993; Alberts et al, 1989; Erlich et al, 1991; Watson et al, 1994, Saiki, 1990), oscilando em poucos minutos entre a

temperatura de desnaturação das novas moléculas de DNA (90-95°C), a da reassociação dos “primers” (37-60°C) e a da extensão da cadeia pela polimerase (72°C) (Fenoll *et al.*, 1993).

O ciclo de PCR envolve:

➤ numa primeira fase, a desnaturação da amostra de DNA de cadeia dupla a temperaturas da ordem dos 94°C (Watson *et al.*, 1994).

O DNA de cada espécie possui uma temperatura de desnaturação específica, directamente relacionada com o seu conteúdo em pares de bases guanina-citosina (Lehninger *et al.*, 1993). Quanto mais elevado for este valor, mais elevada será a temperatura necessária para a desnaturação do DNA. As ligações entre a guanina e a citosina envolvem três pontes de hidrogénio, sendo por isso mais estáveis e requerendo mais energia para se dissociarem do que as ligações adenina-timina, em que apenas se estabelecem duas pontes de hidrogénio. Deste modo, a temperatura e a duração da fase de desnaturação numa reacção de PCR dependem directamente das características da amostra de DNA a amplificar;

➤ numa segunda fase, a reassociação dos “primers” com as sequências de DNA complementares, de acordo com os critérios de emparelhamento de nucleótidos postulados por Watson & Crick.

A quantidade de reassociação é uma variável na determinação da especificidade do PCR. Deste modo, a temperatura e os tempos usados variam consoante as sequências a serem amplificadas;

➤ na 3ª e última fase, processa-se a amplificação propriamente dita, em que, pela acção da DNA polimerase, ocorre o alongamento das cadeias dos nucleótidos. De acordo com Saiki (1990), este passo pode ser completamente eliminado se as sequências alvo tiverem aproximadamente 150 bases ou menos.

O número de cópias da sequência alvo cresce exponencialmente. Na prática dobra em cada ciclo (Lewin, 1995; Alberts *et al.*, 1989; Erlich *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1994, Saiki, 1990) até atingir um determinado nível em que o aumento do DNA alvo se torna linear (Lewin, 1995).

A Figura 37 pretende mostrar o princípio da reacção em cadeia da polimerase (PCR).

Amplificação da sequência de DNA molde

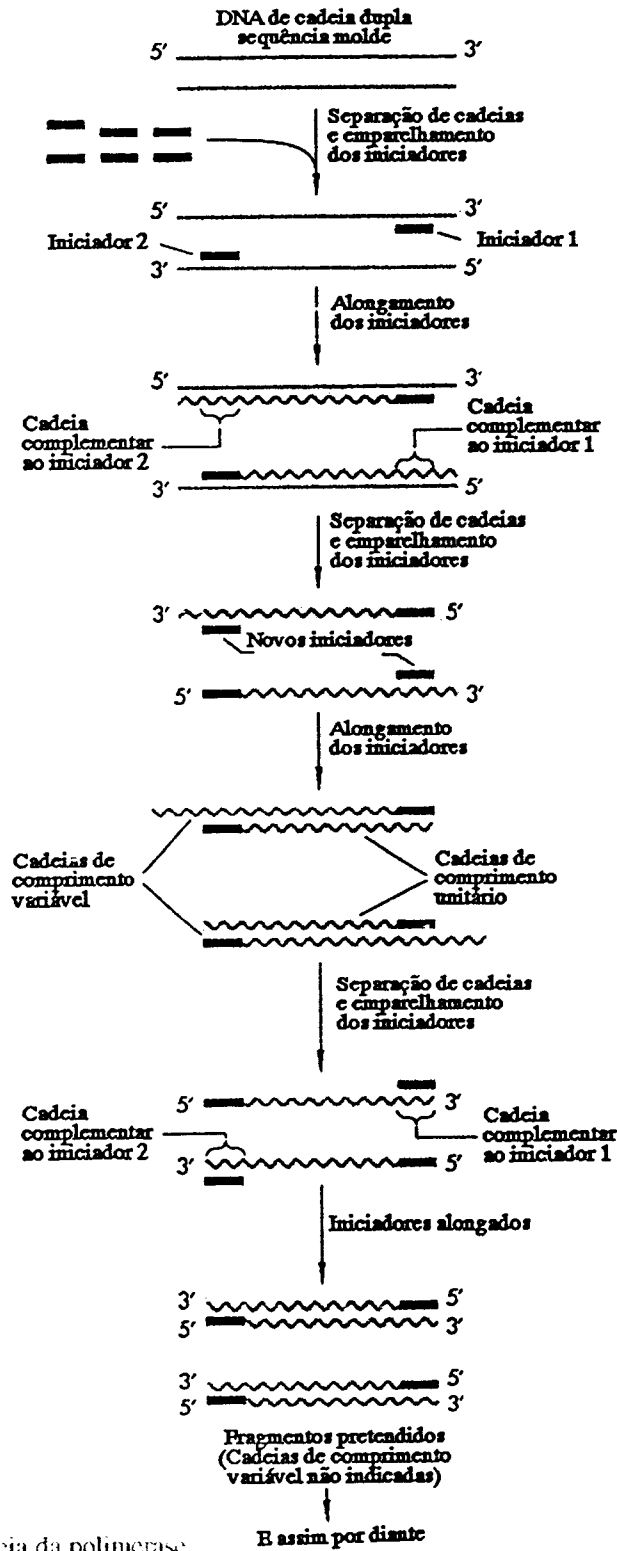


Fig.37 - A reacção em cadeia da polimerase

Fonte: Griffiths et al. 1996

Para uma amplificação efectiva do DNA são necessários vinte a trinta ciclos. Um único ciclo requer cerca de cinco minutos pelo que um procedimento automático permite obter DNA amplificado em poucas horas (Alberts et al, 1989).

A grande vantagem da reacção em cadeia da polimerase é que pode amplificar, por  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes, um gene específico ou uma região de DNA a partir de DNA genómico (Schneider-Stock & Roessner, 1997).

Cada nova reacção de PCR necessita de ser optimizada para evitar o aparecimento de determinados problemas, como sejam:

- ➔ a não detecção de produto ou uma baixa produção do produto desejado;
- ➔ a presença de bandas largas não específicas;
- ➔ a presença de iniciadores dimerizados que competem na amplificação com o produto desejado;
- ➔ mutações (Innis & Gelfand, 1990).

O maior problema inerente à reacção em cadeia da polimerase é a contaminação de reagentes com material previamente amplificado (Kwoch, 1989; Gibbs & Chamberlain, 1989 cit. Sarkar & Sommer, 1990). Assim, são necessários determinados cuidados na sua rotina de execução.

A reacção em cadeia da polimerase é tão sensível que contaminações da amostra de DNA podem ser detectadas como marcadores polimórficos. Contudo, limpeza da amostra e o uso de “primers” aleatórios reduzem a probabilidade de amplificação de DNA epifítico (Ho et al, 1995).

A PCR é caracterizada pela sua elevada selectividade, sensibilidade e rapidez. As principais vantagens decorrentes da sua utilização em estudos genómicos são:

- ▲ necessidade de reduzidas quantidades de DNA molde, pois a elevada eficácia da amplificação leva à sua acumulação de forma exponencial;
- ▲ obtenção de amostras de DNA a partir de uma variada gama de fontes, incluindo vários órgãos de plantas, fósseis de plantas de Magnolia do Período Miocénico (Watson et al, 1994), sangue, etc;



- ▲ possibilidade de utilização de “primers” marcados não radioativamente, o que elimina os riscos inerentes ao manuseamento de material radioactivo;
- ▲ análise directa dos produtos amplificados utilizando diversas técnicas;
- ▲ automatização do processo, o que permite a amplificação de grandes quantidades de DNA num curto espaço de tempo;
- ▲ redução do número de passos de uma análise e portanto do número de produtos e enzimas necessários, sendo por isso económica (Charlieu, 1994).

## VII- Referências Bibliográficas

- 1) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raft, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1989) - "*Molecular Biology of the cell*" (2ª Edição). Garland Publishing Inc., New York & London.
- 2) Alves, M. A. A. (1982) - "*Técnicas de Produção Florestal*". Edited by Instituto Nacional de Investigação Científica, Lisboa.
- 3) Anastassopoulos, E., Keil, M. (1996) - "*Assessment of Natural and Induced Genetic Variation in *Alstroemeria* Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers*". *Euphytica*, Vol. 90, Nº 2, pp. 235-244.
- 4) Ashby, M. F. (1989) - "*Concise Encyclopedia of Wood & Wood - Based Materials*". Edited by Arno P. Schniewind - Pergamon Press, pp 67-69.
- 5) Bai, D. P., Brandle, J., Reeleder, R. (1997) - "*Genetic Diversity in North American Ginseng (*Panax quinquefolius L.*) Grown in Ontario Detected by Rapd Analysis*". *Genome*, Vol. 40, Nº 1, pp. 111-115.
- 6) Bao, P. H., Granata, S., Castiglione, S., Wang, G. J., Giordani, C., Cuzzoni, E., Damiani, G., Bandi, C., Datta, S. K., Datta, K., Potrykus, I., Callegarin, A., Sala, F. (1996) - "*Evidence for Genomic Changes in Transgenic Rice (*Oryza sativa L.*) Recovered from Protoplasts*". *Transgenic Research*, Vol. 5, Nº 2, pp. 97- 103.
- 7) Benner, M. S., Braunstein, M. D., Weisberg, M. U. (1995) - "*Detection of DNA Polymorphisms Within the Genus *Cattleya* (Orchidaceae)*". *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 13, Nº 2, pp. 147-155.
- 8) Breyne, P., Boerjan, W., Gerats, T., VanMontagu, M., VanGysel, A. (1997) - "*Applications of AFLP (TM) in Plant Breeding, Molecular Biology and Genetics*". *Belgian Journal of Botany*, Vol. 129, Nº 2, pp. 107-117.
- 9) BlackSamuelsson, S., Eriksson, G., Gustafsson, L., Gustafsson, P. (1997) - "*Rapd and Morphological Analysis of the Rare Plant Species *Vicia pisiformis* (Fabaceae)*". *Biological Journal of the Linnean Society*, Vol. 61, Nº 3, pp. 325-343.

- 10) Bourquin, J. C.; Tournier, P.; Otten, L.; Walter, B. (1992) - "*Identification of Sixteen Grapevine Rootstocks by RFLP and RFLP Analysis of Nuclear DNA Extracted from the Wood*". *Vitis*, Vol. 31, pp 157-162.
- 11) Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R., Cavalli-Sforza, L. L. (1994) - "*High Resolution of Human Evolutionary Trees with Polymorphic Microsatellites*". *Nature*, Vol. 368, pp. 455-457.
- 12) Bowers, J. E.; Bandman, E. B.; Meredith, C. P. (1993) - "*DNA Fingerprinting of Some Wine Grape Cultivars*". *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 44, N° 3, pp 266-274.
- 13) Brewer, G. J., Sing, C. F. (1970) - "*An Introduction to Isozyme Techniques*". Edited by Academic Press, Inc., London.
- 14) Brown, A. H. D. (1990) - "*The Role of Isozyme Studies in Molecular Systematics*". *Aust. Syst. Bot.* 3, pp. 39-46.
- 15) Büscher, N.; Zyprian, E.; Blaich, R. (1993) - "*Identification of Grapevine Cultivars by DNA Analyses: Pitfalls of Random Amplified Polymorphic DNA Techniques Using 10mer Primers*". *Vitis*, Vol. 32, pp 187-188.
- 16) Caetano-Anollés, G. (1996b) - "*Scanning of Nucleic-Acids by In-Vitro Amplification - New Developments and Applications*". *Nature Biotechnology*, Vol. 14, N° 13, pp. 1668-1674.
- 17) Caetano-Anollés, G. (1996a) - "*Fingerprinting Nucleic Acids with Arbitrary Oligonucleotide Primers*". *Agro - Food - Industry Hi - Tech*, pp, 26-35.
- 18) Carboni, A., Grassi, G., Dicandilo, M. (1995) - "*PCR Selection Method for Nematode Resistance in Tomato*". *Minerva Biotecnologica*, Vol. 7, N° 4, pp. 297-301.
- 19) Carvalho, A. (1994) - "*Avaliação precoce da Superioridade dos Sobreiros*". *Actas III Nac, Figueira da Foz*, Vol. 1, pp 118-123.
- 20) Causse, M. A., Fulton, T. M., Cho, Y. G., Ahn, S. N., Chunwongse, j., Wu, K. S., Tiao, J. H., Yu, Z. H., Ronald, P. C., Harrington. S. E., Second, G., McCouch, S. R., Tanksley, S. D. (1994) - "*Saturated Molecular Map of the Rice Genome Based on na Interspecific Backcross Population*". *Genetics*, Vol. 138, N° 4, pp. 1251-1274.

- 21) Cervera, M. T., Gusmão, J., Steenackers, M., Vangysel, A., Vanmontagu, M. (1996) - "*Application of AFLP ( TM )- Based Molecular Markers to Breeding of Populus spp*". *Plant Growth Regulation*, Vol. 20, N° 1, pp. 47-52.
- 22) Chacon, M. R., Rodriguez, E., Parkhouse, R. M. E., Burrows, P. R., Garate, t. (1994) - "*The Differentiation of Parasitic Nematodes Using Random Amplified Polymorphic DNA*". *Journal of Helminthology*, Vol. 68, N° 2, pp. 109-113.
- 23) Charlieu, J. (1994) - "*PCR as a Technique Used Daily in Molecular Biology*" - In *PCR Technology-Current Innovations (Capitulo I)*. Edited by CRC Press Inc., United States of America, pp. 1-3.
- 24) Cifarelli, R. A., Gallitelli, M., Cellini, F. (1995) - "*Random Amplified Hybridization Microsatellites ( RAHM ): Isolation of a New Class of Microsatellites-Containing DNA Clones*". *Nucleic Acids Research*, Vol. 23, N° 18, pp. 3802-3803.
- 25) Cloutier, S., Landry, B. S. (1994) - "*Molecular Markers Applied to Plant-Tissue Culture*". *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, Vol. 30P, N° 1, pp. 32-39.
- 26) Costa, D.; Magalhães, R.; Guedes - Pinto, H.; Martins, A.; Meredith, C. P.; Monteiro, F. F. (1996) - "*Utilização de Técnicas de Biologia Molecular para Caracterização Objectiva de Clones de Videira*". *Jornadas de Vitivinicultura, Trás-os-Montes*, pp 29.
- 27) Cotrim, H.; Pais, M. S. (1998) - "*A Biologia Molecular na Conservação Biológica: O Caso de RAPD em Silene rothmaleri P. Silva*". *Boletim de Biotecnologia*, N° 59, pp 12-16.
- 28) delRio, A. H., Bamberg, J. B., Huaman, Z. (1997) - "*Assessing Changes in the Genetic Diversity of Potato Gene Banks. 1. Effects of Seed Increase*". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 95, N° 1-2, pp. 191-198.
- 29) Demeke, T., Sasikumar, B., Hucl, P., Chibbar, R. N. (1997) - "*Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Cereal Improvement*". *Maydica*, Vol. 42, N° 2, pp. 133-142.

- 30) D'Ennequin, M. L., Panaud, O., Robert, T., Ricroch, A. (1997) - "Assessment of Genetic Relationships Among Sexual and Asexual Forms of *Allium cepa* Using Morphological Traits and RAPD Markers". *Heredity*, Vol. 78, N° PT4, pp. 403-409.
- 31) DGF (1993) - "*Distribuição da Floresta em Portugal Continental*". Edited by DGF - Divisão de Inventário Florestal, Lisboa, N° 303.
- 32) Dias, J. C. da S. (1990) - "Utilização dos RFLPs na Identificação de Variedades". *Actas 5-I Congresso Ibérico de Ciências Horticolas*, Lisboa.
- 33) Donini, P., Elias, M. L., Bougourd, S. M., Koebner, R. M. D. (1997) - "AFLP Fingerprinting Reveals Pattern Differences Between Template DNA Extracted from Plant Organs". *Genome*, Vol. 40, N° 4, pp. 521-526.
- 34) Dow, B. D., Ashley, M. V., Howe, H. F. (1995) - "Characterization of Highly Variable (GA/CT)<sub>n</sub> Microsatellites in the Bur Oak, *Quercus macrocarpa*". *Theor. Appl. Genet*, 91, pp. 137-141.
- 35) Dowe, J. L., Benzie, J., Ballment, E. (1997) - "Ecology and Genetics of *Carpoxyylon macrospermum* H Wendl & Drude (Arecaceae), na Endangered Palm from Vanatu". *Biological Conservation*, Vol. 79, N° 2-3, pp. 205-216.
- 36) Eiras - Dias, J. E. J.; Cabral, F.; Sousa, B.; Carvalho, I. (1989) - "Métodos Utilizados na Identificação de Cultivares de Videira". *Ciência Téc. Vitiv.*, Vol. 8 (1-2), pp 17-24.
- 37) ElenaRossello, J. A.; Cabrera, E. (1996) - "Isozyme Variation in Natural Populations of Cork-Oak (*Quercus suber* L.) - Population Structure, Diversity, Differentiation and Gene Flow". *Silvae Genetica*, Vol. 45, N° 4, pp 229-235.
- 38) Ellis, R. P., McNichol, J. W., Baird, E., Booth, A., Lawrence, P., Thomas, B., Powell, W. (1997) - "The Use of AFLPs to Examine Genetic Relatedness in Barley". *Molecular Breeding*, Vol. 3, N° 5, pp. 359-369.
- 39) Erlich, H. A., Gelfand, D., Sninsky, J. J. (1991) - "Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction". *Science*, Volume 252.
- 40) Fabião, A. M. D. (1996) - "*Árvores e Florestas*" (2ª Edição). Edited by Publicações Europa-América, Lisboa.

- 41) Fenoll, C., Del Campo, F., Sanz-Alferez, S. (1993) - "*Genética Molecular de Plantas*". In *Fisiologia y Bioquímica Vegetal*, McGraw-Hill.
- 42) Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. (1995) - "*Introdução ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética*". Embrapa - CENERGEN, pp. 1-118.
- 43) Fischesser, B. (1980) - "*Conhecer as Árvores*". Edited by Publicações Europa-América, Lisboa.
- 44) Fonseca, P. a., Ferreira, R. B., Teixeira, A. R. (1997) - "*Seed Proteins from Quercus suber*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 45, Nº 9, pp. 3443-3447.
- 45) Franco, J. A. (1971) - "*Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*". - Vol. 1". Lisboa.
- 46) Fukuoka, S., Okuno, K., Kawase, M., Miura, K., Kiyosawa, S. (1996) - "*Genes Controlling Field Resistance to Blast in Japanese Upland Rice Detected Using RFLP Markers*". *IRRN 21*, pp. 2-3.
- 47) Gallego, F. J., Martinez, I., Celestino, C., Toribio, M. (1997) - "*Testing Somaclonal Variation Using RAPDs in Quercus suber L. Somatic Embryos*". *International Journal of Plant Sciences*, Vol. 158, Nº 5, pp. 503-567.
- 48) Gavidia, I., Agudo, L. D., PerezBermudez, P. (1996) - "*Selection and Long-term Cultures of High-yielding Digitalis obscura Plants: RAPD Markers for Analysis of Genetic Stability*". *Plant Science*, Vol. 121, Nº 2, pp. 197-205.
- 49) Goehrig, H. H., Rosicke, H., Kluge, M. (1997) - "*Detection of DNA Polymorphisms in the Genus Kalanchoe by RAPD-PCR Fingerprint and its Relationships to Infrageneric Taxonomic Position and Ecophysiological Photosynthetic Behaviour of the Species*". *Plant Science*, Vol. 125, Nº 1, pp. 41-51.
- 50) Gelfand, D. H., Whith, T. J. (1990) - "*Thermostable DNA Polymerases*". In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Capítulo XVI)*. Edited by Academy Press Inc.
- 51) Gil, L. (1998) - "*Cortiça, Produção, Tecnologia e Aplicação*". Edited by INETI, Lisboa.

- 52) Gogorcena, Y.; Arulsekar, S.; Dandekar, A. M.; Parfitt, D. E. (1993) - "*Molecular Markers for Grape Characterization*". *Vitis*, Vol. 32, pp 183-185.
- 53) Graham, G. C., Henry, R. J., Redden, R. J. (1994) - "*Identification of Navy Bean Varieties Using Random Amplified of Polymorphic DNA*". *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Vol. 34, N° 8, pp. 1173-1176.
- 54) Grandillo, S., Tanksley, S. D. (1996) - "*QTL Analysis of Horticultural Traits Differentiating the Cultivated Tomato from the Closely-Related Species *Lycopersicon pimpinellifolium**". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 92, N° 8, pp. 935-951.
- 55) Grattapaglia, D. (1994) - "*Genetic Mapping of Quantitatively Inherited Economically Important Traits in Eucalyptus*". Tese apresentada à "Graduate Faculty of North Carolina State University" para a obtenção do grau de "Doctor of Philosophy".
- 56) Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M. (1996) - "*An Introduction to Genetic Analyses*" (6ª Edição), W. H. Freeman and Company, New York, pp. 509-511, 526-529.
- 57) Habu, Y., FukadaTanaka, S., Hisatomi, Y., Iida, S. (1997) - "*Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism-Based mRNA Fingerprinting Using a Single Restriction Enzyme that Recognizes a 4-bp Sequence*". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 234, N° 2, pp. 516-521.
- 58) Hahn, V., Blankenhorn, K., Schwall, M., Melchinger, A. E. (1995) - "*Relationships Among Early European Maize Inbreds: III. Genetic Diversity Revealed With RAPD Markers and Comparison with RFLP and Pedigree Data*". *Maydica*, 40, pp. 299-310.
- 59) He, G. H., Prakash, C. S. (1997) - "*Identification of Polymorphic DNA Markers in Cultivated Peanut (*Arachis hypogaea* L.)*". *Euphytica*, Vol. 97, N° 2, pp. 143-149.
- 60) Hedrick, P. (1992) - "*Shooting the RAPDs*". *Nature*, Vol. 355, pp. 679-670.
- 61) Heinze, B., Schmidt, J. (1995) - "*Monitoring Genetic Fidelity vs Somaclonal Variation in Norway Spruce (*Picea abies*) Somatic Embryogenesis by RAPD Analysis*". *Euphytica*, Vol. 85, N° 1-3, pp. 341-345.

- 62) Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A., Nienhuis, J. (1986) - "*Construction of Genetic Linkage Maps in Maize and Tomato Using Restriction Fragment Length Polymorphisms*". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 72, pp. 761-769.
- 63) Heliodoro, M. N. (1997) - "*Caracterização Isoenzimática de Clones de Azevinho (Ilex aquifolium L.)*". Relatório do Trabalho Final para Obtenção do Grau de Bacharel em Engenharia Florestal. E.S.A.C.B. Castelo Branco.
- 64) Helms, T., Orf, J., Vallad, G., McClean, P. (1997) - "*Genetic Variance Coefficient of Parentage and Genetic Distance of Six Soybean Populations*". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 94, N°1, pp. 20-26.
- 65) Heun, M., Murphy, J. P., Phillips, T. D. (1994) - "*A Comparison of RAPD and Isozyme Analysis for Determining the Genetic Relationships Among Avena sterilis L. Accessions*". *Theor. Appl. Genet.*, Vol. 87, pp. 689-696.
- 66) Ho, C. L., Phang, S. M., Pang, T. (1995) - "*Molecular Characterisation of Sargassum polycystum and S. siliquosum (Phaeophyta) by Polymerase Chain Reaction (PCR) Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Primers*". *Journal of Applied Phycology* 7, pp. 33-41
- 67) Hong, S. W., Kang, K. Y., Kim, N. S., Kang, S. W., Kim, H. K. (1996) - "*Random Amplified Polymorphic DNA and Analysis to Differentiate Races of the Rice Blast Fungus, Pyricularia- oryzae in Korea*". *Molecules and Cells*, Vol. 6, N° 3, pp. 346-351.
- 68) Hongtrakul, V., Huestis, G. M. Knapp, S. J. (1997) - "*Amplified Fragment Length Polymorphisms as a Tool for DNA Fingerprinting Sunflower Germoplasm: Genetic Diversity Among Oilseed Inbred Lines*". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 95, N° 3, pp. 400-407.
- 69) Horn, G. T., Richards, B., Klinger, K. W. (1989) - "*Amplification of a Highly Polymorphic VNTR Segment by The Polymerase Chain Reaction*". *Nucleic Acids Research*, Vol. 17, N° 5, pp. 2140.



- 70) Hu, X. Y., Ohm, H. W., Dweikat, I. (1997) - "*Identification of RAPD Markers Linked to the Gene PM1 for Resistance to Powdery Mildew in Wheat*". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 94, N° 6-7, pp. 832-840.
- 71) Huys, G., Coopman, R., Janssen, P., Kersters, K. (1996) - "*High Resolution Genotypic Analysis of the Genus *Aeromonas* by AFLP Fingerprinting*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 46, N° 2, pp. 572-580.
- 72) Innis, M. A., Gelfand, D. H. (1990) - "*Optimization of PCRs*". In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Capitulo I)*. Edited by Academy Press Inc.
- 73) Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., Kersters, K. (1996) - "*Evaluation of the DNA- Fingerprinting Method *aflp* as a New Tool in Bacterial taxonomy*". *Microbiology-UK*, Vol. 142, N° PT7, pp 1881-1893.
- 74) Janssen, P., Maquelin, K., Coopman, R., Tjernberg, I., Bouret, P., Kersters, K., Dijkshoorn, L. (1997) - "*Discrimination of *Acinetobacter* Genomic Species by AFLP Fingerprinting*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 47, N° 4, pp. 1179-1187.
- 75) Jean - Jaques, I.; Defontaine, A.; Hallet, J. N. (1993) - "*Characterization of *Vitis vinifera* Cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA Markers*". *Vitis*, Vol. 32, pp 189-190.
- 76) Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L. (1985) - "*Hypervariable Minisatellite Regions in Human DNA*". *Nature*, Vol. 314, pp. 67-73.
- 77) Jianhua, Z., McDonald, M. B., Sweeney, P. M. (1996) - "*Soybean Cultivar Identification Using RAPD*". *Seed. Sci. & Technol*, 24, pp. 589-592.
- 78) Joel, D. M., Portnoy, V., Katzir, N. (1996) - "*Identification of Single Tiny Seeds of *Orobanche* Using RAPD Analysis*". *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 14, N° 3, pp 243-248.
- 79) Kema, G. H. J. , van Silfhout, C. H. (1997) - "*Genetic Variation for Virulence and Resistance in the Wheat *Mycosphaerella graminicola* Pathosystem .3. Comparative Seedling and Adult Plant Experiments*". *Phytopathology*, Vol. 87, N° 3, pp. 266-272.

- 80) Ko, H. L., Cowan, D. C., Henry, R. J., Graham, G. C., Blakeney, A. B., Lewin, L. G. (1994) - "*Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Australian Rice (Oryza sativa L.) Varieties*". *Euphytica* 80, Vol. 3, pp. 179-189.
- 81) Ko, H. L., Henry, R. J., Beal, P. R., Moisaner, J. A. Fisher, K. A. (1996) - "*Distinction of Ozothamnus diosmifoliud (VENT) DC Genotypes Using RAPD*". *Hortscience*, Vol. 31, N° 5, pp. 858-861.
- 82) Kornher, J. S.; Livak, K. J. (1989) - "*Mutation Detection Using Nucleotide Analogs that Alter Electrophoretic Mobility*". *Nucleic Acids Research*, Vol. 17, N° 19, pp 7779-7784.
- 83) Lacadena, J. R. (1970) - "*Genética Vegetal: Fundamento e sua Aplicação*" (2ª Edição), A.G.E.S.A., Madrid.
- 84) Lagercrantz, U., Ellegren, H., Anderson, L. (1993) - "*The Abundance of Various Polymorphic Microsatellite Motifs Differs Between Plants and Vertebrates*". *Nucleic Acids Research*, Vol. 21, N° 5, pp. 1111-1115.
- 85) Lawson, D. M., Lunde, C. F., Mutschler, M. A. (1997) - "*Marker-Assisted Transfer of Acylsugar-Mediated Pest Resistance from the Wild Tomato, Lycopersicon pennellii to the Cultivated Tomato, Lycopersicon esculentum*". *Molecular Breeding*, Vol. 3, N° 4, pp. 307-317.
- 86) Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (1993) - "*Principles of Biochemistry*" (2ª Edição). Edited by Worth Publishers, New York.
- 87) Lewin, B. (1995) - "*Genes V*". Edited by Oxford University Press, pp. 642-647.
- 88) Lewin, B. (1997) - "*Genes VP*". Edited by Oxford University Press, pp. 635, 739-740.
- 89) Lin, J. J., Kuo, J., Ma, J., Saunders, J. A., Beard, H. S., MacDonald, M. H., Kenworthy, W., Ude, G. N., Matthews, B. F. (1996b) - "*Identification of Molecular Markers in Soybean Comparing RFLP, RAPD and AFLP Mapping Techniques*". *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 14, N° 2, pp. 156-169.

- 90) Lin, J., Kuo, J., Ma, J. (1996a) - "*A PCR-Based DNA Fingerprinting Technique: AFLP for Molecular Typing of Bacteria*". *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, N° 18, pp. 3649-3650.
- 91) Ling, H. Q., Pich, A., Scholz, G., Ganai, M. W. (1996) - "*Genetic-Analysis of 2 Tomato Mutants Affected in the Regulation of Iron-Metabolism*". *Molecular & General Genetics*, Vol. 252, N° 1-2, pp. 87-92.
- 92) Mackill, D. J., Zhang, Z., Redona, E. D., Colowit, P. M. (1996) - "*Level of Polymorphism and Genetic-Mapping of AFLP Markers in Rice*". *Genome*, Vol. 39, N° 5, pp. 969-977.
- 93) Maheswaran, M., Subudhi, P. K., Nandi, S., Xu, J. C., Parco, A., Yang, D. C., Huang, N. (1997) - "*Polymorphism Distribution and Segregation of AFLP Markers in a Doubled Haploide Rice Population*". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 94, N° 1, pp. 39-45.
- 94) Mandal, P. K., Santha, I. M., Mehta, S. L. (1996) - "*RAPD Analysis of Lathyrus sativus Somaclones*". *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 5, N° 2, pp. 83-86.
- 95) Manen, J. F., Savolainen, V., Cuéncud, P., Marchi, S. (1995) - "*Course of Plant Biotechnology: New Identification and Classification Techniques*" INETI, Queluz de Baixo.
- 96) Maughan, P. J., Maroof, M. A. S., Buss, G. R., Huestis, G. M. (1996) - "*Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) in Soybean - Species - Diversity, Inheritance and Near-Isogenic Line Analysis*". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 93, N° 3, pp. 392-401.
- 97) McCouch, S. R., Chen, X. L., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y. B., Cho, Y. G., Huang, N., Ishii, T., Blair, M. (1997) - "*Microsatellite Marker Development Mapping and Applications in Rice Genetics and Breeding*". *Plant Molecular Biology*, Vol. 35, N° 1-2, pp. 89-99.

- 98) McDonald, M. B., Elliot, L. J., Sweeney, P. M. (1994) - "*DNA Extraction from Dry Seed for RAPD Analysis in Varietal Identification Studies*". Seed Science and Technology, Vol. 22, N° 1, pp. 171-176.
- 99) Meredith, C. P.; Bowers, J. E.; Bandman, E. B. (1992) - "*DNA Fingerprinting of Grape Varieties*". Não Publicado.
- 100) Messner, R., Schweigkafler, W., Ibl, M., Berg, G., Prillinger, H. (1996) - "*Molecular Characterization of the Plant Pathogen Verticillium dahliae Kleb Using RAPD-PCR and Sequencing of the 18SrRNA-Gene*". Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift, Vol. 144, N° 7-8, pp. 347-354.
- 101) Meyer, R., Candrian, U. (1996) - "*PCR-Based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components*". Wiss. U.- Technol., Vol. 29, pp. 1-9.
- 102) Mitchell, A. (1985) - "*Guia de Campo de Los Árboles de Europa*" (2ª Edição). Edited by Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- 103) Momol, M. T., Momol, E. A., Lamboy, W. F., Noretta, J. L., Beer, S. V., Aldwinckle, H. S. (1997) - "*Characterization of Erwinia amylovora Strains Using Random Amplified Polymorphic DNA Fragments (RAPDs)*". Journal of Applied Microbiology, Vol. 82, N° 3, pp 389-398.
- 104) Moreno, S.; Gogorcena, Y.; Ortiz, J. M. (1995) - "*The Use of RAPD markers for Identification of Cultivated Grapevine (Vitis vinifera L.)*". Scientia Horticulturae, Vol. 62, pp 237-243.
- 105) Mullis, K. B. (1990) - "*The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction*". Scientific American-April 1990.
- 106) Natividade, V. (1950) - "*Subericultura*". Edited by Ministério da Economia - Direcção-Geral dos Serviços Florestais e Agrícolas, Lisboa.
- 107) Neuffer, B. (1996) - "*RAPD Analysis in Colonial and Ancestral Populations of Capsella bursa pastoris (L) Med (Brassicaceae)*". Biochemical Systematics and Ecology, Vol. 24, N° 5, pp. 393-403.
- 108) Neves, N. F. (1992) - "*Impacto das principais micoses no montado de sobro*". Scientia Gerundensis, Vol. 18, pp.215-217.

- 109) Otsen, M., Denbieman, M., Kuiper, M. T. R., Pravenec, M., Kneu, V., Kurtz, T. W., Jacob, H. J., Lankhorst, A. E. (1996) - "*Use of AFLP Markers for Gene - Mapping and QTL Detection in the Rat*". *Genomics*, Vol. 37, N° 3, pp. 289-294.
- 110) Palacios, C., GonzalezCandelas, F. (1997) - "*Lack of Genetic Variability in the Rare and Endangered Limonium cavanillesii (Plumbaginaceae) Using RAPD Markers*". *Molecular Ecology*, Vol. 6, N° 7, pp. 671-675.
- 111) Paran, I., Gidon, D., Jacobsohn, R. (1997) - "*Variation Between and Within Broomrape (Orobanch) Species Revealed by RAPD Markers*". *Heredity*, Vol. 78, N° PT1, pp. 68-74.
- 112) Payne, R. C., Koszykowski, T. J. (1978) - "*Esterease Isoenzyme Differences in Seed Extracts among Soybean Cultivars*". *Crop Science*, Vol. 18, pp. 557-560.
- 113) Peltonen, S., Jalli, M., Kammiovirta, K., Karjalainen, R. (1996) - "*Genetic Variation in Drechslera teres Populations as Indicated by RAPD Markers*". *Annals of Applied Biology*, Vol. 128, N° 3, pp. 465-477.
- 114) Penner, G. A., Clarke, J., Bezte, L. J., Leisle, D. (1995) - "*Identification of RAPD Markers Linked to a Gene Governing Cadmium Uptake in Durum-Wheat*". *Genome*, Vol. 38, N° 3, pp. 543-547.
- 115) Piccioni, E., Barcaccia, G., Falcinelli, M., Standardi, A. (1997) - "*Estimating Alfalfa Somaclonal Variation in Axillary Branching Propagation and Indirect Somatic Embryogenesis by RAPD Fingerprinting*". *International Journal of Plant Sciences*, Vol. 158, N° 5, pp. 555-562.
- 116) Poehlman, J. M. (1978) - "*Breeding Field Crops*" (2ª Edição), The Avi Publishing Company, Inc., Westport Connecticut.
- 117) Pooler, M. R., Ritchie, D. F., Hartung, J. S. (1996) - "*Genetic Relationships Among Strains of Xanthomonas fragariae Based on Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial and Generation of Multiplexed PCR Primers Useful for the Identification of this Phytopathogen*". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, N° 9, pp. 3121-3127.

- 118) Powell, W., Machray, G. C., Provan, J. (1996a) - "*Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats*". *Trend in Plant Science*, Vol. 1, N° 7. Elsevier Science Ltd.
- 119) Powell, W., Morgante, M., André, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. (1996b) - "*The Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (Microsatellite) Markers for Germoplasm Analysis*". *Molecular Breeding*, Vol. 2, N° 3, pp. 225-238.
- 120) Powell, W., OrozcoCastillo, C., Chalners, K. J., Provan, J., Waugh, R. (1995) - "*Polymerase Chain Reaction - Based Assays for the Characterization of Plant Genetic Resources*". *Electrophoresis*, Vol. 16, N° 9, pp. 1726-1730.
- 121) Puigderrajols, P.; FernandezGuijarro, B.; Toribio, M.; Molinas, M. (1996) - "*Origin and Early Development of Secondary Embryos in Quercus suber L.*". *International Journal of Plant Sciences*, Vol. 157, N° 6, pp 674-684.
- 122) Qi, X., Lindhout, P. (1997) - "*Development of AFLP Markers in Barley*". *Molecular & General Genetics*, Vol. 254, N° 3, pp. 330-336.
- 123) Rani, V., Parida, A., Raina, S. N. (1995) - "*Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Genetic Analysis in Micropropagated Plants of Populus deltoides Marsh*". *Plant Cell Reports*, Vol. 14, N° 7, pp. 459-462.
- 124) Rasmussen, J. O., Rasmussen, O. S. (1995) - "*Characterization of Somatic Hybrids of Potato by Use of RAPD Markers and Isozyme Analysis*". *Physiologia Plantarum*, 93, pp. 357-364.
- 125) Rodrigues, J. F. (1992) - "*Regeneração do Montado de Sobro*". *Simp. Mediterrânico Sobre Regeneración del Monte Alcornocal. Mérida/Sevilha, Montargil*, pp 113-116.
- 126) Romão, J. M.; Matos, J.; Clemente, A. (1998) - "*RAPD Analysis of Genetic Variability in Quercus suber*". *Book of Abstracts - Biotec' 98, Guimarães*.
- 127) Ronning, C. M., Schnell, R. J., Kuhn, D. N. (1995) - "*Inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in Theobroma cacao L.*". *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol. 120, N° 4, pp. 681-686.

- 128) Royo, B.; Gonzalez, J.; Laquidain, M. J.; Larumbe, M. P. (1989) - "*Puesta a Punto de Uma Tecnica de Extraccion de Enzimas. Aplicacion a la Caracterizacion Isoenzimatica de Distintos Cultivares de Vid (Vitis Vinifera L.)*". Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg., Vol. 4 (3), pp 333-342.
- 129) Royo, B.; Gonzalez, J.; Laquidain, M. J.; Larumbe, M. P. (1989) - "*Caracterizacion Mediante Analisis Isoenzimatica de Clones de la Vinifera "Garnacha" (Vitis Vinifera L.)*". Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg., Vol. 4 (3), pp 343-354.
- 130) Saiki, R. K. (1990) - "*Amplification of Genomic DNA*". In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Capitulo II). Edited by Academy Press Inc.
- 131) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989) - "*Molecular Cloning - A Laboratory Manual*" (2ª Edição). Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, pp 13.3-13.10.
- 132) Sampaio, A. R. (1998) - "Pesquisa de Marcadores Moleculares em Quercus suber". Relatório Final da Licenciatura em Biologia Vegetal Aplicada. FCUL, Lisboa.
- 133) Sarkar, G., Sommer, S. S. (1990) - "*Shedding Light on PCR Contamination*". Nature, Vol. 343, pp. 27.
- 134) Sawazaki, H. E.; Nagai, H.; Sodek, L. (1997) - "*Caracterização da Variabilidade Genética em Couve Manteiga Utilizando Isoenzimas e RAPD*". Bragantia, Vol. 56 (1), pp 9-20.
- 135) Scepers, D., Eloy, M. C., Briquet, M. (1997) - "*Use of RAPD Patterns for Clone Verification and in Studyng Provenance Relationships in Norway Spruce (Picea abies)*". Theoretical and Applied Genetics, Vol. 94, Nº 3-4, pp. 480-485.
- 136) Schneider-Stock, R., Roessner, A. (1997) - "*Sensitive and Reproducible PCR-SSCP Analysys using Ready-To-Go PCR Beads*". Science Tools from Pharmacia Biotech, Vol. 2, Nº 3, pp. 16-17.
- 137) Schnell, R. J., Ronning, C. M., Knight, R. J. JR. (1995) - "*Identification of Cultivars and Validation of Genetic Relationships in Mangifera indica L. Using RAPD Markers*". Theor. Appl. Genet, Vol. 90, pp. 269-274.

- 138) Seo, Y. W., Johnson, J. W., Jarret, R. L. (1997) - "*A Molecular Marker Associated with the H21 Hessian Fly Resistance Gene in Wheat*". *Molecular Breeding*, Vol. 3, N° 3, pp. 177-181.
- 139) Sharrocks, A. D. (1994) - "*The Design of Primers for PCR*". In *PCR Technology- Current Innovations* (capitulo II). Edited by CRC Press Inc., United States of America, pp. 4-11.
- 140) Shoyama, Y., Zhu, X. X., Nakai, R., Shiraishi, S., Kohda, H. (1997) - "*Micropropagation of Panax notoginseng by Somatic Embriogenesis and RAPD Analysys of Regenerated Plantlets*". *Plant Cell Reports*, Vol. 16, N° 7, pp. 450-453.
- 141) Simons, G., vanderLee, T., Diergaarde, P., vanDaelen, R., Gruenendijk, J., Frijters, A., Buschges, R., Hollricher, K., Topsch, S., Schulzelejert, P., Salamini, F., Zabeau, M., Vos, P. (1997) - "*AFLP-Based Fine Mapping of the Mlo Gene to a 30-kb DNA Segment of the Barley Genome*". *Genomics*, Vol. 44, N~1, pp. 61-70.
- 142) Simpson, M. J. A., Withers, L. A. (1986) - "*Characterization of Plant Genetic Resources Using Isozyme Electrophoresis: a Guide to the Literature*". IBPGR, Roma.
- 143) Sivolap, Y. M., Kalendar, R. N. (1995) - "*Genetic-Polymorphism in Barley Detected by PCR with Arbitrary Primers*". *Genetika*, Vol. 31, N° 10, pp. 1358-1364.
- 144) Skorupska, H. T., Choi, I. S., Raorelli, A. P., Bridges, W. C. (1994) - "*Resistance to Soybean Cyst-Nematode and Molecular Polymorphism in Various Sources of Peking Soybean*". *Euphytica*, Vol. 75, N° 1-2, pp. 63-70.
- 145) Smith, O. S., Smith, J. S. C., Bowen, S. L., Tenborg, R. A., Wall, S. J. (1990) - "*Similarities Among a Group of Elite Maize Inbreds as Measured by Pedigree, F<sub>1</sub> Grain Yield, Grain Yield Heterosis and RFLPs*". *Theoretical and Applied Genetics* 80.
- 146) Stiller, J. W., Denton, A. L. (1995) - "*100 Years of Spartina alterniflora (Poaceae) in Willapa Bay, Washington - Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of na Invasive Population*". *Molecular Ecology*, Vol. 4, N° 3, pp. 353-363.



- 147) Striem, M. J.; Ben - Hayyim, G.; Spiegel - Roy, P. (1994) - "*Developing Molecular Genetic Markers for Grape Breeding, Using Polymerase Chain Reaction Procedures*". *Vitis*, Vol. 33, pp 53-54.
- 148) Striem, M. J.; Spiegel - Roy, P.; Ben - Hayyim, G.; Beckmann, J.; Gidoni, D. (1990) - "*Genomic DNA Fingerprinting of Vitis Vinifera by the Use of Multi-loci Probes*". *Vitis*, Vol. 29, pp 223-227.
- 149) Tancred, S. J., Zeppa, A. G., Graham, G. C. (1994) - "The Use of the PCR-RAPD Technique in Improving the Plant Variety Rights Description of a New Queensland Apple (*Malus domestica*) Cultivar". *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Vol. 34, N° 5, pp. 665-667.
- 150) Taramino, G., Tingey, S. (1996) - "*Simple Sequence Repeats for Germoplasm Analysis and Mapping in Maize*". *Genome* 39, pp. 277-287.
- 151) Taylor, P. W. J., Geijskes, J. R., Ko, H. L., Fraser, T. A., Henry, R. J., Birch, R. g. (1995) - "*Sensitivity of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis to Detected Genetic Change in Sugarcane During Tissue-Culture*". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 90, N° 7-8, pp. 1169-1173.
- 152) Tingey, S. V., del Tufo, J. P. (1993) - "*Genetic Analysys With Random Amplified Polymorphic DNA Markers*". *Plant Physiology*, Vol. 101, pp. 349-352.
- 153) Varela, M. C.; Eriksson, G. (1995) - "*Multipurpose Gene Conservation in Quercus suber - A Portuguese Example*". *Silvae Genetica*, Vol. 44, N° 1, pp 28-37.
- 154) Virk, P. S., Fordlloyd, B. V., Jackson, M. T., Newbury, H. J. (1995) - "*Use of RAPD for the Study of Diversity within Plant Germoplasm Collections*". *Heredity*, Vol. 74, N° PT2, pp. 170-179.
- 155) Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) - "*AFLP: a New Technique for DNA Fingerprinting*". *Nucleic Acids Research*, Vol. 23, N° 21, pp. 4407-4414..
- 156) Wang, G., Castiglione, S., Zhang, J., Fu, R., Ma, J., Li, W., Sun, Y., Sala, F. (1994) - "*Hybrid Rice (Oryza sativa L.): Identification and Parentage Determination by RAPD Fingerprinting*". *Plant Cells Reports*, 14, pp. 112-115.

- 157) Warburton, M. L., BecerraVelasquez, V. L., Goffreda, J. C., Bliss, F. A. (1996?) - "*Utility of RAPD Markers in Identifying Genetic Linkages to Genes of Economic Interest in Peach*". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 93, N° 5-6, pp. 920-925.
- 158) Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. (1994) - "*The Polymerase Chain Reaction*". In *Recombinant DNA (2ª Edição)*. Edited by Scientific American Books, pp. 79-98.
- 159) Welsh, J., McClelland, M. (1990) - "*Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers*". *Nucleic Acids Res* 18, pp. 7213-7218.
- 160) William, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Tingey, S. (1990) - "*DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers*". *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, N° 22, pp. 6531-6535.
- 161) Wolff, K., ElAkkad, S., Abbott, R. J. (1997) - "*Population Substructure in *Alkanna orientalis* (Boraginaceae) in the Sinai Desert, in Relation to its Pollinator Behaviour*". *Molecular Ecology*, Vol 6, N° 4, pp. 365-372.
- 162) Wu, K., Jones, R., Danneberger, L., Scolnik, P. A. (1994) - "*Detection of Microsatellite Polymorphisms Without Cloning*". *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, N° 15, pp. 3257-3258.
- 163) Xie, W. W., Wang, B., Lei, J., Li, X. C., Lu, C. B., Qian, H., Zhou, S. J. (1995) - "*Introduction of Exogenous Wild Soybean DNA in Cultivated Soybean and RAPD Molecular Verification*". *Science in China Series B-Chemistry Life Sciences & Earth Sciences*, Vol. 38, N° 10, pp. 1195-1201.
- 164) Zhuang, B. C., Hui, D. W., Wang, Y. M., Gu, J., Xu, B., Chen, S. Y. (1995) - "*Comparison of RAPD Profiles of Different Soybeans in China*". *Chinese Science Bulletin*, Vol. 40, N° 13, pp. 1129-1132.



